

CULTURA DE TECIDOS

(Manual)



CULTURA DE TECIDOS

(Manual)

Osmar Alves Lameira

Oriel Filgueira Lemos

Ilmarina Campos de Menezes

José Eduardo Brasil Pereira Pinto



Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Amazônia Oriental
Trav. Dr. Enéas Pinheiro, s/n
Telefones: (91) 276-6653, 276-6333
Fax: (91) 276-9845
e-mail: cpatu@cpatu.embrapa.br
Caixa Postal, 48
66095-100 – Belém, PA

Tiragem: 200 exemplares

Comitê de Publicações

Leopoldo Brito Teixeira – Presidente
Antonio de Brito Silva
Expedito Ubirajara Peixoto Galvão
Joaquim Ivanir Gomes

José de Brito Lourenço Júnior
Maria do Socorro Padilha de Oliveira
Nazaré Magalhães – Secretária Executiva

Revisores Técnicos

Expediente

Coordenação Editorial: Leopoldo Brito Teixeira
Normalização: Silvio Leopoldo Lima Costa
Revisão Gramatical: Maria de Nazaré Magalhães dos Santos
Composição: Euclides Pereira dos Santos Filho

LAMEIRA, O.A.; LEMOS, O.F.; MENEZES, I.C. de; PINTO, J.E.B.P. **Cultura de tecidos (manual)**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 41p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 66).

ISSN 1517-2201

1. Cultura de tecidos. 2. Micropropagação. I. Embrapa. Centro de Pesquisa Agro-floresta da Amazônia Oriental (Belém, PA). II. Título. III. Série.

CDD: 571.538

Sumário

| | |
|--|-----------|
| INTRODUÇÃO | 5 |
| PROPAGAÇÃO DE PLANTAS ATRAVÉS DA CULTURA DE TECIDO | 6 |
| MÉTODOS DE MICROPROPAGAÇÃO | 11 |
| LABORATÓRIO: INSTALAÇÕES E EQUIPAMENTOS..... | 13 |
| MANUSEIO DE EQUIPAMENTOS..... | 18 |
| COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA | 20 |
| DEFINIÇÕES QUÍMICAS: PESO MOLECULAR E MOLARIDADE..... | 24 |
| TÉCNICAS DE ASSEPSIA | 26 |
| ESCOLHA DO EXPLANTE..... | 27 |
| INDUÇÃO DE CALOS..... | 28 |
| CULTIVO DE CÉLULAS | 30 |
| PROTOCOLOS DE MICROPROPAGAÇÃO DESENVOLVIDOS E UTILIZADOS NO LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL | 32 |
| MICROPROPAGAÇÃO DE BANANEIRA (<i>Musa</i> spp. - Musaceae)..... | 32 |
| MICROPROPAGAÇÃO DE ABACAXIZEIRO (<i>Ananas comosus</i> (L.) Meer - Bromeliaceae) | 34 |
| MICROPROPAGAÇÃO DE IPECACUANHA (<i>Psychotria ipecacu- anha</i> Stokes) | 36 |
| MICROPROPAGAÇÃO DE PIMENTA-DO-REINO (<i>Piper nigrum</i> L.) | 37 |
| MICROPROPAGAÇÃO DE CURAUÁ (<i>Ananas erectifolius</i>) | 38 |
| BIBLIOGRAFIA CONSULTADA | 40 |

CULTURA DE TECIDOS

(Manual)

Osmar Alves Lameira¹
Oriél Filgueira Lemos²
Ilmarina Campos de Menezes³
José Eduardo Brasil Pereira Pinto⁴

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento das novas técnicas de biotecnologia tem apresentado várias alternativas promissoras para auxiliar os programas de melhoramento vegetal, seja na multiplicação de genótipos superiores, limpeza clonal, introdução de genes exógenos em células por manipulação genética (produção de plantas transgênicas), como também na eficiência de indução de mutação e seleção, produção de sementes artificiais, conservação de germoplasma, clonagem de genes, etc. (George, 1993).

Um dos principais objetivos da cultura de tecidos é prover uma alternativa de manipular plantas em nível celular. Portanto, o conhecimento dos mecanismos de regeneração de plantas é fundamental, pois é a maior limitação na aplicação biotecnológica para melhoramento vegetal. A aplicação no melhoramento é, principalmente, para aquelas espécies cujos problemas não podem ser solucionados através de métodos de melhoramento convencional.

A tecnologia de cultura de células, protoplastos e tecidos de plantas, constitui uma das áreas de maior êxito da biotecnologia. Após meio século de progresso, conquistou destacada posição na propagação comercial e industrial de plantas.

Eng.-Agr., Doutor, Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Caixa Postal 48, CEP 66017-970, Belém, PA.

Eng.-Agr., M.Sc., Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental.

Eng.-Agr., M.Sc., Técnica Especializada da Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental.

Eng.-Agr., Ph.D., Professor Titular da UFLA, Caixa Postal 37, CEP 37200-00, Lavras, MG.

A cultura de tecidos utiliza pequenos fragmentos de tecido vivo (explante) que são utilizados assepticamente em meio nutritivo, onde em cada fragmento da planta ainda que pequeno (inclusive células individuais), permanecem todos os elementos que em condições apropriadas podem reconstruir todo o organismo.

A micropropagação, indiscutivelmente, tem sido a técnica mais utilizada, pois oferece vantagens de manutenção de genótipos e fenótipos de híbridos, mutações genéticas selecionadas, e excelente estado fitossanitário das plantas obtidas. A propagação em larga escala foi desenvolvida a partir de 1966 (França e Inglaterra), utilizando orquídeas, crisântemo e cravo que dominaram a fase inicial. Atualmente, concentra-se na limpeza clonal e multiplicação de espécies frutíferas (banana, abacaxi, morango), ornamentais, florestais (coníferas), olerícolas (alho) e medicinais, pois possibilita a multiplicação rápida em período de tempo e espaço físico reduzidos (George, 1993; Lameira et al. 1997; Andrade et al. 2000). Esse manual tem como objetivo apresentar de uma forma sucinta informações sobre o manuseio das técnicas de cultura de tecidos destinadas, em particular, àqueles que estão iniciando trabalhos nessa área e a utilizarão no seu dia a dia.

PROPAGAÇÃO DE PLANTAS ATRAVÉS DA CULTURA DE TECIDO

A cultura de tecido tem como definição básica o cultivo asséptico de qualquer parte viva da planta (explantes) constituído por frações de tecidos, órgãos ou mesmo células em suspensão em meio de cultura sintético (nutrientes, reguladores de crescimento, etc.) sob condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade, para gerar uma nova planta. Esta técnica baseia-se, principalmente, na capacidade de células, tanto animal quanto vegetal, de dar origem a novas células e, por conseguinte, indivíduos, exatamente iguais à célula mãe. Esta propriedade é conhecida como totipotencialidade.

Entre as tecnologias e técnicas que influenciaram a horticultura nos últimos 25 anos, a micropropagação tem tido o mais significativo impacto no desenvolvimento comercial. Atualmente, são produzidas em torno de 180 a 200 milhões de plântulas/ano via cultura de células e tecidos.

A micropropagação tem sido praticada com êxito em espécies hortícolas (batata, cenoura), ornamentais (orquídea, crisântemo), frutíferas (abacaxi, banana), medicinais (ipeca, espinheira santa) e mais recentemente em espécies lenhosas florestais (pinus, eucalipto) (George, 1996; Lameira et al. 1997; Andrade et al. 2000).

Algumas vantagens do uso da micropropagação em comparação com os sistemas convencionais de propagação:

- Incremento acelerado do número de plantas derivadas por genótipo, para obtenção de metabólitos importantes;
- Redução do tempo de multiplicação;
- Possibilidade de multiplicar grandes quantidades de plantas em uma área reduzida a baixos custos;
- Maior controle sobre a sanidade do material propagado;
- Facilidade para transporte do material in vitro de um lugar para outro (país ou região);
- Intercâmbio de germoplasma;
- Possibilidade de multiplicar rapidamente uma variedade da qual só existam poucos indivíduos, e
- Criação e manutenção de bancos de germoplasma.

Dentre as desvantagens destacam-se:

- Necessidade de pessoal especializado, e
- Custo elevado no início de implantação do laboratório.

Necessidades para operacionalizar as técnicas de micropropagação

- Necessidade de uma infra-estrutura (laboratório) adequada;

- Mão-de-obra especializada, e

- Equipamentos, drogas e vidrarias específicas

Para a realização da micropropagação, três passos são importantes:

1- Estabelecimento asséptico de cultivo- o explante é selecionado com base em algumas características da planta doadora e do próprio explante. Quanto à planta doadora, deve-se levar em consideração, a idade da planta, o estado fitossanitário, aspectos nutricionais, estação do ano, tipo de reprodução predominante, produtividade da planta e estado fisiológico. No explante, considerar tamanho, posição na planta, aspectos visuais de cor, lesões, estado fitossanitário e idade fisiológica.

2- Multiplicação e cultivo- a multiplicação pode ocorrer de forma direta ou indireta, com ou sem formação de calo, respectivamente, conforme as condições de cultivo. A micropropagação através da formação de calos tem sido evitada, tendo em vista que as plantas provenientes de calos podem apresentar diferentes graus de variação que podem ser do tipo epigenético ou corresponder à mutação, bem como a limitação da capacidade morfogenética dos calos quando mantidas em condições indiferenciadas por longos períodos. Sem a formação de calos, a multiplicação pode se dar pela **diferenciação de brotos adventícios, estímulo de gemas axilares** e por **embriogênese somática**. Os tecidos meristemáticos possuem maior estabilidade na regeneração de plântulas do que os tecidos mais diferenciados. A Figura 1 mostra o diagrama da produção de mudas advindas da micropropagação de gemas terminais e axilares.

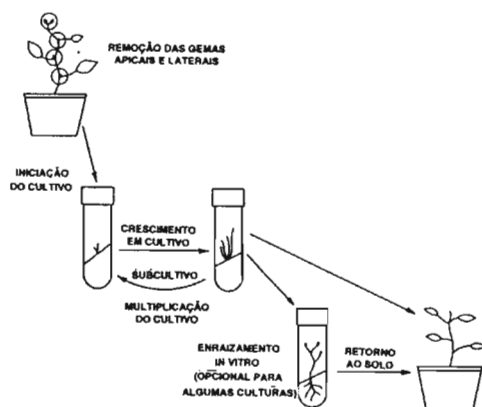


Figura 1. Diagrama da produção de mudas advindas da micropropagação de gemas terminais e axilares (adaptado de Fachinello et al. 1995).

3- Enraizamento e aclimação para transplante ao solo- o processo de enraizamento nos brotos propagados in vitro requer geralmente um meio de cultura com menor concentração de sais. A princípio, durante o período de uma a duas semanas, são usados os meios básicos tradicionais de Murashige & Skoog (1962) -MS e Gamborg et al. (1968) -B5, complementados com uma auxina para induzir a formação de raízes. Um fato importante para o enraizamento é a qualidade da microestaca e o seu tamanho ser maior que 1,0 cm. O desenvolvimento foliar também é importante, porque a microestaca com um sistema foliar desenvolvido enraíza mais consistentemente. Posteriormente, para acelerar o crescimento das raízes, ocorre a transferência dos brotos para um meio com a metade da concentração dos sais do meio de cultivo anterior sem regulador de crescimento. Para iniciar o enraizamento é necessário uma relação de até 5:1 de auxina/citocinina. Durante esse processo, dependendo da espécie, podem ser utilizados alguns produtos fenólicos como ácido clorogênico, floroglucinol e polivinilpirrolidone

– PVP, para absorver metabólitos tóxicos e carvão ativado para reduzir a luz na base dos brotos e absorver componentes inibidores. A Figura 2 mostra algumas alternativas para o enraizamento in vitro.

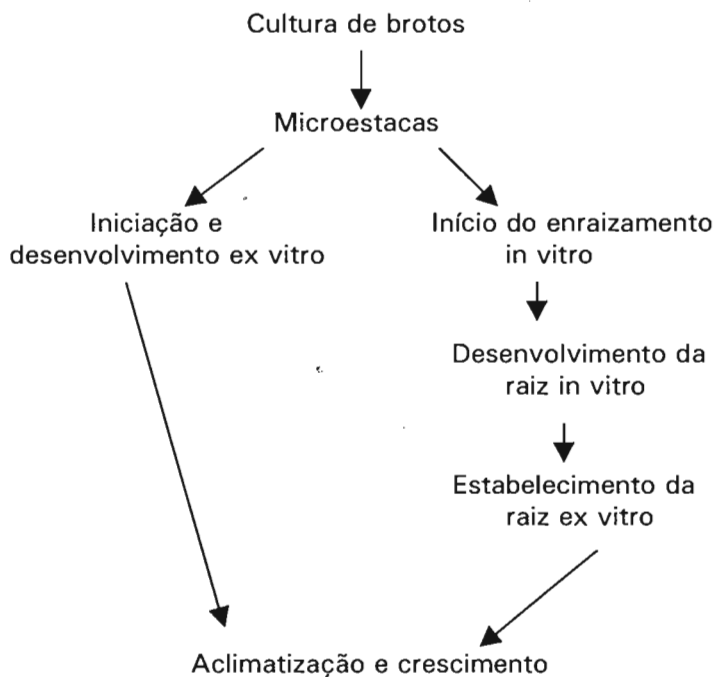


Figura 2. Alternativas para o enraizamento in vitro.

A aclimação e a transferência das plantas para o solo ainda são fatores que necessitam de certos cuidados indispensáveis para a eficiência do processo como local (casa de vegetação, telado ou câmaras de aclimação), tipo de substrato, controle da temperatura, umidade e luz.

MÉTODOS DE MICROPROPAGAÇÃO

Os métodos que são teoricamente viáveis para a propagação de plantas *in vitro* podem ser obtidos diretamente pela diferenciação de brotos adventícios, estímulo de gemas axilares e embriogênese somática ou indiretamente com a formação de calos.

Diferenciação de brotos adventícios - esta permite a formação de novas estruturas unipolares, o sistema permite a regeneração de maior quantidade de brotos que o sistema de gemas axilares. Os brotos adventícios têm a sua origem na formação do tecido meristemático e a posterior diferenciação de ápices. Para isso, os explantes empregados são os meristemas, gemas e segmentos caulinares (apical, nodal e internodal).

A cultura de meristema é uma técnica altamente importante para garantir alta produtividade, como na cultura da batata (*Solanum*), alho, batata-doce e morango. A região meristemática é supostamente livre de vírus, devido à falta de sistema vascular (onde o vírus transloca-se dentro da planta) e alta divisão celular. Apesar da baixa ou da inexistência do vírus nessa região, mesmo assim, as plântulas devem passar por um processo de indexação para testar a presença de vírus. Explantes provenientes de gemas e segmentos caulinares, freqüentemente são os mais utilizados. Por serem de maior tamanho facilitam a regeneração de plantas, são utilizados na micropropagação de banana, abacaxi, ipeca, etc.

Estímulo de gemas axilares - nesse processo, as condições *in vitro* estimulam o desenvolvimento das gemas axilares permitindo a formação de uma planta por gema. A eficiência deste sistema está no número de plantas obtidas determinada pelo número de gemas axilares pré-existentes no inóculo, por outro lado, o sistema apresenta a vantagem de que os indivíduos regenerados mostram grande estabilidade genética.

Embriogênese somática - como embriões somáticos, assexuais ou adventícios, tem-se definido para aqueles que originados a partir de células, não são produtos de fusão de gametas. São estruturas bipolares com um eixo radial apical e que não possuem conexão vascular com o tecido materno. As estruturas bipolares devem ser também capazes de crescer e formar plantas normais. Por esse processo, têm sido propagadas espécies como urucuzeiro, cenoura, tabaco, coníferas, etc. a partir de células do endosperma, hipocótilo, segmentos caulinares e de calos derivados de outros explantes.

Em alguns aspectos, os embriões somáticos mantêm certa semelhança com os embriões zigóticos. Tanto in vivo como in vitro podem ocorrer algumas anormalidades no desenvolvimento. Do ponto de vista da micropropagação, a embriogênese somática é o sistema mais eficiente, se for considerada a eficiência no número de plantas regeneradas por unidade de tempo. Através deste método pode-se obter uma quantidade quase que ilimitada de plantas, supondo-se que cada célula em suspensão no meio de cultura está diferenciando uma planta. Em coníferas, por exemplo, estão se obtendo em um litro de meio de cultura em torno de 50 mil embriões somáticos, aptos para serem regenerados em plântulas.

Deve-se considerar, entretanto que em cultivo de células em suspensão a maioria dos embriões somáticos foram originados de calos, implicando a ocorrência de alguma forma de variação epigenética. A variação somaclonal em propágulos originados da cultura de calos é um dos maiores problemas (George, 1993). Para regenerar plantas com baixa variabilidade, alguns cuidados são necessários como: escolher um tecido (explante) meristemático; baixa concentração de reguladores de crescimento; meio de cultura mais simples; subculturar o tecido meristemático; selecionar calos semi-organizado; obter organogênese nas primeiras repicagens e regenerar plântulas o mais rápido possível.

Altas variabilidades podem ocorrer se forem usados tecidos mais diferenciados, meio de cultura com altos níveis de nitrogênio, altas concentrações de regulador de crescimento, repicagem de tecido desorganizado e longo tempo de cultura antes da regeneração.

LABORATÓRIO: INSTALAÇÕES E EQUIPAMENTOS

O tamanho do laboratório e o número de equipamentos necessários para o desenvolvimento da micropropagação vai depender do objetivo do trabalho a ser realizado. Amadores e pequenos viveiristas podem fazer a propagação de plantas usando poucos equipamentos distribuídos em uma ou mais salas pequenas. Porém, o laboratório destinado à pesquisa requer salas e equipamentos que normalmente não são usados por laboratórios de propagação comercial. Para utilizar o sistema com eficiência, é necessário um conhecimento acadêmico sobre cultura de tecidos de plantas, sendo recomendado um treinamento em um laboratório de pesquisa ou de nível comercial.

A instalação do laboratório deve atender aos objetivos propostos de cada interessado. Para pesquisa, o laboratório deve possuir, no mínimo salas de preparação de meios de cultura, inoculação, crescimento e de observação e uma casa de vegetação ou telado. Pequenas firmas comerciais deverão possuir, no mínimo, salas de escritório, de preparo de meio de cultura, de inoculação e/ou crescimento, casa de vegetação ou telado.

Em cultura de tecidos, a manutenção da assepsia é de fundamental importância porque todo meio de cultura contém nutrientes que permitem o desenvolvimento de bactérias e fungos. Com isto, estes organismos crescem muito mais rapidamente e destroem o tecido da planta, que possui crescimento mais lento. Assim, os órgãos das plantas devem ter suas superfícies esterilizadas quimicamente quando do início da cultura e os instrumentos e frascos com o meio de cultura devem ser esterilizados antes de serem utilizados. Outro fator importante na manipulação asséptica é a rapidez com que o trabalho é realizado, não permitindo a contaminação por microrganismos existentes no ambiente.

De um modo geral, um laboratório de cultura de tecidos, com o objetivo de micropropagação, deve ter as seguintes dependências:

- área para lavagem e esterilização;
- área para preparo de meios de cultura;
- área para manipulação asséptica;
- área para incubação das culturas;
- área para observação e exames das culturas; e
- área para aclimatação das plantas.

A Figura 3, ilustra um modelo de laboratório de cultura de tecidos destinado à micropropagação de plantas.

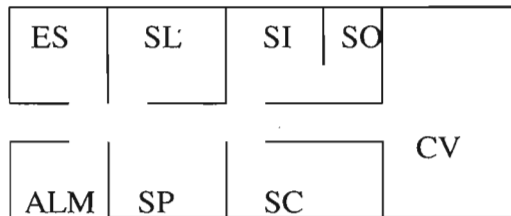


Figura 3. Modelo de um Laboratório de Cultura de Tecidos.

ES- escritório (3,0m x 3,0m); ALM- almoxarifado (2,5m x 3,0m); SL- sala de lavagem (3,0m x 3,0m); SI- sala de inoculação (3,0m x 3,5m); SO- sala de observação (2,0 X 3,0m); SP- sala de preparo de meio (4,0m x 5,0m); SC- sala de crescimento (3,0m x 4,0m) e CV- casa de vegetação (7,0m x 6,0m).

Área de lavagem e esterilização

São necessários equipamentos para lavar e secar vidrarias, autoclave para esterilização de meios, destilador de água ou deionizador. O trabalho de micropropagação envolve o uso de grande quantidade de vidrarias que precisam ser

lavadas e esterilizadas freqüentemente. Para tanto, é conveniente balcões com pias, bandejas de plástico para serem colocadas as vidrarias que serão lavadas e de fácil acesso à água destilada e/ou deionizada.

Geralmente, o processo de lavagem de vidrarias consiste na retirada de meios de cultura, lavagem em água corrente e imersão numa solução com detergente comercial, deixando-as de molho por, no máximo, 24 horas. Após este período, com o auxílio de esponjas e escovas de nylon, o material é lavado e enxaguado em água até remover todo o detergente e, por fim, enxaguado em água destilada e colocado para secagem.

Já existem máquinas próprias para lavagem de vidrarias de laboratório que podem ser adquiridas em companhias especializadas.

A vidraria pode ser seca ao ar, sobre papel de filtro ou papel absorvente, ou em estufas com temperatura regulada para 30-40 °C. Assim que a vidraria estiver seca, esta deve ser conservada em local fechado, a fim de evitar a deposição de pó.

Considerando a necessidade de manutenção da assepsia das culturas, toda vidraria, meios de cultura e instrumentos para a manipulação das culturas in vitro devem ser esterilizados. O método mais comum para a esterilização de meios de cultura é a autoclavagem a 121 °C (1,5 atm), por 15 a 20 minutos. O tempo de esterilização pode variar em função do volume de meio de cultura a ser esterilizado. No caso de meio de cultura ou soluções que possuem substâncias sensíveis à temperatura, deve-se utilizar a esterilização através de filtros estéreis (0,22 e 0,45 µm).

A esterilização por calor seco, isto é, em estufa, é utilizada para esterilizar vidraria (placas de Petri, erlenmeyer, becker, etc.) e instrumentais para manusear as culturas (pinças, cabo de bisturi, estiletos, etc.). A vidraria a ser esterilizada pode ser envolvida por papel alumínio ou de embrulho e os instrumentais em caixas de alumínio ou tubos com tampa. Geralmente, uma temperatura de 150 °C por um período de 3 a 4 horas é suficiente.

Área de preparo de meios de cultura

É o laboratório propriamente dito, local onde são armazenadas as vidrarias, substâncias que compõem os meios de cultura (macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, etc.), equipamentos usados para auxiliar no preparo dos meios, tais como: pH-metro, balanças de precisão, destilador, agitador magnético, estufa, autoclave, banho maria, centrífuga; e para armazenagem de soluções estoques (freezer, refrigerador). Nessa sala, embora haja manipulação e lavagem de explantes, resíduos de solo devem ser eliminados em outro local.

Área de manipulação asséptica ou sala de inoculação

Local onde são realizadas as inoculações e transferências de culturas, em uma câmara de fluxo laminar. A manipulação do material em condições assépticas é essencial para a manutenção da esterilidade. Para tanto, a câmara de fluxo laminar possui um filtro de ar que retém microrganismos e poeiras em geral, deixando o espaço interno com ar estéril e livre de microrganismos. A superfície da câmara deve ser limpa com álcool 70% (v/v) antes de iniciar o trabalho e em intervalos durante o manuseio das culturas para garantir a assepsia. Quando possui uma luz ultravioleta (germicida) deve ser ligada 15 minutos antes de iniciar os trabalhos. Deve-se tomar cuidados com a luz ultravioleta, a qual pode causar lesões nos olhos. Durante o período em que a luz estiver ligada evitar entrar na sala de manipulação. Além da câmara de fluxo laminar, a área de manipulação asséptica deve possuir bicos de Bunsen ou lamparinas para a esterilização dos instrumentos durante o trabalho. Esta sala deve ser mantida sempre fechada e com entrada restrita.

Área de incubação das culturas ou sala de crescimento

Esta área é reservada para que os explantes, em condições controladas de temperatura, luz e fotoperíodo possam desencadear processo de crescimento e morfogênese até à diferenciação em plantas completas. Deve ser um local que facilite o controle de luz e temperatura (média de 25-26 °C) e fotoperíodo, normalmente de 16 h luz/8 h escuro.

Estas condições podem ser obtidas através de salas aclimatizadas, controlando-se a temperatura com ar condicionado e fornecimento de luz através de lâmpadas fluorescentes branca-fria (comum) e/ou grow-lux (especial). O sistema de refrigeração precisa controlar a temperatura para que não se eleve acima de 30° C e abaixo de 15° C. Esta sala deve possuir estantes metálicas para apoio dos frascos, onde são instaladas as lâmpadas. São geralmente estantes de aço, e as lâmpadas são fixadas na parte inferior da prateleira, distanciadas 40 cm a 50 cm entre si.

Dependendo do mecanismo de regeneração de planta e da espécie, em alguns casos é necessária incubação de cultura no escuro através do uso de câmara do tipo Biosystem Organized Development-BOD, ou de salas aclimatizadas na ausência de luz, além das culturas de células em suspensão, que deve ser feita sob agitação. Os agitadores devem estar instalados dentro da sala climatizada.

Área de observação e exame das culturas

Para um laboratório de produção de mudas pode ser dispensada, entretanto para pesquisa é necessária, para observação de órgãos e tecidos como meristemas, embriões, células, protoplastos, calos. Para tanto, são necessários microscópios estereoscópios, composto e invertido. Se possível devem possuir uma câmara fotográfica acoplada.

Área para aclimação das plantas

Antes das plantas produzidas em laboratório serem levadas a campo, precisam passar por um processo de adaptação. Para tal, é necessário que anexo ao laboratório estejam disponíveis casa de vegetação, telados ou estufas de plástico, que permitam a instalação de câmaras úmidas. O ambiente deve ser saturado de umidade através de sistema de irrigação por nebulização intermitente. Para a aclimação, as plantas devem, preferencialmente, ser transferidas para substratos estéril, individualizadas em saquinhos de plástico, copos de plástico, bandejas de isopor ou bandejas de plástico sob condições iniciais de baixa iluminação, inicialmente, sombrite a 70% e, posteriormente, a 50%. No mercado, existem substratos comerciais como plantmax, plantagro, etc., substratos usados para plantas ornamentais e outros que podem ser utilizados.

Quando da instalação do laboratório, o mais importante é a disposição das diversas áreas e equipamentos, de modo a torná-lo o mais funcional possível, facilitando a movimentação de pessoal e materiais, mas com acesso restrito e circulação de pessoas às áreas de manipulação asséptica e incubação das culturas.

MANUSEIO DE EQUIPAMENTOS

No manuseio dos equipamentos, ler com atenção o manual antes do seu uso. Seguir as orientações dos fabricantes com a finalidade de uma boa conservação dos equipamentos e evitar acidentes.

Balança analítica de precisão - não utilizar recipientes para pesagem das substâncias químicas cujo peso seja próximo ao da capacidade máxima da balança. Após o uso, limpar para evitar resíduos que danifiquem a balança, preferencialmente, manter a balança sempre ligada.

pH metro - na medição do pH, utilizar sempre um agitador magnético para homogeneizar a solução. Atentar para a limpeza dos eletrodos.

Autoclave - verificar antes do funcionamento do aparelho o nível d'água. Não autoclavar por tempo maior que o indicado. Evitar o uso do autoclave desnecessariamente, planejar as quantidades de materiais a serem autoclavados de acordo com a sua capacidade. Abrir logo o autoclave, assim que a pressão chegue a zero, para auxiliar o resfriamento.

Fluxo laminar - a assepsia do equipamento com álcool deve ser a 70%, acima desta concentração pode provocar incêndios. O fluxo laminar deve ser ligado preferencialmente, 15 a 20 minutos antes do uso. Após a utilização, fazer a assepsia do mesmo.

Estufa - na secagem das vidrarias, evitar colocar na estufa vidrarias com excesso de água. Quando a estufa estiver esterilizando, ao abrir desligue-a, utilizando o sistema liga-desliga, para melhor conservação da mesma. Materiais esterilizados devem ser retirados para proporcionar espaço para nova esterilização.

Agitador magnético - preferencialmente as soluções devem ser preparadas em erlenmeyer ou becker, facilitando o manejo durante a operação de homogeneização.

Placa aquecedora ou ebulidor - na preparação do agar, observar a diluição do mesmo. Excesso no tempo de preparação do agar, este pode não mais solidificar.

Lupa binocular - atentar para a limpeza das lentes, antes da utilização na câmara de fluxo laminar. Fazer a assepsia com álcool a 70%, utilizando algodão levemente umedecido.

COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura têm por objetivo suprir as exigências das plantas quanto aos nutrientes, visando atender às condições do explante no seu crescimento *in vitro*. As substâncias químicas com estes elementos devem ter um elevado grau de pureza e de preferência na qualidade analítica (p.a.). O pH dos meios de cultura deve ser ajustado com uso de ácido clorídrico-HCl ou hidróxido de sódio-NaOH, para deixar o meio no pH desejado. A exigência quanto ao pH pode variar de cultivo para cultivo e de espécie para espécie, porém de uma maneira geral é corrigido para pH $5,7 \pm 0,1$.

O preparo do meio de cultura é uma das etapas que mais demanda tempo. Por isso, é conveniente e prático armazenar os componentes do meio de cultura em soluções estoque concentradas. As soluções estoques devem ser preparadas seguindo rigorosamente as concentrações indicadas nos meios de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), B⁵ (Gamborg et al., 1968) e WPM (Lloyd & McCown, 1980). Na concentração das soluções estoque, cada laboratório pode adotar um sistema particular. Entretanto, deve ser tomado cuidado quando do preparo, pois determinados sais não podem ser misturados em uma mesma solução, enquanto que outros precisam ser mantidos em solução estoque pura. Considerar na combinação das substâncias, estabilidade e precipitação. Substância instável deve ser preparada isoladamente para evitar a reação ou precipitação com outras substâncias, ex: $Ca \times PO_4$ ou SO_4 e $Mg \times PO_4$. Todas as soluções estoques de sais devem ser mantidas em frascos bem fechados, em geladeiras, a 4-5°C. Enquanto que soluções estoques de vitaminas devem ser mantidas em pequenos frascos, sob temperatura abaixo de zero. Os principais meios de cultura utilizados são descritos a seguir, com suas respectivas soluções estoques praticadas no laboratório de Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental (Tabelas 1 e 2).

Para o preparo das soluções de subestoque de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pesar 250 mg de cada substância e dissolver em 100mL de água destilada e autoclavada, transferir para frascos pequenos e conservar em freezer.

No preparo da solução de FeEDTA, aquecer a solução de sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e adicionar vagarosamente na solução de Na_2EDTA .

TABELA 1. Composição do meio básico MS (Murashige & Skoog, 1962).

| Nº | Composto | Concentração (mg.L ⁻¹) | Solução estoque (SE) | | | Volume(SE) /1.000 mL |
|-----------------|--|---------------------------------------|----------------------|------------|-----------|-------------------------|
| | | | Concentração | Mg/1.000mL | mg/100mL | |
| Macronutrientes | | | | | | |
| 1 | NH_4NO_3 | 1.650 | 50 X | 82.500 | 8.250 | 20 mL |
| | KH_2PO_4 | 170 | 50 X | 8.500 | 850 | |
| 2 | KNO_3 | 1.900 | 50 X | 95.000 | 9.500 | 20 mL |
| | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 370 | 50 X | 18.500 | 1.850 | |
| 3 | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 440 | 50 X | 22.000 | 2.200 | 20 mL |
| Fe-EDTA | | | | | | |
| 4 | $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 27,8 | 100X | 2.780 | 278,00 | 10 mL |
| | Na_2EDTA | 37,3 | 100X | 3.730 | 373,00 | |
| Micronutrientes | | | | | | |
| | $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 22,3 | 100X | 2.230 | 223,00 | |
| | $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 8,6 | 100X | 860 | 86,00 | |
| | H_3BO_3 | 6,2 | 100X | 620 | 62,00 | |
| 5 | KI | 0,83 | 100X | 83 | 8,30 | 10mL |
| | $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,25 | 100X | 25 | 2,50 | |
| | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0,025 | 100X | 2,5 | 0,25 | |
| | $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,025 | 100X | 2,5 | 0,25 | |
| Vitaminas | | | | (mg/100mL) | (mg/10mL) | |
| | Tiamina - HCl | 0,10 | 500X | 5,00 | 0,50 | |
| | Piridoxina - HCl | 0,50 | 500X | 25,00 | 2,50 | |
| 6 | Ácido nicotínico | 0,50 | 500X | 25,00 | 2,50 | 2 mL |
| | Glicina | 2,00 | 500X | 100,00 | 10,00 | |
| | Mio-inositol | 100,00 | 500X | 5.000,00 | 500,00 | |
| Fonte carbono | | | | | | |
| | Sacarose | 30.000 | 3% | | | |
| | PH | | | | | 5,8 |

Obs. Os macronutrientes podem ser pesados em balança de pesagem rápida com aproximação de 0,1g.

A solução de vitamina deve ser conservada em frascos pequenos em freezer.

TABELA 2. Composição do meio básico B₅ (Gamborg et al. 1968).

| Nº | Composto | Concentração | | Solução estoque (SE) | | Volume (SE) /1.000 mL |
|------------------------|--|-----------------------|-------|----------------------|------------------------|-----------------------|
| | | (mg.L ⁻¹) | | Concentração | Mg/1.000mL mg/100mL | |
| Macronutrientes | | | | | | |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 134,0 | 50 X | 6.700 | 670 | |
| 1 | KNO ₃ | 2.500,0 | 50 X | 125.000 | 12.500 | 20 mL |
| | MgSO ₄ .7H ₂ O | 250,0 | 50 X | 12.500 | 1.250 | |
| | NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O | 150,0 | 50 X | 7.500 | 750 | |
| 4 | Fe-EDTA | | | | | |
| MS | FeSO ₄ .7H ₂ O | 27,8 | 100 X | 2.780 | 278 | 20 mL |
| | Na ₂ EDTA | 37,3 | 100 X | 3.730 | 373 | |
| 3 | Cálcio | | | | | |
| MS | CaCl ₂ .2H ₂ O | 150 | 50 X | 7.500 | 750 | 20/6,82mLMS |
| Micronutrientes | | | | | | |
| | MnSO ₄ . H ₂ O | 10 | 100 X | 1.000 | 100 | |
| | ZnSO ₄ .7 H ₂ O | 2 | 100 X | 200 | 20 | |
| 5 | H ₃ BO ₃ | 3 | 100 X | 300 | 30 | 10 mL |
| | KI | 0,75 | 100 X | 75 | 7,5 | |
| | NaMoO ₄ .2 H ₂ O | 0,25 | 100 X | 25 | 2,5 | 10 mL |
| | CuSO ₄ .5 H ₂ O | 0,025 | 100 X | 2,5 | 0,25 | |
| | CoCl ₂ .6 H ₂ O | 0,025 | 100 X | 2,5 | 0,25 | |
| Vitaminas | | | | (mg/100mL) | (mg/10mL) | |
| | Tiamina HCl | 10 | 500 X | 500 | 50 | |
| 6 | Piridoxina HCl | 1 | 500 X | 50 | 5 | 2 mL |
| | Ácido nicotínico | 1 | 500 X | 50 | 5 | |
| | Mio-inositol | 100 | 500 X | 5.000 | 500 | |
| Fonte carbono | | | | | | |
| | Sacarose | 20.000 | 2 % | 2.000 | | |
| | pH | | | | | 5,8 |

No cálculo da concentração das soluções, pode ser utilizada a seguinte fórmula:

$$V_A \cdot C_A = V_B \cdot C_B; \text{ onde: } \begin{array}{l} V_A - \text{volume a ser diluído (inicial)} \\ V_B - \text{volume desejado (final)} \\ C_A - \text{concentração da solução estoque} \\ C_B - \text{concentração desejada} \end{array}$$

Ex: Preparar 100 mL de meio de cultura contendo $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido indolbutírico (AIB). A solução estoque de AIB tem uma concentração de $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

V_A - volume desconhecido (inicial); V_B - volume final (100mL)

C_A - concentração da solução estoque de AIB ($10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

C_B - concentração desejada ($2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

$$V_A \times 10 = 100 \times 2, \text{ onde } V_A = 20\text{mL}$$

- Solução de hidróxido de potássio (KOH) a 1N (um normal)

Pesar 5,6g de KOH e diluir em 100mL de água destilada. Tomar 50mL da solução, retirar 25ml para 0,5N; 12,5mL para 0,25N e 5mL para 0,1N. Em seguida completar todas as soluções para 50mL.

- Solução de ácido clorídrico (HCl) a 1N

Toma-se 8,3 mL da solução padrão e completa-se para 100mL com água destilada. Para obter 0,5; 0,25 e 0,1N, o procedimento é igual ao da solução de hidróxido de potássio.

- Solução de Fe EDTA

Dissolver 3,75g de Na_2 EDTA em 500mL de água destilada. Dissolver 2,78g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 500mL de água destilada. Em seguida, juntar as soluções de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ lentamente com a de Na_2 EDTA em um balão volumétrico de 1000mL.

DEFINIÇÕES QUÍMICAS: PESO MOLECULAR E MOLARIDADE

Compostos e sais - um composto é uma única substância composta de átomos de dois ou mais elementos. Um sal é um composto que em solução produz outros ions, quer hidrogênio (H^+) ou hidroxila (OH^-).

Ions - Um ion é um átomo ou grupo de átomos que carrega uma carga elétrica positiva ou negativa.

Peso molecular - A fórmula química ou peso molecular de um composto químico é a soma dos pesos atômicos dos elementos do qual está composto.

| Símbolo químico | Peso atômico | Número de átomos | Peso |
|-----------------|----------------|------------------|---------|
| K | 39,102 | 1 | 39,102 |
| N | 14,0067 | 1 | 14,0067 |
| O | 15,9994 | 3 | 47,9982 |
| | Peso molecular | | 101,11 |

A fórmula química do nitrato de potássio é KNO_3 . Esse é composto de um átomo de potássio, um átomo de nitrogênio e três átomos de oxigênio. O peso molecular é calculado a seguir:

O peso molecular de um composto é expresso em gramas. Também é conhecido como um mole grama ou mole (abreviado para mol). Assim, um mol de KNO_3 tem uma massa de 101,1g.

Uma solução molar é preparada dissolvendo um mol de uma substância (soluto) em um solvente suficiente (água no caso de meio de cultura) para fazer um litro de solução. Assim, **molaridade** é o número de moles de um composto dissolvido em um litro de solução. Portanto, a quantidade de solvente varia com a massa de soluto dissolvido. Molaridade é ainda expressada pelo sufixo M. Portanto:

Uma solução de 101,1g de KNO_3 em um litro de água contém 1 M;

Uma solução contendo 1/1000 (10^{-3}) mol por litro contém 1 mM;

Uma solução contendo 1/1000000 (10^{-6}) mol por litro contém 1 μM ;

1 mM (10^{-3}M) de solução de KNO_3 contém $0,1011\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ou $101,1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Se $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) induz à formação de calos para a mesma dimensão como $2,5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido indolacético (AIA), qual é a mais efetiva auxina? O peso molecular de 2,4-D é 221,04 e de AIA, 175,19.

2,4-D: $1\text{M} \rightarrow 221,04\text{g}\cdot\text{L}^{-1} = 1\mu\text{M} \rightarrow 0,00022104\text{g}\cdot\text{L}^{-1} = 0,22104\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

$1\mu\text{M} \rightarrow 0,22104\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ _____ AIA: $2,5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ _____ =
 $14,27\mu\text{M}$

x $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ x = $13,57\mu\text{M}$ $0,17519\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

A auxina mais efetiva é 2,4-D, porque um menor número de moléculas é envolvida.

Como transformar μM em mg e vice-versa através de fórmula.

Cálculo: $\text{PM} \times \mu\text{M} \times 10^{-3} = \text{mg}$ 3mg de 2,4-D em μM

$221,04 \times \mu\text{M} \times 10^{-3} = 3\text{mg} \Rightarrow \mu\text{M} = 3000/221,04 = 13,57$

TÉCNICAS DE ASSEPSIA

Explante - após ter sido selecionado o explante, procede-se a sua desinfestação superficialmente, uma vez que no meio de cultivo podem crescer microorganismos principalmente, bactérias e fungos, competindo vantajosamente com o explante. No processo de desinfestação, tem sido utilizado vários compostos como hipoclorito de sódio (NaOCl) e de cálcio (CaOCl), em concentrações que variam de 0,5% a 3%, dependendo do tipo de explante. Álcool sob diferentes concentrações, termoterapia e outros associados ou não e sob diferentes tempo de imersão dos explantes, em geral de 10 a 30 minutos, tem sido utilizados. Posteriormente, procede-se a lavagem dos explantes por três a cinco vezes em água destilada esterilizada. Um procedimento geral para preparar o explante é apresentado a seguir:

1- lavar o explante em água e sabão, em seguida em água corrente, ou

2- lavar o explante em água corrente por um período de 1 a 3 horas.

3- colocar o explante em termoterapia (45°C) por um período de 10 minutos, ou

4- lavar em álcool a 70% por 5 segundos, ou

5- imergir o explante em uma solução de NaOCl a 0,6% mais duas gotas de Tween-20 ou detergente comercial para 100mL de solução por 10 minutos, sendo 5 minutos em agitação e o restante sob a capela de fluxo laminar.

6- lavar de três a cinco vezes o explante em água destilada esterilizada. Em seguida, transferir o explante para o meio de cultura. Obs. os itens 1, 3 e 4 serão utilizados preferencialmente em explantes provenientes diretamente do campo.

Recomenda-se instalar um experimento preliminar sem reguladores de crescimento e com a metade da concentração dos sais para teste de assepsia dos explantes antes da instalação final do experimento.

Vidrarias - toda vidraria deve ser enxaguada com detergente, lavada em água comum e em seguida em água destilada, preferencialmente, de um dia para outro. Vidrarias utilizadas na incubação dos explantes devem ser antes da lavagem, autoclavadas.

Salas - devem estar sempre limpas. A sala de preparo dos meios de cultura deve ser limpa com sabão diariamente, com um pano úmido no chão. As demais salas, semanalmente. A fumigação deve ser realizada nas salas de crescimento e transferência quando ocorrer a presença de formigas, ácaros ou pulgões.

Pessoal - a higiene pessoal (cabelo, barba, unhas, etc.), sapatos, adereços (relógios, colar, anel, etc.) devem ser retirados na sala de transferência, quando o operador estiver manipulando na capela de fluxo laminar. Recomenda-se durante a operação, utilizar luvas, máscara e jalecos.

Esterilização - os meios de cultura, em geral, são autoclavados de 15 a 20 minutos à 121°C, porém materiais contaminados devem ser autoclavados por 30 minutos.

ESCOLHA DO EXPLANTE

O explante é um fragmento do tecido da planta colocado dentro do meio de cultura. Qualquer parte do tecido da planta pode ser usado como explante (Figura 4). A escolha do explante, é determinado pelo objetivo final do projeto da cultura de célula. Na escolha do explante observar o estado fitossanitário, fisiológico e nutricional da fonte doadora in vivo. Atentar para a localização, explantes muito lenhosos não induzem a regeneração e são mais facilmente contaminados, quanto mais jovem o explante, melhores serão os resultados.

Para induzir a propagação, utilizar segmentos caulinares, gemas apicais e axilares e embriões somáticos. Na indução de calos, folhas e segmentos caulinares são os mais utilizados.

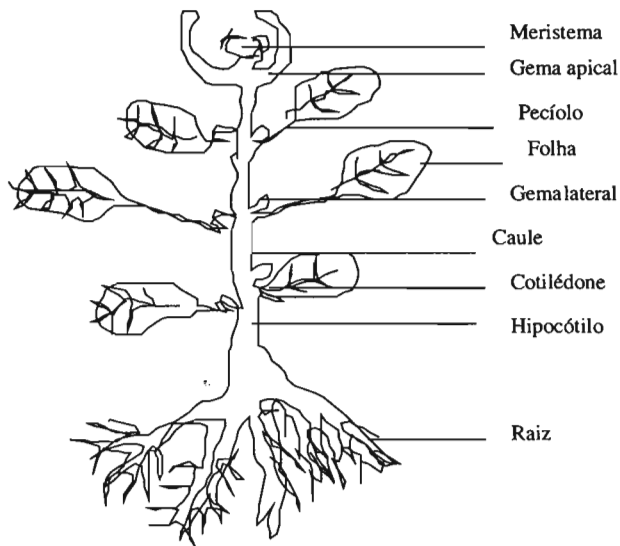


Figura 4. Fonte de explantes.

INDUÇÃO DE CALOS

Como primeiro passo em vários experimentos de cultura de tecidos, é necessário induzir a formação de calos a partir de explante primário. Este explante deve ser um "seedling" germinado assepticamente ou superfície esterilizada de raiz, segmento caulinar, folhas ou estruturas reprodutivas. O calo é um tecido produzido em resposta a uma injúria física ou química. Nem todas as células em um explante contribuem para a formação de calos, o mais importante é que existem certos tipos de células de calos que são competentes para regenerar estruturas organizadas, enquanto outros tipos de células não parecem ser competentes para expressar a totipotencialidade. Antes uma seleção

visual é usualmente necessária para selecionar o tipo de célula que é regenerável. A formação de calos é controlada pelo nível de regulador de crescimento (auxina e citocinina) no meio de cultura.

A concentração dos reguladores de crescimento pode variar para cada espécie de planta e pode ainda depender da fonte do explante ou da planta individual. As condições de cultura (temperatura, luz, etc.) são também fatores importantes na formação e no desenvolvimento de calos. Uma vez estabelecida, a cultura de calos deve ser usada para uma variedade de experimentos. A cultura de calos será usada para estudar: isolamento de protoplastos, tipos de células, seleção celular, embriogênese somática, organogênese e a produção de produtos secundários.

Dentre os reguladores de crescimento mais utilizados na indução de calos destacam-se o 2,4-D, ANA (ácido naftaleno acético) e atualmente o TDZ (thidiazuron) em concentrações maior que $1\mu\text{M}$. O meio sólido de cultivo é o mais utilizado, porém para o cultivo de células em suspensão o meio líquido sob agitação é o mais viável. A escolha e a posição do explante no meio de cultura são fatores que devem ser considerados conforme a Figura 5.

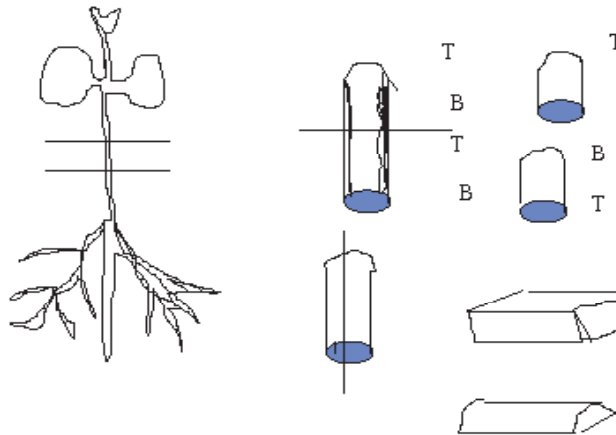


Figura 5. Posição do explante de hipocótilo de seedling.
T = topo; B = base.

CULTIVO DE CÉLULAS

No cultivo de células em suspensão, levar em consideração o tipo de calo a ser utilizado. Os calos devem ser do tipo friável, sem sinais de oxidação e/ou envelhecimento. Primeiramente, são obtidos os calos, após três subcultivos a intervalos de três a quatro semanas no mesmo meio e condições de cultura, esses são transferidos para um meio líquido em erlenmeyers contendo 30 mL do meio de cultura. Posteriormente, são colocados em uma mesa de agitação com uma velocidade que vai depender dos objetivos, ou seja, para produção de metabólitos secundários, utilizar de 50 a 110 rpm sob 6,25 a 12,5 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância.

As células são cultivadas de três a quatro semanas, dependendo da espécie, quando são subcultivadas pelo mesmo período. A curva de crescimento é determinada através do peso das células obtido a intervalos de três a quatro dias durante um período de 28 a 36 dias, dependendo da espécie. Primeiramente, é determinado o peso fresco e em seguida, as células são colocadas em estufa a 45°C durante 24 horas, e logo após, estimado o peso seco.

O percentual de crescimento é determinado subtraindo o peso da matéria fresca final (PF) do peso da matéria fresca inicial (PI), dividindo este valor pelo peso da matéria fresca final e multiplicando o resultado por 100, através da fórmula $[(PF - PI) \div PF] \times 100$.

De posse dos dados, o gráfico da curva de crescimento é obtido podendo ser identificadas as diferentes fases distintas que proporcionarão uma curva de crescimento do tipo sigmóide.

A Figura 6 mostra um exemplo da curva de crescimento da erva-baleeira (*Cordia verbenacea* – Boraginaceae).

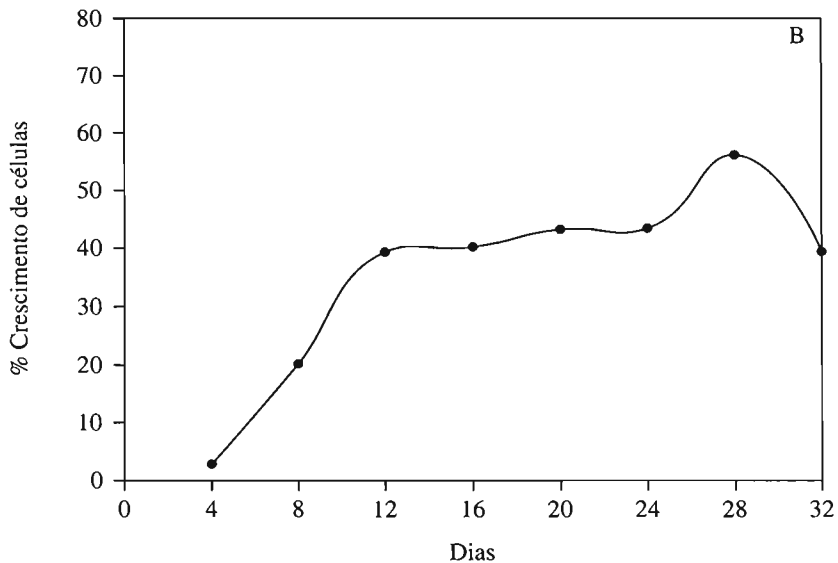
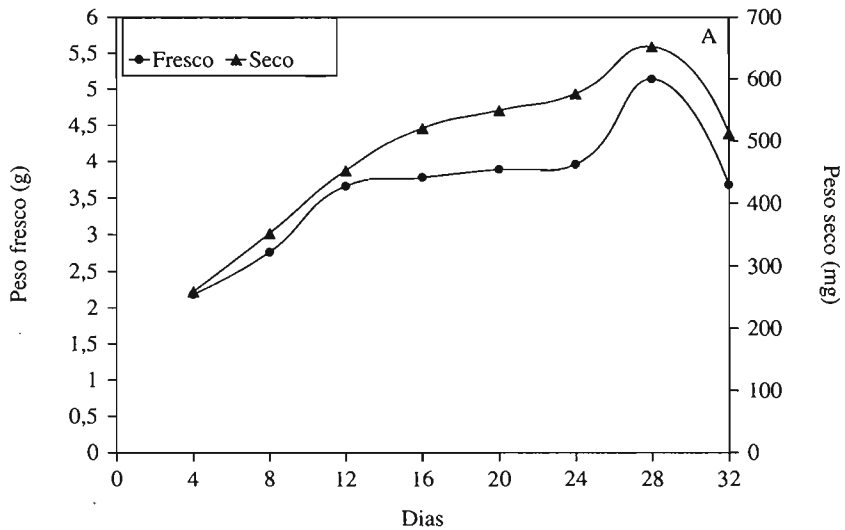


Figura 6. Curva de crescimento de células em suspensão de *Cordia verbenacea* a partir do peso fresco e seco (A) e do percentual de crescimento (B).

PROTOCOLOS DE MICROPROPAGAÇÃO DESENVOLVIDOS E UTILIZADOS NO LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL

MICROPROPAGAÇÃO DE BANANEIRA (*Musa* spp. - Musaceae)

Muitos trabalhos têm apresentado que ápices vegetativos de vários clones de *Musa* são muito responsivos à técnica de multiplicação de brotações *in vitro*, caracterizando-se como uma técnica favorável à propagação clonal rápida de vários clones comercialmente importantes.

No Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, as cultivares freqüentemente micropropagadas de banana são: Yangambi (Caipira), Prata Anã, Thap Maeo, Fhia-01, PV 0344, PV 0376, Pioneira e Zulu.

Para a produção de mudas de bananeira através da biotecnologia, as seguintes etapas devem ser desenvolvidas:

Multiplicação de brotos

A principal fonte de explantes são plantas pequenas (tipo chifre) a partir da qual são extraídos os ápices caulinares. O preparo do explante é realizado através da retirada das bainhas foliares e parte do rizoma até atingir cerca de 50 mm de pseudocaule, 30 mm de rizoma e 30 mm de diâmetro. Em seguida, são imersos em álcool 70% (v/v) por cerca de um minuto. Posteriormente, são submetidos ao tratamento de assepsia com hipoclorito de sódio NaOCl (1-2 %), dependendo das condições do material, com algumas gotas de Tween 20 (0,01% v/v) durante 15 minutos. Após, sob câmara de fluxo laminar asséptica, são lavadas cinco vezes com água destilada esterilizada.

Após as lavagens com auxílio de pinças e bisturis, são reduzidos a 10 mm de pseudocaule e 5 mm de rizoma e inoculados em meio de cultura MS solidificado a 0,7%, contendo 2,5 mg.L⁻¹ de BAP, Polivinilpirrolidone – PVP a 0,1% e sacarose a 3% sob condições de temperatura de 26±2 °C, baixa iluminação (12 μmol.m⁻².s⁻¹ de irradiância) e fotoperíodo de 16h luz/dia. Após duas a três semanas são transferidos para novo meio de cultura com BAP (4,5 a 5,0 mg.L⁻¹) sob condições semelhantes, mas com iluminação de 25 μmol.m⁻².s⁻¹ de irradiância, porém faz-se previamente uma limpeza através da excisão de parte do tecido oxidado e bainha de folhas desenvolvidas.

A proliferação de brotos ocorre, e a cada quatro a seis semanas são realizados de quatro a cinco subcultivos, individualizando os brotos e cultivando-os no mesmo meio de cultura e condições ambientais. Normalmente, não é necessário o alongamento de brotos e estes são transferidos diretamente para enraizamento.

Enraizamento de brotos

“In vitro”

Os brotos são cortados (2,0 cm a 3,0 cm de pseudo-caule e rizoma) e transferidos para o meio MS com a metade de concentração de sais (MS/2) com sacarose 3% sob as mesmas condições anteriores de cultivo.

“Ex vitro”

Nesse processo, os brotos mais desenvolvidos são transferidos diretamente para bandejas ou copos descartáveis contendo o substrato que será usado durante a aclimatização das plantas.

Aclimatização das plantas

As plantas são inicialmente transferidas para bandejas ou copos descartáveis com substrato comercial ou solo (terra preta) mais vermiculita, na proporção de 2:1, permanecendo sob condições de umidade saturada e baixa iluminação de três a cinco dias, para, em seguida, serem transferidas para sacos de plástico sob casa de vegetação, nos quais a partir de três meses já é possível levar para campo.

Embora seja eficiente a propagação rápida da bananeira superando os métodos tradicionais e com uma taxa de 20 a 40 mudas por rizoma tratado a cada 120 dias (Lameira, 1992) é recomendável somente para uso por pequenos produtores.

MICROPROPAGAÇÃO DE ABACAXIZEIRO (*Ananas comosus* (L.) Meer - Bromeliaceae)

A micropropagação do abacaxizeiro no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental é realizada com as cultivares: perolera, primavera e cabeça-de-onça, todas sem espinhos e resistentes à fusariose.

Estabelecimento e multiplicação de brotos

A partir de plantas de abacaxizeiro, perfilhos ou co-roas, são retiradas as folhas e, as gemas axilares são excisadas do caule e inoculadas em meio MS completo com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP para estabelecimento. Com cerca de quatro a seis semanas as gemas estabelecidas e entumescidas são transferidas para o mesmo meio MS solidificado a 0,7% ou líquido contendo 2,5 a $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e 0,0 ou $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA com sacarose a 3%, cultivadas sob condições de temperatura $26 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16h de luz e 8h no escuro, e intensidade de iluminação de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância.

O meio líquido de cultivo geralmente induz uma menor taxa de multiplicação. Entretanto, permite a formação de brotos sem a necessidade de transferência para um meio de alongamento.

Alongamento de brotos

Brotos proliferados em forma de roseta são transferidos para meio MS contendo ácido giberélico (AG_3) em concentrações variadas de 0,0 a 5,0 $mg.L^{-1}$, com sacarose a 3% sob as mesmas condições anteriores de cultivo de proliferação de brotos, dependendo do maior ou menor tempo para atingir um tamanho favorável ao enraizamento (com cerca de dois a quatro pares de folhas).

Enraizamento de brotos

Brotos desenvolvidos devem ser transferidos para meio de cultura, sólido ou líquido, com a metade dos sais de MS, vitaminas, sacarose a 3%, ágar 0,7 % sem regulador de crescimento ou com uma concentração de 0,25 a 1,0 $mg.L^{-1}$ de AIB.

Acclimação das plantas

As plantas ao serem retiradas dos frascos devem ser bem lavadas para retirar todo o resíduo de açúcar e transferidos para copos de plástico ou bandejas sob substrato comercial organomineral (Plantmax HS ou similar) ou substrato composto de terra, serragem e matéria orgânica (2:1:1 v/v), sob condições de 70% de iluminação e umidade saturada nos primeiros cinco dias. Após este período, a umidade diminui e a iluminação aumenta para 50%, permanecendo sob estas condições até desenvolverem novas folhas e ficarem mais resistentes. Após apresentarem um desenvolvimento normal, podem ser transferidas para sacos de

plástico ou permanecerem em bandejas para 24 células e com cerca de três a quatro meses é possível levar para o campo.

MICROPROPAGAÇÃO DE IPECACUANHA (*Psychotria ipecacuanha* Stokes)

A micropropagação constitui uma metodologia eficiente para a multiplicação de plantas de ipeca em curto espaço de tempo. Trabalhos desenvolvidos por Lameira et al. (1994); Costa, (1995); Lameira et al. (1997) mostram essa eficiência.

Estabelecimento e multiplicação

Fonte de explantes - a partir de plântulas obtidas por enraizamento de estaca de raiz em condições de casa de vegetação ou em câmaras instaladas em salas assépticas. O explante utilizado para cultivo é o segmento internodal.

Assepsia - lavar os explantes em hipoclorito de sódio a 1,5% durante 15 minutos, em seguida sob fluxo laminar, lavar quatro vezes em água destilada e autoclavada.

Meio de cultura - B5, solidificado com 0,7% de agar, complementado com 0,11 μM de BAP na cultura inicial e no meio de cultura de MS, com a mesma concentração nas subculturas para a produção de brotos, durante quatro semanas.

Condições de cultivo - em 16 h luz de fotoperíodo sob 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de irradiância, em temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

Alongamento de brotos

O alongamento objetiva acelerar o crescimento dos brotos em forma de rosetas. Utilizar o meio MS, complementado com 0,01 μM de AG₃ durante cinco dias.

Enraizamento

O enraizamento é obtido no meio de cultura MS, complementado com 0,61 μM de AIB, durante uma semana de cultivo, após transferir para o meio MS/2 sem regulador de crescimento.

Aclimação

Após a formação das plântulas, transferir para uma casa de vegetação ou telado, contendo irrigação por nebulização e sombreamento de 70% da radiação solar. Após duas semanas, transferir para bandejas ou sacos de plástico em condições de sombreamento em torno de 50% e com irrigação semelhante a anterior.

MICROPROPAGAÇÃO DE PIMENTA-DO-REINO (*Piper nigrum* L.)

A utilização das técnicas de cultura de tecidos coloca à disposição alternativas para incremento da produção de mudas de pimenta-do-reino isentas de patógenos.

Fonte de explantes – Plântulas germinadas “in vitro”.

Explante para cultivo – Inicialmente ápice caulinar, a partir do primeiro subcultivo são utilizados também segmentos nodais.

Assepsia – As sementes maduras devem ser despoldadas, lavadas em água corrente e sabão neutro. Para desinfestação, deve ser usado álcool 70% por um minuto e hipoclorito de sódio a 2,0% durante 15 minutos, sob fluxo laminar. Em seguida, lavar quatro vezes em água destilada autoclavada.

Meio de cultura para estabelecimento – Meio MS suplementado com 1,0mg.L⁻¹ de AIA durante dez dias.

Meio de cultura para proliferação de brotos - Meio MS suplementado com 2,5mg.L⁻¹ de BAP.

Condições de cultivo - Em 16 h luz de fotoperíodo sob 25 μmol.m⁻².s⁻¹ de irradiância, em temperatura de 26 ± 1°C.

Alongamento – Quando necessário, utilizar somente MS suplementado com 0,3mg.L⁻¹ de AG₃.

Fase de enraizamento – Meio MS complementado com 0,5 mg.L⁻¹ de ANA.

Aclimação – As plântulas formadas devem ser lavadas e colocadas em bandejas de plástico ou isopor com substrato organomineral (Plantmax HS ou similar). Transferir para casa de vegetação ou telado com irrigação por nebulização e 70% de sombreamento. Transferir para saco de plástico quando as mudas atingirem 15 cm de altura.

MICROPROPAGAÇÃO DE CURAUÁ (*Ananas erectifolius*)

A propagação vegetativa utilizando técnicas de cultura de tecidos pode ser um valioso instrumento na propagação clonal rápida de mudas de curauá, em larga escala. No caso do curauá, é possível em cinco meses serem obtidas 625 mudas a partir de apenas uma gema cultivada “in vitro”, enquanto que pelo método convencional, uma planta adulta é capaz de produzir no máximo 40 mudas por ano.

Fonte de explantes – Plantas adultas de campo.

Explante para cultivo – Gemas axilares.

Assepsia – As gemas axilares devem ser lavadas em água corrente e sabão neutro por 30 minutos. Para desinfestação, utilizar álcool 70% por um minuto e hipoclorito de sódio a 2,5% durante 15 minutos em agitação, sob fluxo laminar. Em seguida, lavar quatro vezes em água destilada autoclavada.

Estabelecimento – Meio MS sem regulador de crescimento.

Proliferação de brotos – Meio MS suplementado com concentrações que variam de 0,5 a 2,0mg.L⁻¹ de BAP, alternado com cultivo em meio MS sem regulador de crescimento.

Condições de cultivo – em 16 h luz de fotoperíodo sob 25 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância, em temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

Alongamento – Quando necessário, utilizar somente a metade da concentração dos sais do meio (1/2MS).

Fase de enraizamento – Meio (1/2MS), não necessitando de regulador de crescimento.

Aclimação – As plântulas formadas devem ser lavadas e colocadas em bandejas de plástico ou isopor com plant-max. Transferir para casa de vegetação ou telado com irrigação por nebulização, com 70% de sombreamento. Transferir para saco de plástico quando as mudas atingirem 20 cm de altura.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- ANDRADE, M.W. de; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S.; MELO, P.R.A. de. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr.All). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.1, p.174-180, jan./mar. 2000.
- COSTA, M. P. da. **Desenvolvimento e teor de alcalóides em plantas de ipeca (*Cephaelis ipecacuanha* A. Richard.) obtidas "in vitro" submetidas às condições nutricionais em casa de vegetação**. Lavras: UFLA, 1995. 61p. Dissertação Mestrado.
- FACHINELLO, J.C.; HOFFMAN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G.R. de L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2.ed. Pelotas: UFPEL, 1995.179p.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. **Experiment Cell Research**, v.50, p.151-158, 1968.
- GEORGE, E.F. Plant propagation and micropropagation. In: GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**: 2.ed. Edington: Exegetics, 1993. v.1: The Technology. Cap.2, p.37-66.
- GEORGE, E.F. Appropriate regulants and media. In: GEORGE, E.F. **Plant propagation in tissue culture**. 2.ed. Edington: Exegetics, 1996. v.2: In practice. Cap.12, p.575-638.
- GUPTA, R. Ipecac a promising subsidiary crop for north-eastern plantation regions. **Indian Farming**, v.21, p.19-21, 1971.
- LAMEIRA, O.A.; COSTA, M.P. da.; PINTO, J.E.B.P. The efficiency of shoot and plantlet formation of *cephaelis ipecacuanha* after three subcultures *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.24, n.3, p.523-526, 1994.
- LAMEIRA, O.A.; COSTA, M.P. da C.; PINTO, J.E.B.P.; GAVILANES, M.L. Tissue culture propagation of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard: effect of growth regulators on plantlet root formation. **Ciência e Agrotecnologia**, v.21, n.3, p.390-392, jul./set. 1997.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, v.15, p.416, 1980.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental
Trav. Dr. Enéas Pinheiro s/n, Caixa Postal 48
Cep 66017-970 - Belém - PA.
Fone: (91) 299-4500 - Fax (91) 276-9845
<http://www.embrapa.com.br>*

Patrocínio:



Av. das Nações Unidas, Condomínio Paraíso III, n.7
Bairro da Flores / Benevides-PA - CEP 68795-000
Fone: 9987-5308/(91) 3724-3328
e-mail: bionorte@nautilus.com.br



Av. Almirante Barroso, 71(Shopping São Braz)
2º piso loja 35. Tel.: (91) 226-2857 - 228-3771
e-mail: amazonfl@amazon.com.br

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA
E DO ABASTECIMENTO



Trabalhando em todo o Brasil