

Avaliação da Eficiência do Dimetilsulfóxido na Extração de Pigmentos Foliare de *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* e *V. riparia* Propagadas *in vitro*

Ronisley Pereira Santos¹, Ana Cláudia Ferreira da Cruz², Lourdes Iarema³,
Katyne Rates Goulart Fernandes⁴, Kacilda Naomi Kuki⁵ e Wagner Campos Otoni⁶

Introdução

As clorofilas são pigmentos responsáveis pela conversão da radiação luminosa em energia, sob a forma de ATP e NADPH, por essa razão, são estreitamente relacionadas com a eficiência fotossintética das plantas e, conseqüentemente, ao seu crescimento e adaptabilidade a diferentes ambientes. [1]. A determinação do conteúdo de pigmentos foliares representa importante ferramenta de avaliação em estudos de fisiologia vegetal, quer seja para caracterização do material, quer seja para a distinção entre tratamentos ou interação entre plantas e fatores ambientais [2].

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, é o mais comum para plantas *in vivo* [3].

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, tais 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. 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. Entretanto, este é um processo trabalhoso, pois geralmente em trabalhos experimentais com propagação de plantas *in vitro*, tem-se um 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 esta necessidade. O DMSO é reconhecido por sua elevada capacidade de difusão através de membranas semipermeáveis e por sua eficácia como carreador de proteínas [4]. 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 [5]. Adicionalmente, o DMSO proporciona maior estabilidade dos extratos após estocagem a frio [6]. Porém, para que ocorra a extração e conservação máximas dos pigmentos foliares, são necessários ajustes na quantidade de material vegetal a ser usada e no tempo de incubação, de acordo com cada espécie a ser analisada. Assim, 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*.

Material e Métodos

As duas cultivares estudadas foram videiras dos porta-enxertos 'VR 043-43' (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*) e *Vitis riparia*, cultivadas *in vitro* em meio MS [7]. As culturas foram mantidas por recultivos a cada 30-35 dias, em sala de crescimento à temperatura de 25±2 °C, sob fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 36 µmol m⁻² s⁻¹. Para a realização dos experimentos, após 45 dias de cultivo *in vitro*, foram retirados 4, 5 e 6 discos foliares (5 mm de diâmetro), a

partir da terceira ou quarta folhas 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 Hutachi U- 2000). Os comprimentos de ondas e as equações para o cálculo das concentrações de Clorofilas *a*, *b* e carotenóides foram baseados em metodologia descrita por Wellburn [8]. Paralelamente, efetuou-se a extração de pigmentos em acetona 80% com os mesmos números de discos foliares, de acordo com Lichtenthaler [3], para posterior comparação dos resultados.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 3 (métodos de extração x discos foliares) com cinco repetições por tratamento. Os resultados obtidos foram submetidos à ANOVA e comparação de médias pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

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

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

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

4. Mestranda em Fisiologia Vegetal/DBV, Bolsista FAPEMIG, Universidade Federal de Viçosa -MG

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

6. Professor Adjunto IV, DBV/BIOAGRO/UFV, Av. P.H. Rolfs s/n, Campus Universitário da UFV, 36.570-000 Viçosa, MG.

Apoio financeiro: CAPES e FAPEMIG.

Resultados e Discussão

Comparando-se os três métodos de extração de pigmentos para a *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*, em DMSO com período de incubação de 48 horas, os teores de clorofilas *a* e *b* foram significativamente maiores. Entretanto, para a extração de carotenóides a acetona 80% mostrou melhor resultado comparativamente aos demais métodos (Fig. 1).

Quando foram utilizados 5 e 6 discos foliares de *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* obtiveram-se maiores resultados de extração de clorofila *a*, não sendo encontrada diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o número de discos para a extração de clorofila *b* e carotenóides (Fig. 1). Para esta variedade de videira não houve interação significativa entre os métodos de extração e o número de discos.

Todavia, na extração de pigmentos da *Vitis riparia* foi obtida interação significativa entre os métodos e o número de discos foliares. Os teores de clorofila *a* e *b* foram significativamente maiores quando se encubaram 5 e 4 discos foliares por um período de 24 e 48 horas, respectivamente, em DMSO (Fig. 2). No entanto para a extração de carotenóides, só foram obtidas diferenças significativas quando quatro discos foliares foram encubados por um período de 48 horas em DMSO (Fig.2).

Os resultados da extração da clorofila *b* pelos métodos com DMSO, em *Vitis vinifera* x *V. roundifolia* e *V. riparia* contradizem os resultados obtidos por outros autores [5, 9], que apontam para ineficiência do DMSO para a extração total da clorofila *b*, em plantas *in vivo*.

Para explicar a baixa eficiência do uso de DMSO na extração de clorofila *b* em plantas *in vivo* foram sugeridas limitações como o grau de cutinização e espessura da folha, além da temperatura de incubação [5]. Porém, plantas desenvolvidas *in vitro* geralmente apresentam baixo grau de cutinização e pequena espessura de folhas; não necessitando de tempos prolongados de extração nem temperaturas maiores que a ambiente na incubação, para que se tenha eficiência no processo de extração sem degradação de pigmentos foliares.

Somente foi obtida diferença significativa para a razão entre clorofilas *a* e *b* em *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*, no método de extração com DMSO com período de incubação de 24 horas. Sendo que para *V. riparia* a interação entre o método DMSO e 5 discos foliares incubados, por 48 horas, apresentaram melhor resultado na razão entre clorofilas *a* e *b* (Fig. 2).

Conclusões

Nas condições do presente experimento, o método de extração baseado em DMSO, com incubação por 48 horas, demonstrou ser mais eficaz que a acetona 80% para a extração de clorofilas *a* e *b* em *Vitis vinifera* x *V. rodundifolia*. Os resultados sugerem que podem ser usados tanto cinco quanto seis discos foliares dessa variedade para extração dos pigmentos foliares.

Para a *Vitis riparia* o DMSO, associado com 5 discos foliares, incubados por 24 horas, apresentou maior

eficiência na extração de clorofilas *a* e *b*. A acetona 80% foi mais eficiente na extração de carotenóides para *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*, porém com eficiência similar ao DMSO para *V. riparia*.

O presente trabalho demonstra a viabilidade de se fazer uso do DMSO na extração de pigmentos foliares de videiras propagadas *in vitro*, e sugere que a técnica seja avaliada para outras espécies de propagação rotineira *in vitro*.

Agradecimentos

Ao Prof. Sérgio Y. Motoike (DFT-UFV) pela concessão das culturas *in vitro* de *V. riparia*, ao Prof. Luis A. Biasi (DFTS-UFPR), pelas culturas *in vitro* de 'VR-043-43', e a CAPES e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

Referências

- [1] TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2004. Fisiologia vegetal. 3.ed. Trad. de E.R. Santarém. Porto Alegre: Artmed., 719 p.
- [2] LAMBERS, J.; CHAPIN, F.S.; PONS, T.L. 1998. Plant physiological ecology. New York: Springer-Verlag., 540p.
- [3] LICHTENTHALER, H.K. 1987. Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: COLOWICK, S.P.; KAPLAN, N.O. (Eds.) Methods in Enzymology, V. 148. San Diego: Academic Press. p.350-382.
- [4] RONEN, R.; GALUN, M. 1984. Pigment extraction from liquens with dimetylsulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. *Environmental and Experimental Botany*, 24: 239-245.
- [5] BARNES, J.D.; BALAGUER, L.; MANRIQUE, E.; ELVIRA, S.; DAVISON, A.W. 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.
- [6] TAIT, M.A.; HIK, D.S. 2003. Is dimetylsulfoxide a reliable solvent for extracting chlorophyll under field conditions? *Photosynthesis Research*, 78: 87-91.
- [7] MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- [8] WELLBURN, A. R. 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.
- [9] SHINANO, T.; LEI, T.T.; KAWAMUKAI, T.; INOUE, M.T.; KOIKE, T.; TADANO, T. 1996. Dimetylsulfoxide method for the extraction of chorophylls *a* and *b* from the leaves of wheat, field bean, dwarf bamboo and oak. *Photosynthetica*, v. 32: 409-415.

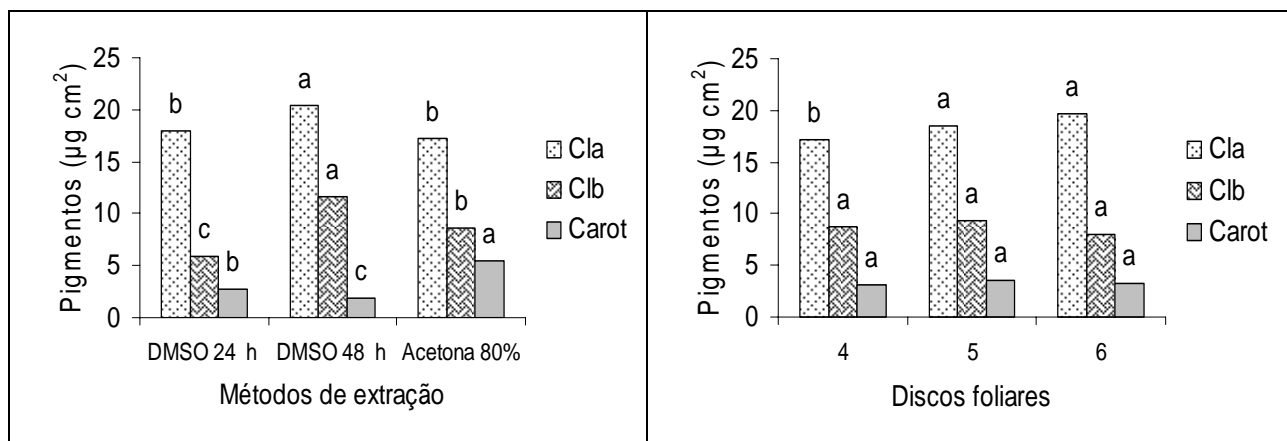


Figura 1: Teores de pigmentos foliares de plantas de *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* propagadas *in vitro*, utilizando-se diferentes métodos de extração e diferentes números de discos foliares. Letras iguais não diferem significativamente para os teores de pigmentos dentro de cada método de extração e para teores de pigmentos dentro de cada número de discos, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Os resultados representam as médias de X repetições.

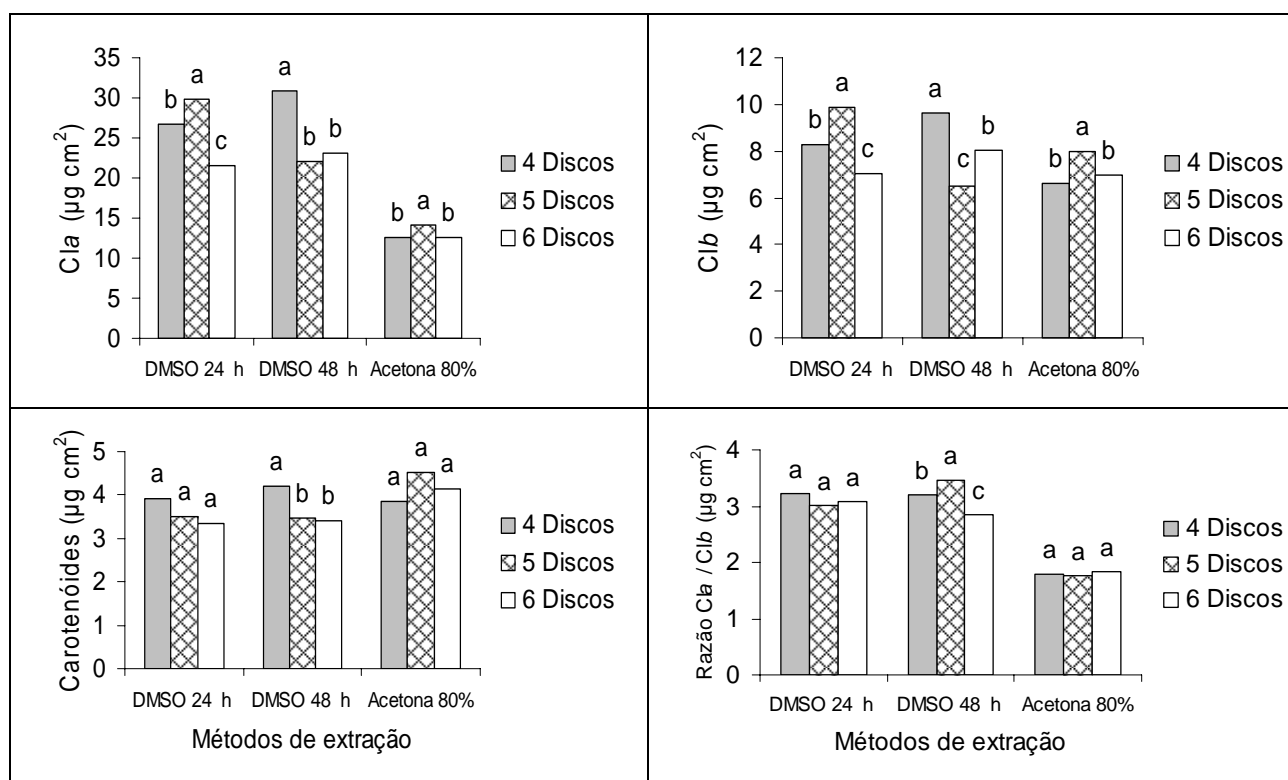


Figura 2: Teores de pigmentos foliares de plantas de *Vitis riparia* propagadas *in vitro*, utilizando-se diferentes métodos de extração e discos foliares. Letras iguais não diferem significativamente para o número de discos dentro de cada método, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Os resultados representam as médias de X repetições.