

MANUAL DO MODELO VEGETAL MICRO-TOM

CAPÍTULO 5: PROTOCOLOS PARA CULTIVO *IN VITRO* E TRANSFORMAÇÃO DE MICRO-TOM

Simone Pacheco Lombardi-Crestana, Lilian Ellen Pino, Mariana S. Azevedo & Lázaro E. P. Peres

No presente capítulo serão apresentados alguns protocolos utilizados para o cultivo *in vitro* de Micro-Tom.

ÍNDICE

PROCEDIMENTOS PARA CULTIVO <i>IN VITRO</i>	
Protocolo	Pg.
Obtenção de explantes cotiledonares e hipocotiledonares para regeneração <i>in vitro</i> de tomateiro-----	02
Obtenção de explantes discos foliares de plantas adultas para regeneração <i>in vitro</i> de tomateiro-----	03
Germinação de sementes <i>in vitro</i> de tomateiro-----	04
Germinação de sementes em gerbox-----	05
MEIOS PARA CULTURA DE TECIDO E ORGÃOS DE TOMATEIRO	
Protocolo	Pg.
Meio para regeneração <i>in vitro</i> de hipocótilos e cotilédones de tomateiro-----	06
Meio para regeneração <i>in vitro</i> de raízes de tomateiro-----	07
Meio para indução de raízes em cotilédones em tomateiro-----	08
Meio para indução de calos em tomateiro-----	09
Meio para germinação <i>in vitro</i> de tomateiro-----	10
Meio MS-----	11
SOLUÇÕES ESTOQUE	
Protocolo	Pg.
Solução estoque de Macronutrientes do MS-----	12
Solução estoque de Micronutrientes do MS-----	13
Solução estoque de vitaminas de Nitch-----	14
Solução de FeEDTA-----	15
Solução estoque de vitaminas do MS-----	16
Utilização de hormônios e reguladores de crescimento-----	17

Obtenção de explantes cotiledonares e hipocotiledonares para regeneração *in vitro* de tomateiro

Para obtenção dos explantes deve-se **germinar as sementes *in vitro***.

- Fonte de explante: plântulas com 8 dias (4 dias no escuro e 4 dias no claro) após inoculação das sementes.
 - Remover os cotilédones com auxílio de um bisturi, cortar as extremidades e cortar ao meio (transversalmente).
 - Obtenção do hipocótilo, cortar tamanhos de aproximadamente 1 cm.
 - Inocular em placas descartáveis estéreis contendo 30 mL de **meio para regeneração *in vitro* de hipocótilos e cotilédones de tomateiro**.
 - Os explantes devem ser inoculados com a superfície abaxial em contato com o meio (20 explantes /placa).
 - Vedar as placas com parafilme

 - Cuidados gerais no fluxo laminar asséptico:
 - Ligar e limpar o câmara de fluxo laminar trinta minutos antes do uso. Após limpeza ligar a luz U.V., a qual deve ficar ligado por 20 minutos. Não deixar nenhum material vegetal nem meio de cultura no fluxo enquanto a luz U.V. estiver ligada.
 - Os materiais a serem utilizados (pinça, água destilada, placa de Petri com papel de filtro, estilete) devem ser autoclavados previamente e mantidos na estufa (exceto a água) até o momento do uso.
 - Manter explantes em placa de Petri com papel de filtro umedecido com a água estéril para evitar a desidratação do material.
 - Manter recipiente com sal de permanganato para eliminar etileno vindo da chama.
-

Obtenção de explantes discos foliares de plantas adultas para regeneração *in vitro* de tomateiro

- Utilizar plantas jovens e folhas jovens (ainda não totalmente expandidas) de cultivares/espécies com alto potencial organogenético crescidas em casa de vegetação (não utilizar material vindo de campo);
 - Lavar as folhas com água destilada abundante;
 - Colocar em álcool (70 %) e imediatamente substituí-lo por cândida (2 - 2.5 % de hipoclorito) 20 % + 0.1 % de Tween 20 (deixar 15 min); (obs: 0,1% = 1 mL / 1 L)
 - Lavar 3 vezes com água destilada estéril;
 - Utilizar vazador de 8 mm de diâmetro para retirar os explantes dos folíolos;
 - Cultivar em **meio para regeneração *in vitro* de hipocótilos e cotilédones de tomateiro**
 - Utilizar 15 explantes/ placas com 20 mL meio.
-

Germinação de sementes *in vitro* de tomateiro

Assepsia das sementes

- Colocar as sementes em um béquer com 150 mL de solução comercial de hipoclorito de sódio (30%) com duas gotas de detergente
- Agitar por 15 minutos
- Descartar o líquido, com auxílio de uma peneira de alumínio previamente autoclavada.
- Realizar uma tríplice lavagem nas sementes com água autoclavada
- Transferir as sementes para frascos contendo meio de cultura (30 mL)

Obs.: Colocar de 20-30 sementes por frasco.

Germinação de sementes em gerbox

1. Assepsia das sementes

1.2. Lavar as sementes com solução de hipoclorito de sódio 5% (150 mL) acrescido de 2 gotas de detergente, manter sob agitação por 5 minutos;

1.3. Com auxílio de uma peneira descartar a solução.

1.4. As sementes separadas devem ser lavadas em água corrente para total remoção da solução com hipoclorito. Fazer último repasse em água destilada;

2. Em um gerbox preto, colocar 5 folhas de papel filtro autoclavado e umedecê-lo com água destilada, ou com solução apropriada em caso de análise ou tratamento específico;

3. Espalhar as sementes de forma aleatória deixando espaço suficiente para seu desenvolvimento, umedecer com água (ou solução) sempre que necessário;

4. As sementes deverão permanecer 4 dias no escuro (gerbox preto com tampa preta), e após este período a tampa deve ser trocada por uma transparente, assim submetemos as sementes a luz, onde permanecerá aproximadamente por 10 dias.

5. Para completar o desenvolvimento das plântulas, estas devem ser transferidas para vasos pequenos, com estufinha previamente umedecida, em casa de vegetação.

Meio para regeneração *in vitro* de hipocótilos e cotilédones de tomateiro

O meio para regeneração de hipocótilos e cotilédones de tomateiro consiste no **meio MS**, 3,0% sacarose suplementado com 4 mL da solução estoque de **vitamina B5 (Gamborg)** e acrescido com 5 μM de BA + 0.1 μM AIA (Kut & Evans. *In vitro*, 18: 593-598, 1982).

Preparo de 1 litro de meio:

- Derreter o meio em forno microondas;
- Esperar esfriar sem deixar solidificar;
- Adicionar 1 mL da solução estoque de BA 5 mM (estéril) em fluxo laminar;
- Adicionar 1 mL da solução estoque de AIA 0,1 mM (100 μM) (estéril) em fluxo laminar;
- Distribuir em placas de Petri estéreis ou em frascos previamente esterilizados em autoclave 120 °C 30 min..

Preparo da solução estoque de BA 5 mM:

- Dissolver 0,056 g BA em 50 mL de água (com a ajuda de algumas gotas de HCl 1 M). Miliporar e colocar em um tubo falcon.
- Utilizar 1 mL de solução estoque de BA 5 mM para cada 1 L de meio (o meio ficará então com 5 μM de BA).

Preparo da solução estoque de AIA 0,1 mM:

- Dissolver 0,00175 g AIA em 100 mL de água (com a ajuda de algumas gotas de KOH 1 M). Miliporar e colocar em 2 tubos falcon de 50 mL.
 - Utilizar 1 mL de solução estoque de AIA 0,1 mM para cada 1 L de meio (o meio ficará então com 0,1 μM de AIA).
-

Meio para regeneração *in vitro* de raízes de tomateiro

O meio para regeneração de raízes de tomateiro consiste no meio MS com 2,0 % sacarose, 4 mL de vitamina B5 (Gamborg), 6,0 g. L⁻¹ de ágar (ou outro valor conforme o lote de ágar) e 5 µM de Z .

- Obs: esse meio só é efetivo para cultivares/espécies com capacidade de regeneração a partir de raízes (PERES, L. E. P.; MORGANTE, P. G.; VECHI, C.; KRAUS, J. E. & VAN SLUYS, M-A. Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of different tomato cultivars and wild related species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 65:37-44, 2001.

Preparo de 1 litro de meio:

- Derreter o meio em forno microondas;
- Esperar esfriar sem deixar solidificar;
- Adicionar 1 mL da solução estoque de Z 5 mM (veja abaixo) (estéril) em fluxo laminar;
- Distribuir o meio com hormônio em placas de Petri estéreis.

- Distribuir em frascos de 0,5 a 1 L com tampa rosqueável e esterilizar em autoclave 120 °C 20 min.

Preparo da solução estoque de zeatina 5 mM:

- Dissolver 0,01096 g de Z em 10 mL de água (com a ajuda de algumas gotas de HCl 1 M). Miliporar e colocar em um tubo falcon estéril.
 - Utilizar 1 µL de solução estoque de Z 5 mM para cada 1 mL de meio (o meio ficará então com 5 µM de Z).
-

Meio para indução de raízes em cotilédones de tomateiro

Consiste em meio MS, 3,0% de sacarose acrescido de 0,4 μM ANA e 6,0 g. L^{-1} de agar (ou outro valor conforme o lote de ágar).

Utilização de 1 litro de **meio MS**.

- Derreter o meio em forno microondas;
- Esperar esfriar sem deixar solidificar;
- Adicionar 400 μL da solução estoque de 1 mM (estéril) (veja abaixo) em fluxo laminar;

Preparo da solução estoque de ácido naftaleno acético (NAA) 1 mM:

- Dissolver 0,0186 g de NAA em 10 mL de água (com a ajuda de algumas gotas de KOH 1 M). Diluir a solução, pegar 1 mL da solução e completar o volume de 10 mL com água destilada autoclavada (solução de 1mM). Miliporar e colocar em um tubo falcon.
 - Utilizar 400 μL de solução estoque de NAA 1 mM para cada 1 L de meio (o meio ficará então com 0,4 μM de NAA).
-

Meio para indução de calos em tomateiro

Consiste em meio MS, 3,0% de sacarose acrescido de 2 μ M 2,4-D e 0,2 μ M Kin.

Utilização de 1 litro de **meio MS**.

- Derreter o meio em forno microondas;
- Esperar esfriar sem deixar solidificar;
- Adicionar 1 mL da solução estoque de 2,4 D 2 mM (estéril) (veja abaixo) em fluxo laminar;
- Adicionar 1 mL da solução estoque de cinetina 0,2 mM (estéril) (veja abaixo) em fluxo laminar;
- Adicionar antibióticos (cefotaxime, higromicina e canamicina), conforme o caso
- Distribuir nos frascos previamente esterilizados em autoclave 120 °C 30 min.

Preparo da solução estoque de 2,4-D 2 mM:

- Dissolver 0,022 g de 2,4-D em 50 mL de água (com a ajuda de algumas gotas de KOH 1 M). Miliporar e colocar em um tubo falcon.
- Utilizar 1 μ L de solução estoque de 2,4 D 2 mM para cada 1 mL de meio (o meio ficará então com 2 μ M de 2,4-D).

Preparo da solução estoque de cinetina (Kin) 0,2 mM:

- Dissolver 0,021 g de Kin em 500 mL de água (com a ajuda de algumas gotas de HCl 1 M). Miliporar 50 mL e colocar em um tubo falcon estéril.
 - Utilizar 1 μ L de solução estoque de Kin 0,2 mM para cada 1 mL de meio (o meio ficará então com 0,2 μ M de Kin).
-

Meio para germinação de sementes *in vitro* de tomateiro

Preparo de 1 litro de meio:

- Adicionar 62,5 mL solução estoque (8x) de macronutrientes do meio MS
 - Adicionar 2,5 mL de solução estoque (200x) de micronutrientes do meio MS
 - Adicionar 5 mL de solução estoque (100x) de FeEDTA
 - Adicionar 15 g de sacarose;
 - Adicionar 2 mL de solução estoque (250x) de vitaminas de B5 ;
 - Completar volume para 1 L;
 - Acertar pH para 5,7 com KOH 1M e 0,1 M;
 - Colocar em um frasco de 1 L com tampa rosqueável;
 - Adicionar 6,0 g de agar (ou outro valor conforme o lote de ágar) ;
 - Ferver o meio em forno microondas até dissolver todo o ágar.
 - Distribuir 30 mL de meio em frasco com tampa.
 - Esterilizar em autoclave 120 °C 20 min.
-

Meio MS

Preparo de 1 litro de meio:

- Adicionar 125 mL solução estoque (8x) de macronutrientes do meio MS
- Adicionar 5 mL de solução estoque (200x) de micronutrientes do meio MS
- Adicionar 10 mL de solução estoque (100x) de FeEDTA
- Adicionar 15 g de sacarose (ou 20 g conforme o caso);
- Adicionar vitaminas de **B5**;
- Completar volume para 1 L;
- Acertar pH para 5,7 com KOH 1M e 0,1 M;
- Colocar em um frasco de 1 L com tampa rosqueável;
- Adicionar 6,0 g de agar (ou outro valor conforme o lote de ágar);
- Esterilizar em autoclave 120 °C 20 min.

Após autoclave o meio pode ser guardado em geladeira até sua utilização.

Utilização do meio:

- Derreter o meio em forno microondas;
 - Esperar esfriar sem deixar solidificar;
 - Distribuir nos frascos previamente esterilizados em autoclave 120 °C 30 min ou placas de Petri estéreis.
-

Solução estoque de Macronutrientes (Meio MS)

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. Physiology Plant, 15: 473-497, 1962.

Macronutrientes – Estoque (8x)

	Sais	Quantidade (g/L)
A1	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,52
A2	KH_2PO_4	1,36
A3	NH_4NO_3	13,20
A4	KNO_3	15,20
A5	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,96

Utilizar 125 mL dessa solução para cada litro de meio de cultura.

**Solução estoque de Micronutrientes
(Meio MS)**

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. *Physiology Plant*, 15: 473-497, 1962.

Micronutrientes – Estoque (200x)

	Sais	Quantidade (g/L)
B1	MnSO ₄ .H ₂ O	3,38
B2	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,72
B3	H ₃ BO ₃	1,24
B4	NiSO ₄ .6H ₂ O	0,0104
B5	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,05
B6	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,005
B7	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,005

Utilizar 5 mL dessa solução para cada litro de meio de cultura.

Solução estoque de vitaminas de Nitch

Dissolver cada vitamina em volumes individuais de 20 mL, juntas todas elas e completar para 200 mL da solução estoque.

Nitch – Estoque (250x)

Substância	Concentração na solução estoque (g/200mL)	Concentração no meio de cultura (mg/L)
Glicina	0,1	2
Mioinositol	5	100
Ácido nicotínico*	0,25	5
Piridoxina	0,025	0,5
Tiamina	0,025	0,5
Biotina	0,0025	0,05
Ácido fólico	0,025	0,5

* Dissolver previamente com gotas de NaOH 1N

Utilizar **4 mL** dessa solução para cada litro de meio de cultura.

Obs: A água utilizada na confecção deve ser previamente esterilizada em autoclave a 120 °C por 20 minutos.

Solução estoque de vitaminas B5 (Gamborg)

Referência: Gamborg, O.L.; Miller, R.A.; Ojima, K. (1968) Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res., 50: 151-158.

Dissolver cada vitamina em volumes individuais de 40 mL, juntas todas elas e completar para 200 mL.

B5 (Gamborg) – Estoque (250x)

Substância	Concentração na solução estoque (g/200mL)	Concentração no meio de cultura (mg/L)
Mio-inositol	5	100
Ácido nicotínico*	0,05	1
Piridoxina HCl	0,05	1
Tiamina HCl	0,5	10

* Dissolver previamente em NaOH 1N

Utilizar **4 mL** dessa solução para cada litro de meio de cultura.

Obs: A água utilizada no preparo dessa solução ser previamente esterilizada em autoclave a 120 °C por 20 minutos.

**Solução estoque de Fe-EDTA
(Estoque - 100X)**

	Sais	Quantidade (g/L)
C1	Na ₂ EDTA	3,72
C2	FeSO ₄ . 7H ₂ O	2,78

1. Dissolver o Na₂EDTA em 100 mL de água quente;
2. Em outro recipiente, dissolver o FeSO₄. 7H₂O;
3. Colocar a primeira solução em um balão de 1 L;
4. Acrescentar 200 mL de água e adicionar a segunda solução;
5. Agitar e completar para um litro.

Utilizar 10 mL dessa solução para cada litro de meio de cultura.

**Solução estoque de vitaminas
(Meio MS)**

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497, 1962

Substância	Concentração (mg/100 mL)	Quantidade a ser adicionada (mL do estoque/ L de meio)
Glicina	200	2,0
Ac. Nicotínico	50	0,5
Piridoxina HCl	50	0,5
Tiamina HCl	100	0,1

Utilização de hormônios e reguladores de crescimento em culturas de tecidos

Substância	PM	Para converter mg/L em μM , multiplique por	Para converter μM em mg/L, multiplique por	Solvente	Estoque $^{\circ}\text{C}$
AUXINAS					
AIA	175,2	5,71	0,175	água + gotas de KOH 1M	0
AIB	203,2	4,92	0,203	água + gotas de KOH 1M	5
ANA	186,2	5,37	0,186	água + gotas de KOH 1M	25
Picloram	241,5	4,14	0,241	água + gotas de KOH 1M	25
2,4 D	221,0	4,53	0,221	água + gotas de KOH 1M	25
Substância	PM	Para converter mg/L em μM , multiplique por	Para converter μM em mg/L, multiplique por	Solvente	Estoque $^{\circ}\text{C}$
CITOCININAS					
BAP	225,3	4,44	0,225	água + gotas de HCl 1M.	25

[9R]BAP	357,4	2,80	0,357	água + gotas de HCl 1M.	0
KIN	215,2	4,65	0,215	água + gotas de HCl 1M.	0
[9R]KIN	347,3	2,88	0,347	água + gotas de HCl 1M.	0
TDZ	220,2	4,54	0,220	Álcool 70% ou DMSO	25
iP	203,2	4,92	0,203	água + gotas de HCl 1M.	0
[9R]iP	335,4	2,98	0,335	água + gotas de HCl 1M.	0
Z	219,2	4,56	0,219	água + gotas de HCl 1M.	0
[9R]Z	351,4	2,85	0,351	água + gotas de HCl 1M.	0
(diH)Z	221,3	4,52	0,221	água + gotas de HCl 1M.	5
Substância	PM	Para converter mg/L em μM, multiplique por	Para converter μM em mg/L, multiplique por	Solvente	Estoque $^{\circ}$C
OUTROS					
GA ₃	346,4	2,89	0,346	água +	25

				gotas de KOH 1M.	
ABA	264,3	3,78	0,264	água + gotas de KOH 1M.	-20
JA	210,3	4,76	0,210	água + gotas de KOH 1M.	5
CEPA	144,49	6,49	0,144		5
EPIBR	480,7	2,08	0,481		0
Trp	204,2	4,90	0,204	Água	
Ade	135,1	7,41	0,135	Água	25
Ado	267,2	3,74	0,267	Água	
Substância	PM	Para converter mg/L em μM, multiplique por	Para converter μM em mg/L, multiplique por	Solvente	Estoque $^{\circ}$C
INIBIDORES					
TIBA	499,8	2,00	0,5	água + gotas de KOH 1M.	
PAA	136,2	7,35	0,136	água + gotas de KOH 1M.	
AVG	196,6	5,08	0,197		
PACLO	293,8	3,40	0,294		
COLCH	399,4	2,51	0,399		25
CCC	158,1	6,33	0,158		25
Glyphosate	169,1	5,92	0,169		25
AS	138,1	7,25	0,138		25
Fluridone	329,3	3,039	0,329		

Auxinas: 2,4 D = ácido 2,4 diclorofenoxiacético; AIA = ácido indolil-3-acético; AIB = ácido indolil-3-butírico; ANA = ácido alfa-naftaleno acético; AIA-Me = AIA metilado.

Citocininas: BAP (BA) = benzilamino purina; [9R]BAP = benzilamino purina ribosídeo; KIN = cinetina; [9R]KIN = cinetina ribosídeo; TDZ = thidiazuron; iP = isopenteniladenina; [9R]iP = isopenteniladenosina; Z = zeatina; [9R] = zeatina ribosídeo; (diH)Z = dihidrozeatina.

Outros: GA = giberelina; ABA = ácido abscísico; JA = ácido jasmônico; CEPA = ácido 2-cloroetil fosfônico (Ethrel); Trp = triptofano; Ade = adenina; Ado = adenosina.

Inibidores: TIBA = ácido triiodo benzóico; PAA = ácido fenil acético; AVG = aminoetoxi vinilglicina; PACLO = paclobutrazol; COLCH = colchicina. CCC = Chlorocholine Chloride (Cycocel); AS = Ácido salicílico.