

Procedimentos Para a Implantação de um Laboratório de Cultivo de Tecidos



Circular Técnica

Campina Grande, PB
Dezembro, 2002

Autores

Julita M^a Frota Chagas Carvalho,
Agrônoma, Dr. Pesquisadora da
Embrapa Algodão. Rua Osvaldo
Cruz, 1143, Centenário. CP. 174,
CEP 58107-720, Campina Grande,
PB.
e-mail julita@cnpa.embrapa.br

Foto: Sérgio Cobel



Cultivo *in vitro* de tecidos vegetais pode ser definido como o crescimento e a multiplicação de células, tecidos, órgãos ou parte de órgãos de uma planta sobre um meio nutritivo e em condições assépticas. O cultivo *in vitro* baseia-se principalmente no aproveitamento da totipotência das células vegetais, ou seja, na capacidade de produzir

órgãos como brotos e/ou raízes ou embriões somáticos que regeneram uma planta completa num meio de cultivo favorável (TORRES, 1990).

O cultivo de tecidos é uma ferramenta muito significativa para acelerar os programas de melhoramento, já que pode oferecer novas alternativas em suas diferentes fases e, muitas vezes oferece soluções únicas. Também é importante na engenharia genética, pois a transformação requer que se possa cultivar *in vitro* protoplastos, células e tecidos de plantas aos quais serão incorporadas os genes e que a partir das células transformadas se possam regenerar plantas.

Um laboratório de cultura de tecidos não deve ser localizado em ambientes sujeitos a poeira e a corrente de ar nem próximo a fontes potenciais de microrganismos ou contaminação química, já que o cultivo *in vitro* de células, tecidos ou órgãos vegetais se caracteriza por se realizar em condições assépticas. O interior do recipiente de cultivo deve estar livre de qualquer organismo capaz de proliferar e afetar o desenvolvimento do material vegetal, daí a importância de se manter o ambiente estéril durante o processo.

Este tipo de laboratório tem algumas particularidades que o distinguem dos demais. A implantação e organização dependem de sua finalidade e do número de pessoas que nele vão trabalhar; assim, um laboratório destinado exclusivamente à micropropagação com base em protocolos estabelecidos, tende a ser maior, porém mais simples em instalações e equipamentos que um laboratório destinado à pesquisa com diferentes sistemas ou, ainda, com aspectos bioquímicos, genéticos e estruturais, entre outros; pode ser pequeno, porém, mais especializado. Um laboratório de pesquisa pode, também, ter finalidade didática caso em que se pode reservar áreas para ensino e demonstrações.

□ Estrutura Física do Laboratório de Cultivo de Tecidos

Num laboratório de cultivo de tecidos devem constar:

Ante-sala

Este ambiente servirá para proteger o laboratório das ações do

ambiente externo, razão por que se deve colocar tapetes na entrada para as pessoas, limpem os pés.

Sala de lavagem e esterilização

É nesta sala que ficará a autoclave e, por motivo de segurança, não deve haver trânsito constante de pessoas. Como em todo laboratório, os pisos e paredes devem ser branco e lisos para evitar acúmulo de poeira e facilitar a limpeza, enquanto as janelas devem ser de vidro, a fim de que permaneçam fechadas. Em funcionamento, a autoclave aquece o ambiente; recomenda-se isolar, esta sala das outras que mantenham ar condicionamento em funcionamento. Aqui, os equipamentos necessários são: estufa grande, para secagem e esterilização do material de vidro, autoclave, destilador e deionizador de água e lavador de pipetas e um exaustor, para eliminação dos vapores desprendidos pela autoclave. Deve-se ter especial cuidado de colocar tomadas para os equipamentos.

Sala de preparação de meios de cultivo

Nesta sala serão preparados os meios de cultura a partir de soluções estoque, que serão distribuídos em tubos de ensaio e/ou em frascos de cultivo. Por isto, deve-se ter maior atenção com a assepsia mais que com a sala de lavagem e esterilização. Portanto, aqui, o piso e as paredes devem ser branco e lisos para evitar acúmulo de poeira e facilitar a limpeza e as janelas devem ser de vidro, afim de que permaneçam fechadas. Recomenda-se colocar, na sala, um aparelho de ar condicionado com o intuito de manter a temperatura agradável, uma vez que o calor gerado por lâmpadas e outros equipamentos, que eleva a temperatura. Como equipamentos necessários nesta sala citam-se: geladeira, freezer, peagâmetro, balanças de topo e analítica, dois agitadores magnéticos, forno de microondas e estabilizador de voltagem ressaltando-se, porém, que outros equipamentos podem facilitar bastante o trabalho no laboratório, como, um dispensador de meio que torna mais ágil e, ao mesmo tempo, uniformiza a distribuição do meio de cultura nos frascos de cultivo; uma máquina de lavar louça também pode ser recomendada, uma vez que a prática de cultivo de tecidos gera grandes quantidades de frascos a serem lavados. Os produtos químicos em uso deverão ser aqui mantidos nessa sala, enquanto a vidraria usada no preparo dos meios de cultura deve estar disponível, assim como tubos e frascos com respectivas tampas, para receber o meio, quando pronto; além disso, na

sala de preparação de meio de cultivo deve-se contar, ainda, com uma mesa grande para preparação dos meios de cultivo, bancadas para colocar os equipamentos de mesa, armários para guardar produtos químicos, vidrarias e instrumentos, além, de duas pias grandes e fundas para facilitar a lavagem da vidraria. Colocar tomadas para os equipamentos. Os meios de cultura ficam mais bem conservados a 4 °C que em temperatura ambiente, sendo conveniente que esta sala contenha uma câmara fria de 1,5 m x 1 m com prateleiras onde serão armazenados os meios de cultivo.

Sala de inoculação

Nela, os materiais serão transferidos em condições de esterilidade; portanto, mais que em qualquer outra sala do laboratório, deve ser a mais asséptica. O piso e as paredes devem ser branco e lisos; ao contrário da sala anterior, não há necessidade de janelas nem de portas com acesso para o exterior do laboratório, evitando o fluxo de poeira, porém devem ser instalados condicionador de ar, considerando-se o calor gerado pelos motores da câmara de fluxo laminar, luzes, lâmpadas etc. Os equipamento necessários são: câmara de fluxo laminar horizontal e esterilizador de pinças. Nesta sala deve haver bancadas, tomadas e um carrinho-de-mão de hospital, para transportar os cultivos para sala de crescimento.

Sala de crescimento dos cultivos

Recomendam-se, na sala de crescimento dos cultivos, piso e paredes brancas e lisas para facilitar a limpeza. Os acessos devem ser limitados, reduzindo a chance de entrada de poeira e contaminação. Não há necessidade de janelas, pois dificultariam o controle de luz e temperatura, mas, devem ser instalados dois condicionadores de ar, com temperatura controlada; o controle ambiental é importante para permitir um crescimento ótimo e o fotoperíodo deve ser controlado por "timers". As culturas são mantidas sobre estantes desmontáveis de aço, com seis prateleiras distantes entre si aproximadamente 40-50 cm e a inferior, a 10 cm do chão. Cada prateleira devem conter 6 a 8 lâmpadas fluorescentes. Os reatores que alimentam as lâmpadas das prateleiras devem ser colocados no lado de fora da sala, e colocar tomadas dentro da sala. Os equipamentos necessários são: estantes de aço com prateleiras contendo lâmpadas fluorescentes, dois aparelhos de ar condicionado.

A temperatura da sala de crescimento é controlada através de aparelhos de ar condicionado ligados a termostatos, a fim de manter a temperatura constante, com variação de cerca de ± 1 a 2°C , normalmente, utiliza-se temperaturas ao redor de 25°C a 27°C .

Sala de preparação das plantas para aclimação

É o local no qual as plantas, após serem removidas dos frascos, serão lavadas para a remoção dos restos de meio de cultura, e transplantadas em vasos contendo substrato. É oportuno se ter, neste local, água em abundância e espaço para transferência das plântulas, além de um janelão de vidro para clarear. O piso e as paredes também devem ser branco e lisos para evitar acúmulo de poeira e facilitar a limpeza; deve-se contar com uma mesa grande para preparação dos vasos, bancadas e armários para guardar o material utilizado na aclimação. Além disso, duas pias grandes e fundas facilitam a lavagem do material. Também deve haver, nesta sala, duas portas, uma com acesso à sala de crescimento e a outra ao exterior do laboratório,

a fim de facilitar a translocação do material para o telado.

Almoxarifado

É neste compartimento que se devem ser colocadas estantes ou prateleiras nas quais serão guardados produtos químicos e outros materiais utilizados no cultivo de tecidos em estoque.

Copa-cozinha

Aqui, deve-se contar com um armário, bancada com pia, fogão, geladeira e depósito de água.

Secretaria e biblioteca

São necessários, aqui, um sofá, mesa de escritório, telefone, computador e estantes.

□ Equipamentos

Equipamentos indispensáveis para manutenção de um laboratório de cultivo de tecidos e suas respectivas finalidades, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Lista dos equipamentos necessários para o laboratório de cultivo de tecidos.

Equipamentos	Finalidade
Agitador rotativo (Shaker)	trabalhos com suspensão celular
Agitador magnético com termostato	preparo de soluções
Ar condicionados	manter a temperatura
Autoclave vertical grande	esterilização de meio de cultura, vidraria e outros materiais
Balança analítica	pesar reagente s
Balança de topo capacidade 120g	pesar reagentes
Biodestilador de água	eliminação de sais minerais da água utilizada em meio de cultivo
Bomba a vácuo	aumentar a eficiência da assepsia.
Câmara de fluxo laminar horizontal de 1,80m	inoculação e transferência de explantes sob condições plenamente assépticas
Câmara fotográfica digital	documentar dos resultados.
Câmara fria	armazenamento dos meios de cultivo
Carrinho para transportar material	locomoção dos materiais entre as salas
Computador	arquivar dados
Dispensador de meio de cultivo	uniformiza a distribuição dos meios de cultura em tubos e frascos
Equipamento para filtragem a frio	esterilização de produtos termolábeis
Estabilizador de voltagem	evitar danos aos equipamentos
Esterilizador de pinças	esterilizar pinças, bisturi e tesoura na câmara de fluxo laminar

Tabela 1. Continuação...

Equipamentos	Finalidade
Estufa grande	esterilização de vidrarias e outros materiais
Estufa incubadora tipo B.O D.	utilizado em crescimento dos cultivos com variação de temperatura e/ou fotoperíodos
No forno de microondas	derreter o ágar
Geladeira e freezer	preservação de produtos químicos, soluções estoque, material vegetal
Impressora	imprimir documentos
Lavador de pipetas	facilitar a lavagem das pipetas.
Medidor de pH digital	ajustar pH de meios de cultura
Microscópio estereoscópio com aumento de 2 a 20 vezes	retirada de meristema e embriões imaturos.
microscópio invertido	utilizado em trabalhos com suspensões celulares e protoplastos

❑ Vidraria

aquelas para as culturas de tecido em si, e suas respectivas capacidade e quantidade, estão apresentadas na Tabela 2.

As vidrarias a serem utilizadas num laboratório de cultura de tecidos, nas preparações diversas e

Tabela 2. Listagem das vidrarias utilizadas num laboratório de cultivo de tecidos e suas respectivas capacidade e quantidade.

Tipo de vidraria	Capacidade	Quantidade(unidades)
Bastão de vidro	50cm	05
Becker com alça graduado	1000ml	03
Bekers	50, 100, 300, 500, 1000, 2000 e 4000ml	05 de cada volume
Frasco de cultivo	100ml c/ 66mm de altura	1000
Frasco de cultivo	175ml c/ 98mm de altura	1500
Funil	120ml	10
Funil	250ml	05
Pipeta	1, 2, 5, 10 e 20ml	15 de cada volumu
Pipetadores automáticos	5, 20, 50 e 200 microlitros	01 de cada volume
Proveta com alça graduada	1000ml	02
Provetas	50, 100, 500, 1000 e 2000ml	05 de cada volume
Tubos de ensaio	25x150mm	1000

❑ Instrumentos e Materiais Necessários Para o Laboratório de Cultivo de Tecidos

os instrumentos e materiais apresentados na Tabela 3, repondo-os quando necessário.

Para o funcionamento eficiente de um laboratório de cultivo de tecidos, deve-se ter sempre à mão

Tabela 3. Listagem dos instrumentos e materiais utilizados no laboratório de cultivo de tecidos e suas respectivas capacidade e quantidade.

Instrumentos/material	Capacidade	Quantidade (unidade)
Armário de aço	200x 90 x 40cm	02
Arquivo	C/ 4 gavetas	01
Bandejas de plástico para laboratório	55 x 30 x 13cm	30
Bastão magnético	0,5 a 5cm	02 caixas
Bisturis	-	6
Bomba pipeta	0,2 2 e 10ml	02 de cada unidade
Borrifador	-	06
Cadeira giratória	-	03
Copo descartável	300ml	1000
Copo descartável cristal	300ml	1000
Desinfetantes	-	05
Detergentes líquido	-	05 caixas
Disquete	-	03
Espátula de colher	-	02
Espátula micro	-	01
Espátula tipo faca	-	01
Esponja de lavar	-	10
Estante de aço	-	03
Estiletes	-	05
Estojo de primeiros socorros	-	01
Etiquetas adesivas	-	05 rolos
Filme colorido	24 poses	10
Filtro milipore	0,22 μ m cas/cn	1 caixa
Gaze	-	30 rolos
Lâminas para bisturi	-	05 caixas
Lâmpadas fluorescentes	-	20
Lâmpadas ultra-violeta	-	01
Luvas cirúrgicas	-	2 caixas
Luvas de Kevlar	-	03
Máscaras	-	5 caixas
Mesa grande	2,5 x 1,5m	01
Mesa para computador	-	01
Mesa para impressora	-	01
Papel alumínio	-	20 rolos
Papel de filtro em folhas	50 x50	01 resmas
Papel ofício	-	05 resmas
Papel toalha	-	30 rolos
Parafilm p/ vedação dos tubos e frascos	-	10 rolos
Pinças longas	-	08
Pincel atômico preto e azul	-	10 de cada cor
Radio relógio com despertador	-	01
Recipiente p/ água destilada	20L	02
Saco plástico	05 e 10kg	100 sacos de cada
Seringa hipodérmica descartável	10cc	30

Tabela 3. Continuação...

Instrumentos/material	Capacidade	Quantidade (unidade)
Suporte p/ colocar papel toalha e papel alumínio	-	01
Suporte p/ placa de petri	-	05
Suporte p/ tubos de ensaio	-	20
Tampas de polipropileno com reentrância p/ tubos de ensaio	-	1000
Tampas de polipropileno p/ frasco de cultivo	-	2000
Tesouras c/ cabo de metal comprido	-	04

Os reagentes mais utilizados nos meios de cultivo de tecidos são apresentados na Tabela 4 e devem ser repostos quando necessários.

Tabela 4. Listagem dos reagentes utilizados no laboratório de cultivo de tecidos e suas respectivas quantidades.

Produto	Quantidade por Embalagem
Ácido 2,4D Diclorofenoxiacético	10g
Ácido 3-indolacético (IAA)	10g
Ácido alfa-naftaleno-acético	10g
Ácido bórico	500g
Ácido giberélico (GA3)	20g
Ácido nicotínico	100g
Ágar-ágar	2Kg
Carvão ativado em pó	600g
Cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	500g
Cloreto de magnésio ($\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	500g
Cloreto de potássio	250g
Dicromato de potássio	500g
Fosfato de amônio monobásico	500g
Fosfato de potássio bibásico	500g
Fosfato de potássio monobásico	500g
Fosfatode sódio bibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	250g
Fosfato de sódio monobásico ($\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	250g
Glicina	250g
Glicose	2kg
Glutamina	250mg
Hidróxido de potássio	3kg
Hidróxido de sódio	3kg
Iodeto de potássio	250g
Kinetina	1g
Mioinositol 500g	500g
Molibdato de sódio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	250mg
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	500mg
Nitrato de amônio (NH_4NO_3)	1kg
Nitrato de cálcio Ca (NaO_3) $_2$ 4 H ₂ O	500g
Nitrato de potássio (KNO_3)	1kg
Piridoxina HCL	50g
Recipiente para água destilada	(02 unidades)

Tabela 4. Continuação...

Produto	Quantidade por Embalagem
Sabão em pó	05 caixas
Sacarose	10kg
Sulfato de amônio	1kg
Sulfato de cobalto	250g
Sulfato de zinco	500mg
Sulfato de ferroso	500g
Sulfato de magnésio	500mg
Sulfato de manganês	1kg
Sulfato de potássio dibásico	1kg
Sulfato de sódio Monobásico	500g
Sulfato de sódio bibásico	250g
Tampão para equilibrar o pH4	250ml
Tampão para equilibrar o pH4	250ml
Tiamina HCl	100mg
Turfa	10 sacos
Tween 20	1L
Vermiculita	05 sacos
ZDZ Thiadizuron	10mg

Telado para aclimação das mudas

Devido às características peculiares das plantas propagadas *in vitro*, em geral a transferência direta para as condições de campo acarreta, grande mortalidade entre elas; desta forma, é imprescindível uma fase intermediária entre o laboratório e a área de cultivo, a fim de que as plantas propagadas adquiram resistência antes de serem levadas para as condições de campo. Esta fase é realizada em telado de 6 x 10m, com sombreamento duplo, sistema de nebulização intermitente (através de “timers”) e quatro bancadas de alvenaria de 1 x 6m de comprimento.

Referências Bibliográficas

BIODI, S.; THORPE, T.A. Requirements for tissue

culture facility. In: THORPE, T.A. ed. **Plant tissue**. [S.l: s.n], 1981. p. 1-20.

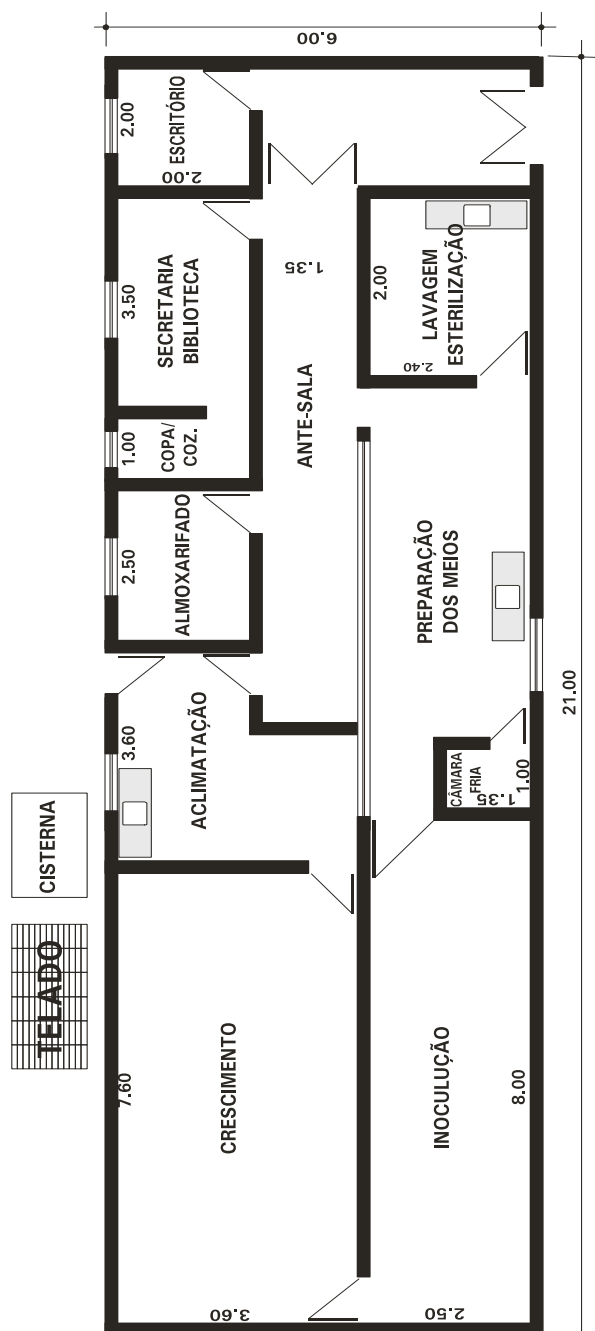
DOWNS, R.J.; HELLMERS, H. **Environment and the experimental control of plant growth**. London: Academic Press, 1975, p.14-25.


STREET, H.E. Laboratory organization. In: STREET, H.E. ed. **Plant tissue and cell culture**. Oxford: Blackwell Science, 1977. p.11-30.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicação da cultura de tecidos de planta**. TORRES, A.C. ; CALDAS, L.S. Eds. Brasília: ABCTP/EMBRAPA CNPH, 1990. 433p.

Anexo I. Croquis das dependências de um laboratório de cultura de tecidos.

ANEXO I



 <i>Algodão</i>		Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA Centro Nacional de Pesquisa de Algodão - CNPA			
Desenhista	R. Estrela	PLANTA BAIXA LABORATÓRIO DE CULTIVO DE TECIDOS			
Téc. Resp.	F. Dias				
Data	Mar/2003				
Escala	S/Escala				
Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, CP 174 - CEP 58107.720 - Campina Grande, PB - Fone: 0(xx)83 341 3608					

**Circular
Técnica, 65**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na: Embrapa Algodão
Rua Osvaldo Cruz, 1143 Centenário, CP 174
58107-720 Campina Grande, PB
Fone: 0XX 83 315 4300 Fax (0XX) 83 315 4367
e-mail algodão@cnpa.embrapa.br
1ª Edição
Tiragem: 1.000

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

**Comitê de
Publicações**

Presidente: Alderi Emidio de Araújo
Secretária Executiva: Nivia M.S. Gomes
Membros: Demóstenes M.P. de Azevedo
José Welington dos Santos
Lúcia Helena A. Araújo
Márcia Barreto de Medeiros
Maria Auxiliadora Lemos Barros
Maria José da Silva e Luz
Napoleão Esberard de M. Beltrão
Rosa Maria Mendes Freire

Expedientes: Supervisor Editorial: Nivia M.S. Gomes
Revisão de Texto: Nisia Luciano Leão
Tratamento das ilustrações: Maria do S. A. de Sousa
Editoração Eletrônica: Maria do S. A. de Sousa