Multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de videira em variações do meio MS

Fabíola Villa[1], Moacir Pasqual[2], Leila Aparecida Salles Pio[1] e Franscinely Aparecida Assis[3]

*[1]Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Departamento de Agronomia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil. [2]Departamento de Agronomia, Universidade Federal de Lavras. [3]Curso de Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras. *Autor para correspondência. e-mail: fvilla2003@libero.it*

RESUMO. A micropropagação da videira pode gerar plantas livres de vírus e em curto espaço de tempo. Com o objetivo de aprimorar técnicas de propagação *in vitro*, testaram-se concentrações de meio de cultura MS e de sacarose. Gemas axilares com 2,0 cm, de plântulas preestabelecidas *in vitro* do porta-enxerto de videira 043-43, foram excisadas em condições assépticas e introduzidas em tubos de ensaio com cinco concentrações de MS (0, 50, 100, 150 e 200%) e cinco diferentes concentrações de sacarose (0, 15, 30, 45 e 60 g L^{-1}), em todas as combinações possíveis. O pH foi ajustado para 5,8 antes da adição de 6,0 g L^{-1} de ágar e da autoclavagem a 121°C e 1 atm por 20 minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos por 60 dias, em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 1°C, irradiância de 32 μmol.m^{-2}.s^{-1} e fotoperíodo de 16 horas diárias. O delineamento experimental foi inteiramente casualisado, em esquema fatorial (5x5), utilizando-se de quatro repetições com 12 plântulas por tratamento. Foram avaliados os números de folhas, número de raízes por planta, comprimento da parte aérea e peso da biomassa. Há influência da concentração do meio MS e da sacarose sobre o crescimento e desenvolvimento, tanto da parte aérea quanto do sistema radicular do porta-enxerto de videira 043-43. Para a micropropagação do porta-enxerto de videira, melhores resultados são obtidos com o uso do meio MS até na sua concentração original, suplementado com 15-30 g L^{-1} de sacarose.

Palavras-chave: *Vitis* sp., micropropagação, meio de cultura MS.

ABSTRACT. In vitro multiplication of rootstock grapevine in variations of culture media. The grapevine micropropagation can generate virus-free plants and in short time period. Aiming at improving *in vitro* propagation techniques, concentrations of MS culture medium and sucrose were tested. Axillary buds (2.0 cm length) of '043-43' rootstocks maintained *in vitro* were excisaded in aseptic conditions and inoculated in tubes with five concentrations of MS culture medium (0, 50, 100, 150 and 200%) and five different sucrose concentrations (0, 15, 30, 45 and 60 g L^{-1}), in all possible combinations. The pH was adjusted for 5.8 before the addition of 6.0 g L^{-1} agar and sterilization to 121ºC and 1 atm for 20 minutes. After inoculation, the explants were maintained for 60 days, in growth room with temperature of 25 ± 1ºC, irradiance of 32 mol.m^{-2}.s^{-1} and photoperiod of 16 hours. The experiment was arranged in a completely randomized design, in a 5x5 factorial scheme, using four repetitions with 12 plants per treatment. The numbers of leaves, number of roots per plant, length of the aerial part and fresh weigh of the aerial part were evaluated. There is influence of the concentration of the culture medium and the sucrose on the growth and development of the aerial part and the roots of grapevine '043-43' rootstock. For the grapevine rootstock micropropagation, better results are obtained with the MS culture medium in its original concentration, supplemented with 15-30 g L^{-1} of sucrose.

Key words: *Vitis* sp., micropropagation, MS culture medium.

Introdução

A micropropagação da videira 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 (Cheé e Pool, 1982; Peixoto e Pasqual, 1996; Silva *et al*., 1997).

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). Esta pode ser feita a partir de brotos apicais ou

segmentos foliares em meio de cultura MS, suplementado com reguladores de crescimento (Skirvin *et al*., 1981).

Vários autores têm relatado a possibilidade de reduzir a concentração de sais do meio MS para diversas espécies, visando ao melhor desenvolvimento das plantas e à redução nos custos (George e Sherrington, 1984). Paiva *et al*. (1997) utilizaram 50% dos sais do meio MS, obtendo bom desenvolvimento *in vitro* de gloxínia. O enraizamento de brotos de amoreira-preta cvs. Thornless Boysenberry e Thornless Youngberry deu-se em meio MS (1/16 da concentração), independentemente da adição de reguladores de crescimento (Skirvin *et al*., 1981). No entanto, concentrações de sais no meio básico MS (Murashige e Skoog, 1962), reduzidas a 1/2, 1/3 ou 1/4, possibilitaram melhor enraizamento *in vitro* de amoreira-preta, cultivar Caiguangue (Dantas *et al*., 2000).

A concentração de sacarose também é um fator determinante no crescimento e é dependente do tipo de explante (Caldas *et al*., 1998). Além disso, afeta a produção de metabólitos secundários de grande importância nos processos metabólicos e na composição da parede celular (Pasqual, 2001). Estudos comprovaram que 75 a 85% do aumento da biomassa se devem à incorporação de carbono pela adição de sacarose (De Riek *et al*., 1997). A concentração mais utilizada no preparo do meio de cultura MS é de 30 g L^{-1}; entretanto, modificações nesse número podem beneficiar o cultivo *in vitro*. Já o excesso de sacarose pode ser prejudicial, pois inibe a síntese de clorofila e, portanto, reduz a capacidade fotossintética das culturas, mesmo sendo essencial ao crescimento (Yamada e Sato, 1978). Embora o açúcar não seja o componente de maior custo no preparo do meio de cultura, a redução de sua concentração pode ser economicamente favorável, especialmente para a produção comercial de mudas (Hoffmann, 1999).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes concentrações de sacarose e do meio de cultura MS na micropropagação do porta-enxerto de videira '043-43'.

Material e métodos

Segmentos nodais do porta-enxerto de videira 043-43 com cerca de 2,0 cm de comprimento, 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 MS (0, 50, 100, 150 e 200%), suplementado com diferentes concentrações de sacarose (0, 15, 30, 45 e 60 g L^{-1}). O meio foi solidificado com 6,0 g L^{-1} de ágar (Merck®) e o pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 121ºC e 1 atm por 20 minutos. Posteriormente, à inoculação, os explantes foram transferidos para sala de crescimento com temperatura de 25 ± 1ºC, irradiância de 32 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ fornecida por tubos fluorescentes de 20W (Osram®), luz do dia especial e fotoperíodo de 16 horas diárias, permanecendo nessas condições por 60 dias. O delineamento experimental foi o inteiramente casualisado, em esquema fatorial (5x5), utilizando-se de quatro repetições com 12 plântulas cada.

Foram avaliados como parâmetro o número de folhas, o número de raízes por planta, o comprimento da parte aérea e o peso da biomassa. Os dados foram analisados pelo software Sisvar (Ferreira, 2000), utilizando regressão polinomial para as concentrações dos sais e de sacarose.

Resultados e discussão

Utilizando-se o teste F ao nível de 5% de probabilidade, verificou-se interação significativa para número de folhas, comprimento da parte aérea e número de raízes do porta-enxerto de videira 043-43, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Análise de variância para número de folhas (NF), número de brotos (NB), número de raízes (NR), comprimento médio de raízes (CMR), comprimento da parte aérea (CPA). Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Estado de Minas Gerais.

Fontes de variação	G.L.	QM			
		NF	CPA	PFPA	NR
MS (A)	4	1,53*	4,46*	0,0003$^{n.s.}$	0,232*
Sacarose (B)	4	2,76*	5,67*	0,0011*	1,489*
(A) x (B)	16	0,44*	1,43*	0,00042$^{n.s.}$	0,214*
erro	72	0,13	0,80	0,00033	0,057
CV %		21,90	25,84	2,49	23,19

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F; n.s. = não significativo; NF = Número de folhas; CPA = Comprimento da parte aérea; PFPA = Peso fresco da parte aérea; NR = Número de raízes.

A partir da análise de variância (Tabela 1), observa-se que a interação entre os fatores MS e sacarose foi significativa. Entretanto, por meio do teste F, não se verificou resultado significativo em relação às concentrações de sacarose apenas em 200% MS.

Com o aumento das concentrações de sacarose, verificou-se um aumento de forma quadrática no número de folhas do porta-enxerto de videira, nos meios 50%MS, MS e 150%MS, sendo que, maior número (2,51) foi obtido com metade do meio MS, adicionado de 30 g L^{-1} de sacarose (Figura 1).

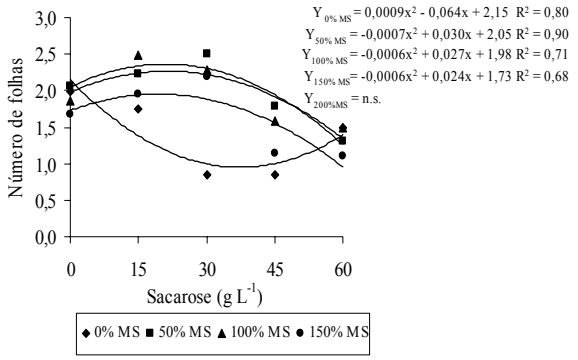

Figura 1. Número de folhas de porta-enxerto de videira 043-43, cultivado em diferentes concentrações de sacarose e do meio MS, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Estado de Minas Gerais.

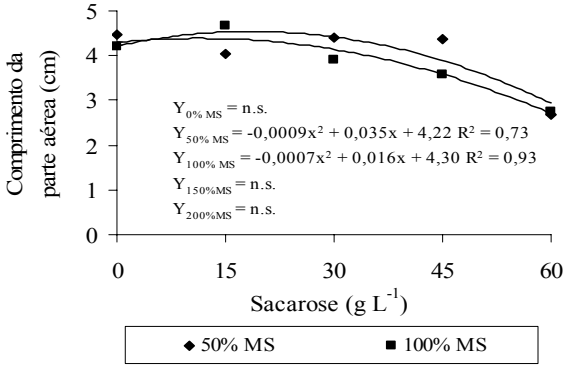

Figura 2. Comprimento da parte aérea (cm) de porta-enxerto de videira 043-43, cultivados em diferentes concentrações de sacarose e do meio MS, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Estado de Minas Gerais.

A diferença observada em 50%MS e 100%MS foi muito pequena. Se o objetivo do trabalho for o de reduzir custos, seria viável a utilização de um meio de cultura com metade de seus sais. Na ausência do meio MS ocorreu de forma quadrática um decréscimo no número de folhas do porta-enxerto de videira. Isso se justifica pelo fato de o meio conter os macro e micronutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento *in vitro* da cultura.

Nos tratamentos que continham baixas concentrações de sacarose (até 15 g L^{-1}) verificou-se vitrificação e clorose nas folhas, corroborando assim com Langford e Wainwright (1987), que verificaram o mesmo efeito em roseiras híbridas *in vitro*, cv. Iceberg e Peace. De acordo com Grattapaglia e Machado (1990) concentrações de sacarose inferiores a 2% podem resultar clorose na cultura. Concentrações acima de 4% podem elevar excessivamente o potencial osmótico do meio, dificultando o desenvolvimento do material, conforme verificado com o porta-enxerto de videira neste trabalho.

Em função da análise de variância para o comprimento das plântulas de videira, verificou-se interação significativa entre sacarose e o meio de cultura MS (Tabela 1). Por meio do teste F, observou-se, entretanto, resultado significativo em relação às concentrações de sacarose apenas na metade do meio MS e na sua concentração total (Figura 2). Com o aumento nas concentrações de sacarose adicionadas ao meio MS, observaram-se resultados semelhantes para esses dois meios de cultura, com um decréscimo no comprimento da parte área.

Maiores alturas da parte aérea do porta-enxerto nos meios de cultura MS e em 50%MS foram observadas em baixas concentrações de sacarose, em que o desenvolvimento da parte aérea possivelmente ocorreu devido ao gasto energético das reservas dos próprios explantes.

O aumento da concentração de sacarose não incrementou o comprimento do porta-enxerto de videira no meio MS, proporcionando um efeito deletério no meio de cultura. O excesso de sacarose pode ser prejudicial, pois a presença de carboidrato no meio de cultura inibe a síntese de clorofila e, portanto, reduz a capacidade fotossintética das culturas, mesmo sendo essencial ao crescimento (Yamada e Sato, 1978). Pasqual (2001) observou um aumento na taxa de fotossíntese quando, em subculturas sucessivas, a concentração de sacarose foi reduzida de 20 ou 40 g L^{-1} para 10 g L^{-1}.

Resultados antagônicos foram relatados por Rezende (1996), nos quais obteve em kiwi, cv Hayward, maiores brotações na associação de 200% de meio MS com 36,30 g L^{-1} de sacarose, e, no cv Matua, com a adição de 35,20 g L^{-1} de sacarose ao meio contendo 163,51% da concentração de nutrientes.

Villa *et al.* (2004) também verificaram maior comprimento de brotos de amoreira-preta, cvs Ébano, com a adição de 15 g L^{-1} de sacarose ao meio contendo 50% MS e na cv. Tupy, com a adição de 60 g L^{-1} de sacarose ao meio, contendo 150% MS. Chong e Pua (1985) observaram que o porta-enxerto de macieira Ottawa 3 apresentou um maior crescimento de brotações, na fase de multiplicação, com 30-50 g L^{-1} de sacarose.

Pode-se observar na Tabela 1 que não houve interação significativa para peso da biomassa fresca de plântulas. Concentrações significativas foram observadas somente para sacarose, em que maior peso da biomassa fresca (0,747g) foi observado na presença de 30 g L^{-1} de sacarose (Figura 3).

Verificou-se, pelo teste F, a interação significativa entre todos os fatores para número de raízes de plântulas de videira. Observa-se, na Figura 4, que com o aumento das concentrações de sacarose, ocorreu um aumento de forma quadrática no número de raízes apenas no meio de cultura 200% MS.

Resultados antagônicos foram verificados para todas as demais concentrações do meio MS. Maior número de raízes (1,59) foi verificado na ausência de sacarose, em metade do meio de cultura MS. Oliger *et al*. (1995) também obtiveram bons resultados na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta em metade do meio MS, suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose.

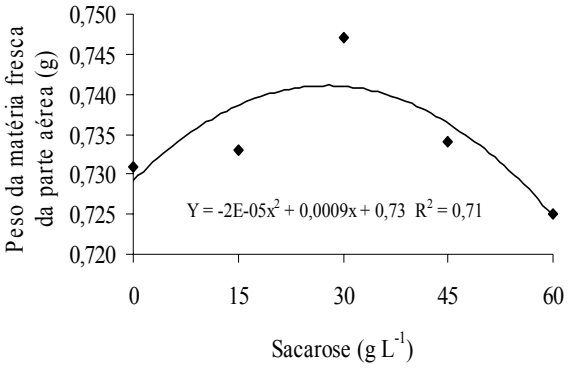

Figura 3. Peso da matéria fresca de porta-enxerto de videira 043-43, cultivados em diferentes concentrações de sacarose. Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Estado de Minas Gerais.

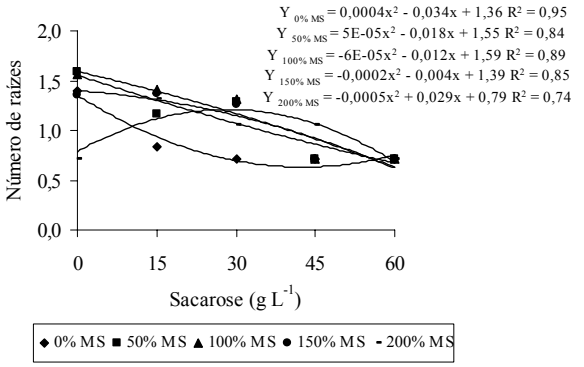

Figura 4. Número de raízes do porta-enxerto de videira 043-43, cultivados em diferentes concentrações de sacarose e do meio MS, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Estado de Minas Gerais.

No enraizamento de morangueiro, meios contendo baixa concentração de sais favorecem o enraizamento e o aumento do número de raízes primárias e secundárias nas cvs. Konvoy, Vila Nova e Campinas (Ferreira *et al*., 1996). Na maioria das vezes, as brotações não iniciam o processo de enraizamento em condições de concentrações altas de sais, uma vez que isso, tende a inibir o enraizamento e, particularmente, o crescimento de raízes (Dantas *et al*., 2000).

Simmonds (1983) conseguiu aumento significativo no enraizamento de macieira 'M-26' de 30 para 90% reduzindo a concentração de sacarose de 30 para 10 g L^{-1}. Embora o açúcar não seja o componente de maior custo no preparo do meio de cultura, a redução de sua concentração pode ser economicamente favorável, especialmente para produção comercial de mudas (Hoffmann, 1999).

De maneira geral, a concentração adequada de sacarose situou-se entre 15 e 30 g L^{-1}, sendo esta última mais usada, normalmente, no meio MS, corroborando a necessidade da sua utilização no meio de cultura. A sacarose, como fonte de carboidratos, visa suprir às necessidades metabólicas dos explantes, participando ou de geração de energia ou como fonte de esqueletos carbônicos para processos biossintéticos implicados na diferenciação celular e no crescimento (Nagao, 1993).

Conclusão

Há influência da concentração do meio MS e da sacarose sobre o crescimento e desenvolvimento tanto da parte aérea quanto do sistema radicular do porta-enxerto de videira 043-43.

Para a micropropagação do porta-enxerto de videira, melhores resultados são obtidos com o uso do meio MS até em sua concentração original, suplementado com 15-30 g L^{-1} de sacarose.

Referências

CALDAS, L.S. *et al*. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa, v. 1, p. 87-132. 1998.

CHEÉ, R.; POOL, R.M. The effects of growth substances and photoperiod on the development of shoot apices of *Vitis* cultured *in vitro*. *Sci. Hortic.,* Amsterdam, v. 16, p. 17-27, 1982.

CHONG, C.; PUA, E.C. Carbon nutrition of Ottawa 3 apple rootstock during stages of *in vitro* propagation. *J. Hortic. Sci.,* Ashford, v. 60, n. 3, p. 285-290, 1985.

COELHO, M.C.F. *Germinação de sementes e propagação in vitro de sucupira branca [Pterodon pubescens (Benth.) Benth.]*. 1999. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

DANTAS, M.C.A. *et al*. Enraizamento *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus* sp.), cultivar Caigangue. *Agropecu. Clima Temp.*, v. 3, p. 123-130, 2000.

DE RIEK, J. *et al*. Sucrose uptake and metabolism in a double layer system for micropropagation of *Rosa multiflora*. *Plant Cell. Tissue Organ. Cult.,* Dordrecht, v. 47, p. 269-278, 1997.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. *In:* REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000. São Carlos. *Anais...* São Carlos: Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), 2000. p. 225-258.

FERREIRA, A.F. *et al*. Enraizamento de duas cultivares de morangueiro (*Fragaria* x *Ananassa*, Duchesne) em diferentes concentrações de sais de meio MS. *In:* CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 14., 1996. Curitiba. *Resumos...* Curitiba: Iapar/SBF. 1996.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. *Plant propagation by tissue culture:* handbook and directory of commercial laboratories. Eversley: Exegetics Limited, 1984.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. *In:* TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.* Brasília: ABCTP/Embrapa-CNPH, 1990.

HOFFMANN, A. *Enraizamento e aclimatização de mudas micropropagadas dos porta-enxertos de maceira 'Marubakaido' e 'M-26'*. 1999. Tese (Doutorado)– Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

LANGFORD, P.J.; WAINWRIGHT, H. Effects of sucrose concentration on the photosynthetic ability of rose shoots *in vitro*. *Ann. Bot.*, London, v. 60, p. 633-640, 1987.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.,* Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

NAGAO, E.O. *Efeitos da sacarose, nitrogênio inorgânico e ácido indolbutírico na propagação in vitro do porta-enxerto Poncirus trifoliata (L.) Raf.* 1993. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1993.

OLIGER, P. *et al*. Micropropagation and *in vitro* regenerative studies in cultivated blackberry (*Rubus* spp). *Cienc. Invest. Agr.,* Santiago, v. 22, n. 3, p. 123-130, 1995.

PAIVA, P.D.O. *et al*. Propagação *in vitro* de gloxínia. *Rev. Bras. Hortic. Ornam.,* Campinas, v. 3, n. 2, p. 29-41, 1997.

PASQUAL, M. *Meios de cultura.* Lavras: UFLA/FAEPE, 2001.

PEIXOTO, P.H.P.; PASQUAL, M. Influência da origem dos explantes na multiplicação e no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de videira. *Cienc. Agrotecnol.,* Lavras, v. 20, n. 3, p. 293-300, 1996.

REZENDE, M.E. de. *Multiplicação in vitro de Kiwi [Actinidia deliciosa (A. Chevalier) Liang e Fergunson var. deliciosa] cvs. 'Hayward' e 'Matua': influência de concentrações do meio MS e sacarose e de níveis de ágar e pH.* 1996. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.

SIMMONDS, J. Direct rooting of micropropagated M-26 apple rootstock. *Sci. Hortic.,* Amsterdam, v. 21, n. 3, p. 233-242, 1983.

SILVA, A.L. *et al.* Cultura *in vitro* do porta-enxerto de videira var. 043-43 resistente a fusariose. *In:* SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE FRUTÍFERAS, 1., 1997. Jaboticabal, 1997. p. 51-53.

SKIRVIN, R.M. *et al*. *In vitro* propagation of Thornless trailing blackberries. *Hortscience*, Alexandria, v. 16, p. 310-312, 1981.

VILLA, F. *et al*. Micropropagação *in vitro* da amoreira-preta em diferentes meios. *Rev. Ceres*, Viçosa, v. 51, n. 296, p. 485-493, 2004.

YAMADA, Y.; SATO, F. The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. *Plant Cell Physiol.*, Kyoto, v. 19, p. 691-699, 1978.

Received on July 05, 2005.
Accepted on July 18, 2006.