

MICROPROPAGAÇÃO

OS MEIOS DE CULTIVO

Como indicado no Guia 60: *Micropropagação no laboratório de ensino*, os meios de cultivo incluem água, uma fonte de carbono, substâncias inorgânicas (sais minerais), vitaminas, hormônios e fatores reguladores do crescimento (Tabela 1). Geralmente, o pH do meio é mantido entre 5,0 e 6,5.

Tabela 1. Os componentes do meio de cultura para células vegetais.

COMPONENTES	CARACTERÍSTICAS E EXEMPLOS
Água destilada	Representa 95% do meio nutriente.
Fonte de carbono	Geralmente se utiliza sacarose. A fonte de carbono é necessária porque os explantes não são totalmente autotróficos e a fotossíntese <i>in vitro</i> não supre as necessidades das células.
Substâncias inorgânicas	Macroelementos (N, P, K, Ca, Mg, S) e microelementos (Fe, Co, Zn, Ni, B, Al, Mn, Mo, Cu, I), em uma proporção que depende da planta escolhida.
Vitaminas	Mioinositol, vitamina B ₁ (tiamina), ácido nicotínico (niacina), vitamina B ₆ (piridoxina), pantotenato de cálcio, ácido fólico, vitamina B ₂ (riboflavina), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina H (biotina), ácido para-aminobenzoico e vitamina E (tocoferol).
Hormônios e reguladores de crescimento	Auxinas. Estas promovem o alongamento celular, a formação de calos e de raízes adventícias; inibem a formação de brotos axilares adventícios e, às vezes, a embriogênese em suspensões celulares. Exemplos: IAA (ácido indolacético), NAA (ácido naftalenoacético), IBA (ácido indolbutírico), 2,4 D (2,4-diclorofenoxiacético).
	Citocininas. Estas promovem a divisão celular, regulam o crescimento e o desenvolvimento dos tecidos vegetais. Exemplos: cinetina, 2iP (2-isopentiladenina), BAP (benzilaminopurina), zeatina.
	Outras substâncias. Exemplos: giberelinas, ácido abscísico, etileno.
Misturas de substâncias pouco definidas	Exemplos: extrato de levedura, extratos vegetais, hidrolisados de caseína, peptona e triptona. A tendência atual em pesquisa é de substituí-los por meios de composição definida.
Materiais inertes	Utilizados como suporte. Exemplos: ágar, agarose, outros polissacarídeos (Gelrite, Phytigel), lâ de vidro, papel de filtro, areia, esponjas de poliestireno.

MICROPROPAGAÇÃO / OS MEIOS DE CULTIVO

Existem diferentes formulações, das mais sofisticadas às mais simples, sendo a mais antiga a solução de Knop, que ainda hoje é utilizada como base para os estudos sobre os macronutrientes necessários para as plantas. Atualmente, se admite que a composição de um meio deve ser ajustada às necessidades de cada espécie.

Um dos meios mais utilizados é o de Murashige & Skoog (M&S), uma mistura complexa de sais complementada com vitaminas, à qual se acrescentam sacarose e ágar. Por ser bastante concentrado, às vezes é usado em diluição 50%. Sua preparação figura no Guia 111: *Micropropagação - meios clássicos*.

O crescimento e a diferenciação celular são controlados *in vitro* mediante modificações na proporção entre os hormônios e reguladores de crescimento. De um modo geral, se a proporção entre citocininas e auxinas for maior que 1, desenvolvem-se brotos, se for menor, raízes e, se for igual, calos.

Contudo, a necessidade de utilizar meios bem definidos se aplica fundamentalmente à pesquisa científica. Para o horticultor ou para o docente essa necessidade é menor e, em muitos casos, os meios alternativos são suficientes para obter bons resultados.

Alguns autores (Taji, Bridgen) desenharam meios alternativos de composição simples: fertilizante NPK 10:10:10 e vitaminas. No laboratório de ensino, tivemos bons resultados com o meio Taji. A informação sobre sua preparação se encontra no Guia 112: *Micropropagação - meios alternativos*.

A sacarose pode ser substituída por açúcar cristal, em uma proporção de 2 a 3%. O meio é solidificado com ágar bacteriológico na concentração 0,6-0,8%. Também pode-se experimentar outros materiais (amido, bolinhas de vidro, *compost*, ponte de papel de filtro, areia etc.).

Excetuando o hormônio de enraizamento que é barato e fácil de encontrar nas floriculturas, o preço da maioria dos fatores de crescimento é muito alto para um laboratório de ensino e inclusive para alguns laboratórios comerciais. Uma possibilidade é a adição nos meios de água de coco, porque esta contém reguladores de crescimento análogos à cinetina, que estimulam a divisão celular.

Além da água de coco, outras substâncias de origem vegetal interessantes são a polpa de banana e os sucos de tomate, de laranja, de uva e de abacaxi. Pouco utilizadas na pesquisa científica, estas substâncias alternativas de composição mal definida substituem, no laboratório de ensino, alguns reagentes caros ou de difícil obtenção.

MICROPROPAGAÇÃO / OS MEIOS DE CULTIVO

No Brasil, a água de coco é um produto barato e fácil de encontrar, de modo que pode ser incluído habitualmente no meio para estimular o crescimento dos explantes. Para induzir a embriogênese ou a organogênese do explante, substitui-se a água de coco por um volume equivalente de água destilada.

Uma vez dominada a técnica para o estabelecimento de uma cultura asséptica, pode-se comparar o crescimento em meios de diferente composição, utilizando uma adaptação de Piérik (Tabela 2).

Tabela 2. Combinações possíveis na formulação de um meio de cultivo.

Substância	Concentração
Açúcar (sacarose)	1-2-4%
Sais minerais (M&S ou Taji)	1:4; 1:2 ; 1:1
Água de coco	25%, 50%, 75%

Podem ser obtidas assim até $3^3=27$ combinações das quais será escolhida a que apresentar melhores resultados.