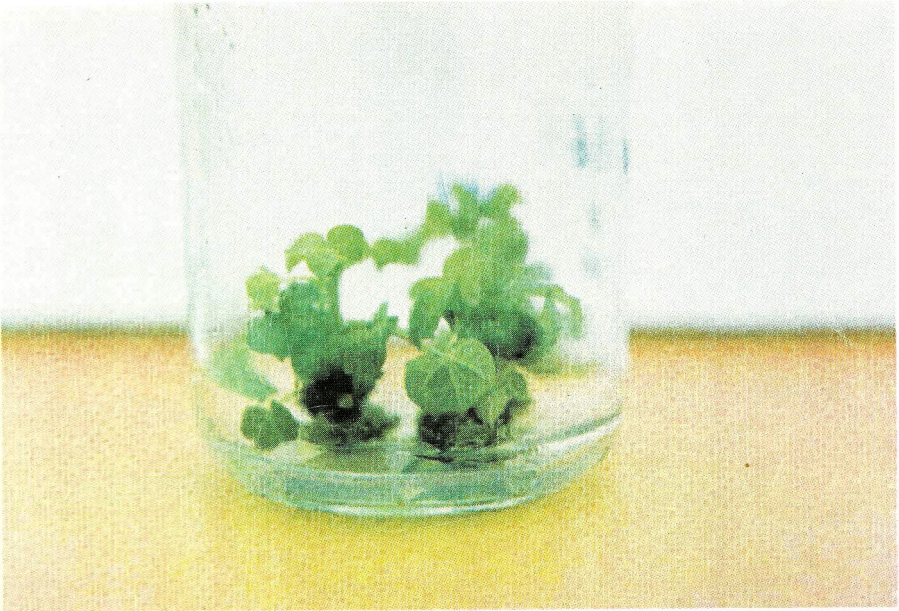


## TÉCNICAS DE MICROPROPAGAÇÃO



ISSN 0103-0205

## TÉCNICAS DE MICROPROPAGAÇÃO

Julita Maria Frota Chagas Carvalho



## **Embrapa Algodão. Documentos, 64**

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Algodão

Rua Osvaldo Cruz, 1143 - Centenário

Caixa Postal 174

Telefone (083) 341-3608

Fax (083) 322-7751

Algodão@cnpa.embrapa.br

<http://www.cnpa.embrapa.br>

CEP 58107-720 - Campina Grande, PB

Tiragem: 300 exemplares

### **Comitê de Publicações**

Presidente: Luiz Paulo de Carvalho

Secretária: Nívia Marta Soares Gomes

Membros: Alderi Emídio de Araújo

Eleusio Curvelo Freire

Francisco de Sousa Ramalho

José da Cunha Medeiros

José Mendes de Araújo

José Wellington dos Santos

Lúcia Helena Avelino Araújo

Malaquias da Silva Amorim Neto

---

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Algodão (Campina Grande, PB)

Técnicas de micropropagação, por Julita Maria Frota Chagas Carvalho. Campina Grande, 1999.

39 p. (Embrapa-CNPA. Documentos, 64)

1. Biotecnologia. 2. Micropropagação-Técnicas. I. Título. II. Série.

CDD 620.8

---

©Embrapa 1999

## SUMÁRIO

	Página
APRESENTAÇÃO.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. CULTIVO DE TECIDO VEGETAL.....	8
2.1. Uso mais Freqüente do Cultivo de Tecido.....	9
2.2. Fatores que Influem no Êxito do Cultivo de Tecido..	15
3. METODOLOGIA GERAL DA PRÁTICA EM LABORA- TÓRIO.....	19
3.1. Laboratório de Cultivo <i>In Vitro</i> .....	19
3.2. Preparação de Meios de Cultivo.....	25
3.3. Esterilização de Instrumentos e Recipientes.....	29
3.4. Assepsia do Material Vegetal.....	
3.5. Início de um Cultivo, Subcultivo, Enraizamento.....	30
3.6. Transferência de Plantas a Condições <i>Ex Vitro</i> .....	35
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	38



## APRESENTAÇÃO

É reconhecido por todos que a biotecnologia já é o grande paradigma da atual e a base do futuro da agricultura e assim da própria humanidade. Uma das ferramentas da biotecnologia é sem dúvida a micropropagação que envolve a obtenção de embriões, via embriogênese somática que tanto podem ser utilizados a nível comercial, como já é feito com várias culturas, especialmente fruteiras, como os casos da bananeira e do abacaxizeiro; bem como para auxiliar no melhoramento genético de plantas, reduzindo o tempo para a obtenção de cultivares de melhor desempenho global. Com este trabalho, a Embrapa Algodão, via a pesquisadora Julita Maria Frota Chagas Carvalho, coloca a disposição da sociedade, em especial as pessoas ligadas a agricultura, informações sobre técnicas disponíveis de micropropagação.

Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão  
Chefe Geral da Embrapa Algodão

# TÉCNICAS DE MICROPROPAGAÇÃO

Julita Maria Frota Chagas Carvalho<sup>1</sup>

## 1. INTRODUÇÃO

Biotecnologia é o conjunto de técnicas específicas para a modificação e melhoria dos sistemas biológicos, ou seja, plantas, animais, microrganismos, células em cultivo ou produtos derivados, (Pasqual et al., 1997).

Muitos desses processos já têm sido utilizados pela humanidade há milênios, para a produção, por exemplo, de pães, queijos, bebidas fermentadas, como vinhos e cervejas ou, ainda, soros, vacinas, antibióticos etc.

A Biotecnologia moderna inclui metodologias avançadas de genética, biologia molecular e cultura de células e tecidos para seleção, engenharia genética e clonagem de espécies e variedades biológicas, além de processo fermentativo para fins produtivos.

A Biotecnologia permite que seja realizada a introgressão de qualquer gene caracterizado, sem levar em consideração as usuais barreiras biológicas (Altman, 1995). Atualmente, os pesquisadores que utilizam a biotecnologia eliminaram as barreiras biológicas normais, criando plantas transgênicas.

---

<sup>1</sup> Pesquisadora da Embrapa Algodão, CP 174 - CEP 58107-720, Campina Grande, PB

## 2. CULTIVO DE TECIDO VEGETAL

O cultivo de tecido vegetal teve início nos anos 30, mas só logrou maior impulso nos anos 70, com o crescente interesse, tanto na aplicação a nível comercial (micropropagação) como para auxiliar nos programas de Melhoramento genético (Ammirato et al., 1984).

O cultivo de tecidos e células vegetais é uma parte da Biotecnologia que, na atualidade, tem rápida evolução. A velocidade com que tem alcançando novos conhecimentos torna difícil apresentar uma síntese concisa e completa dessas técnicas.

Por cultivo *in vitro* entende-se o conjunto de técnicas e de metodologias que permitem o crescimento e a multiplicação de células, tecidos, órgãos ou partes de órgãos de uma planta (explante) sobre um meio nutritivo e em condições assépticas. Utilizam-se recipientes mais ou menos herméticos e o cultivo se realiza sob condições ambientais de iluminação e temperatura controladas. Esta técnica se baseia principalmente no aproveitamento da totipotência das células vegetais, ou seja, na capacidade de produzir órgãos, como brotos e/ou raízes (organogênese) ou embriões somáticos que regeneram uma planta completa (embriogênese somática) num meio de cultivo favorável.

Diante do exposto, a técnica de cultivo *in vitro* apresenta grande potencialidade, sendo possível a obtenção de novos genótipos, de linhas celulares e de híbridos que, de outra maneira, não poderiam ser obtidos na natureza por causa das barreiras reprodutivas na hibridação sexual.

As técnicas da engenharia genética estão amplamente baseadas no cultivo de tecidos, pois a transformação requer que se possa cultivar, *in vitro*, protoplastos, células e tecidos da planta que se deseja transformar e que, das células e tecidos transformados, se possa regenerar plantas (Gyves, 1994).

Os cultivos de tecidos vegetais podem ser iniciados com qualquer parte da planta: gemas, raízes, folhas, células isoladas, protoplastos (célula sem parede celular) semente, embriões zigóticos, antera etc. A escolha de um ou de outro explante dependerá dos objetivos desejados e da disponibilidade e capacidade de resposta do material vegetal.

Qualquer técnica de cultivo *in vitro* tem como fim primário dirigir o crescimento e o desenvolvimento do explante manipulado em seu redor. Este controle se exerce, basicamente, mediante a adição de substâncias de diversas naturezas, principalmente reguladores de crescimento, ao meio de cultivo, como também variando a concentração de determinados nutrientes e, também, através do controle das condições de iluminação e temperatura.

Uma planta *in vitro* é heterotrófica. Em qualquer caso pode-se dizer que no cultivo *in vitro* necessita-se: água, macro e micronutrientes e açúcar como fonte de carbono (Pierik, 1988).

## 2.1. Uso mais Freqüente do Cultivo de Tecidos

### 2.1.1. Micropropagação

Micropropagação ou propagação vegetativa *in vitro* é utilizada principalmente naquelas plantas de difícil propagação pelos métodos convencionais, permitindo a obtenção de grande número de plantas sadias e geneticamente uniformes, em curto período de tempo. Atualmente, a maior concentração da atividade de micropropagação reside na limpeza clonal e na produção de mudas de espécies ornamentais herbáceas e arbustivas (Bajaj, 1993).

A micropropagação pode ser conduzida através de:



#### 2.1.1.1. Proliferação de Gemas Axilares

Gemas axilares são estimuladas a crescer, formando tufos de brotos que são divididos, dando origem a novos explantes.

#### 2.1.1.2. Indução de Gemas Adventícias por Organogênese Direta ou Indireta

Formação de gemas em locais não convencionais, tanto diretamente de tecidos com potencial morfogenético, quanto indiretamente, através da formação de calos. Entende-se por calo, um aglomerado de células desorganizadas, formadas por células diferenciadas e não diferenciadas, que se dividem de forma ativa e que geralmente se originam em zonas com injúrias químicas ou físicas (Bajaj, 1989).

#### 2.1.1.3. Embriogênese Somática

Consiste na formação de embriões somáticos (embrióides) a partir de tecidos somáticos, com constituição idêntica a da planta-mãe, a não ser nos casos em que ocorre a embriogênese por via indireta, passando pela formação de calos, quando poderá ocorrer variabilidade genética. Para que ocorra embriogênese somática as células diferenciadas devem ser primeiro desdiferenciadas, (desprogramação gênica) para ser determinada como células embriogênicas depois da divisão celular, (Pasqual et al., 1997). A indução de embriogênese é muito difícil se não impossível no caso de muitas espécies vegetais.

Os embrióides podem ser utilizados tanto na continuação da propagação *in vitro* quanto na produção de sementes sintéticas.

### 2.1.1.3.1. Embriogênese Direta

Os embrióides são originados diretamente do explante. A ocorrência de embriogênese direta tem sido registrada em tecidos gametófitos, esporofíticos e em tecidos que se originaram em função da fertilização dos gametas. Este fenômeno ocorre com maior probabilidade em micróporos dentro da antera e tecidos de partes do ovário, incluindo as paredes do ovário ou carpelos, óvulo, embrião zigótico ou plântulas jovens (Bajaj, 1992a)

### 2.1.1.3.2. Embriogênese Indireta

Os embrióides são produzidos a partir de calo. A verdadeira embriogênese indireta requer que as células diferenciadas de um explante sejam induzidas a dividir calos não diferenciados e, então, algumas células se tornam comprometidas ou pré-determinadas em uma rota embriogênica (Bajaj, 1992b).

Os embriões somáticos podem ser distinguidos de brotos adventícios por serem bipolares, possuindo primórdios radiculares e foliares, eixo e cotilédones e não têm conexão vascular com o tecido paterno. Por outro lado, gemas axilares ou adventícias podem induzir à formação de condutos procambiais no tecido materno. Esses condutos na planta intacta estabelecem uma conexão entre broto novo e o sistema vascular da planta-mãe. Diferentes dos meristemas, que originam brotos e raízes separadamente, esses embriões quase sempre se originam superficialmente sobre calos e se desprendem facilmente. Os embrióides são formados a partir de células caracteristicamente meristemáticas e, portanto, diferentes das usuais células vacuoladas parenquimatosas encontradas



em calos e em culturas em suspensão; elas possuem citoplasma denso, núcleo grande e muitos grãos de amido (Bajaj, 1991).

As formas dos embriões somáticos correspondentes às distintas fases de desenvolvimento são: pró-embrióide, coração, torpedo e cotiledonar (Figura 1).

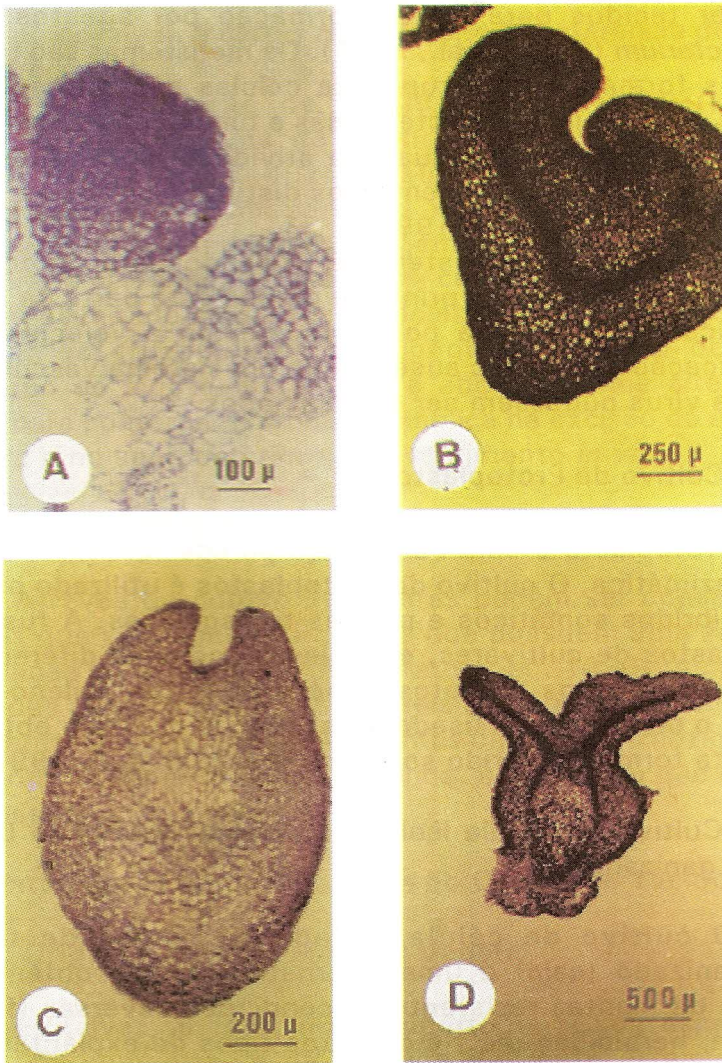


Figura 1. Formas dos embriões somáticos nas diferentes fases de desenvolvimento (a- pró-embrião b- coração; c- torpedo; d- cotiledonar).

### 2.1.2. Cultivo de Meristemas

Nos últimos anos, o cultivo de meristema, em algumas culturas, tem ganhado certa importância, por ser utilizado para se obter tecidos para a transformação por agentes como *Agrobacterium* (Gould et al., 1991). Os meristemas são tecidos vegetais formados por grupos de células não diferenciadas (células com algumas características e função não específicas) que se caracterizam por sua alta atividade de divisão e são responsáveis pelo crescimento dos distintos órgãos da planta (Deberge & Zimmerman, 1991).

O cultivo de meristema é utilizado para limpeza de viroses, baseando-se no princípio de que esta parte da planta é a única não infectada por vírus, devido a velocidade de multiplicação celular e à ausência de um sistema vascular por onde os vírus pudessem ser disseminados.

### 2.1.3. Cultivo de Protoplastos

Protoplasto é uma célula cuja parede foi removida por ação enzimática. O cultivo de protoplastos é utilizado para se obter híbridos somáticos e plantas transgênicas. A fusão de protoplastos de cultivares, espécies ou gêneros diferentes é induzida por vários produtos e métodos. O polietileno-glicol (PEG) é o produto mais usado para indução da fusão obtendo-se, desta forma, o híbrido somático (Pasqual et al., 1997).

### 2.1.4. Cultivo de Célula Isolada ou Massa de Tecido Desorganizado

O cultivo de célula isolada ou massa de tecido desorganizado (calo) é uma alternativa para a obtenção e seleção de plantas resistentes a condições adversas (fungo, bactéria, herbicidas etc.) e distintos tipos de explantes para produzir compostos de interesse (Ammirato et al., 1984)

### 2.1.5. Cultivo de Embriões Zigóticos ou Embriões Imaturos

O cultivo de embriões zigóticos ou embriões imaturos é usado para obtenção de híbridos entre diferentes espécies, tornando possível, a certas cultivares, a transferência de genes desejáveis.

Para obtenção de híbridos interespecíficos ou intergenéricos através do melhoramento convencional é necessário ser conduzido sucessivas gerações de retrocruzamento com parental receptor, no sentido de introgredir a característica selvagem no parental recorrente e recuperar a performance da espécie comercial; entretanto, este método é limitado em certas espécies, por barreiras de origem biótica: os cruzamentos são incompatíveis ou ocorre a formação do zigoto, porém ele é abortivo. Uma alternativa usada para contornar o problema implica na excisão do embrião imaturo e no seu posterior desenvolvimento *in vitro*.

### 2.1.6. Cultivo de Anteras

Através do cultivo de anteras podem ser conseguidas plantas que são clones de células que possuem uma só cópia da dotação cromossômica (Ammirato et al., 1990). As plantas haplóides assim obtidas são estéreis e não formam sementes; entretanto, pode-se conseguir plantas diplóides homozigóticas, mediante tratamento com colchicina, um produto que duplica cromossomos de células.

## 2.2. Fatores que Influem no Êxito do Cultivo de Tecido

### 2.2.1. Origem e Tipo do Material Vegetal

É, talvez, o fator mais importante. Cada espécie ou variedade comporta-se de maneira diferente e tem grande influência a idade da planta e suas condições prévias no campo,



a época da coleta, o tipo de explante, a posição que este ocupa na planta e uma larga lista de aspectos, próprios do material vegetal, que dificilmente se podem controlar em sua totalidade. O material cultivado *in vitro* tem que estar livre de microrganismos que possam interferir durante o processo (Pierek, 1988).

### 2.2.2. Composição do Meio de Cultivo

O meio de cultivo desempenha várias funções, pois ao mesmo tempo em que serve de suporte físico para o explante, proporciona-lhe os nutrientes necessários à sua sobrevivência; além disso, tal como se indicou anteriormente, os componentes do meio podem ser utilizados para dirigir o crescimento e o desenvolvimento do material vegetal (George, 1996). O meio de cultivo pode ser líquido ou solidificado com ágar ou outro tipo de agente gelificante (Carvalho, 1996). Existem vários meios de cultivo; entretanto, o mais amplamente utilizado é o formulado por Murashige & Skoog, de denominação MS. Os componentes deste meio e suas concentrações são listados na Tabela 1.

Todos os meios de cultivo são constituídos de:

- diferentes sais, formados por macro e microelementos, para garantir o suprimento de elementos minerais;
- uma fonte de carbono (açúcar, sacarose, glicose, sorbitol etc.)
- vitaminas e outros suplementos orgânicos (biotina, piridoxina, tiamina, mioinositol, ácido nicotínico etc.)
- na maioria dos casos, de reguladores de crescimento (auxina, citocinina, giberelina etc.)

Tabela 1. Composição das soluções concentradas utilizadas para a preparação do meio de cultivo MS.

<b>Solução A</b>	(Macronutrientes)	mg/l <sup>-1</sup>
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16.500
	KNO <sub>3</sub>	19.000
	CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	4.400
	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	3.700
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.700
<b>Solução B</b>	(Micronutrientes)	
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.200
	MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O	16.900
	ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	8.600
	KI	830
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	250
	CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	25
	CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	25
<b>Solução C</b>	(Fonte de Ferro)	
	Na <sub>2</sub> EDTA*2H <sub>2</sub> O	3.725
	FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	2.785
<b>Solução D</b>	(Vitaminas e outros suplementos orgânicos)	
	Mioinositol	10.000
	Tiamina-HCl	10
	Piridoxina-HCl	50
	Ac. Nicotínico	50
	Glicina	200

Fonte: Murashige & Skoog (1962)

### 2.2.2.1. Reguladores de Crescimento

#### 2.2.2.1.1. Auxinas

É um grupo de reguladores de crescimento. As auxinas utilizadas com maior frequência em cultivo in vitro, são: ácido indol-3-acético (IAA), ácido indol-3-butírico (IBA), ácido  $\alpha$ -



naftalenoacético (NAA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D). O IAA é uma auxina que, comumente, é adicionada a concentrações relativamente elevadas (1-30 mg/l) devido a se decompor na presença de luz, mediante oxidação enzimática. As outras auxinas mencionadas são sintéticas e mais ativas utilizando-se, portanto, em concentrações inferiores. As auxinas são utilizadas para induzir o desenvolvimento de nós, formação de calo e desenvolvimento de raízes adventícias.

#### 2.2.2.1.2. Citocininas

Trata-se de um grupo de reguladores de crescimento que estimulam a divisão celular, sobretudo junto de uma auxina. As citocininas mais utilizadas em cultivo *in vitro*, são: kinetina (KIN), zeatina (citocinina natural), 6-bencilaminopurina (BAP ou BA) e 6-( $\gamma,\gamma$ -dimetilalimino) purina (2iP). Em concentrações elevadas induzem a formação de brotos adventícios e inibem a formação de raízes; são, assim, responsáveis pela eliminação da dormência apical, promovendo o desenvolvimento das gemas axilares.

#### 2.2.2.1.3. Giberelinas

São reguladores de crescimento que induzem ao desenvolvimento dos nós e ao crescimento dos meristemas, ou gemas *in vitro*; podem, também, romper a dormência de embriões isolados ou gemas e inibir a formação de raízes e brotos adventícios e são utilizados com menor freqüência que as auxinas e as citocininas. Dentro das giberelinas, o ácido giberélico (GA3) é o mais empregado. Deve-se ter em conta que o GA3 perde 90% de sua atividade ao se esterilizar junto ao meio no autoclave (Pierik, 1988).

### 2.2.3. Condições de Incubação

Não é comum variar muito de um cultivo a outro; ainda que sua importância seja equiparável a dos demais fatores de cultivo, e embora cada planta, explante e período de cultivo possa ter seus requerimentos específicos, é comum utilizar-se a qualidade e intensidade de luz, fotoperíodos e termoperíodos, mais ou menos padronizados, ou seja para culturas tropicais uma intensidade luminosa de 2.500 lux com um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas no escuro e uma temperatura de 25° a 30°C (Montoya Henao, 1991).

Combinando-se adequadamente esses três fatores (material vegetal, meio de cultivo e condições de incubação) conseguir-se-á obter, no material vegetal, alguns dos seguintes processos morfogenéticos:

- desenvolvimento dos meristemas já existentes no explante
- organogênese, isto é, formação de multibrotação e/ou raízes adventícias
- embriogênese assexual, ou seja, formação de embriões somáticos (embrióides) a partir de células que não são produto de fusão gamética
- dediferenciação (conversão de células diferenciadas em células não diferenciadas ou seja meristemáticas) de tecidos e proliferação de massa de calo.

## 3. METODOLOGIA GERAL DA PRÁTICA EM LABORATORIO

### 3.1. Laboratório de Cultivo *In Vitro*

O cultivo *in vitro* de células, tecidos ou órgãos vegetais, caracteriza-se 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; neste sentido, existem cinco possíveis portadores de microrganismos, que podem ser fonte de contaminação do cultivo: a planta, o meio nutritivo, os instrumentos de trabalho, o operador e o ar.

Em relação ao ar, a utilização de uma câmara de fluxo laminar diminui consideravelmente o risco de contaminação. Essas câmaras emitem um fluxo de ar não turbulento e estéril, graças ao efeito de vários ultra filtros, onde ficam retidos esporos, partículas de pó etc. As condições de limpeza no laboratório devem ser mantidas com o máximo rigor, restringindo a entrada de pessoas, procurando não introduzir material com solo etc. Desta forma, assegura-se o adequado funcionamento dos ultrafiltros, evitando-se que fiquem rapidamente obstruídos; deve-se comprovar, periodicamente, se a câmara de fluxo laminar se encontra em perfeito estado de funcionamento, emitindo um adequado fluxo de ar estéril, até a superfície de trabalho; deve-se evitar, também, correntes de ar (por exemplo movimento de pessoas perto da câmara de fluxo) porque alteram o fluxo laminar de ar. Quando não se estiver utilizando a câmara de fluxo, uma fonte de luz ultravioleta pode facilitar suas condições de esterilidade, devido à ação germicida. É aconselhável, então, retirar os objetos de plástico e o meio de cultivo da ação da luz ultravioleta, já que se podem degradar; entretanto, deve-se levar em consideração que a utilização da luz ultravioleta não evita a necessária limpeza da câmara de fluxo laminar, mas se trata, unicamente, de um fator complementar.

No que diz respeito ao operador, a limpeza das mãos e antebraços é também sumamente importante, assim como a utilização de uma bata de laboratório que cubra a roupa habitual.

A limpeza do laboratório e a precisão no trabalho evitarão a introdução de substâncias desconhecidas no meio de cultivo, o qual possui composição determinada, que poderá ser alterada se não forem mantidas limpas as balanças, espátulas e superfícies



de trabalho. A precisão nas pesagens e medições de volume é especialmente importante com substâncias como os reguladores de crescimento, já que os tecidos vegetais são muito sensíveis, podendo ocorrer de se utilizar o mesmo meio de cultivo e se obter resultados diferentes, devido à falta de rigor e pureza.

Em um laboratório de cultivo *in vitro* deve-se ter, também, certas precauções, já que algumas substâncias ou fatores físicos podem ser tóxicos ou prejudiciais à saúde. As soluções de hipoclorito devem ser manejadas com cuidado, já que podem produzir irritação bronquial por inalação, ou danos na pele, por contato. Não usar nunca hipoclorito em presença de luz ultravioleta, devido à liberação de gases de cloro, nem a exposição direta à luz ultravioleta, porque danifica a retina dos olhos e a pele.

Se os instrumentos utilizados na câmara de fluxo laminar são esterilizados em chama, deve-se ter especial precaução. Antes de se flambar um instrumento, deve-se ter segurança de que o álcool (etanol 70%) com que se tem limpado as mãos, realmente evaporou; nunca submergir um instrumento em álcool, se não foi extinguida totalmente a sua chama.

Como em qualquer outro laboratório, deve-se prestar atenção às indicações de segurança presentes nas etiquetas dos produtos químicos. A utilização de luvas é sempre recomendável no manejo de substâncias corrosivas (ácidos etc.). Na hora de preparar os meios de cultivo, não pipetar com a boca nenhum produto químico, recomendando-se utilizar sempre um aspirador para pipetas; tem-se, também, que prestar especial atenção à correta utilização do autoclave visando evitar queimaduras. Para a retirada de objetos quentes do autoclave, utilizar luvas apropriadas.

### 3.1.1. Equipamentos Básicos

Os equipamentos indispensáveis em um laboratório e suas respectivas finalidades são:

- Autoclave: esterilização de meio de cultura, vidraria e outros materiais.
- Geladeira e Freezer: preservação de produtos químicos, soluções-estoques, material vegetal, etc
- Estufa incubadora tipo  $B < O < D$ : trabalhos com variação de temperatura e/ou fotoperíodo
- Câmara de fluxo laminar: inoculação de explantes sob condição plenamente asséptica
- Destilador e deionizador de água: água para o meio de cultura
- Potenciômetro ou pHmetro: medir pH dos meios de cultura
- Forno de microondas: derreter o ágar
- Agitador rotatório: agitação de meios líquidos
- Balança de precisão: pesar reagentes
- Balança analítica: pesar reagentes
- Banho-maria: manter os meios líquidos para incorporação de produtos esterilizados a frio
- Lavador de pipetas
- Agitadores magnéticos: preparo de soluções
- Microscópio estereoscópio: retirada de meristemas e embrióides
- Aparelhos de ar condicionado: manter a temperatura
- Carrinho: transportar material de laboratório, culturas e meios
- Equipamento para filtração a frio: esterilização de produtos termolábeis
- Estabilizador de voltagem: evitar danos aos equipamentos
- Bomba de vácuo: aumentar a eficiência da assepsia

- Estufa: esterilização e secagem de vidrarias e materiais
- Máquina de lavar louça
- Micrótomo: para fazer corte histológico dos tecidos

### 3.1.2. Instrumentos

Os instrumentos a serem adquiridos para um laboratório de cultivo de tecido, bem como a sua quantidade dependem da finalidade e do tamanho do laboratório. Porém, de modo geral, os instrumentos de maior importância são:

- Pinças
- Bisturis
- Estiletos
- Lâminas para bisturi
- Tesouras
- Bandejas
- Suportes para tubos de ensaio
- Suportes para placas de Petri
- Espátulas
- Lamparinas

### 3.1.3. Vidraria

Assim como citado para os instrumentos, a vidraria e sua quantidade variam conforme o laboratório, sendo as principais citadas a seguir:

- Balão volumétrico 1000ml
- Balão volumétrico 100ml
- Balão volumétrico 200ml
- Balão volumétrico 500ml
- Erlenmeyers 50ml
- Erlenmeyers 100ml



- Erlenmeyers 200ml
- Erlenmeyers 500ml
- Erlenmeyers 1000ml
- Erlenmeyers 2000ml
- Placas de Petri 10cm
- Tubos de ensaio (20 x150mm)
- Frascos de 100ml
- Frascos de 175ml
- Provetas 1000ml
- Provetas 500ml
- Provetas 250ml
- Provetas 100ml
- Bequer 50ml
- Bequer 100ml
- Bequer 300ml
- Bequer 600ml
- Bequer 1000ml
- Bastões de vidro
- Pipeta 1ml
- Pipeta 2ml
- Pipeta 5ml
- Pipeta 10ml
- Pipeta 20ml
- Funis de vidro

### 3.1.3. Outros Materiais

São ainda necessários ao laboratório outros materiais, tais como: tampas plásticas para tubos de ensaio e frascos, algodão hidrófilico, gase, fita adesiva, detergentes, desinfetantes, escovas para lavagem da vidraria, papel de filtro, lâmpadas fluorescentes e ultravioletas, recipientes para água destilada e desmineralizada, papel toalha, papel-alumínio, etiquetas adesivas, entre outros.

## 3.2. Preparação de Meios de Cultivo

### 3.2.1. Preparação da Solução Concentrada

Os meios nutritivos empregados em cultivo *in vitro* são constituídos por vários compostos químicos. É aconselhável utilizar uma espátula para cada composto químico, para evitar contaminação. As substâncias que excederem das pesagens não devem, nunca, serem recolocadas nos frascos. A concentração de uma substância pode ser expressa de diferentes formas e as seguintes expressões são utilizadas:

- percentagem em volume: usa-se para leite de coco, suco de tomate etc.; 5% de leite de coco, quer dizer 5ml, de leite de coco para 95ml de água.
- percentagem em peso: utiliza-se para o ágar e o açúcar; 2% significam 20g do produto para cada litro de meio nutritivo.
- molar: 0,01M significa 1/100 molar por litro (1 molar é o peso molecular expresso em grama)
- micrograma por litro: 1µg/l é equivalente a 0,001 mg/l
- partes por milhão (ppm): 1 parte por milhão equivale a 1 mg/l

Para evitar pesar cada um dos compostos cada vez em que se prepara os meios nutritivos, utilizam-se soluções concentradas, desta maneira, é necessário utilizar-se várias soluções concentradas que contenham compostos compatíveis e cuja concentração final no meio seja de uma amplitude semelhante. Geralmente, preparam-se cinco tipos de solução concentrada indispensáveis à constituição do meio nutritivo: a) macronutrientes, b) micronutrientes, c) ferro, d) vitaminas e suplementos orgânicos, e) reguladores de crescimento.

As soluções concentradas são preparadas pesando-se

os compostos de cada solução, ou seja, das soluções A, B, C e D (Tabela1) dissolvendo-os em água destilada. Para a solução concentrada de ferro (solução C) dissolvem-se, por separado,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , aquecendo ambas as soluções; quando os sais estão dissolvidos, serão então misturados. Em todos os casos, uma vez dissolvidos os compostos, adiciona-se água destilada até o volume final.

Na preparação das soluções concentradas dos reguladores de crescimento, deve-se proceder da seguinte forma:

- para dissolver auxinas (ácidos): pesar a quantidade necessária, colocá-la num erlenmeyer pequeno e adicionar algumas gotas (3-4) de NaOH (hidróxido de sódio) 1N; agitar a mistura, adicionando água destilada, pouco a pouco. Uma vez dissolvida, levá-la ao volume final .
- Para dissolver citocininas, proceder da mesma forma substituindo, entretanto, o NaOH por HCl (ácido clorídrico) 1N, aquecendo ligeiramente.

#### Precauções importantes no preparo de soluções

- usar compostos químicos de grau analítico
- as soluções concentradas se conservam na geladeira ( $5^\circ\text{C}$ ); alguns reguladores de crescimento devem ser armazenados no escuro
- guardar imediatamente na geladeira, depois do uso, soluções de vitaminas e reguladores de crescimento.
- renovar as soluções concentradas dos reguladores de crescimento, a cada três meses; para isto, deve-se colocar, no recipiente, a data em que foi preparada a solução.

### 3.2.2. Preparação do Meio de Cultivo (procedimento geral)

É conveniente, antes de se preparar o meio que se deseja, anotar as quantidades das distintas soluções concentradas e outros compostos, que serão anotados em uma ficha (Quadro 1).

1. Num erlenmeyer, adicionar água destilada (aproximadamente a metade do volume final desejado) e as quantidades correspondentes de sacarose (geralmente 30-35 g/l) e de soluções concentradas de sais e de reguladores de crescimento.
2. Utilizar um agitador para dissolver e misturar os compostos.
3. Verter a solução em uma proveta e completar com água destilada até o volume final desejado.
4. Ajustar o pH (geralmente pH 5,7-5,8) usando-se soluções de NaOH e HCl (1N ou 0,1 N), para titular.
5. No caso de meios sólidos, adicionar a correspondente quantidade de agente solidificante (normalmente 7-10 g/l de ágar).
6. Para dissolver o ágar tampar o erlenmeyer com papel alumínio e introduzi-lo no autoclave (10 minutos a 120°C, 1 kg. cm<sup>2</sup>). Alternativamente, pode-se dissolvê-lo em agitador magnético com calor (100°C, 15 min) ou em forno de microondas.
7. Repartir o meio nos recipientes previamente etiquetados:
  - frascos grandes (200ml de capacidade): aprox. 30ml
  - frascos pequenos (100ml de capacidade): aprox. 20ml
  - tubos de ensaio (50ml de capacidade): aprox. 10 ml



8. Fechar os recipientes e esterilizá-los em autoclave, a  $120^{\circ}\text{C}$  ( $1\text{kg cm}^{-2}$ ) durante 20 a 35 minutos, dependendo do volume a ser esterilizado:
  - recipiente contendo 20-50ml de meio: 20 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$
  - recipiente contendo 50-500ml de meio: 25 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$
  - recipiente contendo 500-5000ml de meio: 35 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$
9. Depois de esterilizados, retirar o meio do autoclave quando a temperatura estiver abaixo de  $100^{\circ}\text{C}$  e a pressão a zero.

### 3.2.3. Preparação de Meio com Substâncias Termolábeis

1. Calcular a quantidade de solução concentrada de substância termolábil que se deve adicionar ( $V_T$ ).
2. Seguir o procedimento geral; no entanto, sem adicionar a substância termolábil e completando o volume com água destilada, na quantidade que corresponda ao volume final menos  $V_T$ .
3. Autoclavar o meio em Erlenmeyer sem a substância termolábil.
4. Retirar o meio do autoclave e esperar que sua temperatura baixe a  $45-50^{\circ}\text{C}$ ; adicionar a quantidade requerida da solução concentrada da substância termolábil previamente esterilizada por filtração, dentro da câmara de fluxo laminar.

GA3, antibióticos e enzimas requerem esterilização por filtrado já que se decompõem com o calor.

### 3.2.4. Preparação de Meio Líquido

Proceder como no caso geral, sem se adicionar ágar ao meio.

Antes de se repartir o meio, colocar nos frascos as pontes de papel de filtro ou outro suporte que se utilize.

Esterilizar em autoclave (20 min. 120°C, 1 kg. cm<sup>-2</sup>).

### 3.3. Esterilização de Instrumentos e Recipientes

Os instrumentos (pinças, bisturis etc.) utilizados na manipulação do material vegetal, dentro da câmara de fluxo laminar, devem ser esterilizados flambando-os. O instrumento deve ser submergido (exceto o extremo onde se sustenta) em etanol a 96% e, em seguida, flambado; no início de cada isolamento é conveniente repetir-se a operação. Os instrumentos devem ser colocados até a sua utilização sobre suporte, limpo previamente com etanol a 70%, sem que as pontas toquem qualquer superfície. O álcool onde se submergem os instrumentos antes de flambar, deve ser renovado periodicamente.

### 3.4. Assepsia do Material Vegetal

A assepsia do material vegetal se consegue, geralmente, utilizando-se um tratamento com etanol e hipoclorito de sódio. Um procedimento geral seria o seguinte:

1. Esterilizar água destilada em frascos fechados no autoclave (120°C, por 30 minutos).
2. Preparar uma solução de etanol a 70%
3. Preparar uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) ou água sanitária comercial em água destilada, adicionando-se 2 gotas de Tween 20 por cada 100ml da solução.



### 3.2.4. Preparação de Meio Líquido

Proceder como no caso geral, sem se adicionar ágar ao meio.

Antes de se repartir o meio, colocar nos frascos as pontes de papel de filtro ou outro suporte que se utilize.

Esterilizar em autoclave (20 min. 120°C, 1 kg. cm<sup>-2</sup>).

### 3.3. Esterilização de Instrumentos e Recipientes

Os instrumentos (pinças, bisturis etc.) utilizados na manipulação do material vegetal, dentro da câmara de fluxo laminar, devem ser esterilizados flambando-os. O instrumento deve ser submergido (exceto o extremo onde se sustenta) em etanol a 96% e, em seguida, flambado; no início de cada isolamento é conveniente repetir-se a operação. Os instrumentos devem ser colocados até a sua utilização sobre suporte, limpo previamente com etanol a 70%, sem que as pontas toquem qualquer superfície. O álcool onde se submergem os instrumentos antes de flambar, deve ser renovado periodicamente.

### 3.4. Assepsia do Material Vegetal

A assepsia do material vegetal se consegue, geralmente, utilizando-se um tratamento com etanol e hipoclorito de sódio. Um procedimento geral seria o seguinte:

1. Esterilizar água destilada em frascos fechados no autoclave (120°C, por 30 minutos).
2. Preparar uma solução de etanol a 70%
3. Preparar uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) ou água sanitária comercial em água destilada, adicionando-se 2 gotas de Tween 20 por cada 100ml da solução.

4. Limpar o material vegetal com água e sabão, escovando-o e retirando qualquer resto de solo ou de parte morta.
5. Colocar o material vegetal no interior de gaze, sem pressionar em excesso
6. Colocar o material vegetal na solução de hipoclorito de sódio e mantê-lo por certo período sob agitação, de acordo com a consistência do material a ser utilizado

Concentrações de NaOCl e tempos orientativos:

- folhas delicadas, pétalas etc.: 0,5%, 5-10min.
  - caules, folhas, gemas etc. (não muito sujas): 0,5-0,7%, 15-20min.
  - caule, gemas, sementes (muito sujas): >0,7%, 15-20min.
7. Dentro da câmara de fluxo, tirar o excesso do hipoclorito de sódio no explante, passando-o três vezes em água destilada estéril
  8. Utilizar placas de Petri estéreis como suporte para cortar os explantes e eliminar os extremos danificados pela solução de NaOCl.
  9. Colocar os explantes sobre o meio, certificando-se de que há contato entre ambos.

Quanto menor for o explante isolado, maior probabilidade há de se obter um cultivo limpo, porém é menor a probabilidade deste se desenvolver.

### 3.5. Início de um Cultivo, Subcultivo, Enraizamento

O início de um cultivo, do subcultivo e da transferência ao meio de enraizamento, é um processo que se realiza sob condições estéreis em câmara de fluxo laminar.

### 3.5.1. Procedimentos Gerais a Seguir na Câmara de Fluxo

1. Acender a luz ultravioleta pelo menos uma hora antes de realizar os trabalhos de excisão, inoculação e transferência dos explantes para os meios de cultura.
2. Apagar a luz ultravioleta; certificar-se de que não há nada que bloqueie a entrada de ar; ligar o motor da câmara de fluxo laminar (é conveniente que esteja ligado durante 10 minutos, antes de começar a trabalhar) e limpar as superfícies interiores com etanol a 70%.
3. Lavar as mãos com água e sabão.
4. Se necessário, utilizar algum aparelho dentro da câmara (lupa, microscópio, balança etc.) limpá-lo previamente com papel-toalha impregnado em álcool a 70%.
5. Antes de começar a trabalhar na câmara de fluxo laminar, limpar as mãos com álcool a 70%, deixando o álcool secar antes de esterilizar os instrumentos, para evitar queimaduras nas mãos; repetir de vez em quando esta operação.
6. Esterilizar os instrumentos (pinças e bisturis) impregnando-os de álcool e flambando-os; deixá-los esfriar sobre uma placa de Petri ou outro suporte (tendo-se o cuidado para que as pontas não toquem qualquer superfície) e proceder à esterilização dos instrumentos periodicamente, como por exemplo, cada vez em que for trocado de explante ou recipiente de partida.
7. A manipulação do material vegetal se realiza sobre placas de Petri estéreis, substituindo-as, para cada explante ou conteúdo de um recipiente. Alternativamente, podem-se utilizar papéis de filtro colocados no interior da placa de Petri, que se retiram periodicamente. O material vegetal deve ser seguro

- com pinças e cortado com o bisturi, tendo-se o cuidado para não danificá-lo.
8. Antes e depois de se colocar o material vegetal no interior do recipiente de cultivo, convém flambar a boca do mesmo, caso este seja de vidro; deve-se flambar, também, o interior da tampa antes de fechá-lo.
  9. Depois de usar a câmara, limpar com etanol a 70%, as superfícies interiores e retirar os instrumentos.
  10. Apagar o motor e a luz e acender a lâmpada ultravioleta.
  11. Ao finalizar o trabalho, limpar os instrumentos com água e sabão e secá-los.

### 3.5.2. Início de um Cultivo

O procedimento a seguir no início de um cultivo, depende do tipo de explante utilizado.

No caso do cultivo de gemas, partem-se porções de caule e/ou ramos e, ao se eliminar folhas, aplica-se-lhe o tratamento de assepsia conveniente; em seguida, as gemas são separadas em condições estéreis, eliminando-se as zonas da gema danificadas durante o processo de assepsia; por último, coloca-se sobre o meio de cultivo.

Quando se utiliza o limbo da folha como explante, a assepsia pode ser realizada com o limbo inteiro ou fragmentado em porções, dependendo de seu tamanho, devendo-se retirar as porções danificadas durante a assepsia. É conveniente utilizar, como explante, fragmentos de tamanho conhecido que contenham alguma nervura, na qual se farão incisões ou pequenos cortes. As nervuras dos fragmentos devem ficar em contato com o meio.



### 3.5.2.1. Para o Cultivo de Meristemas

1. Cortar os brotos, limpá-los com água e sabão e colocá-los em um recipiente com água, para evitar a dessecação.
2. Retirar as folhas do broto e submergi-las por um momento (1-2 segundos) em álcool a 70%; esterilizar os brotos mediante imersão numa solução de NaOCl 0,5-0,7%, durante 5 minutos; por fim, retirar o excesso do hipoclorito de sódio com água destilada esterilizada.
3. Limpar a lupa com etanol a 70% e colocá-la na câmara de fluxo laminar. Colocar os explantes sobre uma placa com papel de filtro (tudo previamente esterilizado). Utilizar uma lupa binocular (iluminada com uma luz fria para impedir a dessecação do meristema) retirando-se as folhas restantes e os primórdios foliares, com a ajuda de agulhas hipodérmicas, com a ponta dobrada ou a metade de uma gilete montada em um cabo. Os instrumentos devem ser esterilizados de forma regular, durante o processo.
4. Quando o meristema se encontrar à vista, proceder à separação do ápice, com devido cuidado para não danificá-lo, cortando-se sua base com uma gilete ou com agulhas. O meristema com os primórdios foliares é muito pequeno (0,1mm de diâmetro; 0,2-0,4mm de comprimento).
5. Colocar o meristema imediatamente no recipiente com meio (MS) para evitar sua dessecação, certificando-se de que está em contato com o meio, mas não totalmente imerso.

### 3.5.3. Subcultivo

Os novos brotos formados, os nós, ou as gemas, se individualizam cortando-os com bisturi, com cuidado de não danificá-los, cultivando-os em um meio fresco. O tipo de "explante secundário" (porção de material vegetal que se utiliza em um subcultivo) será escolhido em função da via de multiplicação selecionada; em todo caso, deve-se empregar, para subcultivo, material vigoroso, não necrótico e homogêneo.

No subcultivo de calo são necessários, geralmente, inóculos de 20-100mg. Se no primeiro cultivo não foi produzido calo suficiente, transferir ao meio fresco com parte do explante original; quando o calo é cultivado em meio líquido, é necessário utilizar erlenmeyers colocados sobre um agitador rotatório (80-120rpm). Os erlenmeyers não devem conter de meio de cultivo mais do que 20-30% de sua capacidade total. Os cultivos em meio líquido são, em geral, suspensões de células e/ou agregados celulares ou porções de calo.

Para o subcultivo de suspensões celulares, transferir ao meio fresco (líquido ou sólido) determinado volume de cultivo, com a ajuda de uma pipeta estéril; alternativamente, o cultivo pode ser filtrado com uma peneira de determinado poro (previamente esterilizada) para eliminar agregados celulares. É fundamental para o êxito do subcultivo, transferir um número suficiente de células, para se conseguir a concentração inicial adequada e que estas estejam se dividindo ativamente (suspensão em fase de crescimento exponencial).

### 3.5.4. Enraizamento *In Vitro*

A transferência de clone a um meio de enraizamento se realiza depois de individualizá-lo e de se certificar de que não contém tecido de calo. É necessário que os clones tenham tamanho mínimo de 2cm. As manipulações são similares às

descritas anteriormente mas, evidentemente, sem dividir cada clone.

### 3.6. Transferência de Plantas a Condições *Ex Vitro*

As plantas obtidas *in vitro* devem ser retiradas dos recipientes de cultivo, procurando-se não danificar o sistema radicular, se o tem formado; lavar com água corrente, eliminando o ágar aderido às raízes, para evitar o ataque de fungos e bactérias; por este mesmo motivo, deve ser utilizado um substrato previamente esterilizado (no autoclave 1h, 120°C, 1kg cm<sup>-2</sup>) composto, por exemplo, de três partes de turfa e uma de vermiculita. Convém realizar tratamento preventivo com uma solução de 2-3 g/l de fungicida, como Captan (50% de captan); em seguida, as plantas devem ser aclimatadas a condições *ex vitro*.

As plantas obtidas por meio da multiplicação *in vitro* diferem, anatômica e fisiologicamente, das plantas cultivadas no campo ou em casa de vegetação. Os detalhes de como as condições peculiares do cultivo *in vitro* influem sobre determinadas características da planta que, posteriormente, afetarão a sua adaptação a condições *ex vitro*, são descritas a seguir:

- alta umidade relativa: as plantas possuem uma cutícula pouco desenvolvida e estômatos não totalmente funcionáveis;
- adição de hidratos de carbono: as plantas têm metabolismo heterotrófico e capacidade fotossintética reduzida;
- enraizamento no meio de cultivo: as raízes não desenvolvem pelos absorventes;
- desenvolvimento em condições assépticas: as plantas necessitam de associações simbióticas (por exemplo

micorrizas) e são pouco resistentes à ação de microrganismos.

Por isso, durante as primeiras semanas de aclimação deve-se evitar uma excessiva perda de água por transpiração, colocando-se, sobre cada plântula, um frasco de vidro invertido, ou cultivando-as dentro de uma mini casa-de-vegetação, túnel de plástico, ou em casa-de-vegetação com sistema de neblina. A temperatura e a irradiação luminosa devem ser reduzidas para evitar excessiva transpiração.



Quadro 1. Preparação de Meio de Cultivo

FICHA:

**ESPÉCIE**

**EXPERIMENTO:**

**MEIO:**

**VOLUME FINAL:**

**ETAPAS:**

1ª

Solução	A	B	C	D	Fonte de carbono (g)
mℓ					

**REGULADORES DE CRESCIMENTO:**

2ª

Nome	Conc. Sol. Madre.	mℓ	

3ª

**ACRESCENTAR ÁGUA ATÉ O VOLUME FINAL**

4ª

**pH**

5ª

**SOLIDIFICANTE**(\_\_\_\_\_ g/ℓ):

6ª

**DISSOLUÇÃO DO SOLIDIFICANTE: AUTOCLAVE-10'**

7ª

**DISTRIBUIR NOS FRASCOS**

8ª

**ESTERILIZAÇÃO: AUTOCLAVE-20'**

**RECIPIENTE:**\_\_\_\_\_ mℓ de meio por recipiente.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTMAN, D.W. **Introgresão de genes para melhoria do algodão: contraste com cruzamento tradicional com a biotecnologia.** [S.l.]: Monsanto do Brasil, 1995.
- AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A; SHARP, W.R.; YAMADA, Y. **Handbook of plant cell culture.** New York: Macmillan, 1984. v.3.
- AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A; SHARP, W.R.; BAJAJ, Y.P.S., **Handbook of plant cell culture.** New York: Macmillan, 1990. v.5.
- BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry 7: medicinal and aromatic plant II.** Berlin: Springer-Verlag, 1989.
- BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry 15: medicinal and aromatic plant III.** Berlin: Springer-Verlag, 1991.
- BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry 19: high-tech and micropropagation III.** Berlin: Springer-Verlag, 1992a.
- BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry 20: high-tech and micropropagation IV.** Berlin: Springer-Verlag, 1992b.
- BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry 21: medicinal and aromatic plants IV.** Berlin: Springer-Verlag, 1993
- CARVALHO, J.M.F.C. **Aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* en la multiplicación y mejora del algodón.** Madri: E.T.S.I.U.P.M., 1996. 174p. Tese Doutorado.

- DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN. **Micropropagação**. [S.l.]: Kluwer, 1991.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Basingstoke: Edington, 1996.
- GYVES, E.M. **Agrobiotecnologia**. México: Iberoamérica, 1994.
- GOULD, J.M.; BANISTER; S.; HASEGAWA.; FAHIMA, M.; SMITH, R.H. Regeneration of *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense* shoot apex tissues for transformation. **Plant Cell Reports**, v.10, p. 12-16, 1991.
- MONTOYA HENAO, M.L. **Cultivo de tejidos vegetales**. Medellín: Universidad Nacional de Colombia, 1991.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497, 1962.
- PASQUAL, M.; HOFFMANN, A; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações**. Lavras: Ed. Brasil, 1997.
- PIERIK, R.L.M. **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. Madrid: Mundiprensa, 1988.

**Embrapa**  

---

*Algodão*



Ministério  
da Agricultura  
e do Abastecimento

**GOVERNO  
FEDERAL**  
Trabalhando em todo o Brasil