

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITRATO DE CÁLCIO E CLORETO DE POTÁSSIO NA MICROPROPAGAÇÃO DE DOIS PORTA-ENXERTOS DE VIDEIRA

Fabiola Villa¹
Moacir Pasqual¹
Leila Aparecida Salles Pio¹
Márcia De Nazaré Oliveira Ribeiro¹
Aparecida Gomes De Araújo¹
Alba Regina Pereira¹

RESUMO

A micropropagação de porta-enxerto de videira é utilizada, entre outros, na obtenção de plantas livres de vírus em curto espaço de tempo e na preservação de germoplasma. Objetivou-se neste trabalho testar diferentes concentrações de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e KCl adicionadas ao meio Knudson, na multiplicação *in vitro* de dois porta-enxertos de videira. Segmentos nodais, oriundos de plântulas preestabelecidas *in vitro*, foram excisados e inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura. Os tratamentos consistiram de diferentes concentrações de nitrato de cálcio e cloreto de potássio, em todas as combinações possíveis, e dos porta-enxertos de videira ‘Kober 5BB’ e ‘Gravesac’. O meio foi acrescido de 25 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar, e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C e 1 atm por 20 minutos. Posteriormente à inoculação, os explantes foram transferidos para sala de crescimento a 25 ± 2 °C, irradiância de 32 mmol.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas. Após 60 dias, foi verificado maior número de folhas e peso de matéria fresca da parte aérea de ‘Kober 5BB’ em meio Knudson, em associação a 250 mg L⁻¹ de cloreto de potássio e 1000 mg L⁻¹ de nitrato de cálcio. Na ausência de cloreto de potássio verificaram-se melhores resultados no desenvolvimento *in vitro* de ‘Gravesac’. A melhor concentração de cloreto de potássio a ser adicionada ao meio Knudson para comprimento da parte aérea e número de raízes de ‘Kober 5BB’ é de 1.000 mg L⁻¹; e de nitrato de cálcio, de 0-500 mg L⁻¹ para ‘Kober 5BB’ e 500-1.500 mg L⁻¹ para ‘Gravesac’.

Palavras-chave: meio Knudson, *Vitis*, cultura *in vitro*.

ABSTRACT

MICROPROPAGATION OF TWO GRAPEVINE ROOTSTOCKS: EFFECT OF CALCIUM NITRATE AND POTASSIUM CHLORIDE

Micropropagation of rootstocks is, among other applications, used for obtaining virus-free plants in short time and germoplasm preservation. The aim of this study was to test the effects of different concentrations of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and KCl added to Knudson medium on the *in vitro* multiplication of rootstocks. Nodal segments obtained from *in vitro* plants were excised and inoculated in tubes containing 15 mL of culture media. The treatments consisted of different concentrations of calcium nitrate and potassium chloride, in all the possible combinations and the grapevine rootstocks ‘Kober 5BB’ and ‘Gravesac’. The culture media was supplemented with 25 g L⁻¹ sucrose, solidified with 6 g L⁻¹ agar, and the pH was adjusted to 5.8 before sterilization at 121°C and 1 atm for 20 minutes. Following inoculation, the explants were transferred to growth room at 25 ± 2°C, 32 μmol.m⁻².s⁻¹ irradiance and photoperiod of 16 hours. After 60 days, larger leaf number and larger fresh weight of aerial part was found for cv ‘Kober 5BB’ in Knudson medium with 250 mg L⁻¹ potassium chloride and 1000 mg L⁻¹ calcium nitrate. *In vitro* ‘Gravesac’ had best results in the

¹ Universidade Federal de Lavras. Departamento de Fitotecnia, DAG/UFLA. Lavras, MG. E-mails: fvilla2003@libero.it; mpasqual@ufla.br; mribeiro@ufla.br; alba.pereira@bol.com.br

absence of potassium chloride. Length of aerial part and root number of 'Kober 5BB' was best with potassium chloride in the concentration of 1000 mg L⁻¹. The best concentration of calcium nitrate for 'Kober 5BB' was 0-500 mg L⁻¹, whereas for 'Gravesac' was 500-1500 mg L⁻¹.

Keywords: Knudson medium, *Vitis*, tissue culture.

INTRODUÇÃO

A videira é uma fruteira difundida normalmente por via vegetativa. A micropropagação apresenta vantagens em relação a métodos tradicionais de propagação vegetativa, dentre os quais se destacam a rapidez do processo e a possibilidade de obtenção e manutenção de plantas matrizes livres de vírus (Peixoto & Pasqual, 1996).

Devido à grande variabilidade genética e à maior dificuldade de crescimento e diferenciação *in vitro*, a micropropagação de espécies lenhosas requer estudos mais específicos e desenvolvimento de metodologias que atendam às exigências do explante (Coelho, 1999). Os meios nutritivos utilizados na micropropagação fornecem substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (Caldas *et al.*, 1998). Embora o meio MS (Murashige & Skoog, 1962) tenha favorecido o crescimento e desenvolvimento de várias espécies, a utilização de composições mais diluídas, como os meios WPM (Lloyd & McCown, 1980) e Knudson (Knudson, 1946), para algumas espécies lenhosas tem fornecido melhores resultados (Grattapaglia & Machado, 1998).

Existe grande variedade de meios de micropropagação. Entretanto, a maioria das descrições de preparos de meios de cultura alternativos não demonstra de maneira comparativa se o novo meio é superior ao previamente estabelecido (Pasqual *et al.*, 1997).

O nitrogênio pode se apresentar em várias formas em meio nutritivo, como de cátion (amônio) e ânion (nitrito e nitrato). O efeito destas diferentes formas inorgânicas sobre o crescimento e desenvolvimento de culturas de tecidos é marcante: o nitrato, como única fonte de nitrogênio, sustenta boa taxa de crescimento em muitas espécies, sendo, também, a melhor forma de nitrogênio para algumas culturas, como orquídea (Reinert & Mohr, 1967) e várias outras espécies (Sargent & King, 1974). No entanto, há espécies que não crescem bem com nitrato no meio, como o arroz (Yatazawa & Furuhashi, 1968).

A alta proporção de nitrogênio (N) na forma de amônio no meio MS e a quantidade total de N são muito

maiores do que na maioria dos outros meios, tornando-se inadequadas para algumas espécies. Meios que apresentam menor proporção, como o Knudson ou WPM, são mais indicados para otimizar o crescimento e a morfogênese em algumas espécies (Pasqual *et al.*, 1997).

O cálcio apresenta limitações na sua translocação na planta intacta, que, às vezes, são observadas também *in vitro*. Como ele depende da transpiração da planta para seu transporte no xilema, as condições de alta umidade do ar que se estabelecem *in vitro* podem induzir deficiência de cálcio em partes aéreas em micropropagação (Sarkar *et al.*, 2005; Pasqual, 2001).

Esse fato foi observado em alguns cultivares de batata (*Solanum tuberosum*) *in vitro* com sintomas de necrose apical do caule (Sha *et al.*, 1985). Porém, quando se encontra um cultivar com maior exigência de cálcio, a concentração desse íon no meio pode aumentar e/ou ser utilizada uma tampa para o tubo ou frasco que permita maior troca de gases entre o ambiente e o interior.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes concentrações de Ca(NO₃)₂·4H₂O e KCl na micropropagação do porta-enxerto das videiras 'Kober 5BB' e 'Gravesac'.

MATERIAL E MÉTODOS

Segmentos nodais de *Vitis* spp. com cerca de 2,5 cm de comprimento, oriundos de plântulas preestabelecidas *in vitro*, foram excisados e introduzidos em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura. Os tratamentos consistiram de diferentes concentrações de nitrato de cálcio (0; 500; 1.000; 1.500; e 2.000 mg L⁻¹) e cloreto de potássio (0; 250; 500; 750; e 1.000 mg L⁻¹), originadas do meio MS (1962) e adicionadas ao meio de cultura Knudson (1946) e dos porta-enxertos das videiras 'Kober 5BB' e 'Gravesac'. O meio foi acrescido de 25 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C e 1 atm por 20 minutos. Posteriormente à inoculação, os explantes foram transferidos para sala de crescimento a 25 ± 2 °C, irradiância de 32 μmol.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas,

permanecendo nestas condições por 60 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando-se de quatro repetições, com 12 plântulas cada.

Foram avaliados os parâmetros número de folhas e de raízes, comprimento da parte aérea e peso das matérias fresca e seca da parte aérea. Os dados foram analisados através do software Sisvar (Ferreira, 2000), e os resultados submetidos à análise de variância, utilizando-se de regressão polinomial para concentrações de nitrato de cálcio e cloreto de potássio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se interação significativa para número de folhas, número de raízes e peso da matéria fresca da parte aérea dos dois porta-enxertos estudados. Além desses parâmetros, a 5% de probabilidade, observou-se também interação significativa para comprimento da parte aérea de ‘Kober 5BB’. Houve decréscimo do número de folhas de ‘Kober 5BB’ em relação ao aumento da concentração de nitrato de cálcio somente para as concentrações de 250 mg L⁻¹ e 1.000 mg L⁻¹ de KCl, e para ‘Gravesac’, com o aumento da concentração de cloreto de potássio (Figuras 1 e 2).

Maior número de folhas (3,49) de ‘Kober 5BB’ foi obtido com a associação de 250 mg L⁻¹ de cloreto de potássio e 1000 mg L⁻¹ de nitrato de cálcio no meio Knudson. Para ‘Gravesac’, verificou-se maior número (10,09; e 9,17) com acréscimo de 500 mg L⁻¹ e 1.500 mg L⁻¹ de nitrato de cálcio na ausência de KCl. Provavelmente esses porta-enxertos de videira requerem um meio de

cultura mais rico em nitrato de cálcio e mais pobre em cloreto de potássio para se desenvolverem melhor.

Esses resultados corroboram com os estudos com crisântemo, em que maior número de folhas foi obtido com a adição de 1.000 mg L⁻¹ de nitrato de cálcio ao meio MS na ausência de cloreto de potássio (Junqueira *et al.*, 2003). O nitrogênio em meio de cultivo é fornecido às plantas em forma de nitrato ou nitrito, estando envolvido no alongamento dos tecidos vegetais (Pasqual, 2001).

Analisando-se a Figura 3, pode-se observar que incrementos nas concentrações de nitrato de cálcio, adicionadas ao meio Knudson, proporcionaram diminuição no comprimento das plântulas de ‘Kober 5BB’ de forma quadrática. Resultado similar ocorreu com número de folhas, em que os melhores foram observados em 750 mg L⁻¹ de KCl.

Desta forma, maior comprimento de plântulas (3,85 cm) foi verificado em 1.000 mg L⁻¹ de cloreto de potássio e 500 mg L⁻¹ de nitrato de cálcio, concordando assim como os resultados obtidos por Junqueira *et al.* (2003), que, estudando o crescimento *in vitro* de crisântemo, encontraram maior comprimento da parte aérea com 125 mg L⁻¹ de nitrato de cálcio combinado com 1000 mg L⁻¹ de cloreto de potássio.

Podem-se observar na Figura 4 somente dados significativos com a adição de cloreto de potássio ao meio de cultivo para comprimento da parte aérea de ‘Gravesac’.

Incrementos nas concentrações de cloreto de potássio, adicionadas ao meio Knudson, proporcionaram diminuição no comprimento das plântulas.

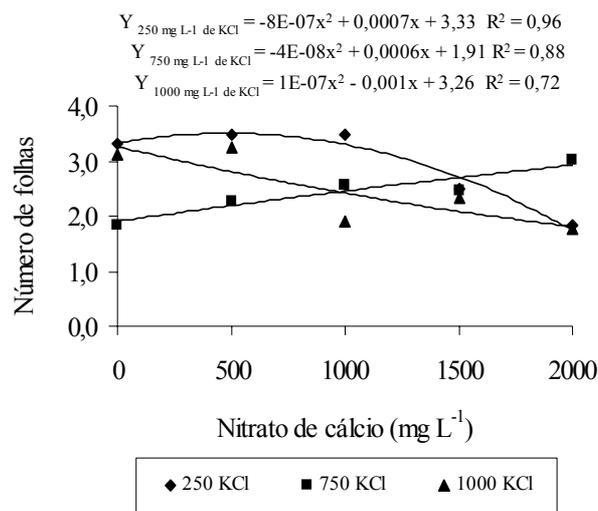


Figura 1. Número de folhas em plântulas de porta-enxerto de videira ‘Kober 5BB’ com diferentes concentrações de cloreto de potássio e nitrato de cálcio.

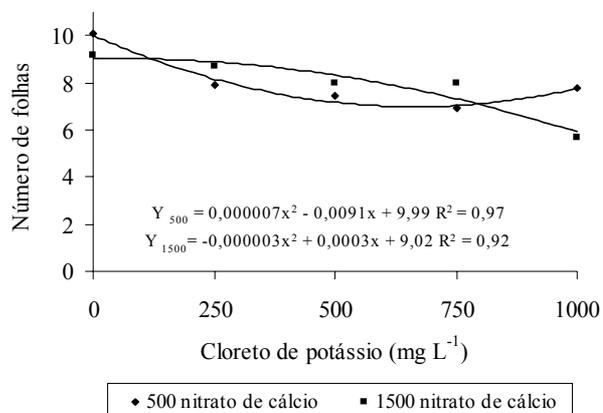


Figura 2. Número de folhas em plântulas de porta-enxerto de videira ‘Gravesac’ com diferentes concentrações de cloreto de potássio e nitrato de cálcio.

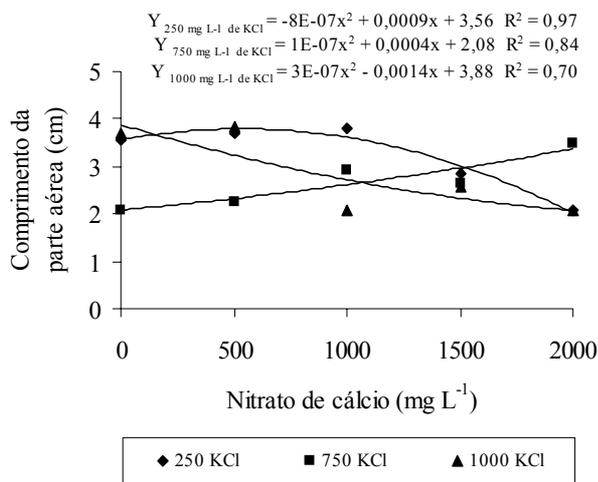


Figura 3. Comprimento da parte aérea em plântulas de porta-enxerto de videira ‘Kober 5BB’ com diferentes concentrações de cloreto de potássio e nitrato de cálcio.

Araújo (2004) verificou que incrementos nas concentrações de KNO_3 e NH_4NO_3 , adicionadas ao meio Knudson C, proporcionaram aumento no comprimento das plântulas de *Cattleya leopoldii* de forma linear, sendo observado maior comprimento de plântulas com 100% de KNO_3 e NH_4NO_3 .

Maior número de raízes de ‘Kober 5BB’ e ‘Gravesac’ (2,09) foi obtido na ausência de nitrato de cálcio e cloreto de potássio, associados a 1000 mg L⁻¹ de cloreto de potássio e 500 mg L⁻¹ de nitrato de cálcio, respectivamente (Figuras 5 e 6).

A adição de cloreto de potássio e nitrato de cálcio ao meio Knudson favoreceu o aumento no número de raízes, provavelmente porque o meio Knudson é considerado pobre em sais em relação ao MS. A adição de sais ao meio Knudson talvez favoreça a formação do sistema radicular da videira.

Poddar *et al.* (1997) estudaram altas concentrações de nitrato de amônio como substituto ao ácido naftaleno acético (ANA) em *Eleusine coracana* e observaram que concentrações de duas a seis vezes maiores que a utilizada no meio MS podem favorecer a formação de raízes na ausência do regulador de crescimento. Já em altas concentrações de nitrato de amônio e do ANA, o meio de cultura tornou-se fitotóxico para a espécie estudada.

De acordo com o mesmo autor, o nitrato pode funcionar como regulador de crescimento, estimulando brotações. Dessa forma, Araújo (2004), estudando as espécies de orquídea *Cattleya nobilior* x *Cattleya nobilior* e *Cattleya leopoldii*, observou que o nitrato estimulou o

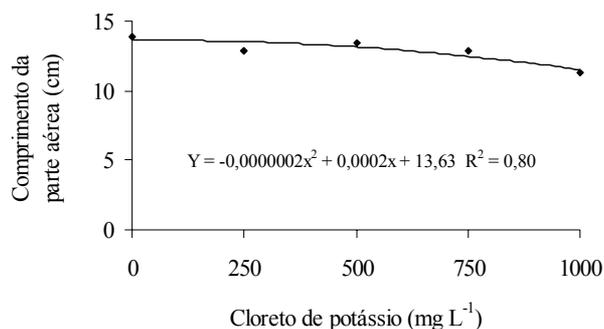


Figura 4. Comprimento da parte aérea em plântulas de porta-enxerto de videira ‘Gravesac’ com diferentes concentrações de cloreto de potássio.

crescimento de brotações até certo ponto, tornando-se tóxico a partir daí com o aumento das concentrações.

Junqueira *et al.* (2003) obtiveram resultados semelhantes, observando maior número de raízes de crisântemo em meio MS, com baixas concentrações de nitrato de cálcio combinado com 1000 mg L⁻¹ de cloreto de cálcio.

O incremento das concentrações de nitrato e cloreto de cálcio adicionadas ao meio Knudson causou diminuição no peso fresco das plântulas de ‘Kober 5BB’ e ‘Gravesac’, respectivamente. Maior peso da matéria fresca de plântulas de ‘Kober 5BB’ (0,84 g) e de ‘Gravesac’ (1,09 g) foi obtido com 1.000 mg L⁻¹ de nitrato de cálcio associado a 250 mg L⁻¹ de KCl e 1.500 mg L⁻¹ de nitrato de cálcio na ausência de KCl, respectivamente (Figuras 7 e 8).

Silva *et al.* (2001), estudando fontes de nitrogênio no desenvolvimento *in vitro* do porta-enxerto ‘Trifoliata’, concluíram que melhores resultados são obtidos com 75% da fonte KNO_3 associada com altas concentrações de NH_4NO_3 para altura e peso das brotações dos explantes.

Segundo Sakuta (1987), altas concentrações de nitrato (NO_3^-) podem ser críticas no processo de morfogênese e crescimento dos explantes. Provavelmente, esses resultados podem estar relacionados com a própria função metabólica do nitrogênio como constituinte de aminoácidos, enzimas e proteínas.

O nitrogênio (N) suplementado ao meio de cultura, tanto em forma de nitrato de amônio como de nitrato de potássio, é citado como benéfico nos processos de desenvolvimento dos explantes (Sakuta, 1987). É o principal nutriente inorgânico de qualquer meio de cultura, independentemente da sua espécie e do seu objetivo. A quantidade e a fonte de N pontualmente também influenciam o crescimento das culturas *in vitro*, seu metabolismo químico e a formação e produção de metabólitos (Russowski & Nicoloso, 2003).

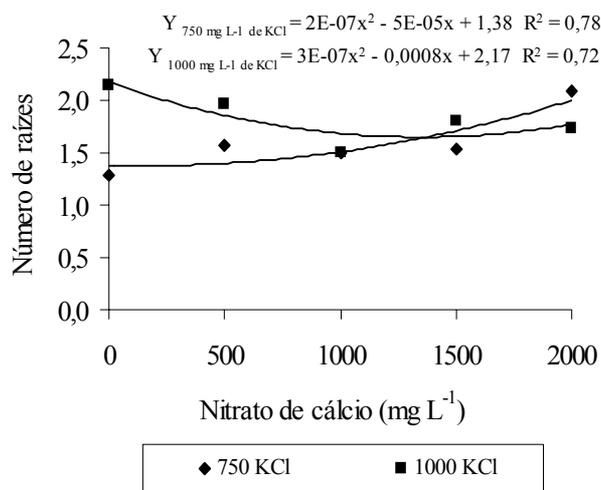


Figura 5. Número de raízes em plântulas de porta-enxerto de videira 'Kober 5BB', com diferentes concentrações de cloreto de potássio e nitrato de cálcio.

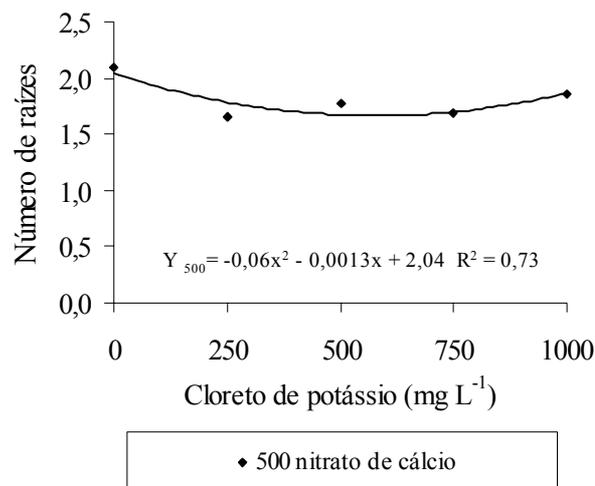


Figura 6. Número de raízes em plântulas de porta-enxerto de videira 'Gravesac' com diferentes concentrações de cloreto de potássio e nitrato de cálcio.

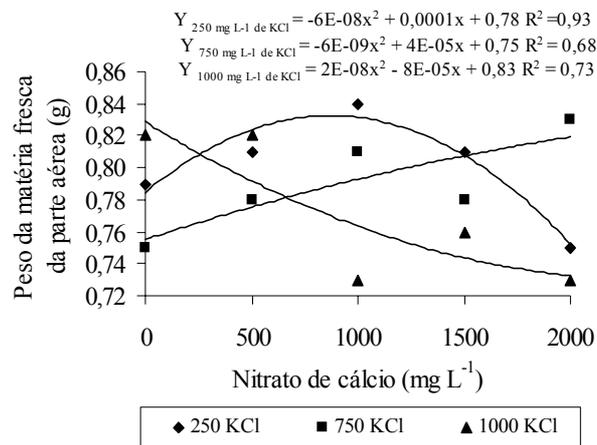


Figura 7. Peso da matéria fresca da parte aérea em plântulas de porta-enxerto de videira 'Kober 5BB' com diferentes concentrações de cloreto de potássio e nitrato de cálcio.

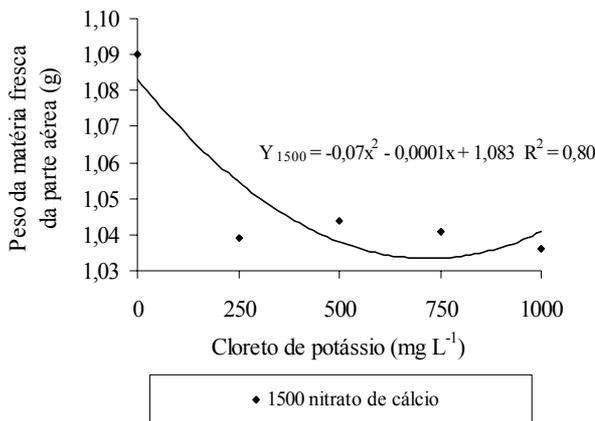


Figura 8. Peso da matéria fresca da parte aérea em plântulas de porta-enxerto de videira 'Gravesac' com diferentes concentrações de cloreto de potássio e nitrato de cálcio.

De acordo com George & Sherrington (1984), o desenvolvimento e a morfogênese em cultura de tecidos são acentuadamente influenciados pela disponibilidade de nitrogênio e pela forma como o mesmo é fornecido.

CONCLUSÕES

Maior número de folhas e peso de matéria fresca da parte aérea de 'Kober 5BB' foi verificado em meio Knudson, em associação com 250 mg L⁻¹ de cloreto de potássio e 1000 mg L⁻¹ de nitrato de cálcio.

Na ausência de cloreto de potássio, observaram-se melhores resultados no desenvolvimento *in vitro* de 'Gravesac'.

A melhor concentração de cloreto de potássio a ser adicionada ao meio Knudson para comprimento da parte aérea e número de raízes de 'Kober 5BB' é de 1.000 mg L⁻¹; e a de nitrato de cálcio, de 0-500 mg L⁻¹ para 'Kober 5BB' e 500-1.500 mg L⁻¹ para 'Gravesac'.

REFERÊNCIAS

- Araujo AG de (2004) Crescimento *in vitro* e aclimatização de plântulas de orquídea. 2004. 77 p. Dissertação de mestrado. Lavras, Universidade Federal de Lavras. Lavras. 77p.
- Caldas LS, Haridasan P & Ferreira ME (1998) Meios nutritivos. In: Torres AC, Caldas LS & Buso JA (eds). Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília; EMBRAPA/ CNPH. 87-132.

- Coelho MCF (1999) Germinação de sementes e propagação *in vitro* de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.]. Dissertação de mestrado. Lavras, Universidade Federal de Lavras. 119p.
- Ferreira DF (2000) Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: 45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, São Carlos. Anais, UFSCar. p.255-258.
- George EF & Sherrington PD (1984) Plant propagation by Tissue Culture - Handbook and directory of commercial laboratories. Eversley, Exegetics Limited. 593p.
- Grattapaglia D & Machado MA (1998) Micropropagação. In: Torres AC, Caldas LS & Buso, A (eds). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília, EMBRAPA/CNPQ. 183-260.
- Junqueira KP, Rodrigues VA, Santos FC & Pasqual M (2003) Crescimento *in vitro* de crisântemo: efeito do nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e cloreto de potássio (KCl). In: 14º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, Lavras. Anais, p.197.
- Knudson L (1946) A new nutrient solution for the germination of orchid seed. American Orchid Society Bulletin, 14:214-217.
- Lloyd, G & McCown B (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. International Plant Propagation Society Proceedings, 30:421-427.
- Murashige T & Skoog FA (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15:473-497.
- Pasqual M (2001) Meios de cultura. Lavras, UFLA/FAEPE. 74p.
- Pasqual M, Ramos JD, Hoffmann A & Carvalho GR (1997) Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações. Meios de cultura. Lavras, UFLA/FAEPE. 127p.
- Peixoto PHP & Pasqual M (1996) Influência da origem dos explantes na multiplicação e no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de videira. Ciência e Agrotecnologia, 20:293-300.
- Poddar K, Vishnoi RK & Kothari SL (1997) Plant regeneration from embryogenic callus of finger millet *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. on higher concentrations of NH_4NO_3 as a replacement of NAA in the medium. Plant Science, 129:101-106.
- Reinert RA & Mohr HC (1967) Propagation of *Cattleya* by tissue culture of lateral bud meristems. American Society for Horticultural Science, 91:664-671.
- Russowski D & Nicoloso FT (2003) Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de Ginseng Brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. Ciência Rural, 33:57-63.
- Sakuta M (1987) Effects of sucrose source on betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacca americana*. Physiology Plantarum, 71:459-463.
- Sargent PA & King J (1974) Investigations of growth-promoting factors in conditioned soybean root cells and in the liquid medium in which they grow: ammonium, glutamine, and aminoacids. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 52:1747-1755.
- Sarkar D, Pandey SK & Chanemougasoundharam A (2005) The role of calcium nutrition in potato (*Solanum tuberosum*) microplants in relation to minimal growth over prolonged storage *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 81:221-227.
- Sha L, McCown BH & Peterson LA (1985) Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. Journal American Society Horticultural Science, 110:631-634.
- Silva AB, Pio R, Ramos JD, Mendonça W, Pasqual M & Calegari M (2001) Influência das fontes de nitrogênio NH_4NO_3 e KNO_3 no desenvolvimento *in vitro* do porta-enxerto 'Trifoliata'. Revista Científica Rural, 6:147-152.
- Yatazawa M & Furuhashi K (1968) Nitrogen sources for the growth of rice callus tissue. Soil Science and Plant Nutrition, 14:73-79.