

VARIAÇÃO DO pH DO MEIO "MS" DE CULTURA *IN VITRO* COMO FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁGAR E DO pH INICIAL¹

INÁCIO DE BARROS² e MOACIR PASQUAL³

RESUMO - O meio Murashige & Skoog (MS) de cultura foi ajustado para diferentes pHs (4,7; 5,7; 6,7 e 7,7) combinados com diversas combinações de ágar (0,0; 3,5; 7,0; 10,5 e 14,0 g/l). Após dissolução do ágar em chapa aquecedora, o pH foi medido a uma temperatura de 50-50°C, e, a seguir, o meio foi submetido a autoclavagem por 20 minutos, a 120°C. Após a autoclavagem o pH foi novamente registrado, mantendo temperatura de 50-55°C. O meio após chapa aquecedora se alcalinizou em pH inicial baixo, quase não variou em pH inicial próximo da neutralidade, e se acidificou em pH inicial alto. A autoclavagem acidificou o meio, tanto mais quanto maior foi o pH inicial. O ágar mostrou um efeito tamponante sobre a variação do pH. Durante a autoclavagem, os extremos na acidificação do meio se deram na ausência do ágar, decrescendo 0,82 unidades em pH inicial 7,7 e 0,18 unidades em pH inicial 4,7. A maior alcalinização (0,72 unidades) se deu no aquecimento em chapa com o uso de 14 g/l de ágar e pH inicial 4,7.

Termos para indexação: cultura de tecidos, chapa aquecedora, autoclavagem.

pH VARIATION OF MS MEDIUM FOR *IN VITRO* CULTURE DEPENDING ON AGAR CONCENTRATION AND INITIAL pH

ABSTRACT - Murashige & Skoog (MS) medium was adjusted for different pHs (4.7, 5.7, 6.7 and 7.7) and supplemented with agar at several concentrations (0.0, 3.5, 7.0, 10.5 and 14.0 g/l). After dissolution of agar on hot plate at 50-55°C temperature the pH of media was measured. The medium was sterilized by autoclaving for 20 min at 120°C, and after, the pH was registred again. The pH after hot plate treatment increased in acid medium, it almost did not change in near neutral, and decreased in alkaline medium. The autoclaving acidified the medium particularly as higher was the initial pH. The agar showed a buffer effect on pH variation. During the autoclaving, the extremes of acidification took place in the medium without agar reducing 0,82 units in initial pH 7.7 and 0.18 units in initial pH 4.7. The higher alkalization (0.72 units) on hot plate treatment took place in the medium with 14.0 g/l agar and initial pH 4.7.

Index terms: tissue culture, hot plate, autoclaving.

INTRODUÇÃO

Na preparação dos meios de cultura de células e tecidos vegetais, o nível de pH é ajustado com o objetivo de se promover maior e melhor aproveitamento dos nutrientes pelos explantes. Contudo, este pH ajustado inicialmente varia com o aquecimento usado no processo de se dissolver os agentes solidificantes e também pela autoclavagem.

Variações de pH promovidas pela autoclavagem foram registradas por George & Sherrington (1984), que evidenciaram uma acidificação do meio 'MS' de cultura pela autoclavagem. Esta acidificação, segundo Skirvin et al. (1986), ocorre tanto em meio sólido como em meio líquido.

A acidificação do meio de cultura, promovida pela autoclavagem, tem sido registrada por diversos outros autores. Skirvin et al. (1986) observaram quedas de até 1,3 unidades, Cousson & Tran Thanh Van (1981), quedas até 0,8 unidades, e Shinga (1982) verificou maior intensidade na variação do pH em meios que tinham pH aferido antes da autoclavagem para 5,2 e 5,8.

¹ Aceito para publicação em 28 de fevereiro de 1992.

² Em curso de Agronomia na ESAL.

³ Eng.-Agr., Dr., Prof.-Adj., Esc. Sup. Agric. de Lavras (ESAL), Dep. de Agric., Caixa Postal 37, CEP 37200 Lavras, MG. Bolsista do CNPq.

As variações de pH após a autoclavagem são devidas às reações químicas ocorridas durante o processo de esterilização do meio de cultura, as quais podem se modificar em função do pH ajustado inicialmente e da temperatura de autoclavagem (Bohagel 1971). Este mesmo autor ainda cita que a qualidade da água, nutrientes minerais e tipo de autoclave, usados no preparo do meio, assim como o tempo gasto para autoclavagem, influem na variação do pH.

O pH afeta a consistência do meio de cultura. Romberger & Tabor (1971) afirmam que se o meio for autoclavado num pH abaixo de 4,5, ocorre uma hidrólise do ágar, que o faz não polimerizar ao esfriar.

O ágar exerce um efeito tamponante sobre o pH do meio, e Singha (1982) verificou um menor grau de acidez em presença de ágar. A capacidade tamponante dos meios de cultura pode ser aumentada adicionando-se água de coco (Caldas et al. 1990). Por outro lado, Waris (1959) usou carbonato de cálcio para manter o pH em culturas de longa duração.

Este trabalho teve como objetivo determinar a variação do pH após a dissolução do ágar em chapa aquecedora e esterilização do meio MS de cultura em autoclave, em função do pH aferido inicialmente e da concentração de ágar.

MATERIAL E MÉTODOS

O meio de cultura utilizado foi o de Murashige & Skoog (1962) - 'MS'. Os tratamentos consistiram de diferentes pHs iniciais: 4,7; 5,7; 6,7; 7,7 e diversas concentrações de ágar: 0,0; 3,5; 7,0; 10,5; 14,0 g/l.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com três repetições, sendo cada repetição formada por 30 ml de meio de cultura em um frasco de boca larga de 200 ml de volume total.

O ágar foi dissolvido em água bidestilada (1/2 do volume total do meio), a qual teve seu pH previamente ajustado e foi fervida em chapa aquecedora. Os componentes do meio (sais minerais, mio-inositol, vitaminas, glicina e sacarose) diluídos em água bidestilada perfizeram a outra metade do volume total do meio, cujo pH também foi ajustado de acordo com os tratamentos anteriormente descritos.

Após o aquecimento e dissolução do ágar em chapa aquecedora as duas metades foram misturadas, e o

pH, medido. Esta variação é, portanto, provocada pela chapa aquecedora e pelo ágar. A seguir, os frascos foram tampados e submetidos a uma esterilização em autoclave horizontal durante 20 minutos a 120°C e pressão de 1,2 atm. Após a autoclavagem, o pH foi novamente registrado a uma temperatura de 50 a 55°C, sendo a variação provocada pelo aquecimento na chapa aquecedora, pelo ágar e pela autoclavagem.

As seguintes avaliações foram efetuadas:

a. Diferença entre o pH inicial e o pH após chapa aquecedora - dpH_1 ;

b. Diferença entre o pH após chapa aquecedora e o pH após autoclavagem - dpHP_2 .

Para determinação das equações de regressão dos fatores avaliados, foi utilizada a técnica da superfície de resposta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 apresenta-se a análise de variância para todos os fatores avaliados em função das variáveis independentes; observa-se que as variáveis independentes atuam conjuntamente (interação significativa) para todos os fatores avaliados.

Observa-se, na Fig. 1 que, à medida que se aumenta o pH, maior é a variação entre o pH inicial e o final. Percebe-se que nos valores de pH inicial 4,7 e 5,7 a diferença de pH (pH ini-

TABELA 1. Análise de variância para os efeitos do pH inicial e das concentrações de ágar, sobre a variação de pH após aquecimento em chapa aquecedora e após autoclavagem.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios para variação de pH após	
		Chapa aquecedora	Auto-clavagem
pH inicial linear	1	8,2598**	1,189**
pH inicial quadrático	1	0,0016NS	0,0086NS
Ágar linear	1	0,0291**	0,0011NS
Ágar quadrático	1	0,0810**	0,1788**
pH inicial x ágar	12	0,2074**	0,1131**
Resíduo	60	0,0028	0,0083

** Significativo a $P < 0,01$.

$$dpH_1 = -0,766 + 0,1241(a) - 0,127(b) - 0,00155(b^2) + 0,0233(a)(b)$$

$$r^2 = 0,81$$

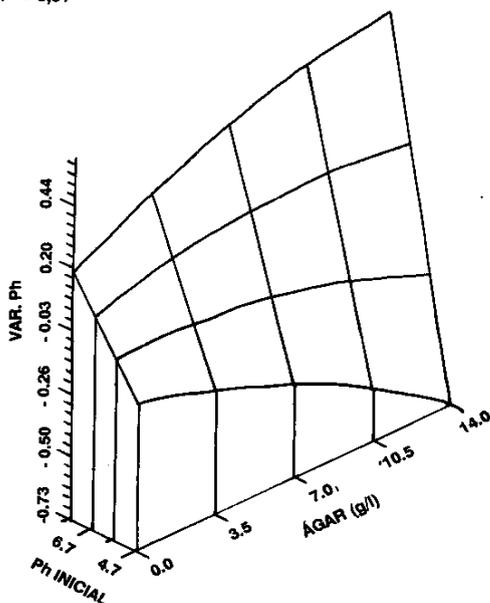


FIG. 1. Variação de pH devido ao aquecimento em chapa aquecedora em função do pH inicial e da concentração de ágar.

dpH_1 : diferença entre pH inicial e pH após chapa aquecedora.

a: pH inicial.

b: concentração de ágar.

cial - pH final) é negativa, e tanto maior quanto mais elevada era a concentração de ágar, indicando que o meio ficou mais alcalino, entretanto, em pHs iniciais acima de 5,7, os valores foram positivos, o que indica que o meio se acidificou.

Por esta mesma Fig. 1, vê-se que as concentrações de ágar influem na variação do pH dentro de cada pH inicial, de tal forma que para pH inicial 4,7 a variação é negativa crescente, ou seja, o meio vai se tornando tanto mais alcalino quanto maior a concentração de ágar; quando se aumenta o pH inicial, diminui-se a variação de pH em função das concentrações de ágar, até que num pH inicial de 6,7, praticamente não há diferença na variação do pH em função das concentrações de ágar.

Estes fatos sugerem o desprendimento de moléculas de H mais livres no meio, em função do pH e das concentrações de ágar. Em pH inicial próximo da neutralidade, a variação do pH é muito pequena, e não é influenciada pelas concentrações de ágar; entretanto, quanto mais opostos, tanto para o sentido alcalino quanto para o ácido, esta variação vai aumentando com o aumento da concentração de ágar. Há uma tendência de tornar o meio de forma inversa ao pH inicial, ou seja: em um pH inicial ácido, a variação aumenta, tendendo a alcalinizar o meio, enquanto que em um pH inicial alcalino a variação também aumenta, contudo, tendendo à acidificação. Estas observações também podem ser feitas olhando a Fig. 1, na qual o pH após chapa em função das concentrações de ágar dentro do pH inicial 4,7 vai alcalinizando, enquanto o pH após chapa dentro de pH inicial 7,7 vai acidificando.

A variação do pH após chapa aquecedora, em função dos pHs iniciais, dentro das concentrações de ágar, aumenta, quanto maior é esta concentração. Pode-se visualizar que dentro de ágar 0,0 g/l a variação é de -0,18 a 0,8, enquanto que dentro de ágar 14 g/l é de -0,71 a 0,62, o que reflete um grande efeito do ágar na variação do pH.

Estes dados concordam com Pasqual et al. (dados enviados para publicação) que observaram haver uma maior variação de pH após chapa aquecedora quanto maior a concentração de ágar, sendo que não houve variação em ágar 0,0 g/l.

A variação do pH devido à ação de autoclavagem, como mostra a Fig. 2, é bem expressiva em função tanto do pH inicial quanto das concentrações de ágar.

Observa-se que à medida que se aumenta a concentração de ágar diminui a variação de pH, devido à autoclavagem, em função do pH inicial. Na ausência de ágar, a variação foi de 0,18 a 0,83, enquanto que com o uso de 14 g/l de ágar esta variação foi de 0,48 a 0,5. Observa-se, também, que, em todos os níveis de ágar, a variação do pH aumentou à medida que se aumentou o pH inicial de uma forma linear crescente. Estes fatos indicam que o ágar promove

$$dpH_2 = -0,82 + 0,214(a) + 0,596(b) + 0,0231(b^2) - 0,0149(a)(b)$$

$$r^2 = 0,57$$

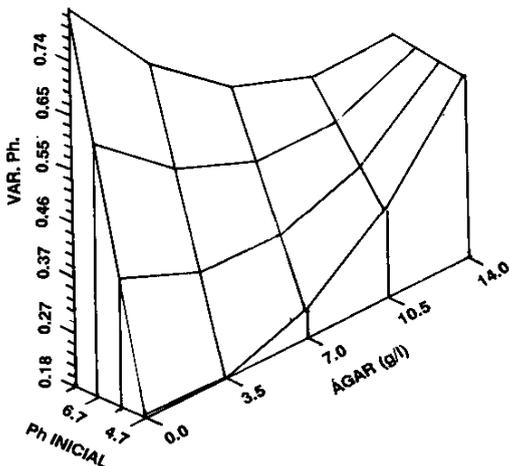


FIG. 2. Variação de pH devido a autoclavagem em função do pH inicial e da concentração de ágar.

dpH₂: diferença entre pH inicial e pH após autoclavagem.

a: pH inicial.

b: concentração de ágar.

um efeito tamponante na variação do pH durante a autoclavagem; variação, esta, no sentido de acidificar o meio de cultura.

À medida que se aumenta a concentração de ágar, cresce a variação do pH durante a autoclavagem, mas este aumento da variação se dá segundo a curva quadrática, em cada nível de pH inicial, sendo que as variações de uma concentração de ágar em relação à sua concentração próxima anterior são aumentadas quanto maior for a concentração de ágar. Assim sendo, a variação de pH no nível de 3,5 g/l de ágar, quando comparada à concentração 0,0 g/l de ágar, ambos em um pH inicial 4,7, é bem pequena (0,17 - 0,18); por outro lado, a variação do pH com 14 g/l de ágar em relação à concentração de ágar de 10,5 g/l, também em um pH inicial de 4,7, é bem maior (0,47 - 0,32).

Quando se aumenta o pH inicial, este efeito gradativamente se inverte, até que, chegando a um pH inicial 7,7, observa-se o efeito contrário da variação, em função das concentrações de ágar.

Estes resultados discordam dos publicados por Skirvin et al. (1986), que observaram não haver diferenças significativas entre meio líquido e meio sólido dentro dos diversos pHs iniciais; estes autores observaram também uma variação média do pH em função da autoclavagem de 1,1 unidades, não registrando diferenças significativas nas variações de pH (0,8 - mínima a 1,3 - máxima).

CONCLUSÕES

1. O meio de cultura após chapa aquecedora se alcaliniza em pH inicial baixo, quase não varia em pH inicial próximo da neutralidade (pH 6,7) e se acidifica em pH inicial alto (pH 7,7).
2. A autoclavagem acidifica o meio de cultura, tanto mais quanto maior for o pH inicial.
3. O ágar possui um efeito tamponante à variação do pH, tanto na autoclavagem quanto no aquecimento em chapa.
4. A maior variação do pH tendendo a alcalinizá-lo se dá no aquecimento em chapa, com o uso de 14 g/l de ágar e pH inicial de 4,7 (acréscimo de 0,72 unidades de pH).
5. Durante a autoclavagem, os extremos na acidificação do meio, em função dos pHs iniciais, se dão na ausência de ágar, decrescendo 0,82 unidades em pH 7,7 e 0,18 unidades em pH 4,7.

REFERÊNCIAS

- BOHAGEL, H.A. The pH and sterilization. In: VANBRAGT, J.; MOSSEL, D.A.A.; PIERIK, R.L.M.; VELDSTRA, H. *Effect of sterilization on components in nutrient media*. The Netherlands: [s.n.], 1971. p.117-120.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. *Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas*. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.37-70.
- COUSSON, A.; TRAN TRANH VAN, K. *In vitro* control of de novo flower differentiation from tobacco thin cell layers cultured on a liquid medium. *Physiologia Plantarum*, v.51, p.77-84, 1981.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. *Plant propagation by tissue culture*. [S.l.]: Eastern Press, 1984. 709p.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
- ROMBERGER, J.A.; TABOR, C.A. The *Picea abies* shoot apical meristem in culture. *American Journal of Botany*, v.58, p.131-140, 1971.
- SHINGA, S. Influence of agar concentration on *in vitro* shoot proliferation of *Malus* sp. 'Almey' and *Pyrus communis* 'Seckel'. *Journal American Society for Horticultural Science*, v.107, p.657-660, 1982.
- SKIRVIN, R.M.; CHU, M.C.; MANN, M.L.; YOUNG, H.; SULLIVAN, J.; FERMANIAN, T. Stability of tissue culture medium pH as function of autoclaving, time and cultured material. *Plant Cell Reports*, v.5, p.292-294, 1986.
- WARIS, H. Neomorphosis in seed plants induced by aminoacids. I. *Oenanthe aquatica*. *Physiologia Plantarum*, v.12, p.753-766, 1959.