

Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de videira ‘VR043-43’: efeito do ANA e NaCl

In vitro rooting grapevine rootstocks ‘VR043-43’: effect of NAA and NaCl

Fabiolla Villa¹, Moacir Pasqual², Chrystiane Borges Fráguas³,
Juliana Costa de Rezende⁴

¹ D.Sc., Pós-doutoranda em Fitotecnia, FAPEMIG/EPAMIG, Maria da Fé, MG.
E-mail: fvilla2003@libero.it

² D.Sc., Professor Adjunto, Departamento de Agricultura (DAG),
Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG.
E-mail: mpasqual@ufla.br

³ D.Sc., Produção Vegetal, FCAV/UNESP, Botucatu, SP.
E-mail: chrysbf@uol.com.br

⁴ D.Sc., Pesquisadora, EPAMIG, Lavras, MG

Recebido: 20/10/2008 Aceito: 19/12/2008

Resumo: A micropropagação do porta-enxerto de videira é utilizada, entre outros fatores, na obtenção de plantas livres de vírus, em curto espaço de tempo e na preservação de germoplasma. Objetivou-se testar diferentes concentrações de NaCl e ANA adicionados ao meio ½ MS, no crescimento e enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de videira. Segmentos nodais, oriundos de brotações preestabelecidas *in vitro* foram excisados e imediatamente inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura. Os tratamentos consistiram de concentrações de NaCl e de ANA, em combinações que resultaram em 25 tratamentos e do porta-enxerto de videira ‘VR043-43’. O meio foi acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 6,0 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 35 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, utilizando-se de quatro repetições com 16 brotações cada. Após 70 dias, observou-se, mesmo em meio salino, a presença de raízes em brotações de ‘VR043-43’. Em altas concentrações de ácido naftaleno acético, o porta-enxerto de videira se desenvolve e se enraíza bem.

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

Abstract: The micropropagation of grapevine rootstocks is used, among other factors, in the obtaining of plants virus-free, in short space time and in germoplasm preservation. It was aimed to test different NaCl and NAA concentrations added ½ MS culture medium, in the *in vitro* growing and rooting of rootstock. Nodal segments, originating from plants preset *in vitro* were excised and inoculated in tubes containing 15 mL of culture medium. The treatments consisted of NaCl and NAA concentrations, in all the possible

combinations and of rootstock 'VR043-43'. It was added to culture medium 30 g L⁻¹ sucrose, solidified with 6 g L⁻¹ agar and the pH adjusted for 5.8, before the sterilization to 121°C and 1 atm for 20 minutes. Later the inoculation, the explants were transferred for growth room to 25 ± 2°C, irradiance of 35 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and photoperiod of 16 hours. The used experimental delineate was casualised blocks, being used of four repetitions with 16 plants each. After 70 days, it was observed, even in saline culture medium, the presence of roots in plants of 'VR043-43'. In discharges acid naftalenacetic concentrations, the grapevine rootstock growing and rooting well.

Key-words: *tissue culture, MS culture medium, Vitis sp.*

Introdução

No Brasil, aproximadamente nove milhões de hectares são afetados pela presença de sais, cobrindo sete Estados. A maior área afetada está localizada no Estado da Bahia (44% do total), seguido pelo estado do Ceará, com 25% da área total do país (GHEYI & FAGEIRA, 1997). Nestas áreas, o aumento da concentração de sais de sódio decorre da drenagem deficiente de áreas irrigadas e do uso de água de má qualidade na irrigação. O excesso de sais de sódio afeta as propriedades físicas e químicas do solo, pois o Na⁺ aumenta a espessura da dupla camada iônica difusa, proporcionando a expansão das argilas e, conseqüentemente, reduzindo a porosidade e a permeabilidade do mesmo (FASSBEIDER & BORNEMUZA, 1987).

A presença de sais de sódio no solo provoca a redução generalizada do crescimento das plantas cultivadas com sérios prejuízos para a atividade agrícola. A redução no crescimento é conseqüência de respostas fisiológicas, incluindo modificações no balanço de íons, potencial hídrico, nutrição mineral, fechamento estomático, eficiência fotossintética e alocação e utilização de carbono (BETHKE & DREW, 1992).

A salinidade na rizosfera acarreta redução na permeabilidade das raízes para água, dando origem ao estresse hídrico. Em conseqüência, as plantas fecham os estômatos para reduzir as perdas de água por transpiração, resultando em uma menor taxa fotossintética, o que constitui uma das causas do reduzido crescimento das espécies sob condições de estresse salino (O'LEARY, 1971). Além desse fato, o NaCl afeta a síntese e a translocação de hormônios radiculares, indispensáveis ao metabolismo foliar (PRISCO, 1980).

O Brasil, atualmente, não figura na lista dos países maiores produtores de uvas. Este cultivo, porém, apresenta grandes possibilidades de expansão no Brasil, devido à utilização de novas fronteiras agrícolas, de variedades mais promissoras, de novas tecnologias, aumento do poder aquisitivo da população, possibilidade de produção em praticamente todo o ano e plantio irrigado onde ocorrem freqüentes problemas decorrentes do acúmulo de sais no solo (PEREIRA & NACHTIGAL, 1997). Apesar de sua importância, há poucos regis-

tros de estudos sobre o efeito da salinidade com NaCl no comportamento de frutíferas (bananeira - ULISSES *et al.*, 2000 e abacaxizeiro - PIZA *et al.*, 2003).

As auxinas controlam processos distintos, tais como crescimento e alongação celular, sendo muito utilizadas em micropropagação para promover a formação e crescimento de calos e de suspensão de células ou órgãos, bem como para regular a morfogênese, especialmente associadas com citocininas. As auxinas sintéticas mais comumente usadas na micropropagação de videira são o ANA (ácido naftaleno-acético) e o AIB (ácido indolbutírico) (CALDAS & HARIDASAN, 1998; PASQUAL *et al.*, 1997).

Diversos trabalhos com solução nutritiva têm evidenciado o efeito negativo dos íons Na e Cl, que contribuem para a salinidade do solo, sobre processos fisiológicos importantes para o crescimento das plantas (CRUZ *et al.*, 2006). Os efeitos desses íons estão relacionados ao efeito osmótico, o qual induz condição de estresse hídrico às plantas e ao efeito tóxico direto, principalmente sobre os sistemas enzimáticos e de membranas.

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos do ANA e NaCl sobre o crescimento e enraizamento *in vitro* de porta-enxerto de videira 'VR043-43'.

Material e Métodos

Segmentos nodais de *Vitis* sp. com cerca de 2,5 cm de comprimento, oriundos de brotações *in vitro* foram excisados e inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura. Os tratamentos consistiram de diferentes concentrações de NaCl (0; 250; 500; 750 e 1000 mg L⁻¹) e de ANA (0; 0,1; 0,5; 1,0 e 1,5 mg L⁻¹) adicionadas ao meio de cultura ½ MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e do porta-enxerto de videira 'VR043-43'. O meio foi acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar (Merck®) 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 35 µmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes de 20 W (Osram®), luz do dia especial e fotoperíodo de 16 horas, permanecendo nestas condições por 70 dias. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, utilizando-se de quatro repetições com 16 brotações cada.

Foram avaliados os parâmetros número de folhas e de raízes, comprimento da parte aérea, peso fresco e seco parte aérea e peso fresco de calos. As avaliações do número de folhas e raízes foram feitas em laboratório através de contagem e o comprimento realizado com régua. As avaliações de peso foram realizadas com balança analítica e o material vegetal foi colocado para secar em estufa por uma semana para se obter o peso seco. Utilizou-se o programa de análise estatística Sisvar (FERREIRA, 2000) para obtenção da análise de variância. Os fatores NaCl e ANA foram analisados através de regressão polinomial, a 5% de significância.

Resultados e Discussão

Mesmo na ausência do cloreto de sódio, houve formação de folhas nas plântulas de 'VR043-43', porém, com o aumento das dosagens deste sal, observou-se uma queda no número de folhas (Figura 1), talvez pelo fato que, altas dosagens são tóxicas aos explantes estudados.

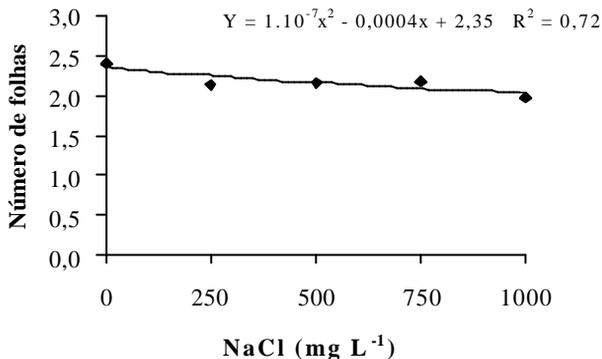


Figura 1. Número de folhas em plântulas de porta-enxerto de videira 'VR043-43', com diferentes concentrações de NaCl. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Segundo Pasqual *et al.* (1997), isto se deve, possivelmente porque o sódio e alguns microelementos são precipitados na solução ou sua absorção é reduzida. A taxa de incorporação de íons fosfato depende do genótipo, o qual é usualmente constante e proporcional à taxa de crescimento da cultura.

Maior número de folhas (2,396) de 'VR043-43' foi obtido na ausência do cloreto de sódio no meio de cultura. Amarelecimento das folhas e enfraquecimento das hastes também foi observado nos tratamentos que continham o cloreto de potássio, corroborando com Pasqual *et al.* (1997), que afirma que concentrações muito elevadas de cloro em algumas espécies lenhosas podem acarretar tal fato.

Patil *et al.* (1984), estudando a influência do cloreto de sódio em plantas de goiabeira, observaram reduções de 17% para o número de folhas/planta, aos 180 dias de estresse salino, em relação ao controle. Desai & Singh (1980) verificaram também em goiabeiras cultivadas em solução nutritiva com 30 e 60 mgL⁻¹ de NaCl, reduções de apenas 22% na altura e número de folhas. Nas dosagens de 750 a 1000 mgL⁻¹ de NaCl foi verificada hiperhidricidade nas folhas do porta-enxerto, onde o excesso de cloro é uma de suas causas (PASQUAL *et al.*, 1997).

Analisando-se a Figura 2, pode-se observar que incrementos nas concentrações de ácido naftaleno acético, adicionadas ao meio MS, proporcionaram aumento de forma quadrática no comprimento das plântulas de 'VR043-43'.

Desta forma, maior comprimento de plântulas (2,531 cm) foi observado com a adição 0,5 mg L⁻¹ de ANA.

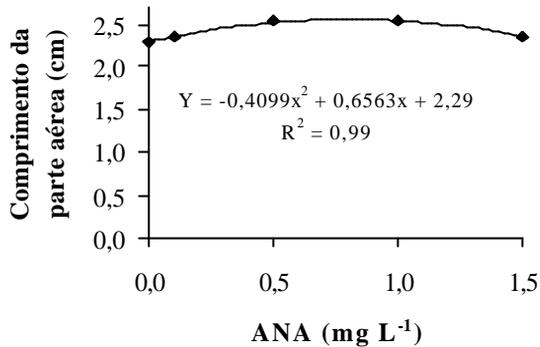


Figura 2. Comprimento da parte aérea em plântulas de porta-enxerto de videira ‘VR043-43’, com diferentes concentrações de ANA. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Verificou-se interação significativa entre o ácido naftaleno acético e o sal para número de raízes. Com o aumento das concentrações de ANA, observou-se um decréscimo no número de raízes de forma quadrática e semelhantes para todas as dosagens de cloreto de sódio. Resultados semelhantes foram observados na micropropagação de porta-enxerto de videira ‘P1103’ (PEIXOTO & PASQUAL, 1992).

Maior número de raízes (3,037) foi obtido na ausência de cloreto de sódio, associado a 1 mg L⁻¹ de ANA (Figura 3). A adição do ANA ao meio MS favoreceu o aumento no número de raízes provavelmente, porque o meio encontrava-se salino.

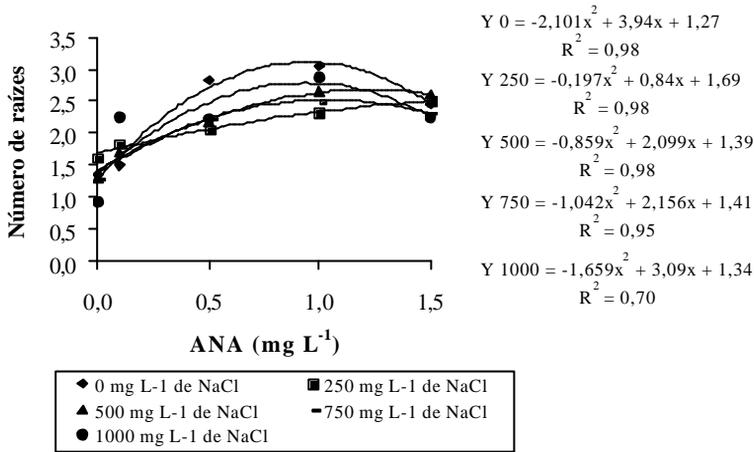


Figura 3. Número de raízes em plântulas de porta-enxerto de videira ‘VR043-43’, com diferentes concentrações de NaCl e ANA. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Quando se aumenta a quantidade de raízes formadas *in vitro*, aumenta-se também a área de contato raiz/substrato, refletindo em maior absorção dos nutrientes. Desta forma, o sódio presente no cloreto de sódio e o ANA contribuíram no aumento do número de raízes. Kanashiro (2005) também observou em bromélias (*Aechmea blanchetiana*) uma maior absorção de nutrientes em meio MS modificado, ocasionando um aumento no seu sistema radicular.

O incremento das concentrações de ANA adicionadas ao meio ½ MS, promoveram diminuição no peso fresco das plântulas de forma quadrática, obtendo-se maior peso da matéria fresca de plântulas (0,823 g) em 1,0 mg L⁻¹ de ANA (Figura 4). Isto se deve ao fato que o estresse salino pode afetar o crescimento celular e a expansão das folhas, tanto através da redução na pressão de turgescência como na extensibilidade da parede celular (PRISCO, 1980).

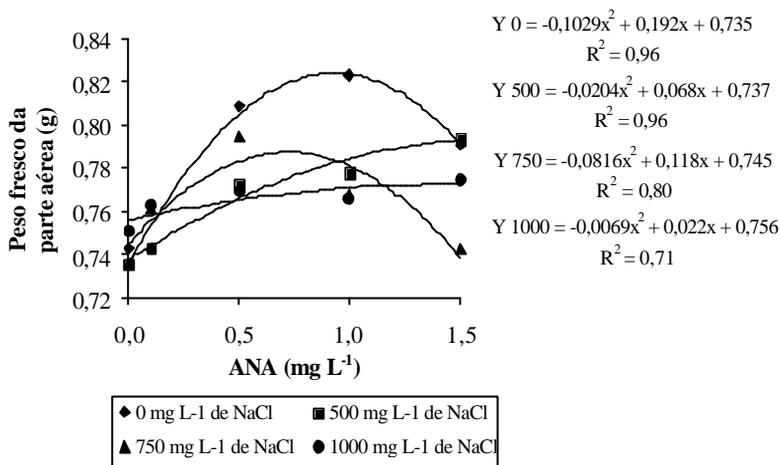


Figura 4. Matéria fresca da parte aérea em plântulas de porta-enxerto de videira ‘VR043-43’, com diferentes concentrações de NaCl e ANA. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Com o incremento das concentrações de ácido naftaleno acético ao meio $\frac{1}{2}$ MS, observou-se aumento no peso fresco de calos de forma quadrática. Maior peso fresco de calos (0,903 g) foi verificado com 1,0-1,5 mg L⁻¹ de ANA (Figura 5).

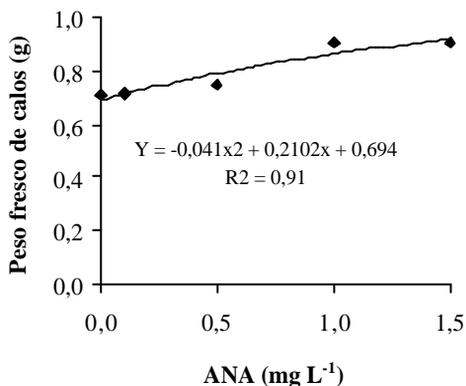


Figura 5. Matéria fresca de calos em plântulas de porta-enxerto de videira ‘VR043-43’, com diferentes concentrações de ANA. UFLA, Lavras, MG, 2008.

A formação de calos não é desejada na micropropagação da videira. Provavelmente o meio de cultivo acrescido de concentrações elevadas de ANA não sejam adequados para multiplicação *in vitro* de explantes de videira estudados.

Não foram observadas diferenças significativas para a matéria seca da parte aérea (g) e matéria seca de calos (g).

Conclusões

Melhores resultados para a micropropagação do porta-enxerto de videira VR043-43 são obtidos com o meio ½ MS acrescido de NaCl e ANA. Brotações de 'VR043-43' se desenvolvem e enraízam bem em altas concentrações de ANA.

Referências

BETHKE, C.P.; DREW, C.M. Stomatal and nonstomatal components to inhibition of photosynthesis in leaves of *Capsicum annum* during progressive exposure to NaCl salinity. **Plant Physiology**, v.99, p.219-226, 1992.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPq, 1998. v. 1. p. 87-132.

CRUZ, J.L.C.; PELACANI, C.R.; COELHO, E.F.; CALDAS, R.C.; ALMEIDA, A.Q.; QUEIROZ, J.R. Influência da salinidade sobre o crescimento, absorção e distribuição de sódio, cloro e macronutrientes em plântulas de maracujazeiro-amarelo. **Bragantia**, Campinas, v.65, n.2, p.275-284, 2006.

DESAI, U.T.; SINGH, R.M. Growth of guava plants (*Psidium guajava* L.) as affected by salinity. **Indian Journal of Horticulture**, v.5, p.3-6, 1980.

FASSBEIDER, H.W.; BORNEMUZA, E. **Química de Suelos de América Latina**. 2. ed. San José, Costa Rica: II CA., 1987. 420p.

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: UFSCar. 2000. p. 255-258.

GHEYI, H.; FAGEIRA, N.K. Efeitos dos sais sobre as plantas. In: **Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada**. Campina Grande: [s.n.], 1997. p.125-131.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPq, 1998. v. 1, p. 183-260.

KANASHIRO, S. **Nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e o crescimento de plântulas de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith *in vitro***. 2005. 187p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - ESALQ, Piracicaba.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- O'LEARY, J.W. High humidity overcomes lethal levels of salinity in hydroponically grown salt-sensitive plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.42, p.717- 721, 1971.
- PASQUAL, M.; RAMOS, J.D.; HOFFMANN, A.; CARVALHO, G.R. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações**. Meios de cultura. Lavras-MG: UFLA/FAEPE, 1997. 127p.
- PATIL, P.K.; PATIL, Y.K.; GHONSIKAR, C.P. Effect of soil salinity on growth and nutritional status of guava (*Psidium guajava* L.) **International Journal of Tropical Agriculture**, v.2, n.4, p.337-344, 1984.
- PEIXOTO, P.H.P.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* de brotações do porta-enxerto de videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, n.4, p.617-622, 1992.
- PEREIRA, F.M.; NACHTIGAL, J.C. A cultura da videira no Brasil. In: FORO INTERNACIONAL DE CULTIVO PROTEGIDO, 1997, Botucatu. **Anais...** Botucatu: [s.n.], 1997. p. 194-225.
- PIZA, I.M.T.; LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G. Atividade da peroxidase e níveis de proteínas em plantas de abacaxizeiro micropropagadas em meio salino. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.9, n.4, p.361-366, 2003.
- PRISCO, J.T. Alguns aspectos da fisiologia do “stress” salino. **Revista Brasileira de Botânica**, v.3, p.85-94, 1980.
- ULISSES, C.; CAMARA, T.R.; WILLADINO, L.; MEUNIER, I.; ROCHA, P.S.G.; ALBUQUERQUE, C. Seleção *in vitro* de gemas de bananeira ‘Nanicão’ tolerantes à salinidade. **Scientia Agricola**, v.57, p.667-670, 2000.

