

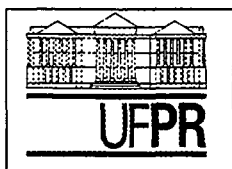
PRYSCILLA MENARIN DZAZIO

MICROPROPAGAÇÃO DO PORTA ENXERTO DE VIDEIRA '420-A'

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Agronomia, Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração Produção Vegetal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Biasi

**CURITIBA
2000**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANITARISMO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
PRODUÇÃO VEGETAL

P A R E C E R

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pela candidata **PRYSCILLA MENARIN DZAZIO**, sob o título “ **Micropropagação do Porta Enxerto de Videira ‘420-A’** ”, para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação.

Curitiba, 29 de agosto de 2000.

Professora Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas
Primeira Examinadora

Professora Dra. Marguerite Quoirin
Segunda Examinadora

Professor Dr. Flávio Zanette
Terceiro Examinador

Professor Dr. Amir Pissaia
Quarto Examinador

Professor Dr. Luiz Antonio Biasi
Presidente da Banca e Orientador

A MINHA MÃEZINHA QUERIDA,
SUELI MENARIN DZAZIO
PELO EXEMPLO DE LUTA E
AMOR A NATUREZA
OFEREÇO

AO ETERNO AMOR DA MINHA
VIDA, **MARCELO (TOCO) REIS**
POR TODO SEU CARINHO E
INCENTIVO
DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao grande PAI pelo maior presente: A VIDA

Ao Dr. Luiz Antonio Biasi pela orientação, conhecimento, amizade e compreensão oferecidos.

À Coordenação do Curso de Pós-graduação em Produção Vegetal, pela oportunidade de realização deste curso.

À CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado.

Ao Prof. Henrique Soares Koehler, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos funcionários do laboratório de Micropropagação Vegetal do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da Universidade Federal do Paraná.

A todos os companheiros de jornada, em especial à Maria Helena, Maria Ildes, Alessandra, Sandra e Marlene.

A todos os professores pela grande contribuição a minha formação.

Aos meus irmãos Aramis (Junior), Francioli e Emerson por serem parte do meu maior bem: a família.

À minha querida vovó Maria Ondina Bueno Menarim pelos ensinamentos da vida.

A minha madrinha Marli Bueno Menarim pela torcida e amor dedicados.

À todas as pessoas que fazem parte da minha vida por tanto amor.

E, finalmente, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 PORTA-ENXERTO ‘420-A’	3
2.2 MICROPROPAGAÇÃO DA VIDEIRA.....	4
2.2.1 Fonte de explantes.....	6
2.2.2 Assepsia dos explantes.....	8
2.2.3 Cultura inicial.....	9
2.2.4 Multiplicação das brotações.....	12
2.2.5 Enraizamento das brotações.....	14
2.2.6 Aclimatização das brotações.....	17
2.2.7 Condições de crescimento <i>in vitro</i>	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 LOCAL DOS EXPERIMENTOS.....	20
3.2 CULTIVAR UTILIZADO.....	20
3.3 FONTE DE EXPLANTES.....	20
3.4 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i>	21
3.5 EXPERIMENTOS DE ESTABELECIMENTO INICIAL DA CULTURA.....	21
3.5.1 Efeito de concentrações de BAP no crescimento inicial da gema axilar de segmentos nodais.....	22
3.5.2 Efeito de concentrações de cinetina no crescimento inicial da gema axilar de segmentos nodais.....	22
3.5.3 Efeito de diferentes diluições de sais do meio de cultura MS no crescimento inicial da gema axilar de segmentos nodais.....	22

3.5.4 Efeito de diferentes meios de cultura no crescimento inicial da gema axilar de segmentos nodais.....	23
3.6 AVALIAÇÃO DOS EXPERIMENTOS DE ESTABELECIMENTO INICIAL DA CULTURA.....	23
3.7 EXPERIMENTO DE MULTIPLICAÇÃO.....	25
3.7.1 Efeito de diferentes meios de cultura na multiplicação das brotações.....	25
3.8 EXPERIMENTO DE ENRAIZAMENTO.....	25
3.8.1 Efeito de diferentes meios de cultura no enraizamento das brotações.....	25
3.9 EXPERIMENTO DE ACLIMATIZAÇÃO.....	26
3.9.1 Efeito de diferentes substratos na sobrevivência das plantas.....	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 EXPERIMENTOS DE ESTABELECIMENTO INICIAL DA CULTURA.....	28
4.1.1 Efeito de concentrações de BAP no crescimento inicial da gema axilar de segmentos nodais.....	28
4.1.2 Efeito de concentrações da cinetina no crescimento inicial da gema axilar de segmentos nodais.....	30
4.1.3 Efeito de diferentes diluições de sais do meio de cultura MS no crescimento inicial da gema axilar de segmentos nodais.....	31
4.1.4 Efeito de diferentes meios de cultura no crescimento inicial da gema axilar de segmentos nodais.....	34
4.2 EXPERIMENTO DE MULTIPLICAÇÃO.....	35
4.2.1 Efeitos de diferentes meios de cultura na multiplicação das brotações.....	35
4.3 EXPERIMENTO DE ENRAIZAMENTO.....	38
4.3.1 Efeito de diferentes meios de cultura no enraizamento das brotações.....	38
4.4 EXPERIMENTO DE ACLIMATIZAÇÃO.....	40
4.4.1 Efeito de diferentes substratos na sobrevivência das plantas.....	40
5 CONCLUSÕES.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
ANEXOS.....	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA EM MG.L ⁻¹ DE ALGUNS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA A MICROPROPAGAÇÃO DE VIDEIRAS.....	24
TABELA 2 - EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE BAP EM CINCO PARÂMETROS ANALISADOS NO CRESCIMENTO INICIAL DA GEMA AXILAR DE SEGMENTOS NODAIS DO PORTA-ENXERTO '420-A', APÓS 30 DIAS (Experimento 4.1.1; Anexo 1).....	30
TABELA 3 - EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE CINETINA EM CINCO PARÂMETROS ANALISADOS NO CRESCIMENTO INICIAL DA GEMA AXILAR DE SEGMENTOS NODAIS DO PORTA-ENXERTO '420-A', APÓS 30 DIAS (Experimento 4.1.2; Anexo 2).....	31
TABELA 4 - EFEITO DE DIFERENTES DILUIÇÕES DE SAIS DO MEIO DE CULTURA MS EM CINCO PARÂMETROS ANALISADOS NO CRESCIMENTO INICIAL DA GEMA AXILAR DE SEGMENTOS NODAIS DO PORTA-ENXERTO '420-A', APÓS 30 DIAS (Experimento 4.1.3; Anexo 3).....	32
TABELA 5 - EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA EM CINCO PARÂMETROS ANALISADOS NO CRESCIMENTO INICIAL DA GEMA AXILAR DE SEGMENTOS NODAIS DO PORTA-ENXERTO '420-A', APÓS 30 DIAS (Experimento 4.1.4; Anexo 4).....	35
TABELA 6 - EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA EM CINCO PARÂMETROS ANALISADOS NA MULTIPLICAÇÃO DAS BROTAÇÕES DE SEGMENTOS NODAIS DO PORTA-ENXERTO '420-A', APÓS 30 DIAS (Experimento 4.2.1; Anexo 5).....	37
TABELA 7 - EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA EM CINCO PARÂMETROS ANALISADOS NO ENRAIZAMENTO DAS BROTAÇÕES DO PORTA-ENXERTO '420-A', APÓS 30 DIAS (Experimento 4.3; Anexo 6).....	39

TABELA 8 - EFEITO DE DIFERENTES SUBSTRATOS NA SOBREVIVÊNCIA DE PLANTAS ACLIMATIZADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO DO PORTA-ENXERTO '420-A' (Experimento 4.4; Anexo 7).....	41
--	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - EFEITO DE DIFERENTES DILUIÇÕES DOS SAIS DO MEIO DE CULTURA MS SOBRE O CRESCIMENTO DE GEMAS AXILARES DE SEGMENTOS NODAIS DO PORTA-ENXERTO '420-A' APÓS 30 DIAS (Experimento 4.1.3).....	33
FIGURA 2 - EFEITO DE DIFERENTES DILUIÇÕES DE SAIS DO MEIO DE CULTURA MS NO PRIMEIRO SUBCULTIVO DE BROTAÇÕES OBTIDAS DE GEMAS AXILARES DE SEGMENTOS NODAIS DO PORTA-ENXERTO '420-A' APÓS 35 DIAS DE CULTIVO (Experimento 4.1.3).....	33
FIGURA 3 - EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NA MULTIPLICAÇÃO DAS BROTAÇÕES OBTIDAS DE SEGMENTOS NODAIS DO PORTA-ENXERTO '420-A' (Experimento 4.2.1).....	37
FIGURA 4 - EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NO ENRAIZAMENTO DE BROTAÇÕES OBTIDAS DE GEMAS AXILARES DE SEGMENTOS NODAIS DO PORTA-ENXERTO '420-A': A - MS/2; B - MS/2 COM CARVÃO ATIVADO; C - MS/2 LÍQUIDO COM ESPUMA FENÓLICA (Experimento 4.3.1).....	40
FIGURA 5 - MICROPROPAGAÇÃO DO PORTA-ENXERTO '420-A': A-ESTACAS COM BROTAÇÕES; B-BROTAÇÕES UTILIZADAS PARA OBTENÇÃO DOS SEGMENTOS NODAIS; C-MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> ; D E E-PLANTAS EM FASE DE ACLIMATIZAÇÃO.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

BAP: 6- benzilaminopurina

ANA: ácido naftaleno acético

AIA: ácido indol acético

AIB: ácido indol butírico

MS: meio de cultura de MURASHIGE e SKOOG (1962)

NN: meio de cultura de NITSCH e NITSCH (1969)

WPM: meio de cultura wood plant medium de LLOYD e McCOWN (1980)

RESUMO

O porta-enxerto de videira '420-A' é um dos mais utilizados na viticultura, por apresentar resistência a filoxera e nematóides e pela afinidade com importantes variedades de copa. Com o objetivo de estabelecer um protocolo de micropropagação deste porta-enxerto, foram realizados vários experimentos em laboratório e casa de vegetação. O estabelecimento das culturas foi realizado com segmentos nodais obtidos de brotações de estacas lenhosas armazenadas sob temperatura fria (4 a 6^oC) durante período mínimo de 30 dias. A assepsia das brotações foi realizada pela imersão em benomyl 2g.L⁻¹ (2 horas) e solução de NaOCL 2,5% acrescido de tween 20 0,1% (20 minutos). Foram testadas diferentes citocininas (BAP e cinetina) em várias concentrações (0, 1, 5 e 10 µM), diferentes diluições do meio de cultura básico MS (MS, MS/2, MS/4 e MS/8) e diferentes meios de cultura (MS, NN e WPM) no cultivo inicial. Na multiplicação das brotações foram testados diferentes meios de cultura (MS, MS/2, NN e WPM). No enraizamento testaram-se os seguintes meios de cultura: MS/2 líquido com espuma fenólica, MS/2 sólido e MS/2 com carvão ativado (1g.L⁻¹). Diferentes substratos (casca de arroz carbonizada, vermiculita e Plantmax[®]) foram testados na aclimatização das mudas. A avaliação dos experimentos foi realizada pelos seguintes parâmetros: porcentagem de brotações da gema axilar (>0,5 cm), comprimento da brotação principal, número de folhas expandidas da brotação principal, número de brotos por explante e porcentagem de explantes perdidos por contaminação e oxidação. No experimento de enraizamento também foram avaliados: porcentagem de explantes apresentando raízes e número de raízes por explante. A cinetina não apresentou efeito sobre todas as variáveis analisadas. Já a presença de BAP no meio de cultura nas concentrações 1, 5 e 10 µM, promoveu aumento no número de brotos por explante (1,3; 1,76; e 1,75), respectivamente. O aumento na concentração de BAP reduziu o número de folhas emitidas por explante e aumentou os sintomas de vitrificação, sendo os melhores resultados obtidos com 1 µM de BAP. No cultivo inicial o meio de cultura MS com a concentração total de sais permitiu o maior crescimento das brotações (2,44 cm). As diluições do meio de cultura MS em 1/4 e 1/8 mostraram-se prejudiciais ao desenvolvimento do porta-enxerto '420-A', reduzindo o crescimento das brotações, notadamente após o primeiro subcultivo. Na multiplicação das brotações o meio de cultura MS/2 foi o que apresentou melhores resultados, apesar de não diferir significativamente dos meios NN e WPM em todas as variáveis analisadas. O enraizamento ocorreu naturalmente na fase de multiplicação, sendo desnecessário o uso de carvão ativado no meio de cultura. A aclimatização foi realizada com sucesso em casa de vegetação sob nebulização, obtendo-se altas taxas de sobrevivência em vermiculita (95,8%) e Plantmax[®] (87%). Conclui-se, então, que o porta-enxerto '420-A' pode ser micropropagado pelo cultivo inicial de segmentos nodais em meio de cultura MS suplementado com 1µM de BAP, multiplicação pelo seccionamento das brotações em meio MS/2 e aclimatação em substrato vermiculita ou Plantmax[®].

ABSTRACT

The grapevine rootstock '420-A' is the most utilized in viticulture. In order to establish a protocol of micropropagation from that rootstock, was made several experiments *in vitro* and glasshouse. *In vitro* establishment of the grapevine rootstock '420-A' were carried out with nodal segments taken from shoots of hardwood cuttings stocked under cold temperature (4 / 6° C) for least period of 30 days. The shoots was sterilized by dipping in benomyl (2g.L⁻¹) for 2 hours and NaOCL 2.5% supplemented with tween 20 (0,1%) for 20 minutes. In the initial culture, different cytokinins (BAP and kinetin) and concentrations (0/ 1/ 5 and 10 μM), different MS salts concentrations (MS/ MS/2/ MS/4 and MS/8) and different culture media (MS/ NN and WPM) were tested. During the multiplication of shoots, different culture media (MS/ MS/2/ NN and WPM) were tested. In the rooting different culture media was tested (MS/2 liquid with phenolic foam; MS/2 solid and MS/2 with addition of charcoal (1g.L⁻¹). In the acclimatization of shoots different substracts (rice's rind/ vermiculite and commercial substract Plantmax®) was tested. The evaluation of the experiments was carried out through percentage shoots of the axillary bud, main shoot length, number of leaves for main shoot, number of shoots for explant and percentage of the explants lost for contamination and browning. In the rooting experiment percentage of the explants with roots and number of the roots for explant was evaluated. The kinetin did not effect the development shoots of axillary bud. BAP (1/ 5 and 10μM) increased the number of shoots (1.3/ 1.76 and 1.75 shoots/explant), respectively. The increase of BAP concentration reduced the number of leaves per explant and increased the vitrification. The best results was obtained with 1 μM BAP. The medium culture MS led to increase growth of shoots in the initial culture (24.4 mm). The growing shoots was mostly inhibited in the culture media MS/4 and MS/8, especially after their first subculture. For the multiplication of shoots the half strength MS medium seemed to be the most appropriate. Rooting occurs during multiplication of shoots, thus the use of charcoal in the medium culture is indispensable for rooting. The bigger survival of shoots was registred when were used vermiculite (95.8%) and Plantmax® (87%) for the acclimatization. It was concluded that rootstock '420-A' can be micropropagated through nodal segments in culture medium MS supplemented with 1μM BAP, the multiplication of shoots in half strength MS medium and acclimatization with vermiculite and Plantmax®.

1 INTRODUÇÃO

A cultura da videira se confunde com a própria história da agricultura. Esta espécie milenar apresenta grande valor econômico e social para o desenvolvimento do nosso país. A atividade se concentra na produção de uvas de mesa e matéria prima na elaboração de vinhos e outros derivados. Os vinhedos estão distribuídos por quase todo o Brasil.

A propagação comercial da videira é feita por meio da estaquia, enxertia, mergulhia e em menor escala a micropropagação (FACHINELLO et al., 1995).

O método de propagação mais empregado no Brasil, consiste no plantio de porta-enxertos no local definitivo do futuro vinhedo para posterior enxertia no campo das variedades de interesse (SOUZA, 1996). A formação do vinhedo por este método leva no mínimo dois anos e apesar de apresentar baixo custo, favorece a disseminação de várias doenças (REGINA et al., 1998).

A propagação *in vitro* se apresenta como alternativa na produção de plantas livres de doenças, especialmente viroses, por meio da cultura de ápices caulinares e/ou meristemas, associada ou não com a termoterapia. Outra importante aplicação está na micropropagação de híbridos, porta-enxertos e outras espécies de grande interesse agrônomo.

Na Europa um método envolve a micropropagação dos porta-enxertos e posterior enxertia verde com máquina, obtendo-se rapidamente um número elevado de mudas.

As técnicas de micropropagação são uma importante alternativa visando a formação mais rápida do vinhedo e a obtenção em larga escala de material vegetativo de boa qualidade fitossanitária.

A micropropagação de videiras consiste no processo de enraizamento de brotações axilares ou adventícias multiplicadas *in vitro*, para a regeneração de plantas inteiras. Este processo possibilita a rápida multiplicação de plantas, a obtenção de planta-matrizes livres de vírus, a propagação de híbridos e a preservação de germoplasmas de interesse (KRUL e MOWBRAY, 1984; DURAN-VILA et al., 1988).

Neste trabalho foram realizados experimentos visando o estabelecimento de um protocolo de micropropagação para o porta-enxerto '420-A', a partir de segmentos nodais de brotações obtidas de estacas lenhosas. Este material foi obtido do cruzamento entre as espécies *Vitis berlanderi* e *Vitis riparia* e apresenta resistência a filoxera e nematóides, além da afinidade com importantes variedades de copa.

Os objetivos específicos deste trabalho foram: testar diferentes concentrações (1, 5 e 10 μM) de benzilaminopurina (BAP) na indução da brotação da gema axilar; testar diferentes concentrações (1, 5 e 10 μM) de cinetina na indução da brotação gema axilar; testar diferentes diluições dos sais do meio de cultura básico Murashige e Skoog (MS) no cultivo inicial; testar diferentes meios de cultura (MS; Nitsch e Nitsch; Wood Plant Medium) no cultivo inicial; testar diferentes meios de cultura (MS, MS/2, NN e WPM) na multiplicação das brotações; testar o meio de cultura MS com a concentração dos sais reduzida pela metade (MS/2 sólido, MS/2 acrescido de carvão ativado e MS líquido com espuma fenólica) no enraizamento das brotações e testar diferentes substratos (vermiculita, casca de arroz carbonizada e Plantmax[®]) na aclimatização das mudas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PORTA-ENXERTO '420-A'

O porta-enxerto utilizado neste trabalho foi o '420-A'. Trata-se de um híbrido originado do cruzamento entre as espécies *Vitis berlanderi* e *Vitis riparia*, realizado na França, por Millardet e De Grasset (POMMER et al., 1997).

Segundo SOUSA (1996), de todos os derivados de *V. berlanderi*, este porta-enxerto é o mais espalhado no mundo, especialmente indicado para terrenos calcários. Nos Estados Unidos é recomendado como resistente à nematóides e à podridão das raízes.

No Rio Grande do Sul é porta-enxerto presente em todas as recomendações, constando entre os oito mais indicados (SO-4; 101-14; Kober 5BB; 161-49; 16-16; R 99 e Schwarzmamm) notabilizando-se sua afinidade, sobretudo para com 'Pinot Noir', 'Trebiano', Sauvignon Blane', 'Pirovano 65-Itália', 'Moscatil de Hamburgo' e 'Cereza' de acordo com DIAS¹ citado por SOUZA (1996).

Em São Paulo, é também um dos mais recomendados por PEREIRA e MARTINS² citados por SOUSA (1996), que sugerem a enxertia de 'Patrícia', 'Piratininga' e mais 3 híbridos do IAC, estas apirenas (sem sementes), sobre '420-A', com o qual apresentam aceitável afinidade, circunstância que se estende também sobre 'Itália' e 'Rubi', mais que de modo algum se verifica para com 'Niagara'.

De acordo com POMMER et al. (1997), o cultivar utilizado neste trabalho apresenta vigor médio, tem mostrado boa adaptação aos solos paulistas desde que não sejam excessivamente ácidos; para alguns, sua adaptação às condições locais tem-se revelado melhor que a do Kober 5BB; suas estacas brotam tardiamente, mas com bom

¹DIAS, M. F. Situação e problemas da viticultura do Sul do Brasil. *Boletim Técnico*: 2, p.67-75. Porto Alegre, 1978.

²PEREIRA, P. M. e MARTINS, F.P. Enraizamento de estacas de 3 porta-enxertos de videira, com o emprego de fitohormônio. *Anais do 1º Congresso Brasileiro de Fruticultura*. Campinas, 1971.

índice de pegamento; além da resistência a filoxera, apresenta certa resistência à nematóides e produz flores masculinas. Bom porta-enxerto para 'Itália', 'Rubi', 'Benitaka' e 'Patrícia' em regiões de inverno mais intenso. No caso de 'Itália', 'Rubi' e 'Benitaka', as plantas apresentam, com menor evidência, a formação do engrossamento do tronco, acima do ponto de enxertia.

2.2 MICROPROPAGAÇÃO DA VIDEIRA

A micropropagação pode ser dividida em três fases: I- etapa de estabelecimento do cultivo inicial ou primário; II- etapa de multiplicação das brotações e III- etapa de enraizamento (MURASHIGE, 1974). Considera-se outras duas fases no processo: uma etapa anterior ao isolamento, que compreende a seleção da planta-matriz, fornecedora de explantes e escolha dos pré-tratamentos para promover uma determinada resposta *in vitro* (DEBERGH e MAENE, 1981) e outra etapa posterior ao enraizamento, que compreende a transferência para o meio ambiente (KRIKORIAN, 1991).

A micropropagação de videiras consiste no processo de enraizamento de brotações axilares ou adventícias multiplicadas *in vitro*, para a regeneração de plantas inteiras. Este processo possibilita a rápida multiplicação de plantas, a obtenção de planta-matrizes livres de vírus, a propagação de híbridos e a preservação de germoplasmas de interesse (KRUL e MOWBRAY, 1984; DURAN-VILA et al., 1988).

Para a videira, a micropropagação baseia-se em dois métodos principais. O mais utilizado segue o procedimento tradicional, descrito por MURASHIGE (1974), com três fases distintas. Outro método, baseia-se na produção adventícia de brotações, originárias de estruturas semelhantes a folhas, obtidas a partir de ápices meristemáticos fragmentados (BARLASS e SKENE, 1978; BARLASS e SKENE, 1980a; BARLASS e SKENE, 1980b; SKENE e BARLASS, 1980; BARLASS et al., 1981; SKENE e BARLASS, 1983).

Por meio das técnicas de cultura de meristemas e de ápices fragmentados, em conjunto com a termoterapia, foi possível a obtenção de clones livres de vírus, que dificilmente eram eliminados apenas com o tratamento térmico (BARLASS et al. 1982;

KORUZA e JELASKA, 1993). Estas técnicas também aumentaram a eficiência da limpeza viral, atingindo-se, em casos como o do trabalho de BARLASS (1987), 100% de plantas sadias indexadas para os vírus do intumescimento dos ramos (“*corky bark*”) e das caneluras do tronco (“*stem pitting*”).

O isolamento de explantes tão pequenos como os ápices e os meristemas, também permite o estabelecimento de culturas com baixíssimo índice de perdas por contaminação e possibilita a eliminação de outros patógenos, como bactérias, viróides e organismos semelhantes a micoplasmas

A cultura de ápices fragmentados de videira foi inicialmente descrita por BARLASS e SKENE (1978), para o cultivar ‘Carbenet Sauvignon’. Os autores obtiveram estruturas semelhantes a folhas a partir de fragmentos do ápice meristemático, retirado com 2 a 3 primórdios foliares e cerca de 1mm de comprimento. Nestas estruturas houve a proliferação de uma grande quantidade de brotações (8.000 por ápice meristemático).

Posteriormente, BARLASS e SKENE (1980a) aprimoraram a técnica pelo cultivo individual dos fragmentos em gotas de meio líquido, com aproximadamente 0,05 ml, sendo adicionados progressivamente volumes maiores de meio de cultura, até a transferência para o meio sólido, após 14 dias.

Estudos anatômicos revelaram que aquelas estruturas semelhantes a folhas foram regeneradas diretamente das células dos primórdios foliares, sem a formação de calos (BARLASS e SKENE, 1980a) e a formação de gemas a partir destas folhas teve origem adventícia (BARLASS et al., 1981). Este método apresentou-se promissor para a multiplicação de videiras em larga escala, pois foram obtidas aproximadamente 8000 plantas em 4 meses, a partir apenas de um ápice (BARLASS e SKENE, 1978), já sendo testado em diversos cultivares (SKENE e BARLASS, 1980), além de possibilitar a limpeza de vírus, quando em conjunto com a termoterapia (BARLASS et al., 1982; BARLASS, 1987).

A micropropagação tornou-se uma alternativa viável para a multiplicação de videiras muscadíneas. Os cultivares da espécie *Vitis rotundifolia* apresentam grande interesse para o melhoramento de plantas, principalmente para a transferência de genes

de resistência à pragas e doenças. Entretanto, sua propagação por estacas lenhosas é muito difícil, mesmo com aplicação exógena de auxina (GOODE JUNIOR et al., 1982). Mas, com a micropropagação, já foi possível realizar a multiplicação de diversos cultivares, tais como: 'Carlos', 'Dixie', 'Fry', 'Junbo', 'Magnolia', 'Noble', 'Regale', 'Sterling', 'Summit', 'Tarheel', 'Triumph' e 'Welder' (GRAY e FISHER, 1985; GRAY e BENTON, 1990; LEE e WETZSTEIN, 1990; SUDARSONO e GOLDY, 1991; ROBACKER e CHANG, 1992; THIES e GRAVES JUNIOR, 1992; WETZSTEIN e MYERS, 1994).

2.2.1 Fonte de explantes

Para a micropropagação de videira, duas fontes básicas de explantes podem ser utilizadas: brotações obtidas de estacas ou coletadas diretamente do campo durante o período de crescimento (KRUL e MOWBRAY, 1984).

A utilização de matrizes a campo não se apresenta adequada, pois perde-se grande parte dos explantes por necrose, em poucos dias após o isolamento (FANIZZA et al., 1984). Isto ocorre devido ao elevado conteúdo de substâncias fenólicas presentes nos ramos, que oxidam *in vitro*, causando a morte dos explantes. Explantes retirados de ramos localizados em regiões sombreadas da planta apresentam maior sobrevivência do que os retirados de ramos a pleno sol, já que a síntese de compostos fenólicos aumenta com a intensidade luminosa (YU e MEREDITH, 1986).

Os explantes provenientes do campo também são mais difíceis de serem desinfestados, resultando sempre em maior perda de material por contaminação com relação aos obtidos em ambientes protegidos (REUSTLE et al., 1988).

Um método para a obtenção de brotações a partir de estacas lenhosas foi descrito por GOUSSARD (1981), e baseia-se na coleta de estacas com 40 cm de comprimento durante o inverno, com tratamento com captan (2%) e armazenamento em sacos plásticos a 2 ou 3° C. Quando há necessidade de explantes, retiram-se as estacas da câmara fria e cortam-se as mesmas em segmentos de 12 a 15 cm, com 3 gemas, colocando-as para brotar em recipientes com 80 ml de água, a uma temperatura

ambiente de 28 a 30° C e com iluminação constante. Outros métodos semelhantes foram utilizados, armazenando-se as estacas em sacos plásticos em temperaturas de 4 a 7° C e promovendo a brotação de estacas com apenas uma gema em água, nas mesmas condições de incubação das culturas micropropagadas (MULLINS et al., 1979; CHÉE e POOL, 1983; DALAL et al., 1992).

O procedimento possibilita a obtenção de grande quantidade de material vegetal homogêneo numa pequena área, durante o ano todo, conforme observado por PASSOS (1991) que realizou uma série de estudos com diversas substâncias adicionadas ao substrato da estaca, tais como 6-benzilaminopurina, cianamida hidrogenada, calciocianamida, ácido giberélico e ácido naftalenoacético, chegando à conclusão de que estes produtos não proporcionaram a obtenção de melhores resultados de brotação, do que apenas a utilização de água.

A partir das brotações retiram-se os explantes que normalmente são segmentos nodais (GRIBAUDO e FRONDA, 1991), ápices meristemáticos (YU e MEREDITH, 1986) ou meristemas (PASSOS et al., 1985).

Os segmentos nodais constituem-se de micro-estacas com apenas uma gema lateral mais uma pequena porção dos tecidos adjacentes do caule e pecíolo, variando de 0,8 a 2,5 cm de comprimento (MULLINS et al., 1979; MARTINEZ e TIZIO, 1989; GRIBAUDO e FRONDA, 1991). Podem ser inoculados verticalmente ou horizontalmente no meio de cultura (CHÉE e POOL, 1982).

A posição do explante nas brotações pode interferir no seu desenvolvimento *in vitro*. Para BIASI et al.(1998b), o crescimento das brotações dos segmentos nodais do porta-enxerto 'Jales' foi maior, à medida que se utilizaram segmentos mais próximos da base das brotações das estacas. Segmentos nodais mais basais, apresentaram-se maiores e mais lignificados do que os apicais, o que pode ter contribuído com maiores reservas nutricionais para o crescimento das gemas axilares.

Ensaio mostraram que explantes oriundos da porção apical de plântulas do porta-enxerto '1103P' cultivadas *in vitro*, produziram um número maior de brotações que as obtidas das porções mediana e basal (PEIXOTO e PASQUAL, 1992). Este fato

também foi observado com o porta-enxerto 'RR-101-14' (PEIXOTO E PASQUAL, 1996).

Os ápices meristemáticos são retirados da extremidade apical das brotações com cerca de 2 a 4 primórdios foliares e 0,5 a 1,5 mm de comprimento (GOUSSARD, 1981; CHÉE e POOL, 1982; BOTTI et al., 1993), sendo cortados em pedaços menores, quando realizada a cultura de ápices fragmentados (BARLASS e SKENE, 1978).

Os meristemas também são retirados da extremidade das brotações, mas possuem um tamanho menor do que os ápices, atingindo no máximo 0,5 mm de comprimento (NOVÁK e JUVOVÁ, 1983; TRONCOSO et al., 1988) com 1 ou 2 primórdios foliares (PASSOS et al., 1985). Meristemas menores do que 0,3 mm dificilmente regeneram novas plantas (KORUZA e JELASKA, 1993).

2.2.2 Assepsia dos explantes

Os produtos geralmente utilizados para a desinfestação dos explantes são hipoclorito de sódio (GOUSSARD, 1981; PASSOS et al., 1985), hipoclorito de cálcio (BASS et al., 1988; FANIZZA et al., 1984), álcool (HARRIS e STEVENSON, 1982; MARTINEZ e TIZIO, 1989), cloreto de benzalcônio (YU e MEREDITH, 1986) e cloreto de mercúrio (DALAL et al., 1992). Além de produtos germicidas, outras substâncias como fungicidas (BIASI et al., 1999) e antibióticos (BIASI et al., 1998b) são utilizados.

O benomyl é indicado como fungicida, pois apresenta amplo espectro de ação e é pouco tóxico às culturas nas concentrações necessárias para controlar os fungos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1999)

BIASI et al. (1998b) realizaram a assepsia das brotações das estacas de videira com Agrimicina[®] (1g.L⁻¹) durante 30 minutos, seguida pela imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% mais Tween 80 a 0,1% por 15 minutos e quatro lavagens em água esterilizada. A perda de explantes por contaminação foi em média de 7,1% em todo o experimento, o que indica que a assepsia utilizada foi eficiente.

2.2.3 Cultura inicial

Após a assepsia, os explantes estão prontos para serem inoculados no meio de cultura, mas dificilmente o procedimento utilizado é completamente eficiente e muitos explantes podem ser perdidos pelo desenvolvimento de microorganismos ou oxidação (FANIZZA et al., 1984; REUSTLE et al., 1988). Neste sentido, pode-se fazer um pré-condicionamento, inoculando os explantes em meio nutritivo sem reguladores, transferindo para novos meios, após uma semana, apenas aqueles saudáveis e viáveis (PASSOS et al., 1985).

O meio de cultura de pré-incubação utilizado para a videira por PASSOS et al. (1985) constou de metade da concentração dos macronutrientes do meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e dos micronutrientes e vitaminas do meio NN (NITSCH e NITSCH, 1969), mais 1mg.L^{-1} de inositol, $0,8\text{mg.L}^{-1}$ de cisteína, 30g.L^{-1} de sacarose, 4g.L^{-1} de carvão ativado, 4g.L^{-1} e 7g.L^{-1} de ágar. Os explantes viáveis são transferidos para o meio de cultura inicial onde frequentemente adicionam-se reguladores com o objetivo de suprir as possíveis deficiências nos teores endógenos de hormônios.

As gemas axilares ou laterais das plantas encontram-se, geralmente, inibidas (PEIXOTO e PASQUAL, 1996). BARLASS e SKENE (1983) atribuem a regulação da dominância apical à distribuição de citocininas por toda a planta, podendo ser suprimida pelo fornecimento exógeno de (BAP) ou outra citocinina.

CHÉE e POOL (1989), sugeriram que a brotação das gemas axilares é controlada pelo balanço hormonal adequado do meio de cultura, e influenciada pelas condições de cultivo *in vitro*.

O regulador de crescimento mais utilizado e mais efetivo é o BAP em concentrações variáveis, dependendo do cultivar e do tipo de explante utilizado (GRAY e FISHER, 1985; BASS et al., 1988; BOTTI et al., 1993; BLAZINA et al., 1991b).

Nesta etapa a adição de auxinas nem sempre é recomendada, pois, segundo NOVÁK e JUVOVÁ (1983), podem promover a formação indesejável de raízes e

calos, além de reduzir o número de brotações produzidas por explante (GRAY e FISHER, 1985)

NOVÁK e JUVOVÁ (1983) comprovaram que BAP foi a citocinina mais eficiente, superior à cinetina e à 2-isopenteniladenina (2-iP), para estimular o crescimento de meristemas (0,5 mm) e a proliferação de novas brotações em 8 clones de videira. A concentração de 10 μ M de BAP em meio de cultura MS, estimulou o crescimento de meristemas axilares 20 dias após o isolamento, ocasionando a formação de múltiplas brotações.

Diversos autores também observaram a superioridade de BAP em relação a outras citocininas (BARLASS e SKENE, 1980b; GOUSSARD, 1982; GRAY e BENTON, 1990).

Para o cultivar 'A Dona', as concentrações de 2 e 5 μ M de BAP em meio básico NN, foram as mais apropriadas para o desenvolvimento e diferenciação de meristemas com um ou dois primórdios foliares (PASSOS et al., 1985).

CHÉE e POOL (1983) trabalhando com 21 genótipos de videira utilizaram para a fase de estabelecimento inicial o meio de cultura MS acrescido de 3 μ M de tiamina, 55,5 μ M de mio-inositol, 8 μ M de ácido nicotínico, 5 μ M de piridoxina, 5 μ M de BAP, 0,5 μ M de ANA, 3% de sacarose e 0,8% de ágar.

Para o híbrido 'Baco', HARRIS e STEVENSON (1982) encontraram os melhores resultados nesta fase cultivando ápices de 3 a 8 mm em meio MS com 0,4 mg.L⁻¹ de tiamina, 100 mg.L⁻¹ de inositol, 30 g.L⁻¹ de sacarose, 80 mg.L⁻¹ de adenina, 170 mg.L⁻¹ de fosfato de sódio monobásico e 13 μ M de BAP. Os autores também utilizaram este meio para micropropagar outros 21 genótipos de videira, reduzindo a concentração de BAP para 9 μ M.

Para os cultivares 'Ribier', 'Thompson Seedless' e 'Black Seedless', BOTTI et al. (1993), isolando ápices com 0,5 a 1,5 mm, utilizaram para a fase inicial o meio MS com $\frac{3}{4}$ de sua concentração normal mais 9 μ M de BAP.

BIASI et al.(1998a), observaram que a melhor concentração de BAP na indução do crescimento de gemas axilares de alguns porta-enxertos, foi 10 μ M. Concentrações

maiores que 11,5 μM , reduziram o crescimento. Segundo, os autores a concentração ideal de BAP deve-se adequar para cada cultivar micropropagado, procurando obter brotações de boa qualidade com o mínimo de vitrificação, mesmo que a taxa de crescimento seja menor, porque o sucesso das fases subseqüentes, multiplicação e enraizamento, depende do bom estado fisiológico das brotações.

O meio de cultura mais utilizado nos trabalhos de micropropagação de videiras é o MS. Muitas modificações na sua composição já foram sugeridas por diversos autores, principalmente alterações nos constituintes orgânicos (HARRIS e STEVENSON, 1982; CHÉE e POOL, 1985; LEWANDOWSKI, 1991) e reduções na concentração dos macro e micronutrientes (BLAZINA et al., 1991a; BOTTI et al., 1993; FANIZZA et al., 1984).

Além do MS, outros meios de cultura foram utilizados para a micropropagação de videiras, como o NN, o WPM (LLOYD e MCCOWN, 1986), o C₂D (CHÉE e POOL, 1983; PEIXOTO e PASQUAL, 1995b) e o Galzy (GALZY, 1964) que foi posteriormente modificado pelo mesmo autor (GALZY, 1990).

Os meios de indução geralmente incluem ágar na concentração de 6 a 8 g.L^{-1} , mas na cultura de ápices fragmentados o isolamento inicial é realizado em meio MS líquido suplementado com 10 μM de BAP (BARLASS e SKENE, 1980b).

BIASI et al.(1998a) avaliaram o tempo de permanência no meio de indução de ápices meristemáticos, possuindo 2 ou 3 primórdios foliares e com tamanho aproximado de 0,5mm, dos porta-enxertos 'Jales' e 'Campinas'. A permanência no meio de indução até 42 dias foi favorável ao desenvolvimento dos explantes.

O comportamento dos explantes de videiras muscadíneas é semelhante ao dos demais cultivares, respondendo melhor à adição de BAP em meio de cultura MS, em concentrações próximas de 10 μM (GRAY e BENTON, 1990; LEE e WETZSTEIN, 1990; THIES e GRAVES JUNIOR, 1992).

2.2.4 Multiplicação das brotações

A multiplicação pode ser realizada pelo subcultivo das plantas seccionadas em segmentos nodais com uma ou mais folhas, em meio de cultura isento de reguladores de crescimento, conforme observaram BIASI et al.(1998b) com o porta-enxerto 'Jales'.

Nesta fase, embora o principal objetivo seja de produzir o maior número possível de plantas em menor tempo, também é importante manter a taxa de multiplicação constante e conseguir brotações homogêneas e de boa qualidade (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1999).

A rápida multiplicação de clones livres de vírus possui grande importância comercial, sendo obtidos bons resultados com a micropropagação (KRUL e MOWBRAY, 1984). A partir de um explante, BOTTI et al. (1993) estimaram a obtenção anual de 2.808.990 brotações do cultivar 'Thompson Seedless', 26.494 brotações do 'Ribier' e 1.213 do 'Black Seedless' em meio MS com 9 μM de BAP .

Na cultura de ápices fragmentados BARLASS e SKENE (1978) estimaram a produção de aproximadamente 8.000 plantas em 4 meses.

HARRIS e STEVENSON (1982) estabeleceram um protocolo capaz de produzir 12.000 brotações em 4 meses, a partir de apenas um ápice meristemático. Após a fase inicial, os autores transferiram os explantes para o meio de cultura MS líquido com $\frac{3}{4}$ de sua concentração normal, suplementando com 170 mg.L^{-1} de fosfato de sódio monobásico, 80 mg.L^{-1} de adenina e 13 μM de BAP. A cada 2 a 3 semanas foi realizada a repicagem até os brotos iniciarem a alongação, reduzindo-se a concentração de BAP para 8,8 μM e o intervalo de repicagem para 2 semanas.

LEWANDOWSKI (1991) obteve cerca de 3.000 plantas de videira 'Delaware' por mês, utilizando um meio de cultura MS modificado e reduzindo os intervalos de repicagem, mas ressaltou a importância de novos isolamentos anualmente, em combinação com uma proliferação limitada de brotações, para reduzir o risco da variação somaclonal.

Para a contínua multiplicação de brotações é necessária a adição de citocinina ao meio de cultura, mas, geralmente a concentração utilizada na fase de indução é suficiente para permitir o crescimento contínuo das brotações (KRUL e MOWBRAY, 1984). A subcultura repetida em meio de cultura com citocinina pode inibir o crescimento das brotações (KORUZA e JELASKA, 1993) e concentrações muito elevadas de citocinina também são prejudiciais, causando a formação de brotações anormais e vitrificadas (HARRIS e STEVENSON, 1982; CHÉE e POOL, 1985; LEE e WETZSTEIN, 1990).

Na micropropagação do cultivar 'Summit', a melhor produção de brotos foi encontrada com a adição de 10 μM de BAP, enquanto concentrações superiores a 20 μM causaram redução na proliferação e crescimento dos brotos, com altos índices de mortalidade. Brotações cultivadas em meio de cultura com 5 μM de BAP enraizaram melhor do que aquelas provenientes de meios de cultura com 10 μM do mesmo regulador (LEE e WETZSTEIN, 1990).

As maiores taxas de multiplicação de porta-enxerto '1103 Paulsen' foram obtidas por PEIXOTO et al. (1994) com 2,2 e 4,4 μM de BAP, mas para a obtenção de brotações maiores que 1cm, a concentração de 2,2 μM foi a melhor. Concentrações maiores do que esta aumentaram a vitrificação das brotações.

O maior crescimento dos explantes na ausência de BAP pode ser atribuído ao efeito desse regulador na morfogênese *in vitro*; BAP aumenta a taxa de multiplicação dos explantes, mas em contrapartida reduz o crescimento das brotações (PEIXOTO e PASQUAL, 1996).

O uso de BAP em combinação com a zeatina, ambos na concentração de 2 mg.L^{-1} , promoveu a obtenção do melhor resultado de multiplicação (14,3 brotos/explante) para o cultivar 'Chenin Blanc', sendo que a concentração de 22 μM de BAP foi extremamente prejudicial (GOUSSARD, 1981). Entretanto para o mesmo cultivar, o uso de 10 mg.L^{-1} de zeatina proporcionou o desenvolvimento de brotações de melhor qualidade do que as obtidas com a combinação de BAP e zeatina (GOUSSARD, 1982).

O thidiazuron, uma feniluréia, possui o efeito de citocinina mesmo em baixas concentrações, conforme verificaram GRIBAUDO e FRONDA (1991) para o cultivar 'Barbera'. Entretanto, em concentrações superiores a 0,1 μM ele provocou sintomas de vitrificação, com folhas mal formadas e engrossamento das brotações, também sendo prejudicial para o enraizamento, inibindo-o totalmente na concentração de 1 μM . GRAY e BENTON (1990), trabalhando com cultivares muscadíneas, também verificaram que apesar do thidiazuron produzir o mesmo número de brotações do que o BAP, aquelas foram atrofiadas e tortas e apresentaram dificuldade de enraizamento.

CHÉE e POOL (1985) após testarem diversas concentrações de várias substâncias orgânicas no meio básico de MS, obtiveram a melhor multiplicação de brotações do cultivar Remaily Seedless com 3 μM de tiamina, 55,5 μM de mio-inositol, 8 μM de ácido nicotínico e 5 μM de piridoxina, sendo que os aminoácidos arginina, asparagina, glutamina e tirosina, em concentrações de 0,25 até 4 mM, não obtiveram efeito sobre a multiplicação.

PEIXOTO e PASQUAL (1995a), concluíram que a concentração de ágar a 3,5 g.L^{-1} adicionada ao meio C_2D , combinada com pH 3,7 e 4,7 proporcionou as maiores taxas de multiplicação e de crescimento dos explantes do porta-enxerto 'RR-101-14'.

Para diversos cultivares de videiras muscadíneas, GRAY e BENTON (1991) verificaram que o meio de cultura WPM provocou a ocorrência de vitrificação e abscisão foliar nas brotações, e os meios MS e C_2D resultaram em taxas equivalentes de multiplicação.

NOVÁK e JUVOVÁ (1983) observaram que a remoção das folhas dos explantes afetou negativamente o enraizamento do porta-enxerto 'Ándré', em meio de cultura com 0,1 μM de BAP.

2.2.5 Enraizamento das brotações

A maioria dos cultivares de videira micropropagados enraízam facilmente, sendo em geral suficiente apenas a transferência para um meio de cultura isento de

reguladores de crescimento (KRUL e MOWBRAY, 1984). O enraizamento pode ser realizado em meio de cultura solidificado com ágar (CHÉE e POOL, 1988), em meio de cultura líquido com suporte de papel de filtro ou diretamente em recipientes *in vivo* (HARRIS e STEVENSON, 1982).

Embora alguns cultivares apresentem enraizamento satisfatório em meio de cultura sem auxinas, a adição de ácido naftalenoacético (ANA) tem papel fundamental na qualidade e no número de raízes produzidas (CHÉE e POOL, 1982).

As auxinas mais utilizadas são o ácido indol butírico AIB (LEE e WETZSTEIN, 1990; LEWANDOWSKI, 1991; BOTTI et al., 1993) e o ANA (CHÉE e POOL, 1982; CHÉE e POOL, 1983; CHÉE e POOL, 1988; MARTINEZ e TIZIO, 1989).

O enraizamento de ‘Moscatto d’Amburgo’ e ‘Pinot Bianco’ foi obtido com sucesso por CICCOTI (1982) em meio de cultura MS, com a metade da concentração de sais sem auxinas, mas adicionado de $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de tiamina.

O uso de meios de cultura mais diluídos e com menor concentração de sacarose, mostraram-se mais adequados para o enraizamento (HARRIS e STEVENSON, 1982). A redução de 3% para 1% no conteúdo de sacarose do meio de cultura MS promoveu o melhor crescimento das brotações da videira ‘Remaily Seedless’ e este aumento de vigor foi indicado por CHÉE e POOL (1988) como causa provável da melhoria no enraizamento. No meio de cultura com 3% de sacarose, mesmo com a adição de $1,6 \mu\text{M}$ de ANA, as brotações enraizaram pouco e com raízes de baixa qualidade, formando plantas inadequadas para a aclimatização.

Há uma forte influência do genótipo sobre a capacidade de enraizamento, ocorrendo diferenças entre espécies e entre cultivares da mesma espécie (CHÉE e POOL, 1983). No trabalho realizado por ROUBELAKIS-ANGELAKIS e ZIVANOVITIC (1991), de quinze cultivares estudados, sete não enraizaram em meio de cultura MS sem AIB, mas todos enraizaram num meio MS modificado pelos autores, mesmo sem AIB, com exceção dos cultivares ‘Liatiko’ e ‘SO4’, cujo enraizamento foi baixo em ambos os meios de cultura. A concentração ótima de AIB para os cultivares de *Vitis vinifera* foi de 3 a $5 \mu\text{M}$.

A adição de 1mg.L^{-1} de ANA foi necessária para induzir a rizogênese em ‘Thompson Seedless’, ‘Muscat of Alexandria’, ‘Dorradillo’, ‘Concord’, ‘Ramsey’, ‘Dog Ridge’, ‘Rupestris du Lot’, ‘R-99’, ‘1613’ e ‘Harmony’, mas para ‘Cabernet Sauvignon’ e ‘Carbenet Franc’ apenas a cultura em meio de cultura White isento de reguladores foi suficiente (BARLASS e SKENE, 1980b; SKENE e BARLASS, 1980).

O ANA aumentou a formação e crescimento das raízes do porta-enxerto ‘R-99’, sendo a concentração de $0,22\ \mu\text{M}$ a mais indicada para o enraizamento (PEIXOTO E PASQUAL, 1996).

O uso de 1g.L^{-1} de carvão ativado não proporcionou aumento no enraizamento de alguns clones de videira no trabalho realizado por NOVÁK e JUVOVÁ (1983), chegando até mesmo a reduzir o efeito da adição de auxinas. Neste trabalho a adição de $0,1\ \mu\text{M}$ de ANA ou AIB, em meio de cultura MS com a concentração reduzida pela metade, foi eficiente na promoção do enraizamento, resultando em valores superiores a 90%. O ANA estimulou também a formação de calos na base das brotações, o que não ocorreu com o uso de AIB, em que as raízes formaram-se diretamente das brotações.

Para o enraizamento dos porta-enxertos ‘1103 Paulsen’ e ‘RR 101-14’, a concentração de $0,02\ \text{mg.L}^{-1}$ de ANA foi a mais efetiva, sendo que concentrações superiores não promoveram aumentos no crescimento radicial e no número de raízes, além de aumentarem a proliferação de calos (PEIXOTO et al., 1994).

O pré-tratamento de imersão em solução de AIB por 15 minutos, nas respectivas concentrações de $2,46\ \text{mM}$ e $3,94\ \text{mM}$, evitou a formação de calos em brotações dos cultivares ‘Marechal Foch’ e ‘Cascade’ e promoveu o melhor enraizamento em meio de cultura MS com metade da concentração de sais (LI e EATON, 1984).

A utilização conjunta de AIB e ANA causou efeito sinérgico no enraizamento da videira ‘Delaware’, sendo $1\ \text{g.L}^{-1}$ de ANA e $5\ \text{g.L}^{-1}$ de AIB a melhor combinação, proporcionando um efeito claramente superior aos efeitos individuais dos reguladores, o que resultou em mais de 95% de brotações enraizadas (LEWANDOWSZKI, 1991).

O enraizamento direto das brotações em recipientes durante a fase de aclimatização, tem apresentado bons resultados para diversos cultivares. Este processo é mais eficiente do que o enraizamento *in vitro*, porque elimina uma etapa da

micropropagação e resulta em plantas mais vigorosas em menor tempo (GRAY e BENTON, 1990; GRAY e BENTON, 1991).

Com o enraizamento *in vivo*, em substrato formado de perlita e sob nebulização, foi possível elevar a sobrevivência após o transplante do cultivar Palomini Fino, obtendo-se até 83% de plantas enraizadas (TRONCOSO et al., 1988).

Substratos à base de turfa e solo, ou adicionados de solução nutritiva com sacarose, não são adequados para o enraizamento direto, pela freqüente contaminação com fungos e algas. A utilização de perlita e vermiculita também requer cuidados, pois o excesso de umidade pode ocasionar o enraizamento superficial das brotações, indicando a falta de aeração do substrato, conforme observaram HARRIS e STEVENSON (1982) com o cultivar Baco. Estes autores também obtiveram em câmara de nebulização resultados semelhantes ao enraizamento *in vitro*, com a utilização de perlita grossa, saturada do meio MS modificado com $\frac{1}{4}$ de sua concentração, adicionado de $0,5\mu\text{M}$ de AIA e sem sacarose.

O pré-tratamento com Rootone-F[®], um produto comercial à base de auxinas, antes do transplante direto, aumentou o número de raízes emitidas por brotações de alguns cultivares de *Vitis rotundifolia*, mas não afetou a porcentagem de enraizamento que, apesar de ter sido inferior à obtida *in vitro*, proporcionou a formação de plantas mais vigorosas (GRAY e BENTON, 1991).

2.1.6 Aclimatização das plantas

A aclimatização em câmaras de nebulização constitui-se na forma mais utilizada para amenizar o estresse hídrico das plantas ocasionado pela saída dos frascos de cultura. Nas primeiras semanas após o transplante, a umidade relativa do ar deve permanecer alta, pois a perda de água pelas folhas *in vitro* é elevada, até que atividade estomática seja regularizada e aumente a camada de cutícula sobre as folhas (LEWANDOWSKI, 1991).

A taxa de sobrevivência da videira em condição de nebulização é alta, sendo freqüentemente obtidos resultados acima de 90% em diversos cultivares (GALZY, 1964; BLAZINA et al., 1991b; LEWANDOWSKI, 1991).

Os substratos utilizados são bastante variados, incluindo solo, perlita, vermiculita, turfa, areia e diversas misturas comerciais (BLAZINA et al., 1991b; GRAY e BENTON, 1991; HARRIS e STEVENSON, 1982; THIES e GRAVES JUNIOR, 1992; TRONCOSO et al., 1988). A inclusão de nutrientes ao substrato, pelo uso de adubos e soluções nutritivas, auxilia o crescimento das plantas micropropagadas (CHÉE e POOL, 1982; LEWANDOWSKI, 1991).

No experimento realizado por BIASI et al. (1998b), a sobrevivência das mudas do porta-enxerto 'Jales' foi maior quando estas permaneceram em recipientes individuais fechados preenchidos com o substrato comercial Multiplant[®], em câmara de nebulização, por 3 semanas.

2.1.7 Condições de crescimento *in vitro*

As condições de ambiente em que as culturas de videira são mantidas apresentam variações entre os trabalhos realizados por diversos autores, principalmente quanto à intensidade luminosa, devido às condições específicas de cada laboratório.

A temperatura determina a velocidade de crescimento das culturas (GALZY e COMPAN, 1988). Ápices fragmentados do cultivar 'Cabernet Sauvignon', quando mantidos com temperatura de 27° C durante o período de luz e 20° C no escuro, levaram 31 dias para iniciar o crescimento das brotações, enquanto na temperatura constante de 35° C, a multiplicação já ocorreu aos 18 dias (BARLASS et al., 1981).

Para o enraizamento de diversos cultivares de videira, a melhor temperatura encontrada por FANIZZA et al. (1988) foi de 32° C.

As videiras podem se adaptar, dentro de certos limites, as condições de crescimento, conforme verificaram GALZY et al. (1990) com os cultivares 'Rupestris du Lot', 'Chardonnay' e 'Pinot Noir'. Na temperatura de 21° C e intensidade luminosa

de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, o genótipo e as condições de crescimento influenciaram no crescimento das plantas, mas o peso da matéria seca permaneceu estável. Já na temperatura de 12°C e $12 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ocorreu um aumento no conteúdo de matéria seca. Segundo os autores, isto sugere que o requerimento nutricional *in vitro* não é apenas uma característica varietal, mas também está relacionado com as condições físicas de crescimento.

A temperatura não deve atingir 38°C , pois esta foi letal para os explantes de diversos cultivares de videira (BARLASS et al., 1981; FANIZZA et al., 1988).

O fotoperíodo pode alterar o crescimento das plantas *in vitro*, já que controla as mudanças no conteúdo endógeno de hormônios (ALLEWELDT e RADLER, 1962). Mas o comportamento varietal é bem diferenciado. CHÉE e POOL (1982) verificaram que o desenvolvimento de brotações e enraizamento do cultivar Rougeon foi melhor em dias curtos (10h). Este resultado foi confirmado por CHÉE e POOL (1983), que também observaram um efeito benéfico de dias curtos (10h) na produção de brotações de ‘Concord’ e ‘Cabernet Sauvignon’, enquanto *Vitis argentifolia* comportou-se melhor em dias longos (16h). Já outros 14 cultivares apresentaram comportamento semelhante em dia curtos e longos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micropropagação Vegetal do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

3.2 CULTIVAR UTILIZADO

O porta-enxerto utilizado neste trabalho foi o híbrido originado do cruzamento entre as espécies *Vitis berlanderi* e *Vitis riparia*, conhecido como '420-A'.

3.3 FONTE DE EXPLANTES

Para o fornecimento contínuo e uniforme de explantes, foi utilizada a metodologia adaptada por BIASI et al. (1998b).

Estacas do porta-enxerto foram coletadas das plantas matrizes mantidas no viveiro do Setor de Fruticultura da Estação Experimental do Canguiri da Universidade Federal do Paraná, localizada em Pinhais -PR. A coleta foi realizada em julho de 1999, durante o período de repouso vegetativo das plantas. Depois foram tratadas por imersão com captan (2g.L^{-1}), enroladas em jornal úmido, acondicionadas dentro de sacos plásticos e armazenadas em temperatura fria (4 a 6°C) durante período mínimo de 30 dias.

Quando havia necessidade de explantes, as estacas foram retiradas do refrigerador, cortadas em segmentos com 2 ou 3 gemas e colocadas para brotar em frascos contendo cerca de 100 mL de água, numa sala climatizada, com fotoperíodo de 16 horas, fornecida por lâmpadas fluorescentes e temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$. As brotações

das estacas surgiram em aproximadamente 15 dias da colocação em água e foram utilizadas nos experimentos como fonte para retirada de explantes, que consistiram em segmentos nodais com cerca de 1cm (Figura 5A, 5B).

3.4 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO *in vitro*

Os frascos utilizados para a cultura *in vitro* foram tubos de ensaio com capacidade de 32 mL, tampados com papel alumínio. Em cada tubo foram colocados 10 mL de meio de cultura. Os tubos com meio de cultura foram autoclavados a 120° C e 1 atm, por 20 minutos.

Todos os experimentos foram mantidos dentro de uma sala climatizada, com fotoperíodo de 16 horas, fornecida por lâmpadas fluorescentes e temperatura de 25±3° C.

3.5 EXPERIMENTOS DE ESTABELECIMENTO INICIAL DA CULTURA

Brotações das estacas, com cerca de 5 nós sem as folhas, foram cortadas pelos pecíolos, e realizada assepsia pelo tratamento das brotações com benomyl (2g.L⁻¹) durante 2 horas, seguida pela imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% mais Tween 20 a 0,1% por 20 minutos e 4 lavagens em água esterilizada.

O ápice das brotações foi desprezado e o restante foi dividido em segmentos nodais com cerca de 1 cm de comprimento cada, possuindo uma gema axilar.

O delineamento utilizado nos experimentos foi de blocos ao acaso com 4 repetições e 10 frascos por parcela. Em cada frasco foi colocado apenas um explante.

3.5.1 Efeito de concentrações de BAP no crescimento inicial da gema axilar de segmentos nodais

O meio de cultura utilizado foi o MS com a metade da concentração de sais e solidificado com $6,5\text{g.L}^{-1}$ de ágar (Agargel[®]-Sigma). Os tratamentos tiveram as seguintes concentrações de BAP:

- 1) $0\mu\text{M}$
- 2) $1\mu\text{M}$
- 3) $5\mu\text{M}$
- 4) $10\mu\text{M}$

3.5.2 Efeito de concentrações da cinetina no crescimento inicial da gema axilar de segmentos nodais

O meio de cultura utilizado foi o MS com a metade da concentração de sais e solidificado com $6,5\text{g.L}^{-1}$ de ágar (Agargel[®]-Sigma).

Os tratamentos tiveram as seguintes concentrações de cinetina:

- 1) $0\mu\text{M}$
- 2) $1\mu\text{M}$
- 3) $5\mu\text{M}$
- 4) $10\mu\text{M}$

3.5.3 Efeito de diferentes diluições de sais do meio de cultura MS no crescimento inicial da gema axilar de segmentos nodais

Os tratamentos foram os seguintes:

- 1) MS
- 2) MS/2
- 3) MS/4
- 4) MS/8

A composição do meio MS pode ser observada na Tabela 1. Cada tratamento foi acrescido de $1\mu\text{M}$ de BAP por litro.

3.5.4 Efeito de diferentes meios de cultura no crescimento inicial da gema axilar de segmentos nodais

Os tratamentos foram os seguintes meios de cultura:

- 1) MS
- 2) MS/2
- 3) NN
- 4) WPM

A composição dos meios pode ser observada na Tabela 1. Cada tratamento foi acrescido de $1\mu\text{M}$ de BAP por litro .

3.6 AVALIAÇÃO DOS EXPERIMENTOS DE ESTABELECIMENTO INICIAL DA CULTURA

A avaliação foi realizada 30 dias após a instalação de cada experimento por meio dos seguintes parâmetros: porcentagem de segmentos com brotação da gema axilar ($>0,5$ cm), comprimento da brotação principal, número de folhas expandidas da brotação principal, número de brotos por explante e porcentagem de explantes perdidos por contaminação e oxidação.

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA EM MG.L⁻¹ DE ALGUNS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA A MICROPROPAGAÇÃO DE VIDEIRAS.

Macronutrientes	MS	NN	WPM
NH ₄ NO ₃	1650	720	400
KNO ₃	1900	950	-
KH ₂ PO ₄	170	68	170
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	556
CaCl ₂ .2 H ₂ O	440	-	96
CaCl ₂	-	166	-
K ₂ SO ₄	-	-	990
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	185	370
Micronutrientes			
Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O	27,8	27,8	27,8
Fe ₂ (SO ₄) ₃ .5 H ₂ O	-	-	-
Na ₂ EDTA	37,3	37,3	37,3
H ₃ BO ₃	6,2	10,0	6,2
MnSO ₄ . H ₂ O	16,9	18,9	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	10,0	8,6
KI	0,830	-	-
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,250	0,25	0,25
CoCl ₂ .6 H ₂ O	-	-	-
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,025	0,025	0,25
Substâncias orgânicas			
Tiamina. HCl	0,1	0,5	1,0
Piridoxina.HCl	0,5	0,5	0,5
Ác. nicotínico	0,5	5	0,5
Glicina	2	2	2
Biotina	-	0,05	-
Ác. Fólico	-	0,5	-
Mio-inositol	100	100	100
Sacarose	30.000	20.000	20.000
pH	5,8	5,5	5,8

Fonte: MS = MURASHIGE e SKOOG (1962); NN = NITSCH e NITSCH (1969); WPM = LLOYD e McCOWN (1980).

3.7 EXPERIMENTO DE MULTIPLICAÇÃO

3.7.1 Efeito de diferentes meios de cultura na multiplicação das brotações

O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso com 4 repetições e 10 frascos por parcela. Cada frasco recebeu um explante.

Os tratamentos foram os seguintes meios:

- 1) MS
- 2) MS/2
- 3) NN
- 4) WPM

Os explantes consistiram de segmentos nodais contendo uma folha, retirados de plantas crescidas *in vitro*, provenientes do primeiro subcultivo em meio de cultura isento de reguladores de crescimento.

A avaliação do experimento foi realizada após 30 dias da sua instalação por meio dos seguintes parâmetros: porcentagem de segmentos com brotação da gema axilar, porcentagem de explantes com raiz, comprimento da brotação principal, número de folhas da brotação principal e número de explantes perdidos por contaminação e oxidação.

3.8 EXPERIMENTO DE ENRAIZAMENTO

3.8.1 Efeito de diferentes meios de cultura no enraizamento das brotações

O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso com 4 repetições e 10 frascos por parcela. Cada frasco recebeu um explante.

Os tratamentos foram os seguintes:

- 1) Meio sólido (6,5 g.L⁻¹ ágar)
- 2) Meio sólido (6,5 g.L⁻¹ ágar) + carvão ativado (1g.L⁻¹)

3) Meio líquido com suporte de espuma fenólica

O meio de cultura utilizado foi MS/2 isento de reguladores de crescimento. Os explantes consistiram de segmentos nodais com 1 folha, provenientes das plantas em fase de multiplicação.

A espuma fenólica da marca Oasis® foi cortada em pedaços de 2x1x1cm e imersa em água deionizada por 24 horas, antes da instalação do experimento.

A avaliação foi realizada 30 dias após a sua instalação por meio dos seguintes parâmetros: comprimento da brotação principal, porcentagem de segmentos com brotação da gema axilar, porcentagem de explantes enraizados, número de raízes por explante e número de folhas da brotação principal e porcentagem de explantes perdidos por contaminação e oxidação.

3.9 EXPERIMENTO DE ACLIMATIZAÇÃO

3.9.1 Efeito de diferentes substratos na sobrevivência das plantas

O experimento foi instalado em Casa de Vegetação. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso com 3 repetições e 8 plantas por parcela. Os tratamentos foram os seguintes substratos:

- 1) Vermiculita
- 2) Casca de arroz carbonizada
- 3) Plantmax®

As plantas utilizadas neste experimento foram provenientes do experimento de enraizamento e da fase de multiplicação.

Após a retirada dos frascos, as raízes foram lavadas em água corrente para retirar o meio de cultura e as plantas foram colocadas numa bandeja com água, onde permaneceram até o momento do transplante. As plantas foram acondicionadas em

tubetes em bandejas de isopor e permaneceram sob nebulização, com intervalo de regas de 30 minutos.

O experimento foi avaliado pela sobrevivência das plantas, 18 dias após a sua instalação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXPERIMENTOS DE ESTABELECIMENTO INICIAL DA CULTURA

4.1.1 Efeito de concentrações de BAP no crescimento inicial da gema axilar de segmentos nodais

A análise de variância não apresentou significância para o efeito de BAP sobre a porcentagem de gemas axilares brotadas, o comprimento das brotações principais e a porcentagem de explantes perdidos por oxidação e contaminação (Anexo 1).

Porém, adição de BAP no meio de cultura afetou o número de brotos por explante e o número de folhas presentes na brotação principal (Anexo 1).

Observou-se, maior índice de brotos, quando BAP foi adicionado aos meios de cultura (Tabela 2). As concentrações 1, 5 e 10 μM de BAP apresentaram 1,3, 1,76 e 1,75 brotos por explante, respectivamente. A multiplicidade de brotos é característica deste regulador, que induz a formação de grandes números de brotos (MARTINELLI, 1985). Segundo MEYERSON et al. (1994), o número de brotos por explante é genótipo-dependente. Dos 13 cultivares avaliados neste trabalho, cultivados em meio de cultura adicionado de 5 μM de BAP, o que produziu mais brotos foi 'Dog Ridge' (5,8 brotos/ápice caulinar) e o menor número foi encontrado para 'Dixie' (2,2 brotos/ápice caulinar).

Quantidades maiores de folhas foram encontradas nos tratamentos com ausência de BAP (1,42 folhas/brotação) e na concentração de 1 μM (2,11 folhas/brotação). Concentrações mais altas do regulador (5 e 10 μM) diminuíram a quantidade de folhas (Tabela 2), afetando seu desenvolvimento e a qualidade das brotações, que apresentaram sintomas de vitrificação. Este fenômeno é um problema comum no

cultivo de videiras, notadamente, em altas concentrações de BAP (GRAY e BENTON, 1991).

Apesar do comprimento das brotações não apresentar diferença significativa entre os tratamentos, a concentração de 1 μM de BAP foi a que apresentou o melhor resultado (1,12 cm) .Já BIASI et al.(1998a) observaram que para o porta-enxerto 'Jales', o BAP induziu o crescimento das gemas axilares dos segmentos nodais até a concentração de 11,5 μM , concentrações superiores a esta reduziram o crescimento. Estes resultados confirmam a conclusão de GRAY e KLEIN(1989), em que a ótima concentração de citocinina depende do cultivar e deve ser determinada caso a caso.

Mediante os resultados obtidos no presente trabalho (Tabela 2), pode-se observar que para cada parâmetro analisado isoladamente, apresenta-se uma determinada concentração de BAP mais adequada. Confirmando os resultados encontrados com o híbrido 'Remaily Seedless', em que CHÉE e POOL (1985), definiram ótimas concentrações para a multiplicação do broto (5 μM), para produção de brotos maiores (2,5 μM) e para a máxima expansão dos internós (1 μM). Este autores demonstraram, que o efeito do BAP em concentrações mais baixas, foi mais eficiente na qualidade e crescimento do explante, como foi observado neste trabalho (Tabela 2).

BIASI et al. (1998a) e LEE e WETZSTEIN (1990), sugerem que concentrações de BAP devem ser determinadas no estabelecimento inicial visando a obtenção de brotações de boa qualidade e com mínimo de vitrificação, mesmo que a taxa de crescimento seja menor, pois, fases subsequentes dependem do bom estado fisiológico das brotações.

A média de explantes perdidos por oxidação e contaminação, em todo o experimento foi de 50,63%. Estes resultados coincidem com os obtidos por GRAY e KLEIN (1989), no qual 50% dos ápices de 'Blanc Du Bois' contaminaram ou tornaram-se necróticos e não cresceram.

TABELA 2 - EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE BAP EM CINCO PARÂMETROS ANALISADOS NO CRESCIMENTO INICIAL DA GEMA AXILAR DE SEGMENTOS NODAIS DO PORTA-ENXERTO '420-A', APÓS 30 DIAS (Experimento 4.1.1; Anexo 1)

BAP (μM)	Brotação (%)	Comprimento das brotações (cm)	N.º Brotos/ Explante	N.º Folhas da brotação principal	Explantos perdidos (%)
0	47,50 ²	0,76 ²	0,78b ¹	1,42ab ¹	60,0 ²
1	63,88	1,12	1,3ab	2,11a	42,5
5	90,95	0,87	1,76a	0,72b	55,0
10	66,40	0,66	1,74a	0,16b	45,0
C.V. (%)	45,59	32,96	25,65	52,03	41,93

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

²Médias não diferem significativamente entre si, pelo teste de F a 5% de probabilidade.

4.1.2 Efeito de concentrações da cinetina no crescimento inicial da gema axilar de segmentos nodais

A análise de variância não apresentou diferenças significativas entre os resultados das variáveis analisadas (Anexo 2).

Estes resultados demonstraram o baixo efeito da cinetina no crescimento inicial do porta-enxerto '420-A'. Resultados semelhantes foram obtidos por GRAY e BENTON (1991), com vários cultivares de videira, onde meios com e sem a presença do regulador de crescimento apresentaram o mesmo efeito.

A ineficiência da cinetina no estabelecimento inicial da cultura, também pode ser observado com *Vitis rotundifolia* (SUDARSONO e GOLDY, 1991), no trabalho com ápices fragmentados, realizado por SKENE e BARLASS (1980) e com meristemas apicais do cultivar 'Blanc Du Bois' (GRAY e KLEIN, 1989).

Apesar do baixo efeito da cinetina na multiplicação da videira, NOVÁK e JUVOVÁ (1983), demonstraram que este regulador afetou o crescimento e desenvolvimento de meristemas de gemas axilares, de vários porta-enxertos, em todas as concentrações testadas (0,1-20 μM).

TABELA 3 - EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE CINETINA EM CINCO PARÂMETROS ANALISADOS NO CRESCIMENTO INICIAL DA GEMA AXILAR DE SEGMENTOS NODAIS DO PORTA-ENXERTO '420-A', APÓS 30 DIAS. (Experimento 4.1.2; Anexo 2)

Cinetina (µM)	Brotação (%)	Comprimento das brotações (cm)	N.º Folhas/brotação principal	N.º Brotos/explante	Explantes Perdidos (%)
0	33,63 ¹	0,96 ¹	0,91 ¹	1	62,5 ¹
1	26,88	1,70	2,42	1	55,0
5	23,80	1,11	1,12	1	70,0
10	33,33	0,94	0,83	1	70,0
C.V.(%)	37,85	41,83	64,10	-	24,60

¹Médias não diferem significativamente pelo teste de F ao nível de 5% de probabilidade

4.1.3 Efeito de diferentes diluições de sais do meio de cultura MS no crescimento inicial da gema axilar de segmentos nodais

As diferentes concentrações do meio de cultura MS testadas, apresentaram resultados significativos para o comprimento da brotação principal, número de folhas do explante e para a porcentagem de explantes perdidos por contaminação e oxidação (Anexo 3).

A porcentagem de gemas axilares brotadas e o número de brotos por explante, não foram afetados pelas diferentes concentrações do meio MS (Anexo 3).

O maior comprimento médio da brotação principal da gema axilar foi de 2,4 cm obtido no meio de cultura MS com a concentração normal de sais (Tabela 4 e Figura 1). Vários trabalhos indicam o meio de cultura MS no estabelecimento inicial da cultura (GOUSSARD, 1981; GOUSSARD, 1982; NOVÁK e JUVOVÁ, 1983; YU e MEREDITH, 1986; LEE e WETZTEIN, 1990; GRAY e BENTON, 1990; LEWANDOWSKI, 1991).

O MS também foi superior no desenvolvimento de meristemas apicais do cultivar 'Blanc Du Bois' (GRAY e KLEIN, 1989). Estes autores sugerem o emprego do meio de cultura MS para a produção comercial, tanto pelo seu uso comum como pela sua composição ser encontrada em mix. Os resultados deste trabalho, coincidem com os encontrados por BARLASS e SKENE (1980b), onde a concentração total de

sais do MS propiciou resultados superiores aos obtidos com a concentração reduzida (MS/2).

Porém, a superioridade do meio de cultura MS para o comprimento da brotação principal, tendeu a diminuir, igualando-se ao efeito do MS/2, quando as brotações foram transferidas para o meio de alongamento desprovido do regulador de crescimento, 30 dias após a permanência no meio de indução (Anexo 8). O mesmo ocorreu com o meio de cultura MS/4, onde observou-se a redução do seu efeito sobre o crescimento das brotações principais (Figura 2).

Para a variável número de folhas as plantas apresentaram a maior quantidade de folhas, nos meios de cultura MS, MS/2 e MS/4 (Tabela 4). Já, BIASI et al. (1998b) encontraram no meio de cultura MS/2 o maior número de folhas (3,9 folhas/explante), superando o resultado obtido com o meio de cultura MS (2,1 folhas/explante).

Os explantes do meio de cultura MS/8 foram os mais afetados pela concentração reduzida dos sais, apresentando menor crescimento, menor número de folhas e maior perda por contaminação e oxidação (80%). Observou-se forte necrose nos ápices do explantes (Figura 1).

TABELA 4 - EFEITO DE DIFERENTES DILUIÇÕES DE SAIS DO MEIO DE CULTURA MS EM CINCO PARÂMETROS ANALISADOS NO CRESCIMENTO INICIAL DA GEMA AXILAR DE SEGMENTOS NODAIS DO PORTA-ENXERTO '420-A', APÓS 30 DIAS. (Experimento 4.1.3; Anexo 3)

MS	Brotação (%)	Comprimento das brotações (cm)	N.º Brotos/explante	N.º Folhas da brotação principal	Explantes perdidos (%)
MS	63,48 ²	2,44a ¹	1,25 ²	3,62a ¹	52,5b ¹
MS/2	85,35	1,79b	1,29	3,13a	42,5b
MS/4	96,43	1,25c	1,18	2,88a	47,5b
MS/8	82,14	0,66d	1,25	0,45b	80,0a
C.V. (%)	20,83	13,52	24,95	24,31	17,02

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

²Médias não diferem significativamente entre si, pelo teste de F a 5% de probabilidade.

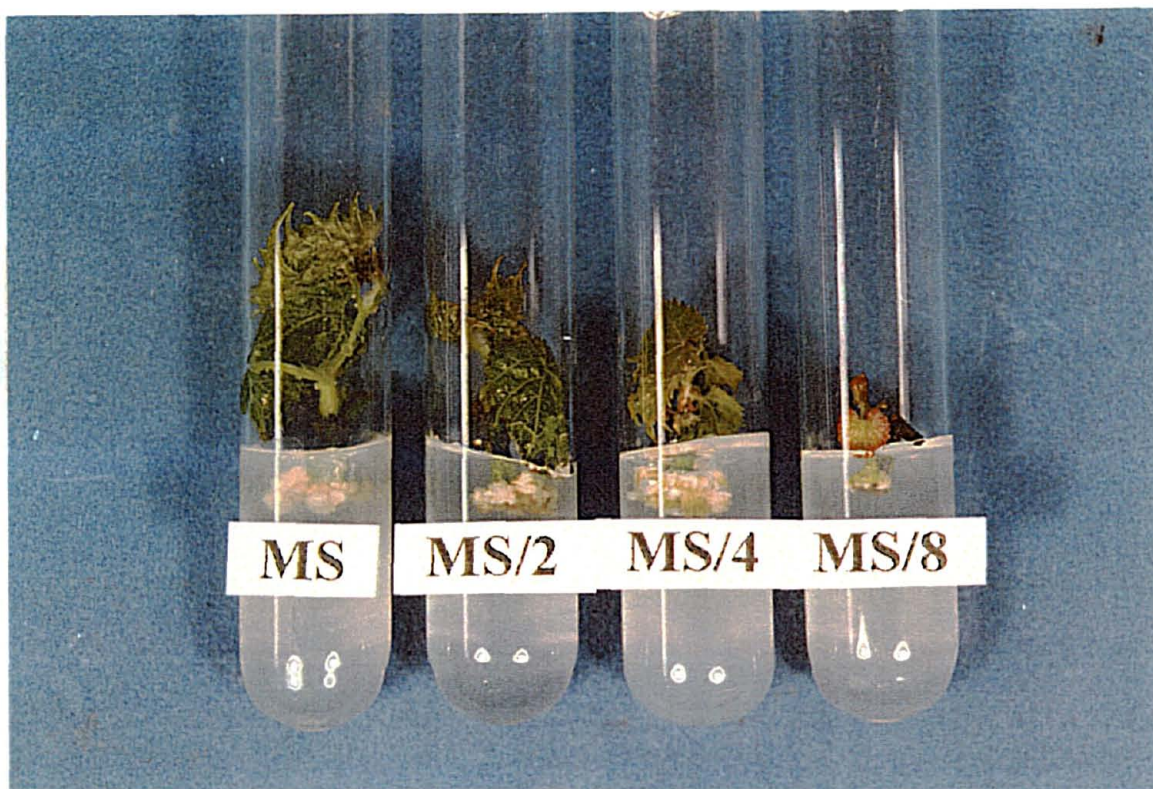


FIGURA 1 - Efeito de diferentes diluições de sais do meio de cultura MS sobre o crescimento de gemas axilares de segmentos nodais do porta enxerto '420-A' após 30 dias de cultivo (Experimento 4.1.3)



FIGURA 2 - Efeito de diferentes diluições de sais do meio de cultura MS no primeiro subcultivo de brotações obtidas de gemas axilares de segmentos nodais do porta-enxerto '420-A', após 35 dias (Experimento 4.1.3).

4.1.4 Efeito de diferentes meios de cultura no crescimento inicial da gema axilar de segmentos nodais

O efeito dos meios de cultura sobre o crescimento inicial das gemas axilares foi significativo apenas para a variável número de folhas por explante (Anexo 4).

O meio de cultura WPM foi o que apresentou menor número de folhas por explante, sendo significativamente inferior ao do meio de cultura MS, mas não diferiu dos demais tratamentos (Tabela 5). Apesar de não apresentar diferença significativa dos meios de cultura MS, MS/2 e NN para comprimento da brotação principal (Anexo 4), o meio WPM foi o que apresentou menor valor (Tabela 5). Este resultado coincide com o trabalho de GRAY e BENTON (1991), em que as brotações desenvolvidas no meio de cultura WPM apresentaram-se raquíticas.

GRAY e BENTON (1990), também observaram o efeito negativo do meio basal WPM sob o desenvolvimento de meristemas apicais de *Vitis rotundifolia*, em que estes apresentaram menor número de brotos, sintomas de vitrificação e sofreram abscisão foliar.

Maior número de folhas foi obtido nos meios MS com concentração total de sais, MS/2 e NN (Tabela 5). Observa-se que apesar de não diferir significativamente dos demais tratamentos, no meio de cultura MS ocorreu maior brotação das gemas axilares e estas apresentaram maior crescimento. Estes resultados revelaram que o meio de cultura MS foi superior ao demais meios testados (Tabela 5). Resultados semelhantes foram obtidos por GRAY e BENTON (1990), em que o meio de cultura MS foi considerado superior aos demais tratamentos testados (MS/2, C₂D, WPM) propiciando a obtenção da média de 3.3 brotos por ápice de vários cultivares de *Vitis rotundifolia*, em 6 semanas.

Já, para os cultivares 'Ribier', 'Thompson Seedless' e 'Black Seedless' foi estabelecido para a fase inicial o meio MS $\frac{3}{4}$, e para a fase de proliferação e alongação o MS com concentração total de sais (BOTTEI et al., 1993).

Concentrações reduzidas do meio de cultura MS também foram superiores no trabalho de BIASI et al. (1998b), em que o meio MS/2 e NN apresentaram melhores

resultados para o porta-enxerto 'Jales' e não diferiram entre si em todas as variáveis analisadas.

TABELA 5 - EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA EM CINCO PARÂMETROS ANALISADOS NO CRESCIMENTO INICIAL DA GEMA AXILAR DE SEGMENTOS NODAIS DO PORTA-ENXERTO '420-A', APÓS 30 DIAS. (Experimento 4.1.4; Anexo 4)

Meios de cultura	Brotação (%)	Comprimento das brotações (cm)	N.º Brotos/explante	N.º Folhas da brotação principal
MS	40,26 ²	2,07 ²	1,00 ²	3,30a ¹
MS/2	31,10	1,47	1,25	2,41ab
NN	35,71	1,63	1,05	2,35ab
WPM	38,54	1,07	1,00	1,16b
C.V. (%)	45,45	30,92	22,89	34,19

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

²Médias não diferem significativamente entre si, pelo teste de F a 5% de probabilidade.

4.2 EXPERIMENTO DE MULTIPLICAÇÃO

4.2.1 Efeito de diferentes meios de cultura na multiplicação das brotações

A análise de variância apresentou significância para o efeito dos meios de cultura para todas as variáveis analisadas, com exceção para a porcentagem de explantes perdidos por contaminação ou oxidação (Anexo 5).

A média total de explantes não viáveis, ou seja, perdidos por contaminação ou oxidação em todo o experimento foi de apenas 18,75%, revelando melhor estabelecimento deste porta-enxerto nesta fase de multiplicação.

Os resultados obtidos nos meios de cultura MS/2, WPM e NN não diferiram significativamente entre si em todas as variáveis analisadas (Tabela 6; Figura 3). Resultados semelhantes foram obtidos com o porta-enxerto 'Jales', comparando os meios NN e MS/2, que se apresentaram superiores aos demais e não diferiram entre si (BIASI et al., 1998b).

O meio de cultura MS com concentração total de sais, apresentou resultados inferiores para comprimento da brotação principal, número de folhas por explante e porcentagem de gemas axilares brotadas, indicando que para esta fase menores concentrações de sais são requeridas (Tabela 6). Concentrações reduzidas do meio MS foram utilizadas por vários autores com vários cultivares de videiras (CICCOTTI, 1982; HARRIS e STEVENSON, 1982; FANIZZA et al., 1984; BOTTI et al., 1993; BIASI et al., 1998b), principalmente na fase de enraizamento das brotações. (CICCOTTI, 1982; HARRIS e STEVENSON, 1982; BOTTI et al., 1993).

O enraizamento em todo o experimento atingiu a média de 80,34%. Apesar de não diferir significativamente dos meios de cultura NN e WPM, o MS/2 foi que apresentou maior porcentagem de enraizamento (97,5%) após 30 dias de cultivo (Tabela 6). Este resultado demonstra a facilidade de enraizamento deste porta-enxerto (Figura 5C), fazendo-se desnecessária uma fase posterior para emissão de raízes.

Brotos de videira produzidos *in vitro*, são facilmente induzidos à produzir raízes tanto pelo uso do meio de cultura contendo auxina ou sem o regulador de crescimento (GRAY e FISHER, 1985).

A maior quantidade de folhas por explante, foi obtida nos meios de cultura MS/2, NN e WPM atingindo as médias 2,3; 2,6; 2,3 folhas por brotação, respectivamente. Isto representa em termos de taxa de multiplicação, aproximadamente 2 a 3 novos brotos à cada 30 dias (Tabela 6) . BIASI et al. (1998b), obtiveram 3,9 folhas por brotação do porta-enxerto 'Jales' no meio MS/2, em 33 dias.

Tabela 6 - EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA EM CINCO PARÂMETROS ANALISADOS NA MULTIPLICAÇÃO DAS BROTAÇÕES DE SEGMENTOS NODAIS DO PORTA-ENXERTO '420-A', APÓS 30 DIAS (Experimento 4.2.1; Anexo 5)

Meios de cultura	Brotação (%)	Comprimento das brotações (cm)	Enraizamento (%)	N.º Folhas da brotação principal	Explantos perdidos (%)
MS	69,51 ^{b1}	1,05 ^b	50,00 ^{b1}	1,36 ^{b1}	27,5 ²
MS/2	97,50 ^a	1,76 ^a	97,50 ^a	2,34 ^{ab}	12,5
NN	87,22 ^{ab}	1,68 ^a	84,44 ^a	2,65 ^a	15,0
WPM	92,22 ^a	1,86 ^a	89,44 ^a	2,31 ^{ab}	20,0
C.V.(%)	9,33	13,52	12,01	21,39	44,21

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

²Médias não diferem significativamente entre si, pelo teste de F a 5% de probabilidade.

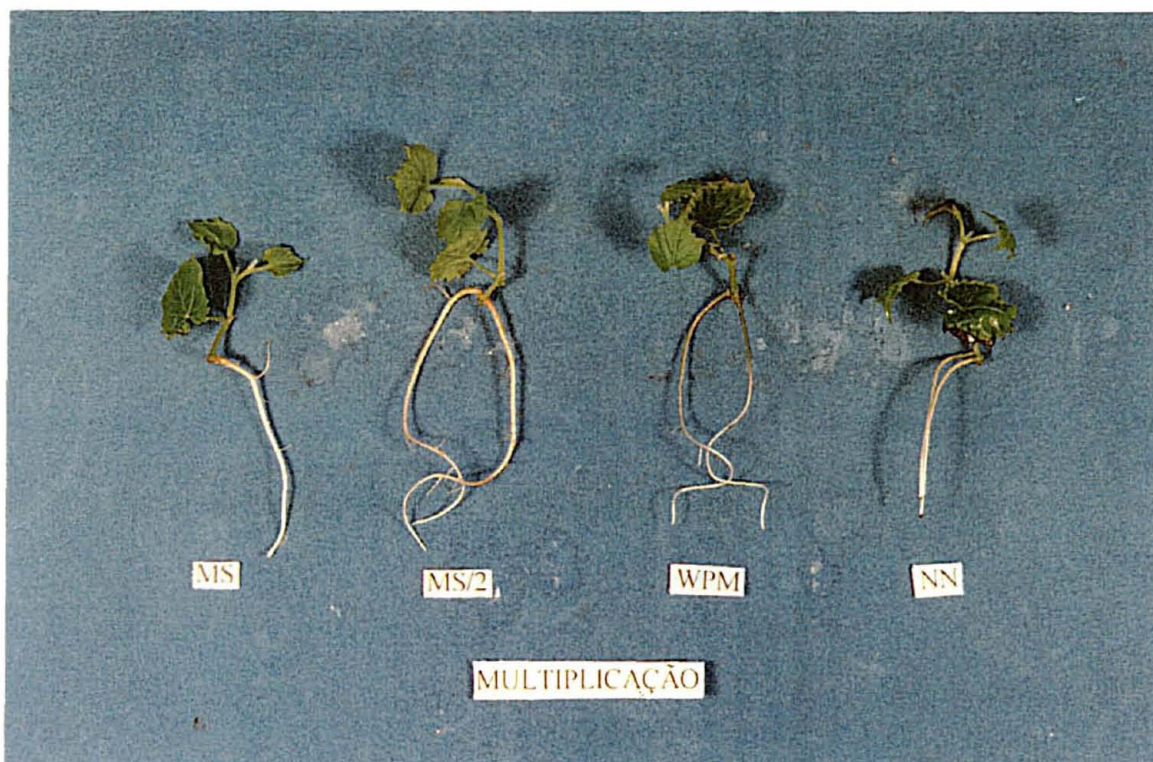


FIGURA 3 - Efeito de diferentes meios de cultura na multiplicação das brotações obtidas de segmentos nodais do porta-enxerto '420-A' (Experimento 4.2.1).

4.3 EXPERIMENTO DE ENRAIZAMENTO

4.3.1 Efeito de diferentes meios de cultura no enraizamento das brotações

A análise de variância não apresentou significância para todas as variáveis analisadas, com exceção para número de raízes por explante (Anexo 6).

O meio de cultura MS/2 líquido com espuma fenólica foi prejudicial ao desenvolvimento dos explantes, ocasionando 100% de morte destes (Figura 4). No entanto, a espuma fenólica como sustentação de explantes, é utilizada com sucesso na micropropagação de espécies florestais, como no caso do *Eucaliptus sp.* (HIGASHI, 1996).

Já, o trabalho com o cultivar 'Baco' (*V. vinifera*), no qual explantes foram sustentados com filtro de papel, explantes obtiveram 90% de enraizamento (HARRIS e STEVENSON, 1982).

LEE e WETZSTEIN (1990) não encontraram diferenças significativas entre os tratamentos meio de cultura líquido e meio sólido no enraizamento do cultivar 'Summit' (*V. rotundifolia*).

A porcentagem média de enraizamento para os tratamentos MS/2 e MS/2 mais carvão ativado foi considerada alta, com 80% dos segmentos nodais apresentando raízes (Tabela 7).

Resultados semelhantes foram obtidos por BIASI et al. (1998b) com o porta-enxerto 'Jales', em que obteve-se a média de 97,6% de enraizamento no meio de cultura MS/2.

Já, para alguns cultivares, a presença de auxina no meio de cultura é importante para o bom enraizamento. GRAY e KLEIN (1987), obtiveram 94% de enraizamento do cultivar 'Orlando Seedless', utilizando o meio C₂D com 0,4 µM ANA.

GRAY e BENTON (1991) obtiveram 55% de enraizamento dos brotos de cultivares de *V. rotundifolia*, cultivados em meio de cultura MS sem presença de auxina e 77% com auxina.

Segundo ROUBELAKIS-ANGELAKIS e ZIVANOVITC (1991), a rizogênese é fortemente dependente do genótipo da videira .

O maior número de raízes por explante foi encontrado no meio de cultura MS/2 (1,97 raízes/ explante), enquanto o meio de cultura MS com presença de carvão, emitiu 1,6 raízes/explante (Tabela 7).

Já, o porta-enxerto 'Jales', em meio de cultura MS/2 emitiu 2,8 raízes/explante (BIASI et al., 1998b).

Apesar dos tratamentos com os meios MS/2 com e sem carvão ativado, não apresentarem diferenças significativas entre si (Anexo 6), a melhor porcentagem de brotação, maior comprimento da brotação e maior número de folhas por explante foram observados no meio de cultura MS/2 sem carvão (Tabela 7).

O uso de 1g.L^{-1} de carvão ativado, também não proporcionou aumento no enraizamento de clones de videira estudados por NOVÁK e JUVOVÁ (1983), chegando até reduzir o efeito da adição de auxina no meio de cultura.

TABELA 7 - EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA EM CINCO PARÂMETROS ANALISADOS NO ENRAIZAMENTO DAS BROTAÇÕES DO PORTA-ENXERTO '420-A' APÓS 30 DIAS. (Experimento 4.3; Anexo 6)

MS/2	Brotação (%)	Comprimento (cm)	Enraizamento (%)	N.º Raízes por explante	N.º Folhas por brotação
Sem carvão ativado	82,50 ¹	1,9 ¹	87,50	1,97 ²	2,12
Com carvão ativado	50,30	1,77	72,50	1,6	2,10
C.V.(%)	33,13	15,51	18,40	4,98	10,72

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de F a 5% de probabilidade.

²Médias diferem significativamente entre si, pelo teste de F a 5% de probabilidade.

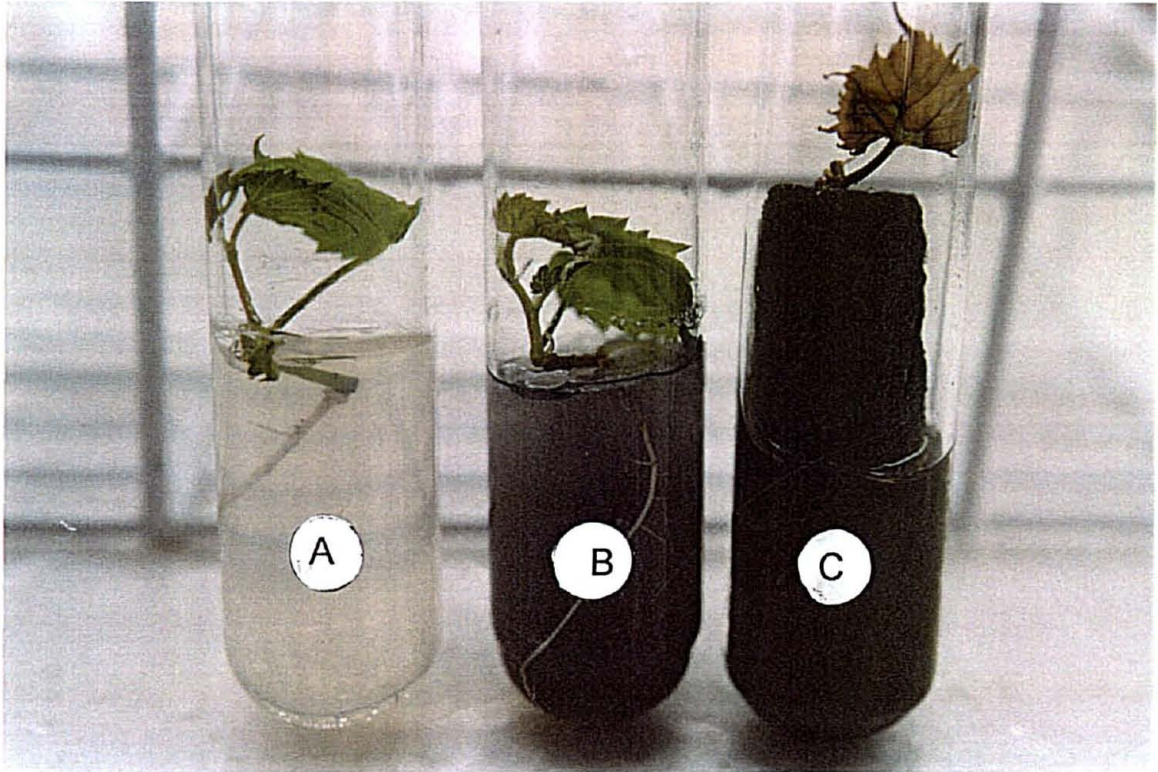


FIGURA 4. Efeito de diferentes meios de cultura no enraizamento de brotações obtidas de gemas axilares de segmentos nodais do porta-enxerto '420-A'. A – MS/2; B – MS/2 mais carvão ativado; C – MS/2 líquido com espuma fenólica (Experimento 4.3.1).

4.4 EXPERIMENTO DE ACLIMATIZAÇÃO

4.4.1 Efeito de diferentes substratos na sobrevivência das plantas

A análise de variância apresentou diferença significativa para a porcentagem de sobrevivência das brotações (Anexo 7).

Os substratos vermiculita e Plantmax[®] não apresentaram diferenças significativas entre si, obtendo-se 95,83% e 87,50% de sobrevivência, respectivamente (Tabela 8). A alta sobrevivência das mudas de videira na fase de aclimatização (Figura 5D-5E) é comum em vários trabalhos realizados (BLAZINA et al., 1991b; COMPTON e GRAY, 1994; COMPTON e GRAY, 1994).

O menor índice de sobrevivência das brotações foi obtida no substrato com casca de arroz carbonizada, onde apenas 45,83% das brotações sobreviveram.

Estes resultados se assemelham ao trabalho de BLAZINA et al. (1991b) em que obtiveram 90% de sobrevivência utilizando como substrato uma mistura de vermiculita, solo e mix comercial.

Bons resultados também foram obtidos por COMPTON e GRAY (1994), utilizando uma parte de mistura comercial e uma de vermiculita para o híbrido 'Southern Home', no qual 90% das plantas aclimatizadas sobreviveram.

A videira também apresentou altos índices de sobrevivência nos trabalhos com 'Delaware', em que 95% das plantas aclimatizadas em casa de vegetação com solo enriquecido sobreviveram (LEWANDOWSKI, 1991).

RAVINDRA e THOMAS (1995) utilizaram um substrato contendo duas partes de areia, uma parte de solo e uma parte de formulação comercial contendo perlita e vermiculita e obtiveram 90% de sobrevivência de plantas de *Vitis vinifera*.

TABELA 8 - EFEITO DE DIFERENTES SUBSTRATOS SOBRE A SOBREVIVÊNCIA DE BROTAÇÕES ACLIMATIZADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO DO PORTA-ENXERTO '420-A' (Experimento 4.4; Anexo 7)

Substratos	Sobrevivência (%)
Vermiculita	95,83 ^a
Plantmax [®]	87,50ab
Casca de arroz carbonizada	45,83b
C.V. (%)	21,82

¹Médias seguidas pela mesma letra diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

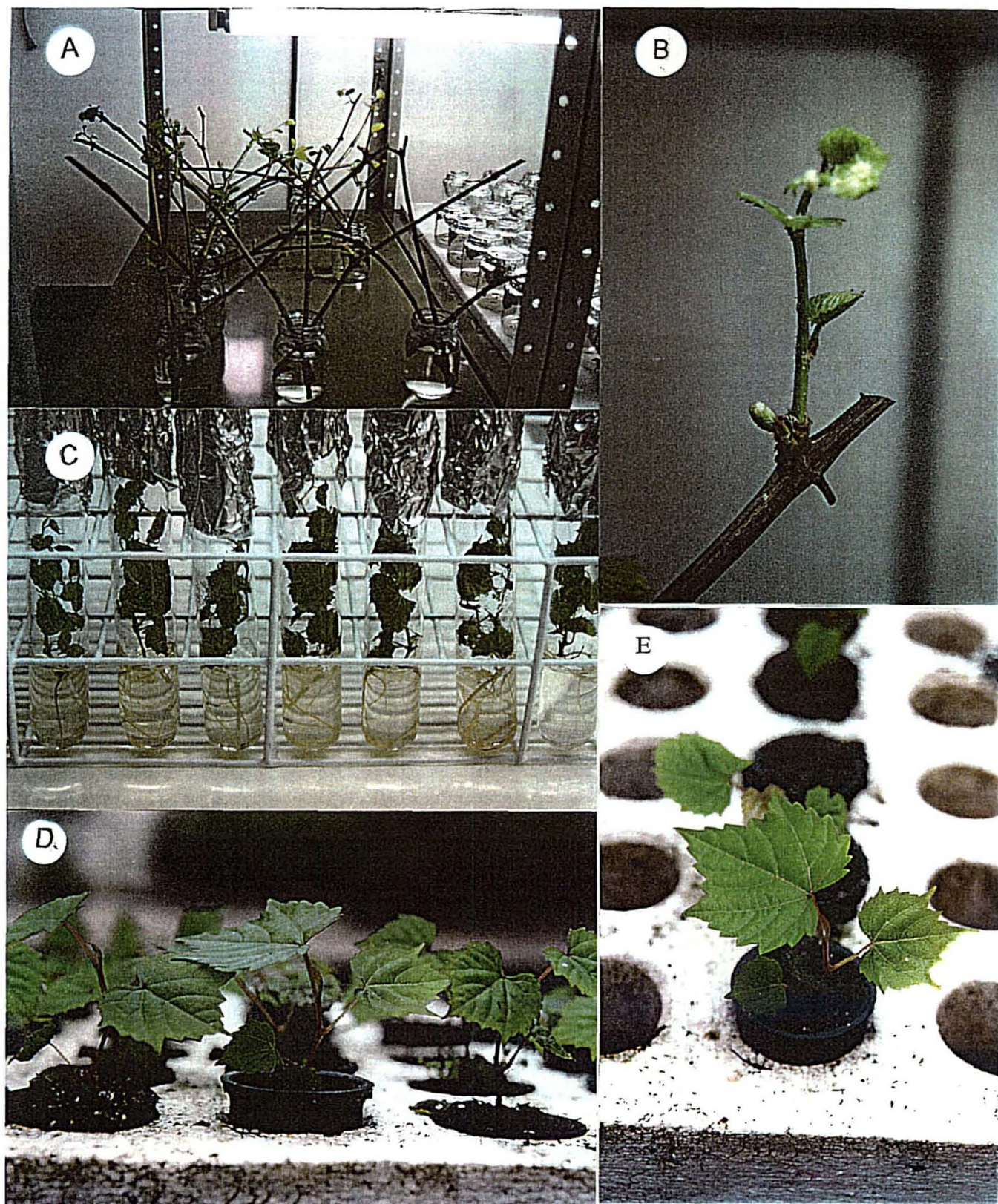


FIGURA 5 - Micropropagação do porta enxerto '420-A': A-estacas com brotações; B-brotações utilizadas para obtenção dos segmentos nodais; C-multiplicação *in vitro*; D e E-plantas em fase de aclimatização.

5 CONCLUSÕES:

Diante dos resultados, conclui-se que:

1) O estabelecimento inicial *in vitro* do porta-enxerto '420-A' pode ser realizado por meio de segmentos nodais obtidos de brotações novas de estacas lenhosas armazenadas sob refrigeração (4 a 6° C), em meio de cultura MS acrescido de 1µM de BAP.

2) A cinetina não é eficiente no estabelecimento inicial dos explantes *in vitro*.

3) A multiplicação das brotações pode ser realizada pelo seccionamento destas em segmentos nodais com uma folha, em meio de cultura MS/2.

4) O enraizamento ocorre naturalmente na fase de multiplicação, não sendo necessário a fase de indução de raízes.

5) A aclimatização das mudas pode ser realizada em casa de vegetação sob nebulização, utilizando-se vermiculita ou Plantmax® como substratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEWELDT, G.; RADLER, F. Interrelationship between photoperiodic behavior of grapes & growth of plant tissue cultures. **Plant Physiology**, v. 37, n. 3, p. 376-379. 1962.
- BARLASS, M. Elimination of stem pitting and corky bark diseases from grapevine by fragmented shoot apex culture. **Annals of Applied Biology**, v. 110, p. 653-656. 1987.
- BARLASS, M.; SKENE, K.G.M. *In vitro* propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices. **Vitis**, v. 17, p. 335-340. 1978.
- BARLASS, M.; SKENE, K.G.M. Studies on the fragmented shoot apex of grapevine. I. The regenerative capacity of leaf primordial fragments *in vitro*. **Journal of Experimental Botany**, v. 31, n. 121, p. 483-488. 1980a.
- BARLASS, M.; SKENE, K.G.M. Studies on the fragmented shoot apex of grapevine. II. Factors affecting growth and differentiation *in vitro*. **Journal of Experimental Botany**, v. 31, n. 121, p. 489-495. 1980b.
- BARLASS, M.; SKENE, K.G.M.; CLINGELEFFER, P.R. Studies on the fragmented shoot apex of grapevine. III. A scanning electron microscope study of adventitious bud formation *in vitro*. **Journal of Experimental Botany**, v. 32, n. 130, p.1079-1083. 1981.
- BARLASS, M.; SKENE, K.G.M.; WOODHAM, R.C.; KRAKE, L.R. Regeneration of virus-free grapevines using *in vitro* apical culture. **Annals of Applied Biology**, v. 101, p. 291-295. 1982.
- BARLASS, M.; SKENE, K.G.M. Studies on the fragmented shoot apex of grapevine. **Journal of Experimental Botany**, v.34, n.147, p 1271-1279, 1983.
- BASS, P.; CLOG, E.; WALTER, B. Improvements in apex culture in *Vitis* species. **Acta Horticulturae**, n. 227, p. 485-488. 1988.
- BIASI, L. A ; PASSOS, I. R. DA S.; POMMER, C. V. Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de videira através de ápices meristemáticos e segmentos nodais. **Sci. Agric.** , Piracicaba, v.55(2),p.196-202, 1998a.

- BIASI, L. A.; PASSOS, I. R. DA S.; POMMER, C. V. Micropropagação do porta-enxerto de videira 'Jales'. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v.33, n. 10, p.1587-1594, 1998b.
- BIASI, L. A.; CARVALHO, D. C.; ANDRADE, A.; ZANETTE, F. Estabelecimento *in vitro* do caquizeiro 'FUYU' por meio de ápices meristemáticos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal,, v.21, n.3, p.279-283, 1999.
- BLAZINA, I.; RAVNIKAR, M.; ZOLNIR, M.; KOROSK-KORUZA, Z.; GOGALA, N. Regeneration of GFLV-free grapevines and synchronization of micropropagation *in vitro*. *Acta Horticulturae*, n. 289, p. 87-88. 1991a.
- BLAZINA, I.; KOROSK-KORUZA, Z.; RAVNIKAR, M.; ZOLNIR, M.; GOGALA, N. Regeneration and micropropagation of the grapevine (*Vitis vinifera* L. 'Zelen') from shoot tip meristems. *Acta Horticulturae*, n. 300, p. 123-126. 1991b.
- BOTTI, C.; GARAY, L.; REGINATO, G. The influence of culture dates, genotype and size and type of shoot apices on *in vitro* shoot proliferation of *Vitis vinifera* cvs Thompson Seedless, Ribier and Black Seedless. *Vitis*, v. 32, n.2, p. 125-126. 1993.
- CHÉE, R.; POOL, R.M. The effects of growth substances and photoperiod on the development of shoot apices of *Vitis* cultured *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, v. 16, n. 1, p. 17-27. 1982.
- CHÉE, R.; POOL, R.M. *In vitro* vegetative propagation of *Vitis*: application of previously defined culture conditions to a selection of genotypes. *Vitis*, v. 22, n. 4, p. 363-374. 1983.
- CHÉE, R.; POOL, R.M. *In vitro* propagation of *Vitis*: the effects of organic substances on shoot multiplication. *Vitis*, v. 24, p. 106-118. 1985.
- CHÉE, R.; POOL, R.M. Improved inorganic media constituents for *in vitro* shoot multiplication of *Vitis*. *Scientia Horticulturae*, v. 32, n. 1-2, p. 85-95. 1987.
- CHÉE, R.; POOL, R.M. Sucrose and NAA influence growth of subcultured shoots and *in vitro* production of roots in *Vitis*. *HortScience*, v. 23, n. 4, p. 776. 1988.
- CHÉE, R.; POOL, R.M. Morphogenic responses to propagule trimming, spectral irradiance, and photoperiod of grapevine shoots recultured *in vitro*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 114, n. 2, p. 350-354. 1989.

- CICCOTTI, A.M. Micropropagazione di *Vitis vinifera* L. cvs. Moscato d'Amburgo e Pinot bianco. **Esperienze e Ricerche, Stazione Sperimentale Agraria Forestale di S. Michele all'Adige**, v. 11, p. 73-81. 1982.
- COMPTON, M. E.; GRAY, D.J. Micropropagation of 'Southern Home' hybrid grape **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v.107, p. 308-310, 1994.
- DALAL, M.A.; SHARMA, B.B.; RAO, M.S. Studies on stock plant treatment and initiation culture mode in control of oxidative browning in in vitro cultures of grapevine. **Scientia Horticulturae**, v. 51, n. 1-2, p. 35-41. 1992.
- DEBERGH, P. C.; MAENE, L. T. A schene for commercial propagation ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**. Amsterdam, v.14, p.335-345, 1981.
- DURAN-VILA, N.; JUÁREZ, J.; ARREGUI, J.M. Production of viroid-free grapevines by shoot tip culture. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 39, n. 3, p. 217-220. 1988.
- FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E.; LUCES FORTES, G. R. de. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas: UFPEL, 179 p.1995
- FANIZZA, G.; RICCIARDI, L.; SILVESTRONI, O.; BOSCIA, D. The influence of high temperatures and benzyladenine on root induction during *in vitro* shoot tip culture in *Vitis vinifera* L. **Acta Horticulturae**, n. 227, p. 479-481. 1988.
- FANIZZA, G.; TANZARELLA, O.A.; CARROZZO, G. Influence of *Vitis* source on in vitro shoot apex culture. **Annals of Applied Biology**, v. 104, p. 577-578. 1984.
- GALZY, R. Technique de thermothérapie des viroses de la vigne. **Ann. Epiphyties**, v. 15, n. 3, p. 245-256. 1964.
- GALZY, R. Remarques sur la nutrition carbonée de la vigne cultivée *in vitro*. **Bulletin de l'Office International de la Vigne et du Vin**, v. 63, n. 707-708, p. 5-20. 1990.
- GALZY, R.; HAFFNER, V.; COMPAN, D. Influence of three factors on the growth and nutrition of grapevine microcuttings. **Journal of Experimental Botany**, v. 41, n. 224, p. 295-301. 1990.
- GALZY, R. e COMPAN, D. Growth and nutrition of grapevine during in vitro long-term storage. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 13, n. 3, p. 229-237. 1988.

- GOODE JUNIOR, D.Z.; KREWER, G.W.; LANE, R.P.; DANIELL, J.W.; COUVILLON, G.A. Rooting studies of dormant muscadine grape cuttings. **HortScience**, v. 17, n. 4, p. 644-645. 1982.
- GOUSSARD, P.G. Effects of cytokinins on elongation, proliferation and total mass of shoots derived from shoot apices of grapevine cultured *in vitro*. **Vitis**, v. 20, n. 3, p. 228-234. 1981.
- GOUSSARD, P.G. Morphological responses of shoot apices of grapevine cultured *in vitro*. Effects of cytokinins in routine subculturing. **Vitis**, v. 21, n. 4, p. 293-298. 1982.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, A M. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. IN: TORRES, A C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J. A (Ed.) **Micropropagação**. Brasília: Embrapa, 1999. P 183-243.
- GRAY, D.J.; BENTON, C.M. Micropropagation and plant establishment of muscadine grape. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v. 103, p. 300-302. 1990.
- GRAY, D.J.; BENTON, C.M. *In vitro* micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (*Vitis rotundifolia*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 27, n. 1, p. 7-14. 1991.
- GRAY, D.J.; FISHER, L.C. *In vitro* shoot propagation of grape species, hybrids and cultivars. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v. 98, p. 172-174. 1985.
- GRAY, D. J.; KLEIN, C. M. *In vitro* shoot micropropagation and plant establishment of Orlando 'Seedless' grape and 'Tampa' rootstock. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v.100, p.308-309, 1987.
- GRAY, D. J.; KLEIN, C. M. *In vitro* micropropagation and plant establishment of 'Blanc du Bois' grape. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v.102, p. 221-223, 1989.
- GRIBAUDO, I.; FRONDA, A. Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated *in vitro*. **HortScience**, v. 26, n. 8, p. 1083. 1991.

- HARRIS, R.E.; STEVENSON, J.H. *In vitro* propagation of *Vitis*. *Vitis*, v. 21, n. 1, p. 22-32. 1982.
- HIGASHI, E. N. **Diagnose de deficiência de nutrientes minerais em três híbridos de *Eucalyptus spp.* cultivados *in vitro***. São Paulo: 1996. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais), Escola Superior de agricultura "Luiz de Queiroz".
- KORUZA, B.; JELASKA, S. Influence of meristem culture and virus elimination on phenotypical modifications of grapevine (*Vitis vinifera* L., cv. Refosk). *Vitis*, v. 32, n. 1, p. 59-60. 1993.
- KRIKORIAN, A D. Propagación clonal *in vitro*. In: ROCA, W. N. e MROGINSKI, L. A (Ed.) **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos e aplicaciones**. Cali, CIAT, 1991. p. 95-125.
- KRUL, W.R.; MOWBRAY, G.H. Grapes. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y., ed. **Handbook of Plant Cell Culture**. New York: Macmillan Publishing Company, 1984. cap. 6, p 396-434.
- LEE, N.; WETZSTEIN, Y. *In vitro* propagation of muscadine grape by axillary shoot proliferation. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 115, n. 2, p. 324-329. 1990.
- LEWANDOWSKI, V.T. Rooting and acclimatization of micropropagated *Vitis labrusca* 'Delaware'. *HortScience*, v. 26, n. 5, p. 586-589. 1991.
- LI, J.; EATON, G.W. Growth and rooting of grape shoot apices *in vitro*. *HortScience*, v. 19, n. 1, p. 64-66. 1984.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagators' Society Combined Proceedings**, v. 30, p. 421-427. 1980.
- MARTINELLI, A Factors affecting *in vitro* propagation of the peach almond hybrids 'Hansen 536'. *Acta Horticulture*, v. 173, p. 237-244. 1985
- MARTINEZ, E.A.; TIZIO, R. Grapevine micropropagation through shoot tips and minicuttings from *in vitro* cultured one-node cuttings. *HortScience*, v. 24, n. 3, p. 513. 1989.

- MEYERSON, M. E.; BENTON, C. M.; GRAY, D.J.A. Comparison of shoot micropropagation among bunch and muscadine grape species and cultivars. **Proc. Fla. State Hort. Soc.**, v. 107, p.311-312,1994.
- MULLINS, M.G.; NAIR, Y.; SAMPET, P. Rejuvenation *in vitro*: induction of juvenile characters in an adult clone of *Vitis vinifera* L. **Annals of Botany**, v. 44, p. 623-627. 1979.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 25, p. 135-166. 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-479. 1962.
- NITSCH, J.P.; NITSCH, C. Haploid plants from pollen grains. **Science**, v. 163, p. 85-87. 1969.
- NOVÁK, F.J.; JUVOVÁ, Z. Clonal propagation of grapevine through *in vitro* axillary bud culture. **Scientia Horticulturae**, v. 18, n. 3, p. 231-240. 1983.
- PASSOS, I. R. da S. Desenvolvimento de metodologia para a obtenção de embriogênese somática em videira. Piracicaba, 1991. 188p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- PASSOS, I.R. da S.; SONDAHL, M.R.; RIBEIRO, I.J.A.; TERRA, M.M.; PIRES, E.J.P. Cultura *in vitro* de meristemas de videira. I. Concentrações do hormônio 6-BA em meio primário. **Bragantia**, v. 44, n. 1, p. 473-479. 1985.
- PEIXOTO, P.H.P.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* de brotações do porta-enxerto de videira. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 27(4), p. 617-622. 1992
- PEIXOTO, P.H.P.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N.N.J.; ALVARENGA, A.A. de. Enraizamento e multiplicação "*in vitro*" de porta-enxertos de videira (*Vitis* spp L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 16, n. 1, p. 178-184. 1994.
- PEIXOTO, P.H.P.; PASQUAL, M. Micropropagação da videira: efeitos de pH e do ágar. **Revista Ceres**, v.42, n242, p. 431-443, 1995a.
- PEIXOTO, P.H.P.; PASQUAL, M. Influência da autoclavagem e filtração da sacarose na multiplicação *in vitro* da videira. **Revista Ceres**, v.42, n. 244, p. 600-603,1995b.

- PEIXOTO, P.H.P.; PASQUAL, M. Influência da origem dos explantes na multiplicação e no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de videira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.20, n.3, p301-305, 1996.
- POMMER, C.V.; PASSOS, H.R.S.; TERRA, M.M.; PIRES, E.J.P. Variedades de videira para o Estado de São Paulo. **Boletim Técnico do Instituto Agrônomo de Campinas**, 59p., 1997.
- RAVINDRA, M.B.; THOMAS, P. Sachet technique - an efficient method for the acclimatization of micropropagated grapes (*Vitis vinifera* L.). **Current Science**, v. 68, n. 5, p. 546-548. 1995.
- REGINA, M. de A.; SOUZA, C. R.; SILVA, T. das G.; PEREIRA, A. F. A propagação da videira. **Informe agropecuário**, v.19, p. 20-27. 1998.
- REUSTLE, G.; MANN, M.; HEINTZ, C. Experience and problems with infections in tissue culture of grapevine. **Acta Horticulturae**, n. 225, p. 119-127. 1988.
- ROBACKER, C.D.; CHANG, C.J. Shoot-tip culture of muscadine grape to eliminate Pierce's disease bacteria. **HortScience**, v. 27, n. 5, p. 449-450. 1992.
- ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A.; ZIVANOVITC, S.B. A new culture medium for *in vitro* rhizogenesis of grapevine (*Vitis* spp.) genotypes. **HortScience**, v. 26, n. 12, p. 1551-1553. 1991.
- SKENE, K.G.M.; BARLASS, M. Micropropagation of grapevine. **International Plant Propagators' Society Combined Proceedings**, v. 30, p. 564-570. 1980.
- SKENE, K.G.M.; BARLASS, M. Studies on the fragmented shoot apex of grapevine. IV. Separation of phenotypes in a periclinal chimera *in vitro*. **Journal of Experimental Botany**, v. 34, n. 147, p. 1271-1280. 1983.
- SOUSA, J.S.I. de. **Uvas para o Brasil**. Piracicaba: FEALQ, 1996. 791p.
- SUDARSONO; GOLDY, R.G. Growth regulator and axillary bud position effects on *in vitro* establishment of *Vitis rotundifolia*. **HortScience**, v. 26, n. 3, p. 304-307. 1991.
- THIES, K.L.; GRAVES JUNIOR, C.H. Meristem micropropagation protocols for *Vitis rotundifolia* Michx. **HortScience**, v. 27, n. 5, p. 447-449. 1992.

- TRONCOSO, A.; CANTOS, M.; LIÑÁN, J.; PRIETO, J.; SARMIENTO, R. The use of "in vitro" culture and tubular container system to propagate selected grapevine plants for sherry wine production. **Acta Horticulturae**, n. 227, p. 358-362. 1988.
- WETZSTEIN, H.Y.; MYERS, S.C. Vegetative and yield component characteristics of micropropagated muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.). **Journal of Horticultural Science**, v. 69, n. 4, p. 747-753. 1994.
- YU, D.; MEREDITH, C.P. The influence of explant origin on tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 111, n. 6, p. 972-975. 1986.

ANEXOS

ANEXO 1. Resumo da análise de variância do efeito do BAP na porcentagem de gemas axilares brotadas, comprimento das brotações principais, número de brotos por explante, número de folhas por brotação principal, porcentagem de explantes com calo e porcentagem de explantes perdidos por contaminação e oxidação.

Causas de variação	GL	QM				
		Brotação (%)	Comprimento das brotações (cm)	Número de brotos/explante	Número de folhas da brotação principal	Explantes perdidos (%)
Blocos	3	1178.966ns	0.042ns	0.083ns	0.327ns	272.917ns
BAP	3	1285.129ns	0.162ns	0.854*	2.872**	272.917ns
Erro	9	938.167	0.079	0.129	0.331	450.694
Total	15					
Bartlett's (Q ²)		4,681	6,868	7,704	6,442	1,421

ns - Não significativo

*Significância estatística ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Significância estatística ao nível de 1% de probabilidade de erro

ANEXO 2. Resumo da análise de variância do efeito da cinetina na porcentagem de gemas axilares brotadas, comprimento das brotações principais, número de folhas por brotação principal e porcentagem de explantes perdidos por contaminação e oxidação.

Causas de variação	GL	QM			
		Brotação (%)	Comprimento das brotações (cm)	Número de folhas da brotação principal	Explantes perdidos (%)
Blocos	3	772.801ns	1.120ns	2.731ns	772.917ns
Cinetina	3	94.661ns	0.508ns	2.214ns	206.250ns
Erro	9	203.312	0.243	0.721	250.694
Total	15				
Bartlett's (Q ²)		1,135	1,459	0,928	1,407

ns - Não significativo

ANEXO 3. Resumo da análise de variância do efeito de diferentes concentrações do meio MS na porcentagem de gemas axilares brotadas, comprimento das brotações principais, número de brotos por explante, número de folhas por brotação principal, porcentagem de explantes com calo e porcentagem de explantes perdidos por contaminação e oxidação.

Causas de variação	de GL	QM				
		Brotação (%)	Comprimento das brotações (cm)	Número de brotos/explante	Número de folhas da brotação principal	Explantes perdidos (%)
Blocos	3	1837.321ns	0.121ns	0.362ns	0.159ns	272.917ns
MS	3	749.677ns	2.298***	0.009ns	7.979***	1122.917**
Erro	9	290.581	0.043	0.096	0.377	89.583
Total	15					
Bartlett's(Q ²)		6,138	0,616	2,245	3,305	1,145

ns - Não significativo

*Significância estatística ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Significância estatística ao nível de 1% de probabilidade de erro.

***Significância estatística ao nível de 0,1% de probabilidade de erro.

ANEXO 4. Resumo da análise de variância do efeito de diferentes meios de cultura na porcentagem de gemas axilares brotadas, comprimento das brotações principais, número de brotos por explante, número de folhas por brotação principal e porcentagem de explantes com calo.

Causas de variação	GL	QM			
		Brotação (%)	Comprimento das brotações (cm)	Número de brotos/explante	Número de folhas da brotação principal
Blocos	3	76.786ns	0.166ns	0.032ns	0.148ns
Meios	3	64.133ns	0.687ns	0.057ns	3.072*
Erro	9	273.792	0.234	0.061	0.622
Total	15				
Bartlett's (Q ²)		3,349	4,762	1,911	1,542

ns - Não significativo

*Significância estatística ao nível de 5% de probabilidade de erro.

ANEXO 5. Resumo da análise de variância do efeito de diferentes meios de cultura na porcentagem de gemas axilares brotadas, comprimento das brotações principais, porcentagem de explantes com raízes, número de folhas da brotação principal e porcentagem de explantes perdidos por contaminação e oxidação.

Causas de variação	GL	QM				
		Brotação (%)	Comprimento das brotações (cm)	Enraizamento (%)	Número de folhas da brotação principal	Explantes perdidos (%)
Blocos	3	105.124ns	0.137ns	24.539ns	0.085ns	83.167ns
Meios	3	590.462**	0.532*	1753.092***	1.250*	175.000ns
Erro	9	65.283	0.076	93.051	0.215	68.722
Total	15					
Bartlett's (Q ²)		1,315	7,038	3,637	0,739	6,440

ns - Não significativo

*Significância estatística ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Significância estatística ao nível de 1% de probabilidade de erro.

***Significância estatística ao nível de 0,1% de probabilidade de erro.

ANEXO 6. Resumo da análise de variância do efeito de diferentes meios de cultura na porcentagem de gemas axilares brotadas, comprimento das brotações principais, número de folhas por brotação principal, porcentagem de explantes perdidos por contaminação e oxidação, porcentagem de explantes com raízes e no número de raízes por explante.

Causas de variação	GL	QM				
		Brotação (%)	Comprimento das brotações (cm)	Enraizamento (%)	Número de folhas da brotação principal	Número de raízes/explante
Blocos	3	1800.00ns	0.031ns	450.000ns	0.001ns	0.281ns
Meios	1	83.333ns	0.015ns	33.333ns	0.038ns	0.315**
Erro	3	500.00	0.081	216.667	0.051	0.008
Total	7					
Bartlett's (Q ²)		1,634	0,250	0,190	0,327	0,078

ns - Não significativo

**Significância estatística ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 7. Resumo da análise de variância do efeito de diferentes substratos na sobrevivência das mudas em casa de vegetação.

Causas de variação	GL	QM
Blocos	2	486.111ns
Tratamentos	2	2152.778*
Erro	4	277.778
Total	8	
Bartlett's (Q ²)		2,978

ns - Não significativo

*Significância estatística ao nível de 5% de probabilidade de erro.

ANEXO 8. Efeito de diferentes diluições de sais do meio de cultura MS no primeiro subcultivo, isento de BAP, realizado após 30 dias em meio de indução com presença de BAP, sob o comprimento e número de folhas da brotação principal de segmentos nodais do porta-enxerto '420-A', após 35 dias.

MS	Comprimento das brotações (cm)	Número de folhas da brotação principal
MS	3.0 ± 1.23 ¹	5.9±3.35 ¹
MS/2	2.48 ±1.43	5.85±2.21
MS/4	1.60± 0.76	3.87±1.14

¹ Dados obtidos através do desvio padrão das médias.