

Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados

Roniscley Pereira Santos¹
Ana Cláudia Ferreira da Cruz²
Lourdes Iarema³
Kacilda Naomi Kuki⁴
Wagner Campos Otoni⁵

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de um protocolo para extração de pigmentos foliares em dois porta-enxertos de videira, *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* e *V. riparia*. Nesse sentido, foram estudados três métodos de extração de pigmentos foliares para plantas cultivadas *in vitro* e aclimatizadas. Para isso, foram realizados dois experimentos no esquema fatorial 3 x 3, sendo três métodos de extração (DMSO com incubação por 24 horas, DMSO com incubação por 48 horas e acetona 80%) e número de discos foliares (quatro, cinco e seis) com cinco repetições por tratamento, sendo mensurados os conteúdos de clorofila *a*, *b*, totais e de carotenóides. O método de extração de pigmentos foliares baseado em DMSO demonstrou ser tão eficiente quanto o com acetona 80% para a extração de clorofila *a* e mais eficiente na extração de clorofila *b* para *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* cultivada *in vitro* e apresentou melhores resultados na extração de clorofilas *a* e *b* para ambos os cultivares na fase de aclimatização.

Palavras-chave: Acetona, dimetilsulfóxido, *Vitis* sp.

ABSTRACT

Protocol for extraction of leaf pigments from micropropagated grapevine rootstocks

The present work aimed to establish a protocol for extraction of leaf pigments of two grapevine rootstock varieties, *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* and *Vitis riparia*. Three leaf pigment extraction methods were evaluated for *in vitro* grown plants and those acclimatized. The experiments followed a factorial design 3 x 3, considering three extraction methods (incubation with DMSO for 24 h, incubation with DMSO for 48 h, and 80% acetone) and number (four, five and six) of 5 mm diameter leaf disks, with five replicates each treatment. *a*, *b*, and total chlorophyll and carotenoid levels were quantified. DMSO proved to be as efficient as 80% acetone to extract chlorophyll *a*, and more efficient to extract chlorophyll *b* from *in vitro* cultured *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*, and also presented better results for extraction of chlorophyll *a* and *b* for both acclimatized cultivars.

Key words: Acetone, dimethylsulfoxide, *Vitis* sp.

Recebido para publicação em agosto de 2007 e aprovado em junho de 2008.

¹ Mestrando em Fisiologia Vegetal, Bolsista CAPES/DBV, Universidade Federal de Viçosa, MG. E-mail: ronisrural@yahoo.com.br

² Doutoranda em Botânica/DBV, Bolsista CAPES, Universidade Federal de Viçosa, MG.

³ Doutoranda em Botânica/DBV, Bolsista CAPES, DBV, Universidade Federal de Viçosa, MG.

⁴ Doutoranda em Botânica/DBV, Bolsista FAPEMIG/DBV, Universidade Federal de Viçosa, MG.

⁵ Professor Associado I, DBV/BIOAGRO/UFV, Av. P. H. Rolfs s/n, Campus Universitário da UFV, 36.570-000 Viçosa, MG.

INTRODUÇÃO

As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes presentes nas plantas e ocorrem nos cloroplastos das folhas e em outros tecidos vegetais. Estudos em grande variedade de plantas caracterizaram que os pigmentos clorofilianos são os mesmos (Streit *et al.*, 2005) e que as diferenças aparentes na cor do vegetal são devidas à presença e distribuição variável de outros pigmentos associados, como os carotenóides, os quais sempre acompanham as clorofilas (Von Elbe, 2000).

Esses pigmentos são responsáveis pela conversão da radiação luminosa em energia, em forma de ATP e NADPH. Por essa razão, são estreitamente relacionados com a eficiência fotossintética das plantas e, conseqüentemente, ao seu crescimento e adaptabilidade a diferentes ambientes. A clorofila *a* (*chl a*) é o pigmento utilizado para realizar a etapa fotoquímica, o primeiro estágio do processo fotossintético. Os demais pigmentos auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação, sendo assim chamados de pigmentos acessórios (Buchanan *et al.*, 2000; Taiz & Zeiger, 2004).

A determinação do conteúdo de pigmentos foliares apresenta importante ferramenta de avaliação em estudos de fisiologia vegetal, quer seja para caracterização do material, que seja para a distinção entre tratamentos ou interação entre plantas e fatores ambientais (Lambers *et al.*, 1998).

Em sua maioria, os métodos empregados baseiam-se na absorvância e refletância dos pigmentos constituintes das folhas, podendo ser de caráter destrutivo ou não. Entre os métodos destrutivos, os que utilizam solventes orgânicos como a acetona e o éter são os mais comuns para plantas *in vivo* (Lichtenthaler, 1987). Entretanto, não se tem um protocolo para extração de pigmentos foliares de plantas propagadas *in vitro*. Tipicamente, essas crescem e se desenvolvem sob diferentes condições de estresse, como alta umidade relativa, elevados níveis de reguladores de crescimento, acúmulo de gases nos recipientes de cultivo e baixas irradiâncias, as quais podem causar degenerações nos cloroplastos, resultando em plantas com baixos conteúdos de clorofilas (Zobayed *et al.*, 2004; Zobayed, 2006).

O uso da acetona 80%, simultaneamente com o processo de maceração e centrifugação, constitui-se um dos métodos mais difundidos para a quantificação de clorofilas e carotenóides (Hiscox & Israelstam, 1979). Entretanto, este é um processo trabalhoso, pois geralmente em pesquisas com propagação de plantas *in vitro*, tem-se grande número de tratamentos e/ou, repetições, resultando, na maioria das vezes, em elevado número de amostras a serem analisadas.

O emprego de outros solventes orgânicos como o dimetilsulfóxido (DMSO) pode suprir em parte essa ne-

cessidade. O DMSO é reconhecido por sua elevada capacidade de difusão por meio de membranas semipermeáveis e por sua eficácia como carreador de proteínas (Ronen & Galun, 1984). Para a extração dos pigmentos em DMSO é necessária somente a imersão do material foliar em um conhecido volume do solvente, eliminando-se as etapas de maceração e centrifugação (Barnes *et al.*, 1992). Adicionalmente, o DMSO proporciona maior estabilidade dos extratos após estocagem a frio (Tait & Hilck, 2003). Porém, para que ocorra a extração e conservação máxima dos pigmentos foliares são necessários ajustes na quantidade de material vegetal a ser usado e no tempo de incubação, de acordo com cada espécie a ser analisada.

O presente trabalho buscou avaliar a aplicabilidade do DMSO na extração de pigmentos foliares em plantas cultivadas *in vitro*. Para tal, realizaram-se ensaios comparativos entre os dois solventes (DMSO e acetona 80%) com o intuito de determinar a eficiência do DMSO como extrator de pigmentos foliares em dois porta-enxertos de videira propagados *in vitro*, com o objetivo de estabelecer protocolo alternativo de extração de pigmentos.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas cultivadas in vitro

Plântulas de dois porta-enxertos de videiras – ‘VR 043-43’ (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*) e *Vitis riparia* – foram cultivadas *in vitro* em meio semi-sólido MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, complexo vitamínico de MS (0,2 g L⁻¹ de glicina, 0,05 g L⁻¹ de ácido nicotínico, 0,05 g L⁻¹ de piridoxina-HCl e 0,01 g L⁻¹ de tiamina-HCl) e 6,5 g L⁻¹ de ágar (Merck), e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C e 1,1 atm, por 20 minutos.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 36 μmol m⁻² s⁻¹ (fornecida por dois tubos fluorescentes de 20 W, OSRAM) e realizados subcultivos a cada 30-35 dias. Após 45 dias de cultivo *in vitro*, foram retirados quatro, cinco e seis discos foliares (5 mm de diâmetro), a partir da terceira ou quarta folha, e incubados em 5 mL de solução de DMSO (saturado com carbonato de cálcio), por períodos de 24 e 48 horas. Após cada período de incubação, determinou-se a absorvância das amostras, utilizando-se cubeta de quartzo de 10 mm de caminho ótico, em espectrofotômetro de duplo feixe (Modelo Hitachi U- 2000). Os comprimentos de ondas e as equações para o cálculo das concentrações de clorofilas *a*, *b* e carotenóides foram baseados no método descrito por Wellburn (1994). Paralelamente, efetuou-se a extração de pigmentos em acetona 80% com os mesmos números de discos foliares, de acordo com Lichtenthaler (1987), para posterior comparação dos resultados.

Plantas aclimatizadas

Após 45 dias de cultivo *in vitro* em ambiente controlado, as plantas dos dois porta-enxertos de videira foram transferidas para ambiente *ex vitro*, onde tiveram suas raízes lavadas em água corrente e acondicionadas em copos plásticos de 200 mL, contendo uma mistura de 50% de substrato comercial Plantmax® (Eucatex, Brasil) e 50% de fibra de coco triturada, autoclavados a 121 °C, 1,1 atm, por 30 minutos. Ainda em condições de laboratório, porém fora do ambiente controlado da sala de crescimento, as plantas foram individualmente envolvidas por um saco plástico transparente e submetidas à irradiância de 76 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, onde permaneceram por um período de 30-40 dias, até serem levadas para casa de vegetação.

Já em casa de vegetação, as plantas foram transferidas para vasos plásticos, contendo uma mistura de 50% de substrato de Plantmax® e 50% de fibra de coco. Após 70 dias de aclimatização, foram retirados quatro, cinco e seis discos foliares (5 mm de diâmetro cada), perfazendo 0,78; 0,98; e 1,18 cm^2 , respectivamente, a partir da terceira ou quarta folha, e incubados em 5 mL de solução de DMSO (saturado com carbonato de cálcio), por períodos de 24 e 48 horas em temperatura ambiente, semelhantemente ao método descrito para plantas cultivadas *in vitro*. O DMSO foi previamente saturado com carbonato de cálcio (CaCO_3) na proporção de 5 g L^{-1} de DMSO, sob agitação constante por quatro horas, e então filtrado em torno de seis vezes em duas camadas de papel filtro até ficar totalmente cristalino.

Assim como no método anterior, foram utilizados os mesmos comprimentos de ondas e as equações para os cálculos das concentrações de clorofilas *a*, *b* e carotenóides, baseados em método descrito por Wellburn (1994). Paralelamente, efetuou-se a extração de pigmentos em acetona 80% com os mesmos números de discos foliares, de acordo com Lichtenthaler (1987), para posterior comparação dos resultados.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 3 x 3 (métodos de extração x discos foliares), com cinco repetições por tratamento. Os resultados foram submetidos à ANOVA, e feita comparação de médias pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade. Os experimentos foram repetidos uma vez.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Plantas cultivadas in vitro

Comparando-se a extração de pigmentos para *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*, observa-se que houve interação significativa entre os dois fatores testados, observando-se resultados semelhantes na extração de chl *a*, independentemente do método e número de disco utilizados, com exceção de quatro discos em DMSO por 24 horas (Fig. 1A).

A extração de chl *b* em *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* pelo método DMSO com período de incubação de 48 horas apresentou melhores resultados, independentemente do número de discos foliares utilizados (Fig. 1B).

Kuki *et al.* (2005) obtiveram teores de clorofilas *a* e *b* significativamente maiores, quando três discos foliares de aroeira-vermelha (*Schinum terebenthifolius*) foram incubados em DMSO a 65 °C, por um período máximo de 48 horas.

O resultado da extração de pigmentos de *V. riparia* foi influenciado pela interação significativa entre os métodos e o número de discos foliares. Os teores de clorofilas *a* e *b* foram significativamente maiores quando se incubaram cinco e quatro discos foliares por um período de 24 e 48 horas, respectivamente, em DMSO (Fig. 1C e D).

Os resultados da extração da chl *b* pelos métodos com DMSO em *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* e *V. riparia* contradizem com os obtidos por Barnes *et al.* (1992) e Shinano *et al.* (1996), que apontam a ineficiência do DMSO para a extração total da chl *b*. No entanto, condizem com os encontrados por Kuki *et al.* (2005), ao trabalharem *in vivo* com *S. terebenthifolius* e *Cocos nucifera*.

Entretanto, para a extração de carotenóides em *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* a acetona 80% mostrou melhores resultados comparativamente aos demais métodos, tanto no desdobramento da interação do número de discos dentro de cada método como nos métodos para os números de discos (Fig. 2A). Já para extração de carotenóides em *V. riparia*, o método com acetona 80%, independentemente do número de discos foliares, foi superior e semelhante aos demais, quando quatro discos foliares foram incubados (Fig. 2B).

Foi obtida diferença significativa para a razão entre clorofilas *a* e *b* somente para *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* no método de extração com DMSO com período de incubação de 24 horas na comparação dos métodos para cada número de discos foliares mostrando a eficiência de extração de chl *a* em relação à chl *b* neste método, comparado aos demais (Fig. 2C).

Em *V. riparia*, a interação entre o método DMSO e cinco discos foliares, incubados por 48 horas, apresentou melhor resultado na razão entre as clorofilas *a* e *b*, evidenciando a especificidade na extração de pigmentos foliares entre os dois porta-enxertos, não apresentando diferenças nesta razão quando quatro discos foliares foram incubados em DMSO por 24 e 48 horas (Fig. 2D).

Segundo Morishige & Dreyfuss (1998) e Buchanan *et al.* (2000), para o complexo coletor de luz relacionado ao fotossistema I, a razão chl *a/b* varia de 2,0 a 4,4, e para o fotossistema II varia de 1,5 a 4,0. Nesse sentido, os resultados encontrados para *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* e *V. riparia* (1,6 a 3,3 e 1,9 a 3,6, respectivamente) estariam dentro dos limites verificados para outras plantas em geral.

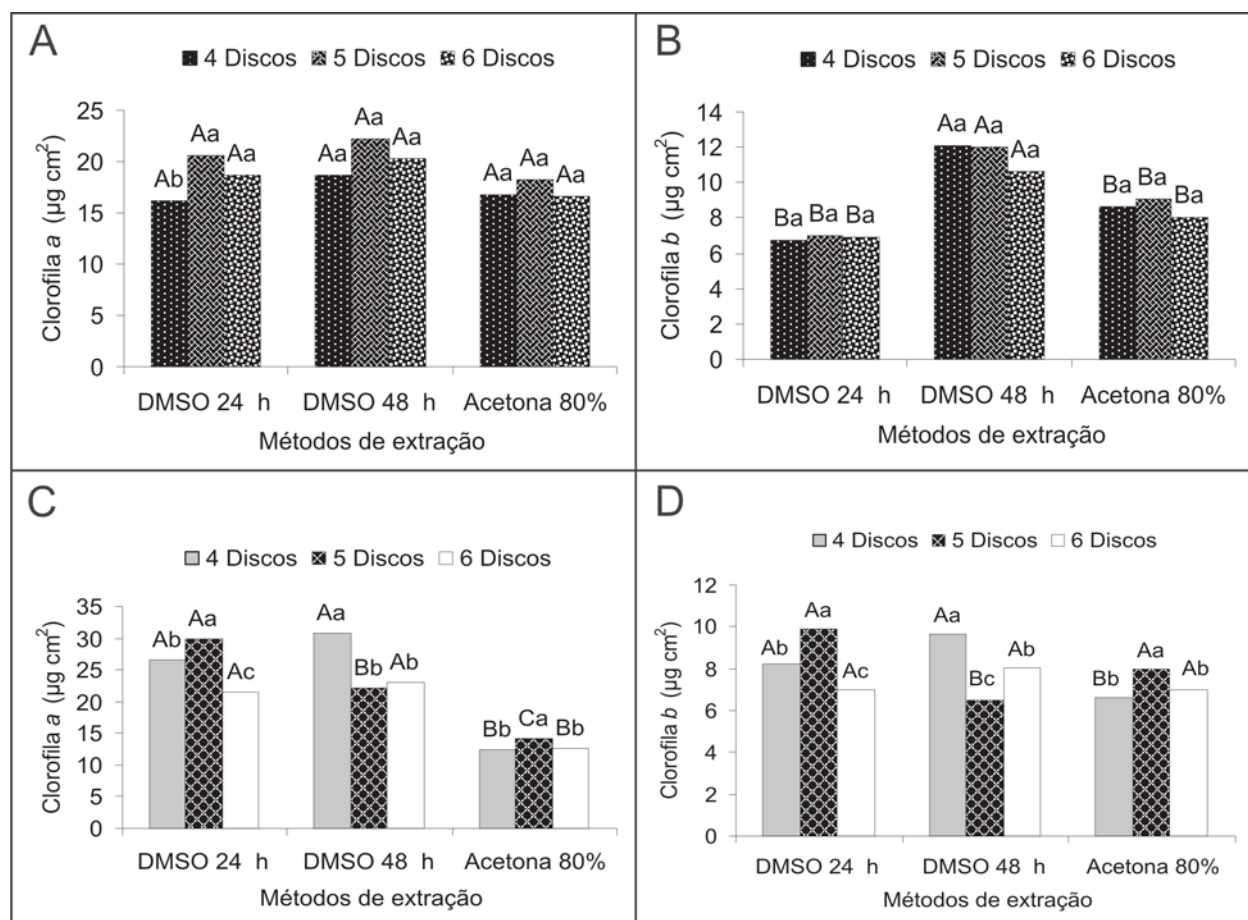


Figura 1. A) Médias da extração de clorofila a em *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*; **B)** extração de chl b em *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*; **C)** extração de chl a em *Vitis riparia*; e **D)** extração de chl b em *Vitis riparia*, propagadas *in vitro*, utilizando-se diferentes métodos de extração e discos foliares. Letras minúsculas comparam o número de discos foliares dentro de cada método de extração e letras maiúsculas comparam os métodos de extração para cada número de discos, pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade.

Mediante a análise de variância, observa-se que para *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*, o efeito da interação dos métodos com os números de discos foliares nos resultados da extração de clorofilas totais (chl a + chl b) não diferiram ao se usar quatro, cinco ou seis discos dentro de cada método de extração. Entretanto, dentre os métodos, o que utiliza DMSO com incubação por um período de 48 horas apresenta ser o mais indicado para a extração de clorofilas totais nesta espécie. O método baseado em DMSO, com incubação por 24 horas e acetona 80%, apresentou extração similar de clorofilas totais, porém inferior ao DMSO com incubação por 48 horas (Fig. 3A).

Diferentemente de plantas de *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*, a extração de clorofilas totais em *V. riparia* apresentou resultados mais expressivos quando se utilizaram cinco discos foliares incubados por 24 horas em DMSO e com quatro discos foliares incubados por 24 ou 48 horas, sendo os métodos com DMSO superiores ao com acetona 80% (Fig. 3B).

Borghazan *et al.* (2003), estudando diferentes porta-enxertos em condições *in vitro*, obtiveram teores de clorofila total variando de 0,70 a 1,48 mg g⁻¹ de massa fresca. 55(4): 356-364, 2008

Os porta-enxertos VR039-16, Paulsen 1103 e VR043-43 foram superiores aos demais, com valores próximos a 1,50 mg g⁻¹, mostrando a diferença em conteúdo de pigmentos entre os cultivares.

Para explicar a baixa eficiência do uso de DMSO na extração de chl b em plantas *in vivo*, foram sugeridas limitações como o grau de cutinização e espessura da folha, além da temperatura de incubação (Barnes *et al.*, 1992). Porém, plantas desenvolvidas *in vitro* geralmente apresentam pequena espessura da lâmina foliar e baixo grau de cutinização, além do baixo grau de lignificação. Portanto, não necessitam de tempo prolongado de extração nem de temperaturas maiores que a ambiente na incubação das amostras foliares para que se tenha eficiência no processo de extração sem degradação de pigmentos foliares.

A chl a é o pigmento mais abundante nos complexos coletores de luz e presente também nos centros de reação, ao passo que a chl b se encontra em menor quantidade e está presente, exclusivamente, nos complexos coletores de luz (Sandmann & Scheer, 1998; Buchanan *et al.*, 2000). Se por um lado as variações nos teores desses pigmentos podem indicar um ajuste das plantas às condi-

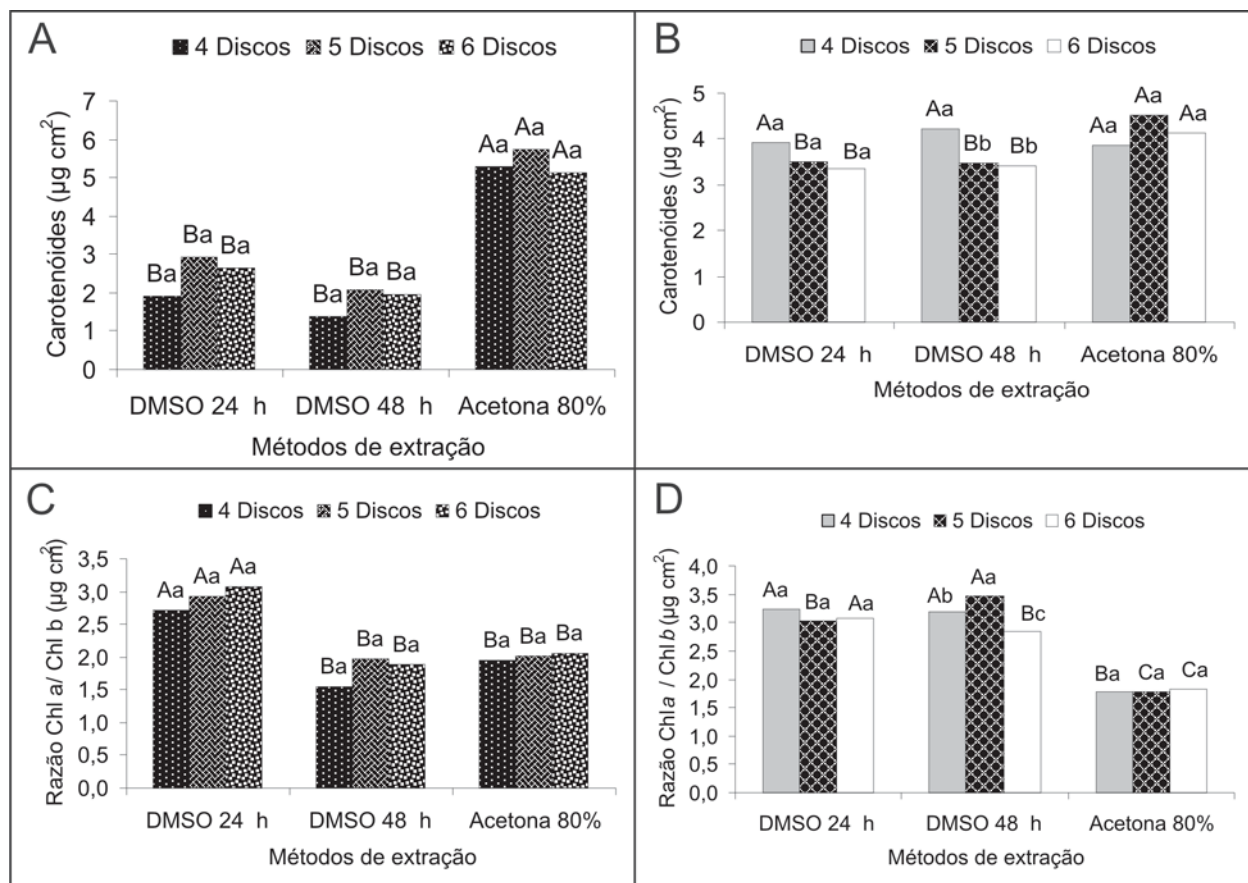


Figura 2. A) Médias dos teores de carotenóides em *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*; **B)** teores de carotenóides em *Vitis riparia*; **C)** razão entre chl a e chl b em *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*; e **D)** razão entre chl a e chl b em *Vitis riparia* propagadas *in vitro*, utilizando-se diferentes métodos de extração e discos foliares. Letras minúsculas comparam o número de discos foliares dentro de cada método de extração e letras maiúsculas comparam os métodos de extração para cada número de discos, pelo teste de Scott-Knot a 5 % de probabilidade.

ções particulares do meio em que se encontram, por outro, nas mesmas condições ambientais, as variações podem refletir diferenças intrínsecas do potencial de cada material vegetal.

As plantas cultivadas *in vitro* normalmente apresentam redução nos teores de clorofila quando comparadas às plantas aclimatizadas (Desjardins, 1995; Amâncio *et al.*, 1999; Pospíšilová *et al.*, 1999).

Plantas aclimatizadas

Por meio da análise de variância (ANOVA), pode-se verificar interação significativa a 5% de probabilidade entre os métodos e o número de discos foliares estudados nos dois porta-enxertos de videira para a extração de chl a; entretanto, sendo significativo para chl b somente no cultivar *V. riparia*, mostrando que os mesmos influenciam na extração de pigmentos em plantas aclimatizadas.

Em *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*, o método que utiliza DMSO com tempo de incubação por 24 horas apresentou maiores valores em termo de absorção de chl a, podendo ser usados quatro, cinco ou seis discos foliares,

sem diferenças significativas na extração desse pigmento cloroplastídico (Fig. 4A).

Comparando-se a extração de chl a de plantas aclimatizadas em relação às cultivadas *in vitro*, verifica-se que foi extraído mais que o dobro deste pigmento em todos os métodos de extração. Essa característica confirma a menor produção de pigmentos foliares em videiras cultivadas *in vitro*.

Para a extração de chl a em *V. riparia*, o efeito da interação entre os métodos e o número de discos foliares foi significativo, tendo em DMSO com tempo de incubação por 24 horas a utilização de cinco e seis discos foliares apresentado maior eficácia em relação aos métodos com DMSO por 48 horas e acetona 80% (Fig. 4B).

Não foi observada diferença na extração de clorofila a no método DMSO com incubação por 48 horas ao se usar quatro, cinco ou seis discos foliares (Fig. 4B).

Em termos quantitativos, foi observada em ambos os métodos maior produção/extração de chl a em *V. riparia* em relação à *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*, em que esta característica está diretamente ligada à maior extração de clorofilas totais em *V. riparia*, (Fig. 4A e B).

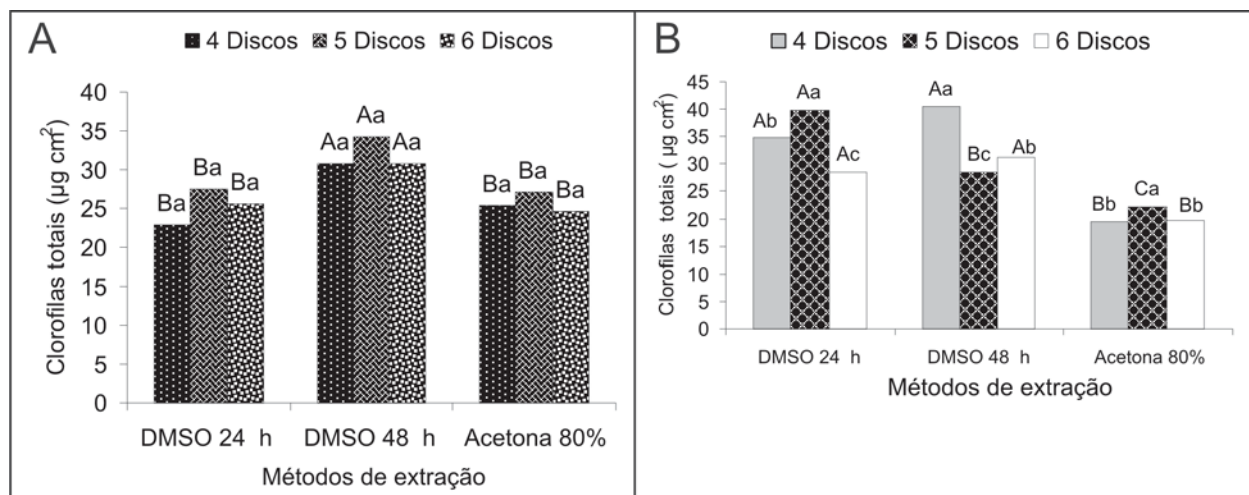


Figura 3. A) Médias de clorofilas totais (chl a + chl b) em *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* e **B)** clorofilas totais em *Vitis riparia* propagadas *in vitro*, utilizando-se diferentes métodos de extração e discos foliares. Letras minúsculas comparam o número de discos foliares dentro de cada método de extração e letras maiúsculas comparam os métodos de extração para cada número de discos, pelo teste de Scott-Knot a 5 % de probabilidade.

Em trabalhos realizados por Borghezani et al. (2003), o teor de clorofila variou entre os genótipos e os ambientes de cultura *in vitro* e *ex vitro*. Os porta-enxertos VR039-16 e Paulsen 1103 apresentaram teores superiores *in vitro*, enquanto nos porta-enxertos VR043-43, R110, SO4 e Kober 5BB os maiores valores de clorofila foram obtidos em casa de vegetação.

O efeito da extração de chl b em *V. riparia* foi significativamente maior no método DMSO com tempo de incubação por 24 horas associado ao uso de cinco ou seis discos foliares (Fig. 4C), não havendo diferença ao se usarem quatro ou seis discos foliares em todos os métodos estudados.

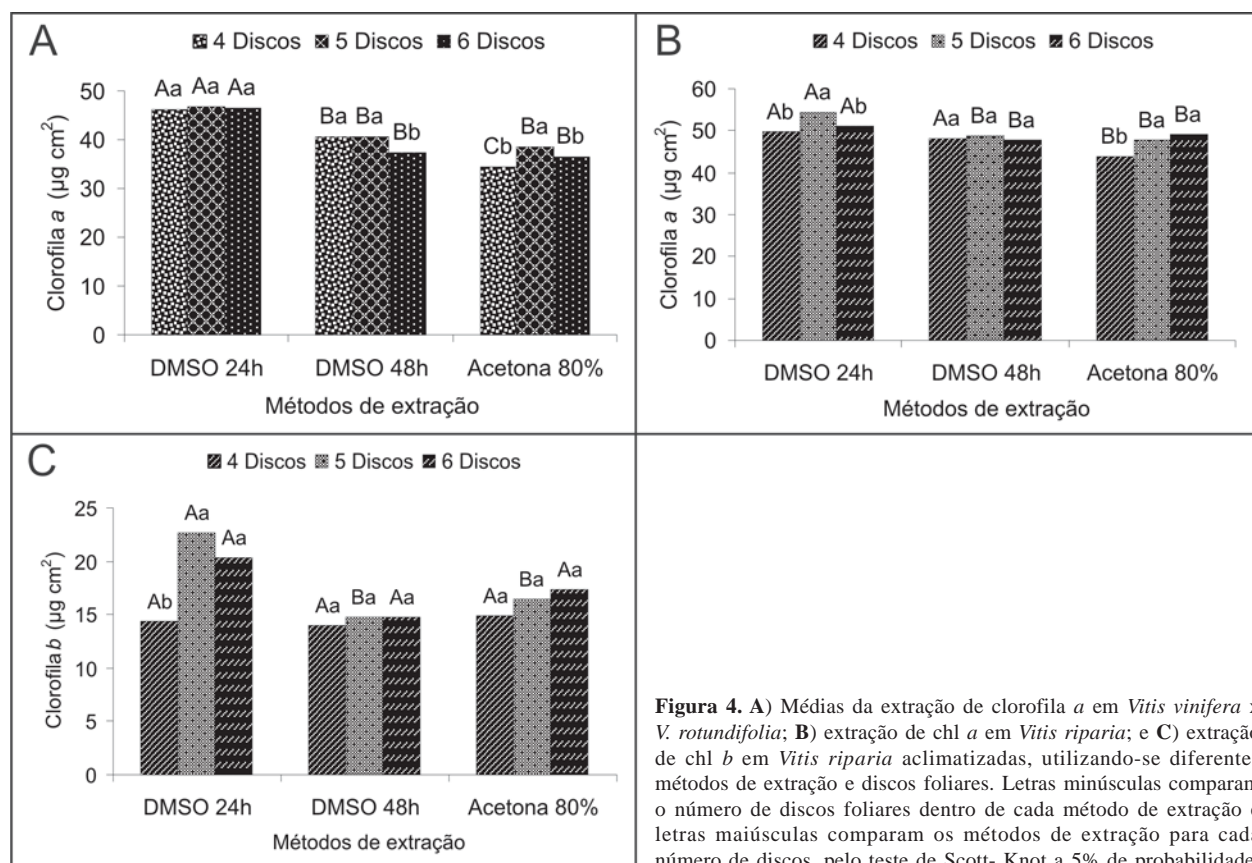


Figura 4. A) Médias da extração de clorofila a em *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*; **B)** extração de chl a em *Vitis riparia*; e **C)** extração de chl b em *Vitis riparia* aclimatizadas, utilizando-se diferentes métodos de extração e discos foliares. Letras minúsculas comparam o número de discos foliares dentro de cada método de extração e letras maiúsculas comparam os métodos de extração para cada número de discos, pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade.

Assim como em plantas de *V. vinifera* x *V. rotundifolia* propagadas *in vitro*, para plantas de *V. vinifera* aclimatizadas o método com acetona 80% combinado com quatro, cinco ou seis discos foliares mostrou-se bem mais eficiente na extração de carotenóides, quando comparado com os demais (Fig. 5A). O mesmo foi obtido para *V. riparia*; entretanto, seguido pelo método com DMSO 48 horas (Fig. 5B).

A razão entre chl *a* e chl *b* mostra que para plantas de *V. vinifera* x *V. rotundifolia* aclimatizadas a extração de chl *a* e chl *b* pelos métodos com DMSO com períodos de incubação de 24 e 48 horas, associados aos diferentes números de discos foliares, apresentou resultados similares e superiores ao método com acetona 80% (Fig. 5C).

Para a *V. riparia*, o resultado da razão entre chl *a* e chl *b* obtido no método com DMSO com incubação por 48 horas foi significativamente superior ao dos métodos DMSO por 24 horas e acetona 80%, exceto quanto se usaram quatro discos foliares incubados por 24 horas em DMSO (Fig. 5D).

Entre os métodos estudados, o que utiliza DMSO com período de incubação por 24 horas, associado tanto com quatro, cinco ou seis discos foliares, apresentou maior eficiência na extração de clorofilas totais (chl *a* + chl *b*) para *V. vinifera* x *V. rotundifolia*, não mostrando diferença ao se usarem quatro discos foliares incubados por 48 horas em DMSO (Fig. 6A).

Vitis riparia apresentou maior conteúdo de clorofilas totais quando comparada com *V. vinifera* x *V. rotundifolia*, sendo em parte explicado pela maior extração de chl *a*.

Da interação entre os fatores, métodos de extração e número de discos, o efeito dos resultados para clorofilas totais em *V. riparia* foi significativamente maior no método que utiliza DMSO com tempo de incubação por 24 horas, quando associado com cinco e seis discos foliares, não diferindo ao se usarem quatro discos foliares associados aos demais métodos (Fig. 6B).

Nas plantas aclimatizadas em casa de vegetação, o VR043-43 apresentou o maior teor de clorofila (2,76 mg g⁻¹), diferindo dos demais genótipos, enquanto o Paulsen 1103

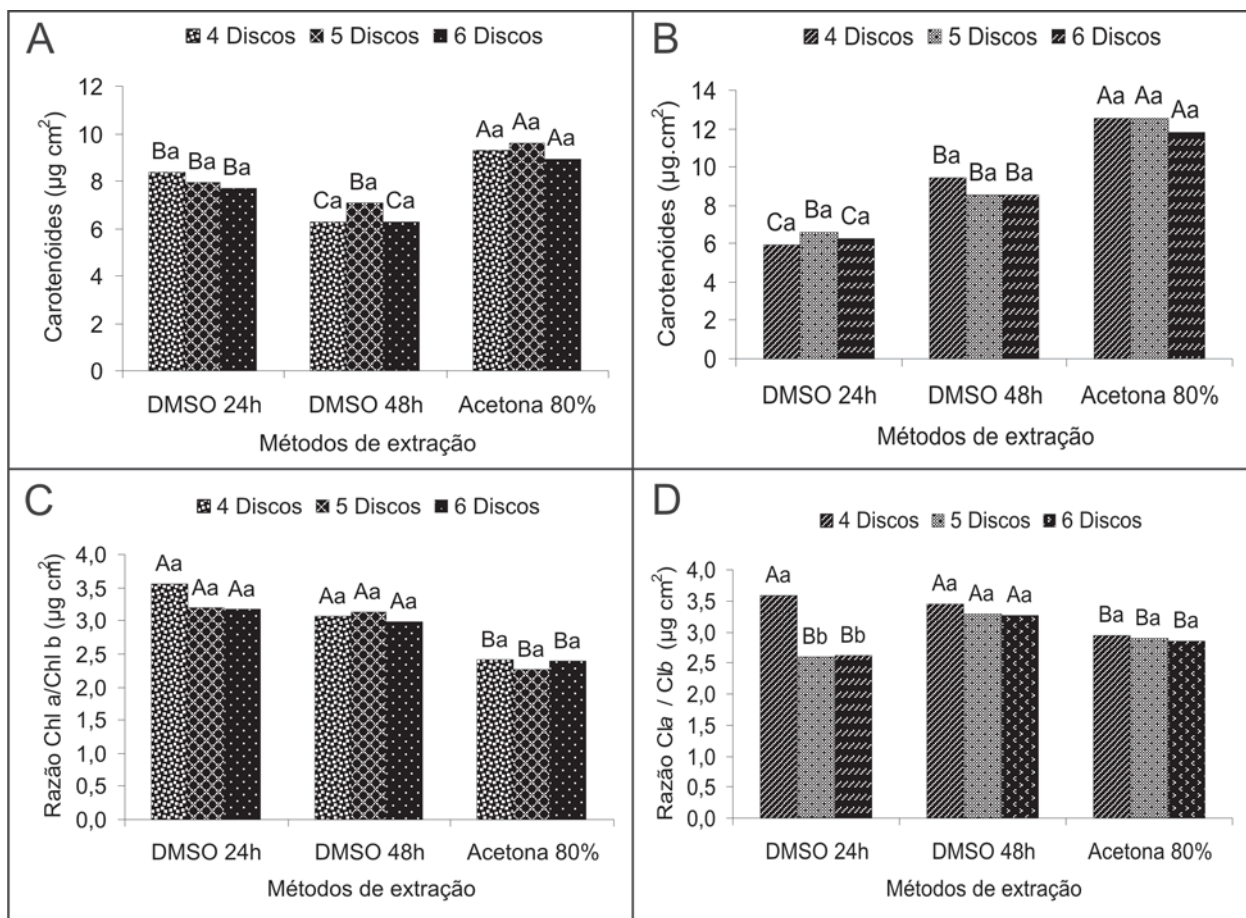


Figura 5. A) Médias da extração de carotenóides em *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*; **B)** extração de carotenóides em *Vitis riparia*; **C)** razão entre chl *a* e chl *b* em *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*; e **D)** razão entre chl *a* e chl *b* em *Vitis riparia* aclimatizadas, utilizando-se diferentes métodos de extração e discos foliares. Letras minúsculas comparam o número de discos foliares dentro de cada método de extração e letras maiúsculas comparam os métodos de extração para cada número de discos, pelo teste de Scott-Knot a 5 % de probabilidade.

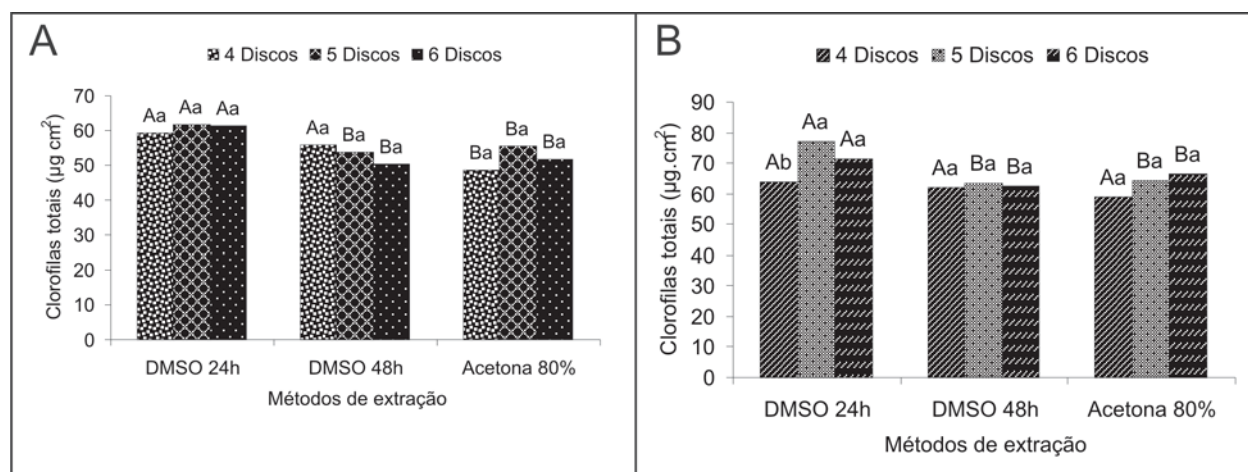


Figura 6. A) Médias da extração de clorofilas totais (chl a + chl b) em plantas de *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* e **B)** extração de clorofilas totais em plantas de *Vitis riparia* aclimatizadas utilizando-se diferentes métodos de extração e discos foliares. Letras minúsculas comparam o número de discos foliares dentro de cada método de extração e letras maiúsculas comparam os métodos de extração para cada número de discos, pelo teste de Scott-Knot a 5 % de probabilidade.

(0,86 mg g⁻¹) foi inferior a todos os porta-enxertos (Borghazan *et al.*, 2003).

Esses dados vêm comprovar que mesmo para plantas de *V. vinifera* x *V. rotundifolia* e *V. riparia* aclimatizadas podem ser utilizados métodos com o extrator DMSO por um período de tempo de incubação não muito prolongado, obtendo eficiência na extração de clorofilas em relação ao método da acetona 80%.

CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstra a viabilidade do uso do DMSO na extração de pigmentos foliares de porta-enxertos de videira micropropagados e sugere que a técnica seja avaliada para outras espécies de propagação rotineira *in vitro*.

Os métodos de extração baseados em DMSO com período de incubação de 48 (plantas cultivadas *in vitro*) ou 24 horas (plantas aclimatizadas), demonstraram ser tão eficientes quanto o com acetona 80% para a extração de clorofilas a e mais eficientes na extração de chl b para *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*, podendo ser usados quatro, cinco, ou seis discos foliares.

Para a *V. riparia*, o método DMSO, associado a cinco discos foliares incubados por 24 horas, demonstrou ser mais eficiente na extração de clorofilas tanto para plantas cultivadas *in vitro* como em plantas aclimatizadas.

Tanto para *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* quanto para *V. riparia* o método com acetona 80% mostrou ser mais eficiente na extração de carotenóides, seja em plantas cultivadas *in vitro* ou em plantas aclimatizadas

AGRADECIMENTO

CAPES e FAPEMIG., pelo apoio financeiro

REFERÊNCIAS

- Amâncio S, Rebordão JP, Chaves MM (1999) Improvement of acclimatization of micropropagated grapevine: photosynthetic competence and carbon allocation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58:31-37.
- Barnes JD, Balaguer L, Manrique E, Elvira S, Davison AW (1992) A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 32:85-100.
- Borghazan M, Moraes LKA de, Moreira FM, Silva AL da (2003) Propagação *in vitro* e avaliação de parâmetros morfofisiológicos de porta-enxertos de videira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38:783-789.
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2000) Photosynthesis. In: Buchanan BB, Gruissem W & Jones RL (Eds.) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville American Society of Plant Physiologists. p.568-629.
- Desjardins, Y. (1995) Overview of factors influencing photosynthesis of micropropagated plantlets and their effect on acclimatization. In: Carre F & Chagvardieff P (Eds.) *Ecophysiology and photosynthetic in vitro cultures*. Saint-Paul-lez-Durance, Centre d'études de Cadarache. p. 145-160.
- Hiscox JD & Israelstam GF (1979) A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*, 57:1332-1334.
- Kuki KN, Oliva MA, Gomes FP, Costa AC (2005) Avaliação da eficiência do dimetilsulfóxido na extração de pigmentos foliares de *Schinus terebenthifolius* e *Cocos nucifera*. In: X Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal e XII Congresso Latino-Americano de Fisiologia Vegetal, Recife. Anais, SBFV. CD Rom.
- Lambers J, Chapin FS, Pons TL (1998) *Plant physiological ecology*. New York, Springer-Verlag. 540 p.
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Colowick SP & Kaplan NO (Eds.) *Methods in Enzymology*, v.148. San Diego, Academic Press. p. 350-382.
- Morishige DT & Dreyfuss BW (1998) Light-harvesting complexes of higher plants. In: Raghavendra AS (Ed.) *Photosynthesis: A Comprehensive Treatise*. Cambridge, Cambridge University Press. p. 18-28.

- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
- Pospíšilová J, Tichá I, Kadlecěk P, Haisel D, Plzáková S (1999) Acclimatization of micropropagated to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum*, 42:481-497.
- Ronen R & Galun M (1984) Pigment extraction from lichens with dimethylsulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. *Environmental and Experimental Botany*, 24:239-245.
- Sandmann G & Scheer H (1998) Chloroplast pigments: chlorophylls and carotenoids. In: aghavendra AS (Ed.) *Photosynthesis: A Comprehensive Treatise*. Cambridge, Cambridge University Press, p. 44-57.
- Shinano T, Lei TT, Kawamukai T, Inoue MT, Koike T, Tadano T (1996) Dimethylsulfoxide method for the extraction of chlorophylls *a* and *b* from the leaves of wheat, field bean, dwarf bamboo and oak. *Photosynthetica*, 32:409-415.
- Streit, NM, Canterle LP, Canto MW, Hecktheuer LHH (2005) As clorofilas. *Ciência Rural*, 35:748-755.
- Tait MA & Hik DS (2003) Is dimethylsulfoxide a reliable solvent for extracting chlorophyll under field conditions? *Photosynthesis Research*, 78:87-91.
- Taiz L & Zeiger E (2004) *Fisiologia vegetal*. 3. ed. Santarém ER (Tradução). Porto Alegre, Artmed. 719 p.
- Von Elbe JH (2000) Colorantes. In: Fennema OW (Ed.) *Química de los alimentos*. 2.ed. Zaragoza, Wisconsin-Madison. p.782-799.
- Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144:307-313.
- Zobayed SMA (2006) Aeration in plant tissue culture. In: Dutta Gupta S & Ibaraki Y (Eds.) *Plant tissue culture engineering*. Netherlands, Springer. p.313-327.
- Zobayed SMA, Afreen F, Xiao Y, Kozai T (2004) Recent advancement in research on photoautotrophic micropropagation using large culture vessels with forced ventilation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 40:450-458.