

MICROPROPAGAÇÃO DA VIDEIRA: EFEITOS DO pH E DO ÁGAR¹

Paulo Henrique Pereira Peixoto²
Moacir Pasqual³

1. INTRODUÇÃO

A micropropagação é uma técnica de propagação clonal que tem como objetivo básico a maximização da produção de brotações. A manipulação dos componentes de crescimento do meio de cultura é um processo bastante importante para o sucesso da técnica. Dentre os fatores que influenciam o tipo de organogênese induzido e o crescimento das brotações o pH e a concentração de ágar adicionado ao meio de cultura apresentam especial relevância (3, 8).

O ágar é um dos componentes mais caros do meio de cultura e é utilizado em concentrações que variam em uma faixa bastante ampla (1). Dependendo do grau de pureza do ágar, diversos íons contaminantes podem estar presentes em concentrações elevadas, prejudicando o desenvolvimento das brotações. A concentração de ágar pode influenciar a taxa de difusão de moléculas no meio de cultura, a disponibilidade de água, a aeração dos explantes, o crescimento e a vitrificação das brotações (1, 5, 8,).

Em relação ao pH do meio de cultura, na maioria dos trabalhos, o ajuste é efetuado antes da autoclavagem. Contudo, após este

¹ Aceito para publicação em 30.01.1995.

² Departamento de Botânica, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). 36036-330 Juiz de Fora, MG. Bolsista da CAPES.

³ Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras (UFLA). Cx. Postal 37. 37200-000 Lavras, MG. Bolsista do CNPq.

procedimento, alterações nos valores inicialmente ajustados podem ser observadas (8). A concentração de ágar adicionada ao meio de cultura tem influência sobre a variação do pH. As alterações do pH do meio de cultura podem ser tanto de acidificação quanto de alcalinização em função, principalmente, da liberação de compostos pelos explantes e, até mesmo, durante o seu armazenamento. Geralmente, quanto menor a concentração de ágar maior é a variação do pH (10, 11).

Os efeitos do pH podem ser diretos ou indiretos (1) e, por esse motivo, a absorção de certos íons e até mesmo a geleificação do meio de cultura podem ser alterados pela variação desse fator (3, 8, 10).

A propagação clonal *in vitro* da videira representa grande passo no controle da disseminação de doenças, principalmente das viroses. Por esse motivo a minimização dos custos de produção aliada à maximização das taxas de multiplicação dos explantes são muito importantes para a viabilização da utilização desta técnica na vitivinicultura nacional.

Este trabalho teve como objetivo o estudo da influência da concentração de ágar e de pH na micropropagação e absorção de nutrientes do porta-enxerto da videira RR-101-14.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do DAG-UFLA, em Lavras (MG). Foram utilizadas brotações do porta-enxerto da videira RR-101-14 obtidas *in vitro* em meio C₂D (2) com pH ajustado para 5,7 e 7,0 g.l⁻¹ de ágar (tratamento-padrão). As brotações medindo 1,0-1,5 cm e apresentando três gemas foram inoculadas horizontalmente no meio de cultura. No experimento utilizou-se o meio C₂D adicionado de 0,5 mg.l⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) e 0,001 mg.l⁻¹ de ácido naftaleno acético (ANA). Os tratamentos constaram de todas as combinações possíveis de ágar (ÁGAR-ÁGAR - Vetec Química e Representações Ltda.) a 3,5; 7,0; e 10,5 g.l⁻¹ e de pH 3,7; 4,7; 5,7; 6,7; e 7,7, num fatorial de 3 x 5, totalizando 15 tratamentos, com oito repetições e dois explantes por parcela. O ajuste do pH foi efetuado à temperatura ambiente, antes da autoclavagem. Após a inoculação dos explantes em câmara de fluxo laminar, os tubos de ensaio foram levados para sala de crescimento com fotoperíodo de 16/8 h, termoperíodo de 25/27°C e luminosidade de 50 µE.m⁻².s⁻¹. Aos 60 dias de cultivo, os explantes foram retirados e o meio de cultura aquecido a 50°C para a aferição de seu pH. Em seguida, avaliaram-se o número médio de brotações, número médio de brotações superiores a 1,5 cm e o peso das brotações frescas (PBF) e secas (PBS). Procedeu-se, posteriormente, à análise dos tecidos para os seguintes nutrientes: K, S, Fe, Mg, Ca, Mn, P, Zn e Cu. Para a análise

estatística utilizaram-se o delineamento inteiramente casualizado e a análise de regressão, sendo os dados transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A interação entre o ágar e pH foi altamente significativa, evidenciando efeito marcante das variáveis nas características estudadas (Quadro 1).

QUADRO 1 - Análises de variância do número médio de brotações, número médio de brotações superiores a 1,5 cm e dos pesos das brotações frescas e secas do porta-enxerto da videira RR-101-14 nas diferentes concentrações de ágar e pH

CV	GL	Quadrados médios			
		No. de brotações	No. de brotações > 1,5 cm	PBF	PBS
Ágar	2	12,701**	10,708**	0,584**	0,0104**
pH	4	1,503**	2,078**	0,111**	0,0021**
Ágar x pH	8	0,795**	0,664**	0,021**	0,0008**
C.V. %		16,09	21,81	6,64	1,27

** Significativo a 1 % de probabilidade.

A Figura 1 apresenta as equações de regressão para número médio de brotações. Pode-se observar pela referida figura que as maiores taxas de multiplicação foram obtidas na concentração de ágar a 3,5 g.l⁻¹, principalmente em pH mais baixo, 3,7 e 4,7, e, ainda, que o aumento da concentração de ágar foi prejudicial à multiplicação das brotações. Na concentração de ágar a 7,0 g.l⁻¹, as maiores taxas de multiplicação foram obtidas nos valores de pH mais baixos, com menor taxa de multiplicação no valor de pH 7,7. Em pH abaixo de 4,5, a polimerização do ágar após a autoclavagem é bastante reduzida (1), o que resulta em menor geleificação do meio de cultura. No experimento isto foi observado, principalmente em pH 3,7 e 4,7. Nos tratamentos referentes a esta combinação de fatores de crescimento, a consistência do meio de cultura foi a mesma da observada na concentração de ágar a 3,5 g.l⁻¹. Ainda pela Figura 1 observa-se que na dosagem de ágar mais elevada, a 10,5 g.l⁻¹, a superioridade dos pHs mais baixos não foi evidenciada, uma vez que, mesmo sob condições de pH bastante ácido, a polimerização do ágar se verifica com intensidade satisfatória. Os resultados observados no ensaio são comparáveis aos

—□	pH 3.7 - $Y = 4,6676 - 0,2167 x$ $R^2 = 0,99$
- - -◇	pH 4.7 - $Y = 4,5726 - 0,2320 x$ $R^2 = 0,94$
—△	pH 5.7 - $Y = 4,7614 - 0,5010 x + 0,0295 x^2$ $R^2 = 1,00$
- - -●	pH 6.7 - $Y = 3,3023 - 0,1094 x$ $R^2 = 0,95$
- - -○	pH 7.7 - $Y = 5,4088 - 0,7474 x + 0,0431 x^2$ $R^2 = 1,00$

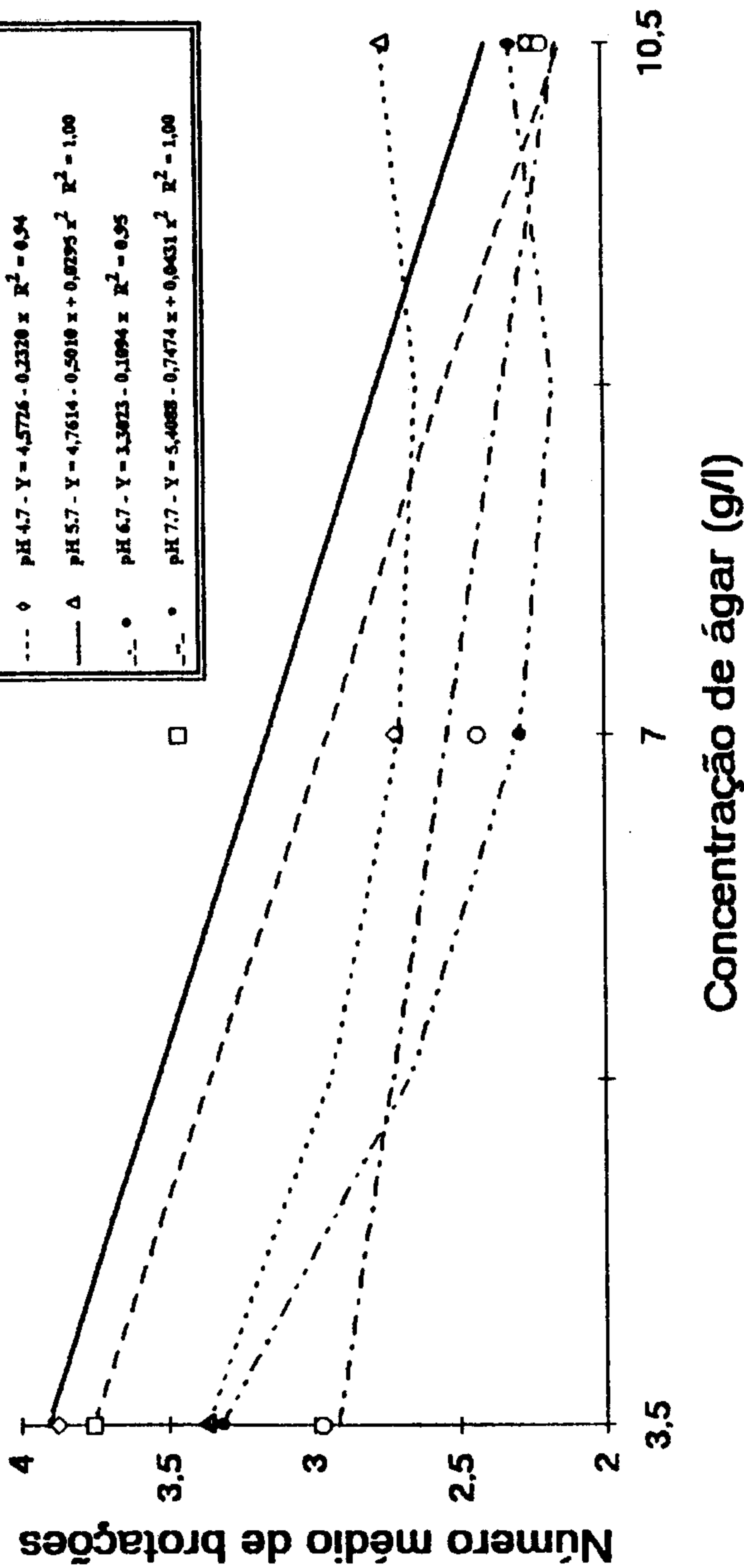


FIGURA 1 - Equações de regressão para o número médio de brotações por explante do porta-enxerto da videira RR-101-14, em relação aos diferentes pH e em função das concentrações de ágar, 60 dias após a inoculação.

observados por SINGHA (8, 9), que verificou a redução da multiplicação e do crescimento das brotações de pessegueiro e macieira *in vitro* quando submetidos a concentrações muito altas de ágar.

Em relação ao número médio de brotações superiores a 1,5 cm, observa-se, pela Figura 2, que os resultados foram similares aos verificados para o número médio de brotações. A produção de brotações com comprimento superior a 1,5 cm é parâmetro importante, uma vez que quanto maior o tamanho dos explantes obtidos durante uma etapa de multiplicação maior será a possibilidade de sucesso nas repicagens subseqüentes. Pode-se observar, ainda, em relação a este parâmetro, que os tratamentos de maior destaque foram obtidos também na concentração de ágar, a 3,5 g.l⁻¹, principalmente em pH 3,7 e 4,7, e que o aumento da concentração de ágar foi prejudicial ao crescimento das brotações com redução no número de brotações superiores a 1,5 cm. Da mesma forma que para a característica anterior o pH mostrou influência indireta nos resultados, principalmente no caso dos tratamentos com ágar, a 7,0 g.l⁻¹, e pH 3,7, em que os mesmos efeitos na polimerização do ágar após a autoclavagem foram observados. Na concentração mais elevada de ágar, a 10,5 g.l⁻¹, os resultados também foram semelhantes aos discutidos para o parâmetro anterior, evidenciando claramente que concentrações elevadas de ágar e, conseqüentemente, o endurecimento excessivo do meio de cultura pode ser prejudicial ao processo morfogênético *in vitro*.

Os resultados observados para estas duas características são comparáveis aos obtidos por SINGHA (8, 9). Em função da presença de contaminantes tóxicos e dos efeitos do ágar na taxa de difusão de moléculas e no potencial osmótico do meio de cultura, pode-se sugerir que o ágar é, potencialmente, um dos componentes de maior influência nos processos morfogênicos dos explantes *in vitro*. No caso deste experimento, os resultados possibilitam recomendar a redução da concentração de ágar adicionado ao meio de propagação *in vitro* de explantes do porta-enxerto da videira RR-101-14, para a obtenção de maiores taxas de multiplicação e a redução dos custos de produção dos meios de cultura.

Em relação ao pH do meio de cultura, pelos resultados do experimento, verifica-se que os efeitos foram principalmente indiretos, sendo decorrentes da sua influência na polimerização do ágar após a autoclavagem, principalmente nas dosagens de 3,5 e 7,0 g.l⁻¹. Estes resultados são semelhantes aos relatados por CALDAS *et alii* (1) e por SKIRVIN *et alii* (10).

A vitrificação dos explantes é bastante utilizada como parâmetro de qualidade do material obtido (7). No experimento, a vitrificação dos explantes foi mais pronunciada nos meios de cultura com concentração de

—	□	pH 3.7 - Y = 3,8675 - 0,1919 x R ² = 0,93
...	◇	pH 4.7 - Y = 5,9801 - 1,0402 x - 0,0598 x ² R ² = 1,00
---	△	pH 5.7 - Y = 2,4430 - 0,0758 x R ² = 0,82
-.-	●	pH 6.7 - Y = 2,6761 - 0,1272 x R ² = 0,99
-.-	○	pH 7.7 - Y = 2,6836 - 0,1213 x R ² = 0,83

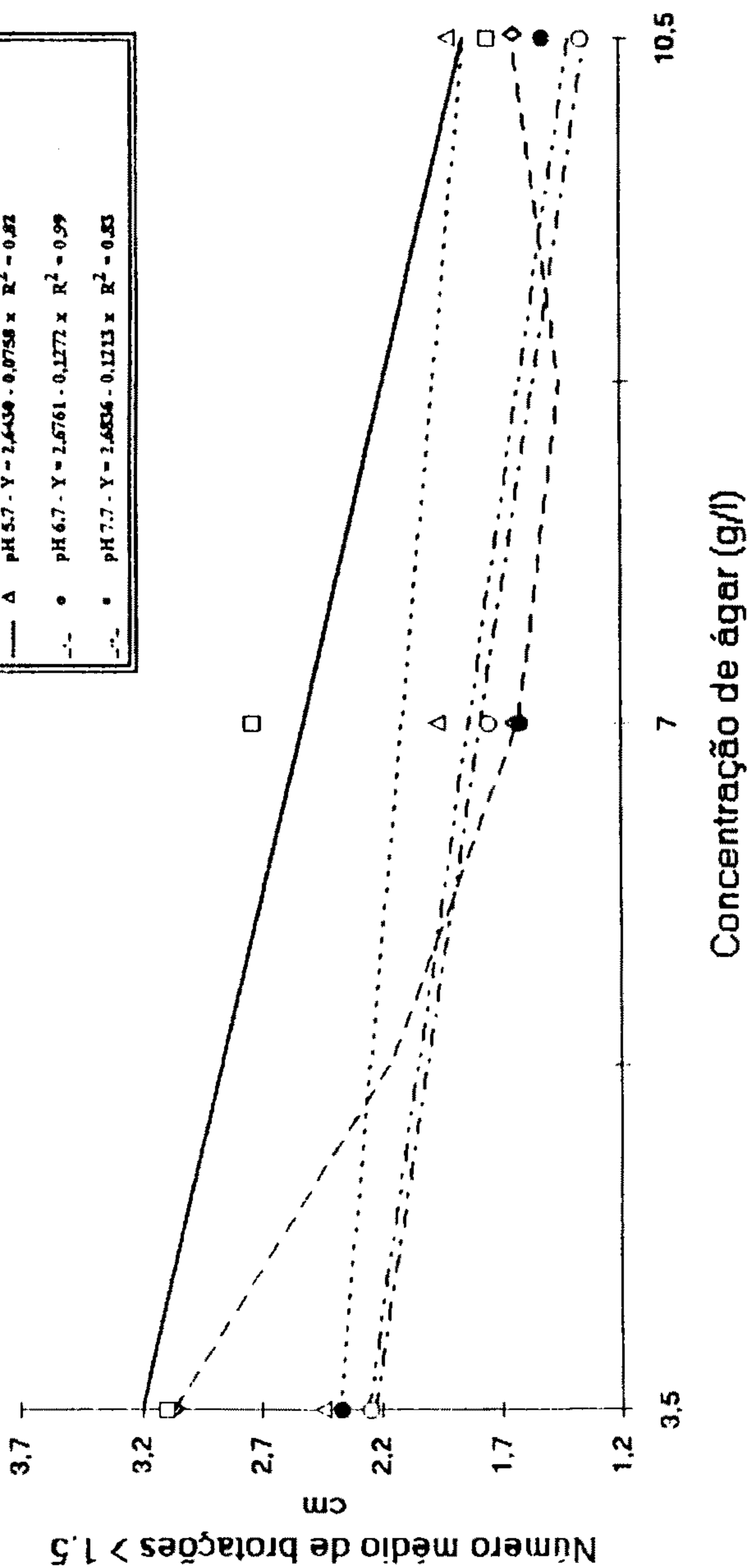


FIGURA 2 - Equações de regressão referentes ao número médio de brotações superiores a 1,5 cm por explante do porta-enxerto da videira RR-101-14, em relação aos diferentes pH e em função das concentrações de ágar, 60 dias após a inoculação.

ágar mais reduzida e também naqueles onde a polimerização foi prejudicada pelos valores muito baixos de pH. Entretanto, o grau de vitrificação dos explantes não influenciou a capacidade morfogênica em repicagens subseqüentes (dados não-mostrados). Recomenda-se, contudo, antes do enraizamento dos explantes, visando a sua posterior aclimatação, a utilização de meios de cultura mais endurecidos, com concentrações de ágar mais altas e polimerizado adequadamente. Dessa forma, é possível evitar a vitrificação excessiva dos explantes e a redução da sobrevivência dos mesmos durante a aclimatação (6).

Observa-se pelas Figuras 3 e 4 a resposta dos explantes para PBF e PBS em função da concentração de ágar e do pH do meio de cultura. Os resultados foram similares aos observados para os parâmetros avaliados anteriormente, com valores mais elevados de PBF e PBS na concentração de ágar a $3,5 \text{ g.l}^{-1}$, principalmente em pH 3,7 e 4,7. Os resultados mostram que a elevação da concentração de ágar no meio de cultura resulta na redução do acúmulo de água nos tecidos. Os valores de PBF mais elevados observados na concentração de $3,5 \text{ g.l}^{-1}$ de ágar e também a $7,0 \text{ g.l}^{-1}$ nos pHs mais baixos apresentam coerência com a maior vitrificação dos explantes observados nesses tratamentos. Ainda é possível observar que na concentração de ágar a $10,5 \text{ g.l}^{-1}$ tanto o PBF quanto o PBS das brotações foi reduzido, independente do pH do meio de cultura. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por SINGHA (8), que observou a redução do PBF e do PBS de brotações de pessegueiro, macieira e pereira em função da elevação da concentração de ágar no meio de cultura. Quanto mais elevada a concentração de ágar no meio de cultura maior é o seu potencial osmótico, o que resulta na redução da absorção de água por parte do explante e na difusão de componentes por meio de cultura.

Em relação à variação do pH do meio de cultura após a autoclavagem e o cultivo *in vitro* dos explantes (Quadro 2) observa-se que nos valores mais baixos de pH, a 3,7 e 4,7, a reação observada foi de alcalinização, independente da concentração de ágar. Para os demais valores de pH, a reação observada foi de acidificação do meio, o que ocorreu, também, em todas as concentrações de ágar. É possível observar, ainda, que o aumento da concentração de ágar não foi suficiente para evitar a variação do pH dos meios de cultura, sendo observadas reações tanto de acidificação quanto de alcalinização mesmo na dosagem de $10,5 \text{ g.l}^{-1}$ de ágar. Estes resultados estão de acordo com SKIRVIN *et alii* (10) e Nash & Davies (1972), citados por CALDAS *et alii* (1), que verificaram amplas variações nos pHs de meios de cultura após a sua autoclavagem e o cultivos *in vitro*. A variação nos valores de pH são decorrentes, provavelmente, da liberação de compostos para o meio de cultura e da absorção diferencial de nutrientes e de outros componentes do

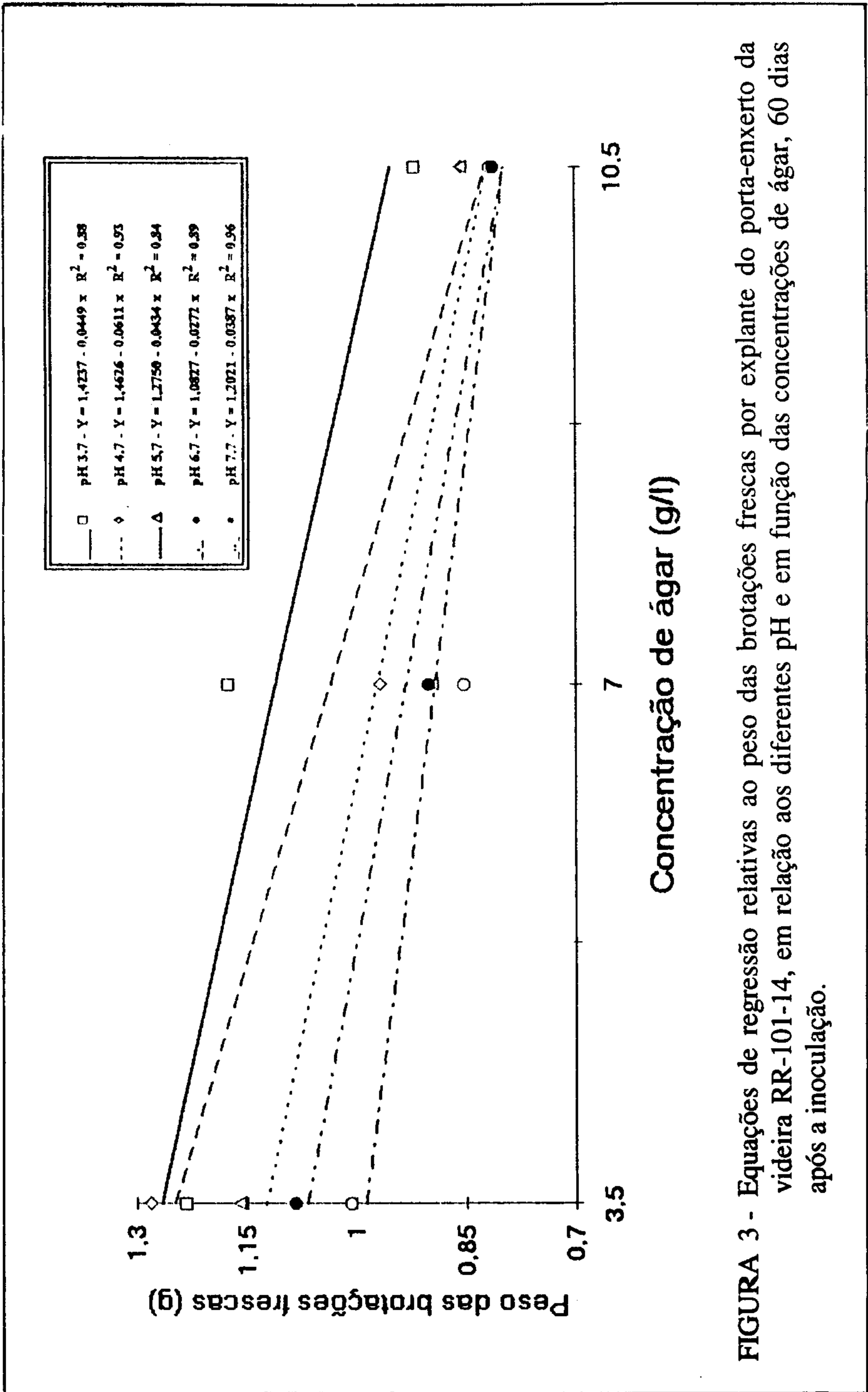


FIGURA 3 - Equações de regressão relativas ao peso das brotações frescas por explante do porta-enxerto da videira RR-101-14, em relação aos diferentes pH e em função das concentrações de ágar, 60 dias após a inoculação.

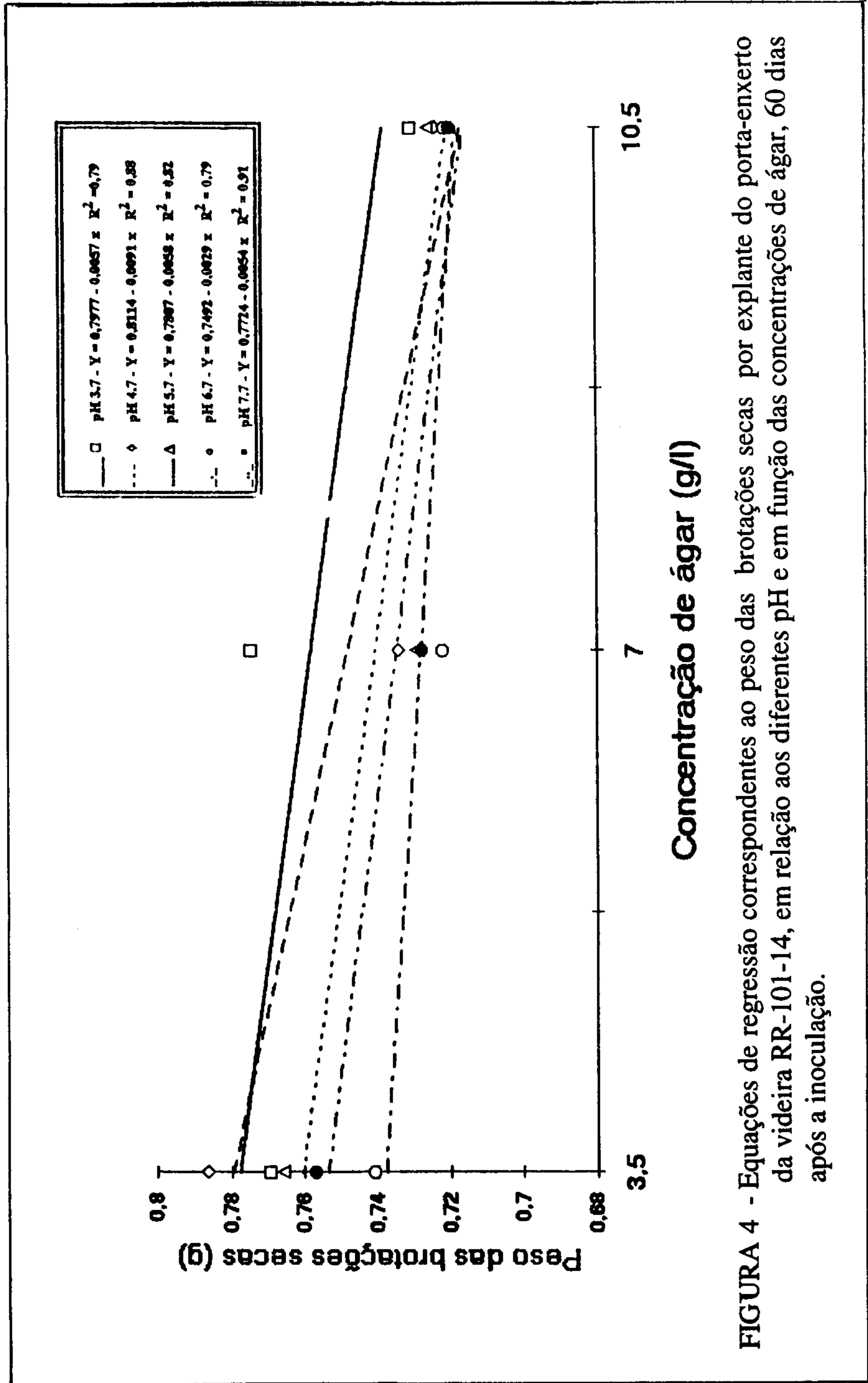


FIGURA 4 - Equações de regressão correspondentes ao peso das brotações secas por explante do porta-enxerto da videira RR-101-14, em relação aos diferentes pH e em função das concentrações de ágar, 60 dias após a inoculação.

QUADRO 2 - Variação do pH após a autoclavagem e o cultivo *in vitro* de brotações do porta-enxerto da videira RR-101-14, em função da concentração de ágar e pH

pH inicial	3,7	3,7	3,7	4,7	4,7	4,7	4,7	5,7	5,7*	5,7	6,7	6,7	6,7	7,7	7,7	7,7
pH final	7,1	6,3	4,1	5,4	5,3	4,9	5,4	4,8	4,8	4,6	5,0	4,8	4,8	5,6	5,0	5,0
[Ágar] (g/l)	3,5	7,0	10,5	3,5	7,0	10,5	3,5	3,5	7,0	10,5	3,5	7,0	10,5	3,5	7,0	10,5

* Tratamento-padrão (pH 5,7 e [ágar] = 7,0 g.l⁻¹).

meio por parte dos explantes.

Pelo Quadro 3 observa-se os valores referentes à concentração de alguns nutrientes encontrados nos tecidos analisados após o cultivo dos explantes *in vitro* em diferentes concentrações de ágar e pH e que a absorção dos nutrientes foi extremamente variável. A ausência de respostas lineares positivas ou negativas para os elementos analisados é indicativo da variabilidade do comportamento desta característica. Quando comparado com o tratamento-padrão (7,0 g.l⁻¹ de ágar e pH 5,7), a absorção de alguns elementos como K, S, Mn e Ca foi maior nos tratamentos com pH mais ácido, na faixa de 3,7 e 4,7. Entretanto, em relação à concentração de ágar, as respostas foram bastante complexas, o que dificultou a identificação de algum tratamento específico em que a maior parte dos nutrientes analisados tenha sido absorvida em maior quantidade. Por esse motivo, a recomendação de uma determinada combinação ágar/pH como "ideal" para a máxima absorção de todos os nutrientes analisados torna-se impossível. Além disso, a inexistência de trabalhos similares dificulta a discussão dos resultados, uma vez que a maior parte das informações da literatura relaciona-se com plantas mantidas *in vivo* (4). Os resultados encontrados neste experimento sugerem, então, que, pelo menos sob condições de cultivo *in vitro*, a absorção diferencial de nutrientes apresenta reduzida influência nos processos morfogênicos dos explantes do porta-enxerto da videira RR-101-14.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Objetivou-se verificar a influência do ágar e do pH na multiplicação e absorção de nutrientes *in vitro* em brotações do porta-enxerto da videira RR-101-14. O experimento constou de todas as combinações possíveis de ágar (3,5; 7,0; e 10,5 g.l⁻¹) e pH (3,7; 4,7; 5,7; 6,7; e 7,7) adicionado ao meio C₂D (2), totalizando 15 tratamentos. Aos 60 dias de cultivo o experimento foi avaliado. Os resultados possibilitaram as seguintes conclusões: a concentração de ágar a 3,5 g.l⁻¹ combinada com pH 3,7 e 4,7 proporcionou as maiores taxas de multiplicação e de crescimento dos explantes; o aumento da concentração de ágar reduziu a multiplicação, o crescimento e os valores de PBF e PBS dos explantes; a vitrificação dos explantes foi mais pronunciada nos meios de cultura com menor polimerização; os pHs dos meios de cultura sofreram alterações tanto de acidificação quanto de alcalinização após o cultivo dos explantes; e a absorção *in vitro* dos nutrientes foi variável e, aparentemente, apresenta pouca influência sobre as respostas morfológicas dos explantes.

QUADRO 3 - Concentração de K, S, Fe, Ca, Mg, P, Cu e Zn em tecidos do porta-enxerto da videira RR-101-14 cultivados *in vitro* em diferentes concentrações de ágar e pH

[Ágar] (g/l)	3,5	7	10,5	3,5	7	10,5	3,5	7*	10,5	3,5	7	10,5	7	10,5
pH Inicial	3,7	3,7	3,7	4,7	4,7	4,7	5,7	5,7*	5,7	6,7	6,7	6,7	7,7	7,7
Nutriente														
K %	4,16	3,9	2,92	4,3	3,19	2,84	3,81	3,1	3,28	3,37	3,19	3,28	3,94	3,66
S %	0,33	0,36	0,35	0,32	0,3	0,39	0,34	0,31	0,32	0,31	0,29	0,39	0,28	0,31
Fe ppm	386,2	568,7	721,3	272,1	335,1	296,6	180,3	394,8	616,7	412,9	691,4	241,1	87,5	552,2
Mn ppm	26,1	31,1	25,9	29,1	23,8	24,1	22,9	24,2	23,3	20,7	19,4	18,8	20,7	21,9
Ca %	0,43	0,43	0,41	0,52	0,4	0,46	0,41	0,39	0,36	0,36	0,34	0,36	0,39	0,41
Mg %	0,27	0,28	0,23	0,31	0,21	0,23	0,25	0,22	0,22	0,19	0,21	0,21	0,26	0,23
P %	0,34	0,33	0,44	0,27	0,4	0,43	0,33	0,44	0,46	0,4	0,46	0,42	0,35	0,44
Cu ppm	6,32	5,66	7,41	3,27	6,53	7,41	3,92	6,53	5,23	5,23	10,89	7,84	3,92	7,84
Zn ppm	156,3	162,6	199,6	149,4	194,3	155,2	168,4	197,5	158,4	161,6	158,4	141,5	139,4	130,9
														171,6

* Tratamento-padrão (pH 5,7 e [ágar] = 7,0 g.l⁻¹).

5. SUMMARY

(MICROPROPAGATION OF *Vitis* spp. L.: INFLUENCE OF AGAR AND pH)

The objective of this study was to verify the influence of agar and pH on shoot proliferation and absorption of nutrients of *Vitis* spp. rootstock 'RR-101-14'. The experiment studied all possible combinations of agar (3.5, 7.0 and 10.5 g.l⁻¹) and pH (3.7, 4.7, 5.7, 6.7 and 7.7). The culture media used was "C₂D". The experiment was analyzed 60 days after installation. The best results was obtained at 3.5 g.l⁻¹ of agar and pH 3.7 and 4.7. Very high doses of agar reduced the growth, multiplication, PBF and PBS of the explants. The explants vitrification was increased at 3.5 g.l⁻¹ of agar and low pH. The absorption *in vitro* of nutrients was very variable.

6. LITERATURA CITADA

1. CALDAS, L.E.; HARIDASAN, P. & FERREIRA, M.F. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L. E. (ed.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília, ABCTP-EMBRAPA-CNPH, 1990. p.37-70.
2. CHÉE, R.; POOL, R.M. & BUCHER, D. A method for large scale *in vitro* propagation of *Vitis*. *New York Food Life Science Bulletin*, 190:1-9, 1984.
3. COUSSON, A.; TOBART, P. & TRAN THANH VAN, K. Control of morphogenetic pathways in thin cell layers of tobacco by pH. *Canadian Journal of Botany*, 67:650-654, 1989.
4. CUMMINGS, G.A. Variation in the concentration of certain elements in muscadine grape leaves related to season, leaf portion, and age. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 102:339-342, 1977.
5. MONETTE, P.L. Grapevine (*Vitis vinifera* L.) . In: BAJAJ, Y.P.S. (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry*. Berlin, Springer-Verlag, 1988. v. 6, p.3-37.
6. PASQUALETTO, P.L.; ZIMMERMAN, R.H. & FORDHAM, I. Gelling agent and growth regulator effects on shoot vitrification of 'Gala' apple *in vitro*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 111:976-980, 1986.
7. PHAN, C.T. & HEGEDUS, P. Possible metabolic basis for the developmental anomaly called "vitreous plants". *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 6:83-94, 1986.
8. SINGHA, S. Influence of agar concentration on *in vitro* shoot proliferation of *Malus* sp 'Almey' and *Pyrus communis* 'Seckel'. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 107:657-660, 1982.
9. SINGHA, S. Influence of two commercial agars on *in vitro* shoot proliferation of 'Almey' crabapple and 'Seckel' pear. *HortScience*, 19:227-228, 1984.
10. SKIRVIN, R.M.; CHU, M.C.; MANN, M.L.; YOUNG, H., SULLIVAN, J. & FERMANIAN, T. Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. *Plant Cell Reports*, 5:292-294, 1986.
11. WOLFE, D.; CHIN, C.K. & ECK, P. Relationship of the pH of medium to growth of 'Bluecrop' highbush blueberry *in vitro*. *HortScience*, 21:296-298, 1986.