

MICROPROPAGAÇÃO

CULTIVO IN VITRO DE EMBRIÕES DE MILHO

O milho (*Zea mays*) é um cereal da família Graminaceae originária do continente americano e atualmente cultivada em quase todo o mundo.



Como em todas as monocotiledôneas o cotilédone tem como função a transferência dos nutrientes do endosperma à plântula em desenvolvimento. No cultivo *in vitro* o meio nutriente substitui o endosperma, já que o embrião é retirado junto com o cotilédone (Figura 1).

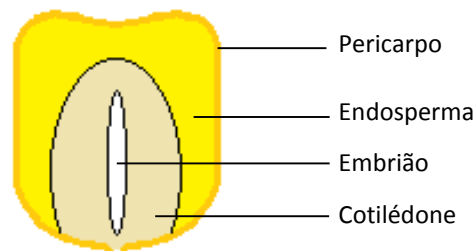
Em Biotecnologia vegetal, esta modalidade de *cultivo in vitro* permite resgatar embriões híbridos, resultantes de cruzamentos incompatíveis. Também se utiliza para quebrar a dormência das sementes, encurtando assim o ciclo de vida de algumas plantas. Trata-se de um bom modelo para os estudos fisiológicos ligados à germinação da semente e ao desenvolvimento das plântulas.

Assim como outros órgãos das plantas, os embriões podem ser cultivados em um meio nutriente contendo água, sais minerais, açúcar e ágar.

MICROPROPAGAÇÃO / CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE MILHO

Figura 1: O grão de milho

A. Estrutura do grão



B. Retirada do embrião



BIBLIOGRAFIA

T. T. FURTADO, FONSECA DA SILVA V.C. e MANN V.S. Cultivo de embriões de milho. Trabalho de finalização do curso médio técnico de Biotecnologia do Instituto de Tecnologia ORT do Rio de Janeiro, 2002.

MALAJOVICH M.A. e MANN V.S. Micropropagação. Guia 80: *Micropropagação no laboratório de ensino*; Guia 85: *A desinfecção dos instrumentos*; Guia90: *A desinfecção dos explantes* e Guia 96: *Os meios de cultivo*. <http://www.bteduc.bio.br>

Video: Extração e semeadura do embrião de milho. <http://www.bteduc.bio.br>

MY AGRICULTURE INFORMATION BANK <http://www.agriinfo.in/>

SHOESTRING BIOTECHNOLOGY. National Association of Biology Teachers

MICROPROPAGAÇÃO / CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE MILHO

ATIVIDADE PRÁTICA

OBJETIVO

Cultivar embriões de milho, *in vitro*.

MATERIAIS

1 pedaço de espiga de milho, tubos de ensaio com meio nutriente* estéril, 1 faca ou 1 bisturi, palitos estéreis, água sanitária diluída à metade, 3 frascos de água destilada estéril, álcool 96^o, álcool 70^o, bico de Bunsen (opcional).

* O meio nutriente (Murashige&Skoog, Taji ou Knop) é uma solução de sais minerais às quais se adiciona sacarose (1 a 5%), ágar (0,7%) e água de coco, como indicado nos Guias 111: *Micropropagação: meios clássicos* e 112: *Micropropagação: meios alternativos*.

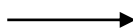
PROCEDIMENTO

A limpeza do lugar de trabalho é fundamental, assim como a higiene das mãos. O lugar de trabalho será desinfetado com álcool 70^o. Os participantes lavarão muito bem as mãos e os antebraços com água e sabão, antes de passar álcool 70^o. Cuidado! O álcool é inflamável. Esterilizar o material contaminado antes de descartá-lo.



1. Desinfecção dos explantes

- Separar com uma faca os grãos de milho.



MICROPROPAGAÇÃO / CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE MILHO

- Desinfetar os grãos com a solução de água sanitária (15 minutos), agitando suavemente.
- Lavar os grãos três vezes com água destilada estéril (1, 3 e 5 minutos)

2. Extração do embrião

- Perto do bico de Bunsen aceso e com muito cuidado, pressionar suavemente o grão de milho para facilitar a saída do embrião.
- Colher o embrião com um palito estéril (Participante A). O procedimento pode ser visto no vídeo *Extração e semeadura do embrião de milho*.



3. Semeadura do embrião

- Abrir o tubo de ensaio contendo meio de cultivo estéril e flambar a boca do tubo (Participante B).
- Deixar cair o embrião dentro do tubo (Participante A).
- Flambar novamente a boca do tubo e fecha-lo (Participante B).
- A seguir, verificar que o embrião se encontre em contato com o meio. Se não for assim, agitar suavemente o tubo de modo a acomodar o embrião no meio.

4. Incubação

Na luz, a temperatura ambiente.

5. Estabelecimento da cultura

Acompanhar semanalmente medindo a altura (mm) do epicótilo.

MICROPROPAGAÇÃO / CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE MILHO

NOSSO COMENTÁRIO

Este protocolo está baseado no trabalho de conclusão do Curso Médio Técnico de Biotecnologia de Tássia Torres Furtado, Vania Carolina Fonseca da Silva e Vítor Soares Mann intitulado "Cultivo de embriões de milho", desenvolvido em 2002 no Instituto de Tecnologia ORT do Rio de Janeiro.

Os autores não encontraram dificuldades no acompanhamento do crescimento do embrião (Figura 2). Eles trabalharam com dois meios alternativos, meio básico Taji e meio de coco. Os resultados podem ser apreciados no gráfico 1, mostrando que os embriões de milho se desenvolveram melhor no meio básico Taji que no meio de coco. O meio Taji parece ter esgotado mais tarde (3 semanas) que o meio de coco (2 semanas).

Em repetições posteriores desta atividade, desinfetamos os grãos de milho com álcool e com Clor-in 10 sem que fosse observado um aumento significativo das contaminações.

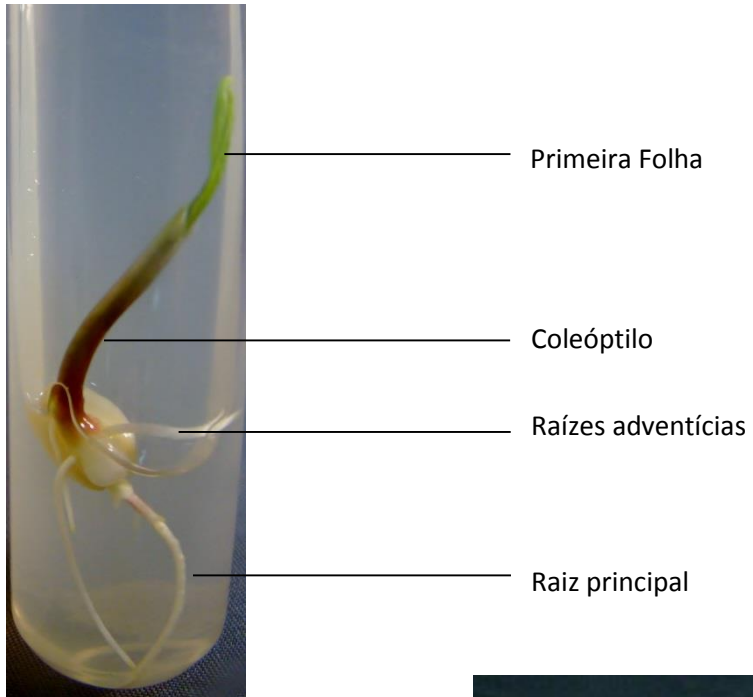
COMO MONTAR UM PROJETO

Alterar a composição do meio de cultivo

Pesquisar o crescimento *in vitro* de embriões de outras monocotiledôneas.

MICROPROPAGAÇÃO / CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE MILHO

Figura 2: Desenvolvimento *in vitro* do embrião de milho.



MICROPROPAGAÇÃO / CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE MILHO

Gráfico 1: Crescimento dos epicótilos de plântulas de milho, desenvolvidas a partir de embriões cultivados em dois meios alternativos (T. Torres Furtado, V.C. Fonseca da Silva e V. Soares Mann, Instituto de Tecnologia ORT do Rio de Janeiro, 2002)

