

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VANESSA REINHART

**MULTIPLICAÇÃO DE MATRIZES DE PORTA-ENXERTOS HÍBRIDOS DE
VIDEIRA (*Vitis labrusca* x *Vitis rotundifolia*) POR MICROPROPAGAÇÃO**

CURITIBA

2013

VANESSA REINHART

**MULTIPLICAÇÃO DE MATRIZES DE PORTA-ENXERTOS HÍBRIDOS DE
VIDEIRA (*Vitis labrusca* x *Vitis rotundifolia*) POR MICROPROPAGAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Luiz Antonio Biasi

CURITIBA

2013

TERMO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL



PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pela candidata **VANESSA REINHART**, sob o título "**MULTIPLICAÇÃO DE MATRIZES DE PORTA-ENXERTOS HÍBRIDOS DE VIDEIRA (*Vitis labrusca X Vitis rotundifolia*) POR MICROPROPAGAÇÃO**", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

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

Curitiba, 25 de Setembro de 2013.

Professora Dra. Louise Larissa May De Mio
Coordenadora do Programa

Professora Dra. Rosete Pescador
Primeira Examinadora

Professora Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas
Segunda Examinadora

Professor Dr. Flávio Zanette
Terceiro Examinador

Professor Dr. Luiz Antonio Biasi
Presidente da Banca e Orientador

Dedico

A meus pais, por serem meu exemplo, pelo amor, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me abençoado de todas as maneiras e tornado possível essa conquista.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

A Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, por todos os conhecimentos adquiridos durante o curso.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação pelos ensinamentos compartilhados.

Ao professor Luiz Antonio Biasi pela orientação, paciência e apoio desde os tempos da iniciação científica, que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos professores João Carlos Bessalho, Flávio Zanette e Marília Pereira Machado pelas sugestões na banca de pré-defesa.

As amigas Caroline e Cassiana por toda a ajuda no trabalho e em todos os momentos, sem as quais meu mestrado não seria o mesmo, e principalmente pela amizade que começou durante o curso e continuará por toda a vida.

As amigas Ana Paula e Bruna por todos os anos de amizade e incentivo, e que mesmo com rotinas diferentes se fazem presentes nos momentos importantes.

Ao melhor amigo e namorado Reginaldo, por todo amor, companheirismo, compreensão e pela ajuda durante o trabalho.

Aos meus pais, pelos chás na madrugada, por toda a paciência, compreensão, dedicação e por terem sido meus estagiários em vários finais de semana.

A toda a minha família pelo incentivo.

A todos que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

MULTIPLICAÇÃO DE MATRIZES DE PORTA-ENXERTOS HÍBRIDOS DE VIDEIRA (*Vitis labrusca* x *Vitis rotundifolia*) POR MICROPROPAGAÇÃO

RESUMO

A videira é uma espécie frutífera de grande importância, porém a maioria das cultivares copa e porta-enxerto são suscetíveis a pragas e doenças, sendo o uso de cultivares resistentes a forma mais eficiente de controle. As cultivares de *Vitis rotundifolia* e seus híbridos tem mostrado tolerância a várias doenças e pragas de solo importantes na viticultura. A partir desses conhecimentos, foram realizados cruzamentos entre cultivares de *V. labrusca* e *V. rotundifolia* com o objetivo de desenvolver novos porta-enxertos. Com a obtenção das matrizes híbridas, é necessário realizar a propagação massal desses porta-enxertos, sendo a micropropagação o método mais adequado devido à possibilidade da obtenção de material vegetativo de boa qualidade fitossanitária em curto período de tempo. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de micropropagação para a rápida produção de mudas dos novos porta-enxertos híbridos de videira. Para a realização dos experimentos foram utilizados segmentos nodais oriundos de plantas matrizes dos seguintes cruzamentos: Isabel x Carlos (IC125), Isabel x Bountiful (IB481), Isabel x Magnólia (IM628) Isabel x Regale (IR423), Bordô x Carlos (BC161) e Bordô x Magnólia (BM573). Na avaliação de diferentes meios de cultura (QL, MS/2 e C₂D). O meio MS/2 mostrou-se adequado para o desenvolvimento das brotações de ambos os híbridos. Para a multiplicação das brotações foi testada a citocinina BAP (6-benzilaminopurina) em diferentes concentrações (0,0; 1,0; 2,5 e 5,0 μM), sendo que a concentração de 5,0 μM apresentou maior número de brotações por explante, sem afetar o desenvolvimento das brotações. Na fase de enraizamento *in vitro* foi adicionada ao meio de cultura a auxina ANA (ácido naftaleno acético) em diferentes concentrações (0,0; 0,2; 0,4 e 0,8 μM). Houve 100% de enraizamento em todos os tratamentos, mostrando que não há necessidade da utilização de auxina no meio de cultura para promover a rizogênese desses híbridos. A adição de ANA ao meio de cultura prejudicou a formação de brotações nos explantes e a posterior aclimatização, sendo que após a aclimatização, os explantes pertencentes à testemunha obtiveram maior porcentagem de sobrevivência. Para o enraizamento *ex vitro* foram utilizadas microestacas padronizadas com duas folhas, as quais foram tratadas com a auxina AIB (ácido indolbutírico) em diferentes concentrações (0; 500; 1000 e 1500 mg L^{-1}). Assim como no enraizamento *in vitro*, houve 100% de enraizamento das microestacas em todos os tratamentos, mostrando que não é necessária a utilização de auxinas exógenas independente do método de enraizamento. Conclui-se que para a micropropagação dos porta-enxertos híbridos é adequada à utilização de meio MS/2 suplementado com 5 μM de BAP. O enraizamento *ex vitro* sem auxina com simultânea aclimatização pode ser utilizado para os híbridos IM628, BC161 e BM573, para os híbridos IC125 e IB481, o enraizamento *in vitro* mostrou-se mais eficiente, necessitando de mais estudos para o enraizamento *ex vitro*.

Palavras chave: muscadínia, enraizamento, aclimatização.

MATRIX MULTIPLICATION OF GRAPEVINE HYBRID ROOTSTOCKS (*Vitis labrusca* x *Vitis rotundifolia*) BY MICROPROPAGATION

ABSTRACT

Grapevine is a very important fruiting species, but most scion and rootstock varieties are susceptible to pests and diseases. Using resistant cultivars is the most efficient way of controlling them. *Vitis rotundifolia* cultivars and their hybrids have been tolerant to several important diseases and soil pests in viticulture. Crosses between *V. labrusca* and *V. rotundifolia* were carried out aiming to develop new rootstocks. After hybrid matrices are obtained, it is necessary to perform rootstocks mass propagation. Micropropagation is the most appropriate method as it is possible to get good plant quality material at a short period of time. Hence, the aim of this study was to develop a micropropagation protocol for fast seedling production of new grapevine hybrid rootstocks. Nodal segments from mother plants of the following crosses were used in the experiments: Isabel x Carlos (IC125), Isabel x Bountiful (IB481), Isabel x Magnólia (IM628) Isabel x Regale (IR423), Bordô x Carlos (BC161), and Bordô x Magnólia (BM573) in the evaluation of different growing media (QL, MS/2, and C₂D). MS/2 was appropriate for shoot development of both hybrids. For shoot multiplication BAP cytokinin (6-benzylaminopurine) was tested at different concentrations (0.0; 1.0; 2.5 and 5.0 µM). At 5.0 µM there was a greater number of shoots per explant without affecting shoot development. During *in vitro* rooting, NAA auxin (naphthalene acetic acid) was added to the growth medium at different concentrations (0.0; 0.2; 0.4 and 0.8 µM). There was 100% rooting at all treatments, which shows that there is no need to use auxin in the growth medium to promote root formation. The addition of NAA to the growth medium hindered shoot formation in the explants and subsequent acclimatization. After acclimatization, explants belonging to the control showed higher survival rate. For *ex vitro* rooting, standardized micropiles with two leaves were used, which were treated with IBA auxin (indolebutyric acid) at different concentrations (0; 500; 1000, and 1500 mg L⁻¹). As for *in vitro* rooting, there was 100% rooting of micropiles for all treatments showing that the use of exogenous auxins is not required regardless of rooting method. It is possible to conclude that micropropagation of hybrid rootstocks is suitable for the use of MS/2 medium supplemented with 5 µM of BAP. *Ex vitro* rooting without auxin with simultaneous acclimatization can be used for hybrids IM628, BC161, and BM573. For IC125 and IB481, *in vitro* rooting was more efficient. More research is needed for *ex vitro* rooting.

Key words: muscadine, rooting, acclimatization.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- FIGURA 1 – Brotações do híbrido de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivar Regale) em diferentes meios de cultura no primeiro subcultivo.....42
- FIGURA 2 – Brotações do híbrido de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivar Carlos) em diferentes meios de cultura. (A) Primeiro subcultivo, (B), segundo subcultivo, (C) terceiro subcultivo.....43
- FIGURA 3 – Brotações do híbrido de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivar Bountiful) em diferentes meios de cultura. (A) Primeiro subcultivo, (B), segundo subcultivo, (C) terceiro subcultivo.....44
- FIGURA 4 – Brotações do híbrido de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivar Magnólia) em diferentes meios de cultura. (A) Primeiro subcultivo, (B), segundo subcultivo, (C) terceiro subcultivo.....45
- FIGURA 5 – Brotações do híbrido de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivar Carlos) em diferentes meios de cultura. (A) Primeiro subcultivo, (B), segundo subcultivo, (C) terceiro subcultivo.....46
- FIGURA 6 – Brotações do híbrido de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivar Magnólia) em diferentes meios de cultura. (A) Primeiro subcultivo, (B), segundo subcultivo, (C) terceiro subcultivo.....47

CAPÍTULO II

- FIGURA 7 – Altura das brotações (A, B e C), número de brotações por explante (D, E e F) e número de folhas por explante (G, H e I) de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos, Bountiful e Magnólia) em diferentes concentrações de BAP ao longo de três subcultivos.....59
- FIGURA 8 – Altura das brotações (A e B), número de brotações por explante (C e D) e número de folhas por explante (E e F) de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia) em diferentes concentrações de BAP ao longo de três subcultivos.....60
- FIGURA 9 – Brotações do híbrido de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivar Carlos) em diferentes concentrações de BAP. (A) Primeiro subcultivo, (B), segundo subcultivo, (C) terceiro subcultivo.....66

- FIGURA 10 – Brotações do híbrido de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivar Bountiful) em diferentes concentrações de BAP. (A) Primeiro subcultivo, (B), segundo subcultivo, (C) terceiro subcultivo.....67
- FIGURA 11 – Brotações do híbrido de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivar Magnólia) em diferentes concentrações de BAP. (A) Primeiro subcultivo, (B), segundo subcultivo, (C) terceiro subcultivo.....68
- FIGURA 12 – Brotações do híbrido de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivar Carlos) em diferentes concentrações de BAP. (A) Primeiro subcultivo, (B), segundo subcultivo, (C) terceiro subcultivo.....69
- FIGURA 13 – Brotações do híbrido de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivar Magnólia) em diferentes concentrações de BAP. (A) Primeiro subcultivo, (B), segundo subcultivo, (C) terceiro subcultivo.....70

CAPÍTULO III

- FIGURA 14 – Diferentes concentrações de ANA na porcentagem de explantes com brotação (A, B e C), número de raízes por explante (D, E e F) e comprimento de raízes (G, H e I) de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos, Bountiful e Magnólia) após 30 dias de cultivo *in vitro* e 4 dias de pré-aclimatização.....81
- FIGURA 15 - Diferentes concentrações de ANA na porcentagem de explantes com brotação (A e B), número de raízes por explante (C e D) e comprimento de raízes (E e F) de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia) após 30 dias de cultivo *in vitro* e 4 dias de pré-aclimatização.....82
- FIGURA 16 – Brotações de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos (A), Bountiful (B) e Magnólia (C)) após 30 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de ANA e 4 dias de pré-aclimatização.....84
- FIGURA 17 – Brotações de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos (A) e Magnólia (B)) após 30 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de ANA e 4 dias de pré-aclimatização.....85
- FIGURA 18 – Brotações dos híbridos de videira *V. labrusca* x *V. rotundifolia* após 21 dias de aclimatização em câmara de nebulização.....87
- FIGURA 19 – Efeito de diferentes concentrações de AIB no número de raízes por microestaca (A e B), comprimento de raízes (cm) por microestaca (C e D) e sobrevivência (%) de microestacas (E e F) após 30 dias de enraizamento *ex*

<i>vitro</i> de híbridos de videira <i>V. labrusca</i> (cultivar Isabel) x <i>V. rotundifolia</i> (cultivares Carlos e Magnólia).....	89
FIGURA 20 – Diferentes concentrações de AIB no número de raízes por microestaca (A e B), comprimento de raízes (cm) por microestaca (C e D) e sobrevivência (%) de microestacas (E e F) após 30 dias de enraizamento <i>ex vitro</i> de híbridos de videira <i>V. labrusca</i> (cultivar Bordô) x <i>V. rotundifolia</i> (cultivares Carlos e Magnólia).....	91
FIGURA 21 – Microestacas de híbridos de videira <i>V. labrusca</i> (cultivar Isabel) x <i>V. rotundifolia</i> (cultivares Carlos e Magnólia) em diferentes concentrações de AIB, após 30 dias de enraizamento <i>ex vitro</i>	92
FIGURA 22 – Microestacas de híbridos de videira <i>V. labrusca</i> (cultivar Bordô) x <i>V. rotundifolia</i> (cultivares Carlos e Magnólia) em diferentes concentrações de AIB, após 30 dias de enraizamento <i>ex vitro</i>	93
CONCLUSÕES FINAIS	
FIGURA 23 - Esquema representativo do protocolo de micropropagação para os híbridos de <i>V. labrusca</i> x <i>V. rotundifolia</i> testados.....	101

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- TABELA 1 - Porcentagem de explantes brotados de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos, Bountiful, Magnólia e Regale) submetidos a diferentes meios de cultura ao longo de três subcultivos.....34
- TABELA 2 - Porcentagem de explantes com brotação de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia) submetidos a diferentes meios de cultura ao longo de três subcultivos.....35
- TABELA 3 - Altura (cm) das brotações de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos, Bountiful, Magnólia e Regale) submetidos a diferentes meios de cultura ao longo de três subcultivos.....36
- TABELA 4 - Altura (cm) das brotações de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia) submetidos a diferentes meios de cultura ao longo de três subcultivos.....37
- TABELA 5 - Número médio de folhas por explante de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos, Bountiful, Magnólia e Regale) submetidos a diferentes meios de cultura ao longo de três subcultivos.....38
- TABELA 6 - Número médio de folhas por explante de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia) submetidos a diferentes meios de cultura ao longo de três subcultivos.....39
- TABELA 7 - Porcentagem de explantes com calo de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos, Bountiful, Magnólia e Regale) submetidos a diferentes meios de cultura ao longo de três subcultivos.....40
- TABELA 8 - Porcentagem de explantes com calo de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia) submetidos a diferentes meios de cultura ao longo de três subcultivos.....41
- TABELA 9 - Porcentagem de explantes enraizados de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos, Bountiful, Magnólia e Regale) submetidos a diferentes meios de cultura ao longo de três subcultivos.....42

TABELA 10 - Porcentagem de explantes enraizados de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia) submetidos a diferentes meios de cultura ao longo de três subcultivos.....43

CAPÍTULO II

TABELA 11 - Porcentagem de explantes com calo de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos, Bountiful e Magnólia) em diferentes concentrações de BAP ao longo de três subcultivos.....62

TABELA 12 - Porcentagem de explantes com calos, de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia) em diferentes concentrações de BAP ao longo de três subcultivos.....63

TABELA 13 - Porcentagem de explantes enraizados, de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos, Bountiful e Magnólia) em diferentes concentrações de BAP ao longo de três subcultivos.....64

TABELA 14 - Porcentagem de explantes enraizados, de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia) em diferentes concentrações de BAP ao longo de três subcultivos.....65

CAPÍTULO III

TABELA 15 - Porcentagem de sobrevivência de explantes de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos, Bountiful e Magnólia) em diferentes concentrações de ANA após 21 dias de aclimatização em câmara de nebulização.....86

TABELA 16 - Porcentagem de sobrevivência de explantes de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia) em diferentes concentrações de ANA após 21 dias de aclimatização em câmara de nebulização.....86

TABELA 17 - Porcentagem de microestacas brotadas de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia) em diferentes concentrações de AIB após 30 dias em câmara de nebulização.....88

TABELA 18 - Porcentagem de microestacas brotadas de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia) em diferentes concentrações de AIB após 30 dias em câmara de nebulização.....88

LISTA DE ABREVIATURAS

2iP – 2-isopenteniladenina

ANA – ácido naftaleno acético

AIB – ácido indolbutírico

BAP - 6-benzilaminopurina

C₂D – meio de cultura Chée e Pool (1983)

C.V. – coeficiente de variação

DSD1 – meio de cultura Silva e Doazan (1995)

GZ – meio de cultura Galzy (1964)

MS – meio de cultura Murashige e Skoog (1962)

MS/2 meio de cultura Murashige e Skoog com a metade dos sais

QL – meio de cultura Quoirin e Lepoivre (1977)

SSR – Simple Sequence Repeats

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	4
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
1 INTRODUÇÃO GERAL	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 PORTA-ENXERTOS NA VITICULTURA	19
2.2 MICROPROPAGAÇÃO DA VIDEIRA.....	20
2.2.1 Fontes de explantes	21
2.2.2 Desinfestação	22
2.2.3 Estabelecimento <i>in vitro</i>	23
2.2.4 Multiplicação.....	24
2.2.5 Enraizamento <i>in vitro</i>	25
2.2.7 Aclimatização.....	27
DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NA MICROPROPAGAÇÃO DE PORTA-ENXERTOS HÍBRIDOS DE VIDEIRA <i>Vitis labrusca</i> x <i>Vitis rotundifolia</i>	28
RESUMO	28
DIFFERENT GROWTH MEDIA DURING MICROPROPAGATION OF GRAPEVINE HYBRID ROOTSTOCKS <i>Vitis labrusca</i> x <i>Vitis rotundifolia</i>	29
ABSTRACT	29
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.2.1 Condições de cultivo <i>in vitro</i>	31
3.2.2 Estabelecimento <i>in vitro</i>	31
3.2.3 Efeito de diferentes meios de cultura na micropropagação das brotações	31
3.2.4 Análise estatística e delineamento experimental	32
3.2.5 Identificação dos híbridos	32
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.3.1 Estabelecimento <i>in vitro</i>	33
3.3.2 Diferentes meios de cultura na micropropagação das brotações.....	33
3.4 CONCLUSÕES.....	49
3.5 REFERÊNCIAS	50
4 CAPÍTULO II	53

DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP NA MICROPROPAGAÇÃO DE PORTA-ENXERTOS HÍBRIDOS DE VIDEIRA <i>Vitis labrusca</i> x <i>Vitis rotundifolia</i>	53
RESUMO	53
DIFFERENT BA CONCENTRATIONS DURING MICROPOPAGATION OF GRAPEVINE HYBRID ROOTSTOCKS <i>Vitis labrusca</i> x <i>Vitis rotundifolia</i>	54
ABSTRACT.....	54
4.1 INTRODUÇÃO	55
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	56
4.2.1 Condições de cultivo <i>in vitro</i>	56
4.2.2 Diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) na micropropagação das brotações	56
4.2.3 Análise estatística e delineamento experimental	56
4.2.4 Identificação dos híbridos	57
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.4 CONCLUSÕES.....	71
4.5 REFERÊNCIAS	72
5 CAPITULO III	74
ENRAIZAMENTO <i>in vitro</i> , <i>ex vitro</i> E ACLIMATIZAÇÃO DE PORTA-ENXERTOS HÍBRIDOS DE VIDEIRA <i>V. labrusca</i> x <i>V. rotundifolia</i>	74
RESUMO	74
<i>in vitro</i> , <i>ex vitro</i> ROOTING AND ACCLIMATIZATION OF GRAPEVINE HYBRID ROOTSTOCKS <i>V. labrusca</i> x <i>V. rotundifolia</i>	75
ABSTRACT.....	75
5.1 INTRODUÇÃO	76
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	77
5.2.1 Condições de cultivo <i>in vitro</i>	77
5.2.2 Fonte de explantes.....	77
5.2.3 Fonte de microestacas	77
5.2.4 Diferentes concentrações de ANA (ácido naftaleno acético) no enraizamento <i>in vitro</i> e aclimatização das brotações	77
5.2.5 Diferentes concentrações de AIB (ácido indolbutírico) no enraizamento <i>ex vitro</i> das microestacas	78
5.2.6 Análise estatística e delineamento experimental	78
5.2.7 Identificação dos híbridos	79
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	80

5.3.1 Diferentes concentrações de ANA (ácido naftaleno acético) no enraizamento <i>in vitro</i> e aclimatização das brotações	80
5.3.2 Diferentes concentrações de AIB (ácido indolbutírico) no enraizamento <i>ex vitro</i> das microestacas	88
5.4 CONCLUSÕES.....	94
5.5 REFERÊNCIAS	95
6 CONCLUSÕES FINAIS.....	100
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
8 REFERÊNCIAS	103
ANEXOS.....	114

1 INTRODUÇÃO GERAL

A videira é uma das espécies frutíferas mais importantes no Brasil, sendo que a produção nacional atingiu 1.463.481 toneladas em 2011, em uma área plantada de 81.915 hectares (IBGE, 2011). Destacam-se como principais estados produtores Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, sendo que em 2011 o maior volume de produção foi do Rio Grande do Sul, chegando a 829.589 toneladas (IBGE, 2011).

Entretanto, apesar da importância econômica, a maioria das cultivares copa e porta-enxerto são muito suscetíveis ao ataque de pragas e doenças, sendo decorrentes desse fato a redução da qualidade e da produtividade dos pomares com a consequente elevação dos custos de produção (SÔNEGO; GARRIDO; GRIGOLETTI JÚNIOR, 2005).

Entre os principais agentes causais identificados associados a este problema e que atualmente vêm causando sérios prejuízos na cultura da videira na região Sul do Brasil estão os patógenos que infectam as plantas através do sistema radicular, como os fungos *Cylindrocarpon sp.*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *herbemontis* e *Verticillium sp.* (GARRIDO; SÔNEGO; GOMES, 2004) e a cochonilha pérola-da-terra (*Eurhizococcus brasiliensis*) (BOTTON *et al.*, 2004).

As regiões vinícolas do sul do Brasil são dominadas por diferentes porta-enxertos híbridos norte-americanos. Algumas dessas cultivares são consideradas tradicionais, como ‘Solferino’, ‘SO4’, ‘Kober 5BB’ e ‘101-14’ Mgt (*V. berlandieri* x *V. riparia*), enquanto outros foram recentemente introduzidos, como ‘Paulsen 1103’ e ‘R99’ (*V. berlandieri* x *V. rupestris*). Esses porta-enxertos têm sido recomendados devido à sua resistência ao *Fusarium oxysporum* Schlecht, porém, eles são os mais suscetíveis à principal praga do solo desta região, a pérola-da-terra (BOTTON; COLLETA, 2010; BOTTON *et al.*, 2010).

Até o momento, a forma de controle mais preconizada é o uso de porta-enxertos resistentes ou tolerantes (SCHUCK *et al.*, 2007), tais como aqueles derivados da espécie *Vitis rotundifolia*, principalmente devido ao seu baixo custo e pequeno risco de desequilíbrio ambiental (SORIA; BRAGHINI, 1999).

Pesquisas têm mostrado um comportamento diferenciado dos porta-enxertos de videira derivados de *V. rotundifolia*, os quais se mostraram mais resistentes do que os porta-enxertos pertencentes às diferentes espécies de *Vitis* (SORIA *et al.*, 1999). Existem evidências de que a espécie *V. rotundifolia* e seus híbridos são resistentes à pérola-da-terra e fungos de solo com

destaque ao *Fusarium* (ANDRADE; SCHUCK; DALBÓ, 1993; BOTTON *et al.*, 2004; DALBÓ; PERUZZO; SCHUCK, 2007). Além disso, de acordo com POMMER *et al.* (1997), os híbridos de *V. vinifera* e *V. rotundifolia* são praticamente imunes a alguns nematóides, como *Xiphinema index*, e apresentam elevada resistência ao pulgão filoxera.

Devido às vantagens fitogenéticas, essa espécie tem sido incorporada nos programas de melhoramento da videira (TORREGROSA; LOPEZ, 1996), sendo empregada mundialmente como fonte de resistência a problemas fitossanitários, principalmente nematóides de solo (WALKER; WOLPERT; WEBER, 1994).

Existe, porém, uma incompatibilidade genética da espécie *V. rotundifolia* ($2n=40$) para uso como porta-enxerto das variedades comerciais de videira ($2n=38$). Para solucionar esse problema, são desenvolvidos híbridos interespecíficos (TORREGROSA; BOUQUET, 1995).

Alguns híbridos desses cruzamentos, incluindo 'VR 039-16' e 'VR 043-43' (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*), lançados pelo programa de melhoramento de uva da Universidade da Califórnia, em Davis, CA, EUA (WALKER *et al.*, 1991), são atualmente os principais porta-enxertos utilizados no controle da pérola-da-terra no Brasil (DALBÓ; PERUZZO; SCHUCK, 2007). No entanto, 'VR043-43' não é mais recomendado para utilização em locais infestados por filoxera, além disso, a resistência do porta-enxerto a pérola-da-terra foi recentemente posta em dúvida (DE CÉSARO, 2008). O 'VR 039-16' só é recomendado para uso em locais infestados por vírus, já que sua resistência em longo prazo à filoxera também é questionável (SMITH, 2010).

A partir desses conhecimentos, foram desenvolvidos cruzamentos controlados entre *V. labrusca* e *V. rotundifolia* em um programa de melhoramento de videira da Universidade Federal do Paraná visando à obtenção de porta-enxertos resistentes às principais pragas e doenças da videira. A paternidade dos híbridos interespecíficos F1 foram confirmadas por meio de marcadores SSR (Simple Sequence Repeats). Dos cruzamentos recíprocos, 114 genótipos foram identificados como híbridos verdadeiros, obtidos a partir de *V. labrusca* (cultivar Isabel) e cultivares de *V. rotundifolia* (Bountiful, Carlos, Magnólia, Regale e Roanoke) e *V. labrusca* (cultivar Bordô) e *V. rotundifolia* (cultivares Carlos, Magnólia, Regale e Roanoke) (SCHUCK *et al.*, 2011).

Porém, para que se torne viável a avaliação da resistência a campo desses materiais quanto à pérola-da-terra, filoxera, fusariose e algumas espécies de nematóides, é de grande importância a obtenção de clones dos híbridos por propagação vegetativa.

A propagação de híbridos de *V. rotundifolia* pelo método tradicional de estaquia tem apresentado limitações, pois estacas lignificadas das variedades e híbridos de *V. rotundifolia*

têm dificuldade na emissão de raízes. (GOODE JUNIOR *et al.*, 1982; BOTELHO *et al.*, 2005), e, além disso, exigem uma grande quantidade de material vegetativo para propagação, o que nem sempre é viável se tratando de híbridos, constituindo-se, assim, uma grande barreira para a produção de mudas em larga escala.

Diversos trabalhos têm apontado as técnicas de micropropagação como alternativa para a rápida propagação de cultivares da espécie *V. rotundifolia* e, especialmente, híbridos de *Vitis* e *Muscadinia* (WETZSTEIN; MYERS, 1994).

Na viticultura, as técnicas de micropropagação tornam-se imprescindíveis para a obtenção em larga escala de material vegetativo de boa qualidade fitossanitária (BIASI, 2003; BIASI; PASSOS; POMMER, 1998a).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de multiplicação para as matrizes dos porta-enxertos híbridos de videira (*V. labrusca* x *V. rotundifolia*) por micropropagação, viabilizando sua rápida propagação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PORTA-ENXERTOS NA VITICULTURA

A partir do século XVIII, com o aumento do intercâmbio mundial de material vegetativo, uma praga de raízes, a filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch, 1855), foi introduzida na Europa. Esse inseto provocou enormes danos nas videiras da Europa e de todo o mundo, tornando obrigatória a utilização de porta-enxertos resistentes a essa praga na maioria das regiões vitícolas, com raras exceções (SOUZA, 1996).

A descoberta de que espécies americanas eram resistentes, fez com que os viticultores passassem a utilizá-las diretamente como porta-enxerto das cultivares de *V. vinifera*. Neste mesmo período, iniciaram-se os primeiros trabalhos de melhoramento de porta-enxertos, permitindo o ressurgimento dos vinhedos de *V. vinifera*. Seleções de *V. riparia*, *V. rupestris* e *V. berlandieri* foram as mais utilizadas em hibridações. Portanto, resistência a filoxera foi o primeiro critério para seleção de porta-enxertos para a cultura da videira (POMMER, 2003).

Posteriormente, os trabalhos de melhoramento buscaram além da resistência à filoxera, outras qualidades como afinidade com as cultivares copa e adaptação às condições locais de solo e clima. Como a maior parte dos programas de melhoramento foram desenvolvidos na Europa, os porta-enxertos mais difundidos foram selecionados principalmente para tolerância a solos calcários, ao déficit hídrico e buscando-se afinidade com as cultivares viníferas plantadas nos principais países produtores. No entanto, pela diversidade genética, pode-se observar diferenças acentuadas entre porta-enxertos quanto à adaptação as mais diversas condições de solo e clima (DELAS, 1992).

Tradicionalmente, durante muitos anos, na viticultura do Brasil, principalmente na região Sul, foram usados porta-enxertos de alta capacidade de enraizamento e pegamento na enxertia. Estes porta-enxertos como o '101-14', 'SO4', 'Kobber 5BB', '3309C' entre outros são os mais usados na viticultura mundial e por isso foram usados largamente na viticultura brasileira. A constatação é que estes porta-enxertos, embora bem adaptados às condições climáticas brasileiras, e bem aceitos pelos produtores de uvas (matéria-prima de alta qualidade) não são tolerantes aos problemas de solo das condições brasileiras, ácidos e com alto teor de argila, contrárias às condições de solos das principais regiões vitícolas do mundo que são alcalinos (solo calcário) e arenosos (SCHUCK; ROSIER; DALBÓ, 2004).

As espécies de *V. rotundifolia* tem se mostrado mais adaptadas às condições de solo do Brasil, além de pesquisas já terem demonstrado que essa espécie possui tolerância a algumas doenças e pragas de solo. Porém, o uso de *V. rotundifolia* diretamente como porta-enxerto para cultivares de videira não tem sido possível por falta de compatibilidade de enxertia entre essas espécies (SCHUCK *et al.*, 1993). Entretanto, é possível a utilização de híbridos de *V. rotundifolia* com espécies da seção *Euvitis*, cuja compatibilidade de enxertia já tem sido comprovada.

Os primeiros porta-enxertos comerciais tendo em seu parentesco *V. rotundifolia* foram os híbridos de *V. vinifera* x *V. rotundifolia*, ‘VR 039-16’ e ‘VR 043-43’. Criados por Olmo em 1948, estes dois porta-enxertos foram lançados pelo programa de melhoramento da Universidade da Califórnia, Davis, e mostraram bons resultados em áreas com problemas de doenças e pragas de solo da videira (WALKER *et al.*, 1991), e são atualmente recomendados pela pesquisa em áreas infestadas por pérola-da-terra e *Fusarium* spp. (SCHUCK *et al.*, 2007). No entanto, nas áreas vitícolas da Califórnia, ‘VR 043-43’ e ‘VR 039-16’ não são mais recomendados para uso como porta-enxertos devido à quebra de resistência à filoxera (SMITH, 2010). No Brasil, recentes observações indicam que o ‘VR 043-43’ pode definhir e morrer em poucos anos, dependendo do grau de infestação por pérola-da-terra que o local apresenta (DE CÉSARO, 2008).

O histórico da viticultura vem mostrando a importância da diversificação de porta-enxertos, além da necessidade de cultivares porta-enxertos melhoradas. A utilização generalizada de um único porta-enxerto para todas as cultivares copa provavelmente não atende às características peculiares de cada cultivar, impedindo que a planta manifeste todo seu potencial produtivo, além de constituir-se em inconveniente problema no caso de moléstias endêmicas (LEÃO, 2001).

2.2 MICROPROPAGAÇÃO DA VIDEIRA

A partir da cultura de tecidos de plantas é possível a obtenção de plantas geneticamente idênticas à planta matriz, em número elevado e curto espaço de tempo, estando isto na dependência do controle da morfogênese, a qual é influenciada por vários fatores como espécie, cultivar, tipo de explante, componentes do meio nutritivo, reguladores de crescimento e ambiente de cultivo (CARVALHO; SILVA; MEDEIROS, 2006). A cultura de tecidos tem sido reconhecida como uma área chave da biotecnologia, devido à sua utilização potencial

para a rápida multiplicação clonal e conservação de espécies importantes de plantas (GHEORGHE *et al.*, 2009).

A videira é propagada normalmente por via vegetativa. A micropropagação apresenta vantagens em relação a métodos tradicionais de propagação vegetativa, dentre os quais se destacam a rapidez do processo e a possibilidade de obtenção e manutenção de plantas matrizes livres de vírus (PEIXOTO; PASQUAL, 1996).

A micropropagação da videira é utilizada com diversos objetivos, entre os quais a multiplicação rápida de plantas, propagação de novos híbridos e obtenção de matrizes livres de patógenos, tornando-se uma alternativa viável para a multiplicação de videiras (BIASI; PASSOS; POMMER, 1998b; DZAZIO; BIASI; ZANETTE, 2002; COLETTI; MARTINS; GOULART, 2008). Diversos trabalhos têm apontado as técnicas de micropropagação como alternativa para a rápida propagação de cultivares da espécie *V. rotundifolia* e, especialmente, híbridos de *Vitis* e *Muscadinia* (WETZSTEIN; MYERS, 1994).

O desenvolvimento de protocolos de micropropagação, embriogênese somática e cultura de células em suspensão representam a possibilidade de superação dos entraves encontrados no atual sistema de propagação de videiras, além de fornecerem suporte para o melhoramento da espécie por meio de técnicas biotecnológicas como a hibridação somática e a transformação genética, as quais são dependentes de protocolos eficientes de regeneração de plantas (CARVALHO *et al.*, 2011).

2.2.1 Fontes de explantes

O tipo de explante exerce forte influência nas subseqüentes respostas obtidas *in vitro*, e dentre os explantes que podem ser utilizados, ápices caulinares, gemas axilares e meristemas isolados são os mais indicados na micropropagação, pois suas células possuem determinação para o crescimento vegetativo, desenvolvendo plantas sem a passagem pela fase de calo, quando em meio de cultivo adequado (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008).

A regeneração de videiras via organogênese tem sido descrita a partir de diferentes explantes, tais como segmentos nodais (STAMP; COLBY; MEREDITH, 1990), ápices caulinares (GOUSSARD, 1981) e meristemas (MEZZETTI *et al.*, 2002). Os ápices caulinares são retirados da extremidade apical das brotações com cerca de 2 a 4 primórdios foliares e 0,5 a 1,5 mm de comprimento (BOTTI; GARAY; REGINATO, 1993; CHÉE; POOL, 1982; GOUSSARD, 1981).

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 (TRONCOSO *et al.*, 1988; NOVÁK; JUVOVÁ, 1983). Meristemas menores do que 0,3 mm dificilmente regeneram novas plantas (KORUZA; JELASKA, 1993).

Também podem ser utilizados segmentos nodais que se constituem de microestacas com apenas uma gema lateral mais uma pequena porção dos tecidos adjacentes do caule e pecíolo, variando de 8 a 25 mm de comprimento (GRIBAUDO; FRONDA, 1991; MARTINEZ; TIZIO, 1989; MULLINS; NAIR; SAMPET, 1979).

2.2.2 Desinfestação

A contaminação por microrganismos é um dos principais problemas na micropropagação, podendo chegar inclusive a ser um fator limitante para o estabelecimento e cultivo *in vitro* de certos explantes (RIBAS *et al.*, 2002).

Estas contaminações causadas por bactérias, fungos e insetos tornam-se um sério problema devido à competição pelos nutrientes, liberação de toxinas, modificação do meio de cultura e predação, resultando na morte do tecido vegetal. É necessário remover as contaminações com desinfetantes antes do estabelecimento *in vitro* para que não haja perda de material, principalmente quando as contaminações não são detectadas precocemente. Após a escolha do melhor explante, este deve ser desinfestado superficialmente, porque os microrganismos que crescerem no meio de cultivo irão competir com o explante pelos nutrientes (SMITH, 2000).

As substâncias mais utilizadas para fazer a desinfestação dos explantes são os compostos à base de cloro, tais como o hipoclorito de sódio e de cálcio, assim como o etanol, que além da ação germicida, tem ação surfactante e facilita a ação de outros produtos, sendo utilizado em concentrações em torno de 70 a 80%, pois concentrações maiores podem causar desidratação dos tecidos (HIRATA; MANCINI FILHO, 2002).

Além do etanol e hipoclorito de sódio e de cálcio, vários esterilizantes podem ser utilizados como peróxido de hidrogênio, nitrato de prata e cloreto de mercúrio, sendo que o sucesso da desinfestação vai depender do tipo e idade do explante, concentração do agente desinfestante e do tempo de exposição. A superexposição do tecido aos agentes desinfestantes, geralmente, danifica o explante e leva à morte celular (SMITH, 2000).

Para a assepsia de brotações de estacas do porta-enxerto de videira '420-A', DZAZIO, BIASI e ZANETTE (2002) realizaram o tratamento das brotações com benomyl (2 g L⁻¹),

seguida pela imersão em solução de hipoclorito de sódio (2,5%) mais Tween 20 (0,1%) por 20 minutos e quatro lavagens em água esterilizada.

MACHADO *et al.* (2006) utilizaram para o porta-enxerto de videira ‘VR 043-43’ um tratamento com Benlate® (2 g L⁻¹) por 10 minutos, seguido pela imersão em etanol (70%) por 25 segundos e hipoclorito de sódio (1,5%) mais Tween-20 (0,2%) por 15 minutos e quatro lavagens em água deionizada e esterilizada.

BERND *et al.* (2007) utilizaram para híbridos de *V. labrusca* x *V. rotundifolia* um processo de imersão por 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 1% (p/v) e Tween 80 (2 gotas L⁻¹). O material foi lavado três vezes em água destilada estéril sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar.

2.2.3 Estabelecimento *in vitro*

A escolha adequada do meio de cultura é um fator relevante para a micropropagação, devido ao importante papel dos componentes minerais no processo de regeneração dos explantes (RAMAGE; WILLIAMS, 2002). Os nutrientes essenciais incluem sais orgânicos, fonte de carbono e energia, vitaminas e reguladores de crescimento (GAMBORG; SHYLUK, 1981).

Poucos são os trabalhos de micropropagação de *V. rotundifolia* e híbridos encontrados na literatura e, de uma maneira geral, quase todos os trabalhos apontam, como melhor meio de cultura para a produção de brotos, o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), completo (LEE; WETZSTEIN, 1990; NASR EL-DIN; RIZK; MADKOUR, 1997), com a concentração de sais reduzida pela metade (TORREGROSA; BOUQUET, 1995; TORREGROSA; LOPEZ, 1996), ou modificado (SUDASORNO; GOLDY, 1991), exceto um trabalho que indicou o meio DSD1 (BORGHEZAN *et al.*, 2003).

Para induzir o crescimento dos explantes *in vitro*, recomenda-se a adição de uma citocinina ao meio de cultura inicial (BOUQUET; TORREGROSA, 2003; MACHADO *et al.*, 2006). As citocininas são utilizadas para estimular a divisão celular, atuando desta forma na morfogênese (GEORGE, 1996).

A concentração e o tipo de citocinina, para a melhor proliferação de brotações, podem variar entre os diferentes genótipos (DZAZIO; BIASI; ZANETTE, 2002). Contudo, as concentrações muito elevadas também são prejudiciais, causando a formação de brotações anormais e hiperídricas (MACHADO *et al.*, 2006). Os primeiros trabalhos de micropropagação de *V. rotundifolia* utilizavam dosagens altas da citocinina BAP (20 µM e 40

μM), mas foi observado que essas concentrações maiores são letais (com 65% e 71% de mortalidade, respectivamente, na variedade ‘Summit’) (LEE; WETZSTEIN, 1990).

Para BERND *et al.* (2007), o regulador vegetal BAP apresentou os melhores resultados na produção de brotos, em concentrações variáveis e específicas, para cada variedade ou híbrido em estudo. Ainda os mesmos autores verificaram que o meio GZ, acrescido de 3 μM de BAP, também foi eficiente na indução de brotações em porta-enxertos híbridos de *V. labrusca* x *V. rotundifolia*.

NOVÁK e JUVOVÁ (1983) comprovaram que BAP foi a citocinina mais eficiente, superior à cinetina e a 2-isopenteniladenina (2iP), para estimular o crescimento de meristemas (0,5 mm) e a proliferação de novas brotações em oito clones de videira. A concentração de 10 μM de BAP em meio 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; SKENE, 1980; GOUSSARD, 1982; GRAY; BENTON, 1991).

CHÉE e POOL (1983) trabalhando com 21 genótipos de videira utilizaram para a fase de estabelecimento inicial o meio de cultura MS com 5 μM de BAP e 0,5 μM de ácido naftaleno acético (ANA).

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 3 mg L^{-1} de BAP. Os autores também utilizaram este meio para micropropagar outros 21 genótipos de videira, reduzindo a concentração de BAP para 2 mg L^{-1} .

Para os cultivares ‘Ribier’, ‘Thompson Seedless’ e ‘Black Seedless’, BOTTI, GARAY e REGINATO (1993) isolando ápices com 0,5 a 1,5 mm, utilizaram para a fase inicial o meio MS com 3/4 de sua concentração normal mais 2 mg L^{-1} de BAP.

2.2.4 Multiplicação

O potencial de multiplicação *in vitro* é elevado, sendo estimado por BOTTI, GARAY e REGINATO (1993) a obtenção anual de 2.808.990 brotações da cultivar ‘Thompson Seedless’, 26.494 brotações da cultivar ‘Ribier’ e 1.213 da cultivar ‘Black Seedless’ em meio MS com 2 mg L^{-1} de BAP, a partir de um explante. HARRIS e STEVENSON (1982) estabeleceram um protocolo capaz de produzir 12.000 brotações em quatro meses, a partir de

apenas um ápice meristemático. Na cultura de ápices fragmentados, BARLASS e SKENE (1980) estimaram a produção de aproximadamente 8.000 plantas em quatro meses. LEWANDOWSKI (1991) obteve cerca de 3.000 plantas de videira 'Delaware' por mês, utilizando um meio 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 multiplicação dos explantes de videiras dois métodos são sugeridos, um baseado na formação de uma única planta enraizada em meio de cultura isento de regulador vegetal, a partir de um segmento nodal utilizado como explante. O outro visa aumentar a eficiência da micropropagação, pela proliferação de gemas axilares com altos níveis de citocinina no meio de cultura, resultando na formação de múltiplas brotações não enraizadas (BOUQUET; TORREGROSA, 2003; JONA; WEBB, 1978).

As citocininas são utilizadas para estimular a divisão celular, atuando desta forma na morfogênese (GEORGE, 1996). A multiplicação de videiras *in vitro*, com a utilização de citocininas, foi reportada em diversos trabalhos (DZAZIO; BIASI; ZANETTE, 2002; GRAY; BENTON, 1991; MEYERSON *et al.*, 1994; MACHADO *et al.*, 2006). Contudo, a concentração e o tipo de citocinina para a melhor proliferação de brotações variou entre os diferentes genótipos estudados. A citocinina BAP tem sido muito eficaz para promover multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias em diversas espécies (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Para híbridos de videira a cinetina teve efeito positivo na altura das brotações (NOVÁK; JUVOVA, 1983).

2.2.5 Enraizamento *in vitro*

Para videiras, cultivares copa e porta-enxerto, a rizogênese *in vitro* é fortemente influenciada pelo genótipo (ROUBELAKIS-ANGELAKIS; ZIVANOVITC, 1991), enraizando facilmente pelo uso de meio de cultura sem regulador de crescimento ou com adição de auxina (GRAY; FISHER, 1985).

A competência para o enraizamento de *V. rotundifolia* e híbridos é muitas vezes adquirida na etapa precedente de multibrotação. TORREGROSA e BOUQUET (1995), em estudo com diferentes híbridos de *V. rotundifolia*, observaram que a concentração de 4,4 μM de BAP, que apresentou os melhores índices de multibrotação em meio MS/2, reduziu em 70% o posterior enraizamento, quando comparada à concentração de 1,1 μM BAP, sendo o enraizamento completamente inibido na concentração de 8,8 μM de BAP. Para LEE e

WETZSTEIN (1990), com *V. rotundifolia* ‘Summit’, a redução da concentração de BAP de 10 μM , em meio MS completo, no qual obtiveram o maior número de brotos após 16 semanas em cultivo, para 5 μM de BAP, proporcionou melhor enraizamento, com raízes maiores e mais ramificadas. Muitos autores obtiveram enraizamento em meio de cultura sem a adição de reguladores vegetais quando a etapa precedente de produção e alongação de brotos foi satisfatória, mas a adição de auxinas variadas, em geral, promoveu o aumento da porcentagem de enraizamento, que não atingiu 100% nos trabalhos encontrados na literatura com uvas muscadíneas (LEE; WETZSTEIN, 1990; TORREGROSA; LOPEZ, 1996; NASR EL-DIN; RIZK; MADKOUR, 1997).

BIASI; PASSOS e POMMER (1998a) obtiveram para segmentos nodais do porta-enxerto ‘Jales’ taxas de enraizamento próximas de 100%, no meio MS/2 sem auxina. Para a cultivar Cabernet Sauvignon, o melhor enraizamento foi obtido quando se utilizou o meio White sem regulador de crescimento (BARLASS; SKENE, 1980). Já, para algumas cultivares, a presença de auxina no meio é importante para o bom enraizamento, como no trabalho de GRAY e KLEIN (1989), que obtiveram 94% de enraizamento da cultivar Orlando Seedless, utilizando o meio C₂D (CHÉE; POOL, 1983) com 0,4 μM ANA. GRAY e BENTON (1991) obtiveram 55% de enraizamento dos brotos de cultivares de *V. rotundifolia*, cultivadas em meio MS sem presença de auxina e 77% com auxina.

PEIXOTO e PASQUAL (1996) obtiveram resultados onde 1,42 e 1,35 raiz foram emitidas por explante do porta-enxerto ‘R99’, nos tratamentos com 0,22 μM e 0,44 μM de ANA, respectivamente. Já o porta-enxerto ‘Jales’, em meio MS/2, emitiu 2,8 raízes por explante (BIASI; PASSOS; POMMER, 1998a).

2.2.6 Enraizamento *ex vitro*

A indução ao enraizamento pode ser realizada *in vitro*, ou *ex vitro*, em substratos porosos (PEDROTTI; VOLTOLINI, 1997). No processo de micropropagação o enraizamento *ex vitro* é mais vantajoso, pois reduz o tempo para a formação das mudas, a mão de obra e o custo (FEYISSA; WELANDER; NEGASH, 2007).

O enraizamento *ex vitro* de brotações micropropagadas tem sido relatado para diferentes espécies, por exemplo, *Camptotheca acuminata*, *Rotula aquatica*, *Wedelia chinensis* e *Malus prunifolia* (MARTIN, 2003; MARTIN; BENNA; JOSEPH, 2003; LIU; LI, 2001).

2.2.7 Aclimatização

A aclimatização é uma fase da micropropagação que pode ser crítica se não permitir elevada taxa de sobrevivência das plantas (LOPES DA SILVA *et al.*, 2007). Na aclimatização, as plantas sofrem muitos estresses durante a transferência das condições *in vitro* para as condições *ex vitro*. O tipo de substrato, dependendo de suas características físico-químicas, entre elas sua capacidade de retenção de água, influencia na sobrevivência, crescimento e desenvolvimento das plantas (LOPES DA SILVA *et al.*, 2006). Uma das causas da baixa sobrevivência de plantas na aclimatização deve-se à excessiva perda de água que estas sofrem durante o período de aclimatização (SUTTER; LANGHANS, 1982).

BLAZINA *et al.* (1991) obtiveram 90% de sobrevivência de *V. vinifera* L. ‘Zelen’ 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 aclimatização do híbrido ‘Southern Home’. DZAZIO; BIASI e ZANETTE (2002) obtiveram para os substratos vermiculita e Plantmax® 95,83% e 87,50% de sobrevivência, respectivamente para o porta-enxerto ‘420-A’.

Pode-se constatar a facilidade de aclimatização da videira pelos altos índices de sobrevivência obtidos por vários autores (KORUZA; JELASKA, 1993; RAVINDRA; THOMAS, 1995; LEWANDOWSKI, 1991; BIASI; PASSOS; POMMER, 1998a).

3 CAPÍTULO I

DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NA MICROPROPAGAÇÃO DE PORTA- ENXERTOS HÍBRIDOS DE VIDEIRA *Vitis labrusca* x *Vitis rotundifolia*

RESUMO

A escolha adequada do meio de cultura é um fator relevante na micropropagação devido ao importante papel dos componentes minerais e orgânicos no desenvolvimento *in vitro* dos explantes. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de três meios de cultura, C₂D, MS/2 (MS com a metade da concentração dos sais) e QL, em três subcultivos de híbridos de videira provenientes de segmentos nodais. Os híbridos utilizados foram: Isabel x Carlos (IC125), Isabel x Bountiful (IB481), Isabel x Magnólia (IM628), Isabel x Regale (IR423), Bordô x Carlos (BC161) e Bordô x Magnólia (BM573) preestabelecidos *in vitro*, provenientes do quarto subcultivo em meio QL suplementado com 5 µM de BAP. Os subcultivos foram realizados a cada 40 dias. Todas as culturas foram submetidas à luz com fotoperíodo de 16 horas por dia. Para o híbrido IR423 foi realizado apenas o primeiro subcultivo, pois se desenvolveu adequadamente apenas no meio MS/2. O meio C₂D prejudicou o desenvolvimento dos híbridos IB481 e IM628, formando apenas massa de calos sem brotações nos explantes, sendo retirado dos demais subcultivos para esses híbridos, o meio QL também proporcionou uma porcentagem de explantes com brotação inferior para esses híbridos. O meio C₂D proporcionou a maior formação de calos e o menor enraizamento no primeiro subcultivo para os híbridos IB481, IM628 e IR423, os híbridos IC125, BC161 e BM573 não demonstraram problemas de desenvolvimento em todos os meios testados. O meio de cultura MS/2 apresentou, de forma geral, os melhores resultados para todas as variáveis analisadas (porcentagem de explantes brotados, número de folhas, altura das brotações, porcentagem de formação de calos e enraizamento) para todos os híbridos testados. Conclui-se que para o desenvolvimento *in vitro* dos híbridos de *V. labrusca* x *V. rotundifolia* testados é recomendado o cultivo em meio de cultura MS/2.

Palavras-chave: muscadínia, cultura de tecidos, multiplicação.

**DIFFERENT GROWTH MEDIA DURING MICROPROPAGATION OF GRAPEVINE
HYBRID ROOTSTOCKS *Vitis labrusca* x *Vitis rotundifolia***

ABSTRACT

Choosing the proper growth medium is a relevant factor during micropropagation due to the important role mineral and organic compounds play in the *in vitro* development of explants. The aim of this work was to evaluate the effect of three growth media C₂D, MS/2 (MS with half the concentration of salts), and QL in three subcultures of grapevine hybrids from nodal segments. Hybrids used were: Isabel x Carlos (IC125), Isabel x Bountiful (IB481), Isabel x Magnólia (IM628), Isabel x Regale (IR423), Bordô x Carlos (BC161), and Bordô x Magnólia (BM573) pre-established *in vitro* from four subcultures in QL supplemented with 5 µM of BAP. Subcultivations were performed every 40 days. All cultures were submitted to light with photoperiod of 16 hours a day. For the hybrid IR423, only the first subcultivation was carried out as it developed appropriately only in MS/2. The medium C₂D hindered the development of IB481 and IM628, only forming mass callus without shoots in the explants, so it was removed from the other subcultures for these hybrids. QL also provided lower percentage of explant shoots for these hybrids. The medium C₂D provided the highest percentage of callus formation and the lowest rooting in the first subculture for IB481, IM628, and IR423. The hybrids IC125, BC161, and BM573 did not present development issues for all media tested. In general, the growth medium MS/2 showed the best results for all variables analyzed (sprouted explants rate, number of leaves, shoot height, percentage of callus formation, and rooting) with all hybrids tested. Hence, the cultivation in the growth medium MS/2 is recommended for the development *in vitro* of hybrids *V. labrusca* x *V. rotundifolia*.

Key words: muscadine, tissue culture, multiplication.

3.1 INTRODUÇÃO

A micropropagação da videira é utilizada com diversos objetivos, entre os quais a multiplicação rápida de plantas, propagação de novos híbridos e obtenção de matrizes livres de patógenos, tornando-se uma alternativa viável para a multiplicação de videiras (BIASI; PASSOS; POMMER, 1998a; DZAZIO; BIASI; ZANETTE, 2002; COLETTI; MARTINS; GOULART, 2008).

Devido à grande variabilidade genética e à maior dificuldade de crescimento e diferenciação *in vitro*, a micropropagação de espécies lenhosas requer estudos mais específicos e desenvolvimento de metodologias que atendam às exigências do explante (COELHO, 1999). A escolha adequada do meio de cultura é um fator relevante para a micropropagação, devido ao importante papel dos componentes minerais no processo de regeneração dos explantes (RAMAGE; WILLIAMS, 2002).

Os meios nutritivos utilizados na micropropagação fornecem substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998). Os nutrientes essenciais incluem sais orgânicos, fonte de carbono e energia, vitaminas e reguladores de crescimento (GAMBORG; SHYLUK, 1981).

De forma geral, a maioria dos trabalhos, apontam como melhor meio de cultura para a videira, o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) completo, ou com metade da concentração de sais. Outros meios de cultura também são utilizados, como o C₂D (CHÉE; POOL, 1983), e o QL (QUOIRIN; LEPOIVRE, 1977).

O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes meios de cultura para o melhor desenvolvimento de brotações cultivadas *in vitro* a partir de gema axilar de segmentos nodais de porta-enxertos híbridos de videira *V. labrusca* x *V. rotundifolia*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

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

3.2.1 Condições de cultivo *in vitro*

Todas as culturas *in vitro* foram mantidas em sala de crescimento, sob luz fluorescente branca fria com densidade de fluxo de fótons de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 h e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Todos os meios de cultura tiveram o pH ajustado para 5,8 e foram esterilizados em autoclave durante 20 min a 120°C .

3.2.2 Estabelecimento *in vitro*

Os explantes utilizados, para iniciar as culturas *in vitro*, foram segmentos nodais coletados de plantas matrizes de porta-enxertos híbridos de videira *V. labrusca* x *V. rotundifolia*, provenientes dos cruzamentos das seguintes cultivares: Isabel x Carlos, Isabel x Bountiful, Isabel x Magnólia, Isabel x Regale, Bordô x Carlos e Bordô x Magnólia (SCHUCK *et al.*, 2011) mantidas em vasos contendo solo com substrato em casa de vegetação. Para a desinfestação, os explantes foram imersos em etanol (70%) por 25 segundos e hipoclorito de sódio (1,5%) mais Tween-20 (0,2%), por 15 minutos e quatro lavagens em água deionizada e esterilizada. Após a assepsia, as brotações foram seccionadas em segmentos nodais de aproximadamente 1,0 cm de comprimento, com uma gema axilar e sem folha.

Os segmentos nodais foram isolados individualmente em frascos, tampados com papel alumínio, contendo 10 mL de meio de cultura QL, suplementado com $0,5 \mu\text{M}$ de BAP e 6 g L^{-1} de ágar (Vetec®).

3.2.3 Efeito de diferentes meios de cultura na micropropagação das brotações

Os segmentos nodais obtidos a partir do quarto subcultivo em meio de cultura QL, suplementado com $0,5 \mu\text{M}$ de BAP e 6 g L^{-1} de ágar (Vetec®) foram padronizados com 0,5 cm de comprimento e uma folha, foram cultivados em diferentes meios de cultura: MS/2 (MS com a metade da concentração de sais), QL e C₂D, suplementados com as vitaminas do meio MS, 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 30 g L^{-1} de sacarose, e 6 g L^{-1} de ágar (Vetec®), isentos de

reguladores vegetais. Foram utilizados tubos de ensaio, contendo 10 mL de meio de cultura, tampados com alumínio.

As avaliações foram realizadas a cada 40 dias de cultivo, em um total de três. Após cada avaliação os segmentos nodais foram reinoculados em um novo meio de cultura com a mesma composição do anterior. As variáveis analisadas foram porcentagem de explantes brotados, altura das brotações (cm), número de folhas por explante, porcentagem de explantes enraizados e porcentagem de explantes com formação de calo.

Para os híbridos Isabel x Bountiful e Isabel x Magnólia o meio de cultura C₂D foi retirado após o primeiro subcultivo, pois não desenvolveu explantes suficientes para a continuidade dos subcultivos. Para o híbrido Isabel x Regale foi realizada avaliação apenas do primeiro subcultivo, pois apenas o meio de cultura MS/2 obteve explantes suficientes para a continuidade dos subcultivos.

3.2.4 Análise estatística e delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema de parcela subdividida (parcela = meios de cultura; subparcela = subcultivos) em um total de três subcultivos com quatro repetições e 10 explantes por unidade experimental para cada híbrido testado. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa ASSISTAT versão 7.6 (SILVA; AZEVEDO, 2009).

3.2.5 Identificação dos híbridos

Para organização e manuseio dos híbridos em laboratório e casa de vegetação, foram estabelecidos os seguintes códigos para a identificação dos cruzamentos:

- Isabel x Carlos = IC125
- Isabel x Bountiful = IB481
- Isabel x Magnólia = IM628
- Isabel x Regale = IR423
- Bordô x Carlos = BC161
- Bordô x Magnólia = BM573

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Estabelecimento *in vitro*

O tratamento de desinfestação utilizado foi eficiente para o estabelecimento dos segmentos nodais dos híbridos de videira *V. labrusca* x *V. rotundifolia*, proporcionando uma taxa de 95% dos explantes assépticos e com indução de brotações.

3.3.2 Diferentes meios de cultura na micropropagação das brotações

De acordo com os resultados observados, os meios de cultura comparados para a micropropagação dos híbridos de videira *V. labrusca* x *V. rotundifolia* demonstraram efeito significativo para todas as variáveis analisadas, evidenciando que a composição do meio de cultura influencia a morfogênese *in vitro*, uma vez que ocorreram diferentes respostas no desenvolvimento das brotações.

Com relação à porcentagem de explantes brotados os meios C₂D e QL obtiveram melhores resultados para o híbrido IC125 no primeiro (71,67 e 81,51 % respectivamente) e terceiro (100 e 86,95% respectivamente) subcultivos, porém no segundo subcultivo o meio MS/2 proporcionou a maior porcentagem de brotações (97,5 %) (Tabela 1). Para os híbridos IB481 e IM628, os meios MS/2 e QL proporcionaram os melhores resultados, aumentando a porcentagem de brotações ao longo dos subcultivos, chegando a 100% de explantes brotados no terceiro subcultivo (Tabela 1).

No primeiro subcultivo o meio C₂D obteve a menor porcentagem de brotações para os híbridos IB481, IM628 e IR423 (10; 10 e 8,75% respectivamente), devido à formação de massa de calos sem brotações nos explantes, sendo retirado dos demais subcultivos. O meio QL também apresentou alta formação de calos para esses híbridos no primeiro subcultivo, porém, gerou brotações suficientes para os subcultivos subsequentes, exceto para o híbrido IR423, o qual se desenvolveu satisfatoriamente apenas no meio MS/2 (Tabela 1, Figura 1, 3 e 4). Para os híbridos BC161 e BM573 o meio QL mostrou-se superior aos demais nos três subcultivos, porém não houve grandes diferenças entre os três meios testados, apenas no segundo subcultivo onde o meio C₂D apresentou a menor porcentagem de explantes brotados (38%) (Tabela 2).

Quanto à altura das brotações os três meios de cultura testados não apresentaram diferença significativa no primeiro e segundo subcultivos para o híbrido IC125. No entanto, no terceiro subcultivo o meio MS/2 mostrou-se superior aos demais, com brotações de 4,6 cm

em média, para o IM628 o MS/2 também obteve melhores resultados no terceiro subcultivo (5,87 cm) (Tabela 3).

TABELA 1 – Porcentagem de explantes brotados de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos, Bountiful, Magnólia e Regale) submetidos a diferentes meios de cultura ao longo de três subcultivos.

Explantes brotados (%)			
Meio de cultura	Primeiro subcultivo ¹	Segundo subcultivo ¹	Terceiro subcultivo ¹
Isabel x Carlos (IC125)			
C ₂ D	71,67 ± 17,3	54,17 ± 18,3	100,00 ± 0,0
MS/2	51,25 ± 19,3	97,50 ± 5,0	68,13 ± 21,9
QL	81,51 ± 18,2	92,22 ± 5,2	86,95 ± 6,1
Isabel x Bountiful (IB481)			
C ₂ D	10,00 ± 8,2	-	-
MS/2	63,06 ± 23,2	82,59 ± 5,3	92,50 ± 9,6
QL	50,83 ± 17,1	100,00 ± 0,0	97,22 ± 0,0
Isabel x Magnólia (IM628)			
C ₂ D	10,00 ± 8,2	-	-
MS/2	82,50 ± 9,6	91,25 ± 11,8	100,00 ± 0,0
QL	38,61 ± 13,1	97,22 ± 5,6	100,00 ± 0,0
Isabel x Regale (IR423)			
C ₂ D	8,75 ± 6,3	-	-
MS/2	77,50 ± 26,3	-	-
QL	30,56 ± 13,7	-	-

¹Dados originais.

Para o híbrido IB481, os meios MS/2 e QL não mostraram diferença significativa no primeiro e terceiro subcultivo, apenas no segundo subcultivo o meio MS/2 mostrou-se inferior com brotações de 2,59 cm, para o IR423 foi realizado apenas o primeiro subcultivo, no qual os meios MS/2 e QL foram superiores ao C₂D, sem diferença entre si (Tabela 3). Para o híbrido BC161 não houve efeito dos tratamentos, apenas dos subcultivos, aumentando a altura das brotações ao longo dos subcultivos. Para o BM573 o meio QL obteve os melhores resultados no primeiro e terceiro subcultivo, com brotações de 2,63 e 4,13 cm em média respectivamente, no segundo subcultivo não houve diferença entre os tratamentos. (Tabela 4).

TABELA 2 – Porcentagem de explantes com brotação de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia) submetidos a diferentes meios de cultura ao longo de três subcultivos.

Explantes brotados (%)			
Meio de cultura	Primeiro subcultivo ¹	Segundo subcultivo ¹	Terceiro subcultivo ¹
Bordô x Carlos (BC161)			
C ₂ D	82,85 ± 13,6	75,70 ± 20,5	92,50 ± 5,0
MS/2	82,50 ± 17,1	77,50 ± 12,6	67,50 ± 18,9
QL	90,00 ± 11,5	88,89 ± 9,1	100,00 ± 0,0
Bordô x Magnólia (BM573)			
C ₂ D	61,88 ± 27,2	38,33 ± 14,5	78,20 ± 13,8
MS/2	70,00 ± 18,3	67,50 ± 18,9	94,45 ± 11,1
QL	78,20 ± 12,9	97,50 ± 5,0	95,00 ± 5,8

¹Dados originais.

Houve aumento na altura das brotações ao longo dos subcultivos para todos os híbridos testados, o que pode ser atribuído a perda do efeito residual da citocinina BAP utilizada nos cultivos iniciais, onde as brotações foram multiplicadas utilizando-se 5,0 µM de BAP em quatro subcultivos consecutivos. Segundo KRUL e MOWBRAY (1984), a concentração utilizada de citocinina no cultivo inicial é suficiente para permitir o crescimento das brotações nos meios de cultura isentos de regulador de crescimento, nos subcultivos posteriores, logo, o maior crescimento dos explantes na ausência de BAP pode ser atribuído ao efeito desse regulador na morfogênese *in vitro*, pois BAP aumenta a taxa de multiplicação dos explantes, porém reduz o crescimento das brotações (PEIXOTO; PASQUAL, 1996).

Com relação ao número de folhas por explante, os meios de cultura testados igualaram-se ao longo dos subcultivos para os híbridos IC125 e IB481, porém para o híbrido IM628 o meio de cultura MS/2 mostrou-se superior ao QL, proporcionando brotações com 5,83 folhas em média no terceiro subcultivo, o meio MS/2 também obteve o melhor resultado para o IR423 com 2,75 folhas por explante em média (Tabela 5).

Para o BC161 não houve diferença entre os tratamentos no primeiro subcultivo, no segundo subcultivo o meio QL se mostrou superior aos demais com 4,45 folhas por explante em média, porém no terceiro subcultivo obteve resultados semelhantes ao C₂D com 5,43 e 4,47 folhas por explante em média respectivamente (Tabela 6). Para o BM573 o meio QL obteve melhores resultados no primeiro e segundo subcultivo (4,21 e 4,37 folhas por explante

em média respectivamente), porém no terceiro subcultivo o meio QL apresentou resultados semelhantes ao MS/2 (5,98 e 5,59 folhas por explante em média respectivamente) sem diferença entre si (Tabela 6).

TABELA 3 – Altura (cm) das brotações de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos, Bountiful, Magnólia e Regale) submetidos a diferentes meios de cultura ao longo de três subcultivos.

Altura das brotações (cm)			
Meio de cultura	Primeiro subcultivo ¹	Segundo subcultivo ¹	Terceiro subcultivo ¹
Isabel x Carlos (IC125)			
C ₂ D	2,03 aB	2,59 aB	3,43 bA
MS/2	2,20 aB	2,80 aB	4,60 aA
QL	1,80 aB	3,16 aB	3,77 bA
C.V. (%)	Parcela = 13,55		Subparcela = 11,60
Isabel x Bountiful (IB481)			
C ₂ D	-	-	-
MS/2	0,97 aC	2,59 bB	3,86 aA
QL	1,47 aB	3,76 aA	3,81 aA
C.V. (%)	Parcela = 16,88		Subparcela = 15,62
Isabel x Magnólia (IM628)			
C ₂ D	-	-	-
MS/2	2,47 ns	4,37 ns	5,87 a
QL	1,80 ns	3,52 ns	4,13 b
C.V. (%)	34,45	17,94	10,68
Isabel x Regale (IR423)			
C ₂ D	0,92 b	-	-
MS/2	2,50 a	-	-
QL	2,65 a	-	-
C.V. (%)	39,48		

¹ As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ns = não significativo.

TABELA 4 – Altura (cm) das brotações de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia) submetidos a diferentes meios de cultura ao longo de três subcultivos.

Altura das brotações (cm)			
Meio de cultura	Primeiro subcultivo	Segundo subcultivo	Terceiro subcultivo
Bordô x Carlos (BC161) ^{ns}			
C ₂ D	1,56	2,65	3,97
MS/2	1,60	3,11	3,13
QL	1,56	3,54	4,10
C.V. (%)	18,14	16,36	19,65
Bordô x Magnólia (BM573) ¹			
C ₂ D	1,77 ab	2,40 ns	3,40 b
MS/2	1,32 b	2,14 ns	3,74 ab
QL	2,63 a	2,83 ns	4,13 a
C.V. (%)	24,73	27,74	9,03

¹ As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ns = não significativo.

Para a propagação *in vitro* de videira por segmentos nodais, o número de folhas é uma importante variável, pois, cada unidade de folha representa um segmento nodal que deve conter uma gema axilar para permitir a propagação em larga escala (CLAUMANN *et al.*, 2004).

Os resultados demonstram o elevado potencial de multiplicação *in vitro* da videira, como foi constatado também por outros autores: BOTTI, GARAY e REGINATO (1993) estimaram a obtenção anual de 2.808.990 brotações da cultivar Thompson Seedless, 26.494 brotações da cultivar Ribier e 1.213 da cultivar Black Seedless em meio MS com 2 mgL⁻¹ de BAP, a partir de um explante. HARRIS e STEVENSON (1982) estabeleceram um protocolo capaz de produzir 12.000 brotações em quatro meses, a partir de apenas um ápice meristemático. Na cultura de ápices fragmentados, BARLASS e SKENE (1980) estimaram a produção de aproximadamente 8.000 plantas em quatro meses. LEWANDOWSKI (1991) obteve cerca de 3.000 plantas de videira ‘Delaware’ por mês, utilizando um meio MS modificado e reduzindo os intervalos de repicagem,

TABELA 5 – Número médio de folhas por explante de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos, Bountiful, Magnólia e Regale) submetidos a diferentes meios de cultura ao longo de três subcultivos.

Número de folhas por explante			
Meio de cultura	Primeiro subcultivo ¹	Segundo subcultivo ¹	Terceiro subcultivo ¹
Isabel x Carlos (IC125)			
C ₂ D	2,94 bB	2,49 bB	4,25 aA
MS/2	2,56 bC	4,66 aA	3,57 aB
QL	3,83 aB	4,72 aA	4,15 aAB
C.V. (%)	Parcela = 14,44		Subparcela = 12,73
Isabel x Bountiful (IB481)			
C ₂ D	-	-	-
MS/2	2,63 aC	3,81 bB	4,76 aA
QL	2,19 aC	5,48 aA	4,80 aB
C.V. (%)	Parcela = 10,24		Subparcela = 7,98
Isabel x Magnólia (IM628)			
C ₂ D	-	-	-
MS/2	3,20 aC	4,64 aB	5,83 aA
QL	1,82 bB	4,54 aA	5,11 bA
C.V. (%)	Parcela = 5,57		Subparcela = 10,39
Isabel x Regale (IR423)			
C ₂ D	1,20 b	-	-
MS/2	2,75 a	-	-
QL	1,73 b	-	-
C.V. (%)	23,36		

¹ As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os cruzamentos com Isabel apresentaram maior formação de calos em relação aos cruzamentos com Bordô (Tabelas 7 e 8). A porcentagem de explantes com calos diminuiu ao longo dos subcultivos. O meio MS/2 demonstrou a menor formação de calos na base dos explantes para os híbridos IB481, IM628 e IR423. O meio de cultura C₂D mostrou-se prejudicial para o desenvolvimento das brotações dos híbridos IB481, IM628, e IR423 formando calos em aproximadamente 100% dos explantes e sem formar brotações, sendo retirado assim dos demais subcultivos. O meio de cultura QL também apresentou 100% de

explantes com calos para esses híbridos, porém, com formação de brotações, exceto para o híbrido IR423, onde o meio QL também prejudicou o desenvolvimento dos explantes. (Tabela 7, Figuras 1, 3 e 4). Para os híbridos IC125, BC161 e BM573 a formação de calos nos explantes foi menor e não demonstrou efeito prejudicial no desenvolvimento das brotações (Tabelas 7 e 8, Figuras 2, 5 e 6).

TABELA 6 – Número médio de folhas por explante de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia) submetidos a diferentes meios de cultura ao longo de três subcultivos.

Número de folhas por explante			
Meio de cultura	Primeiro subcultivo ¹	Segundo subcultivo ¹	Terceiro subcultivo ¹
Bordô x Carlos (BC161)			
C ₂ D	2,92 aB	3,15 bB	4,47 aA
MS/2	3,48 aA	3,18 bA	3,40 bA
QL	3,15 aB	4,45 aA	5,43 aA
C.V. (%)	Parcela = 11,97		Subparcela = 17,31
Bordô x Magnólia (BM573)			
C ₂ D	2,92 bAB	2,19 bB	3,70 bA
MS/2	2,68 bB	2,70 bB	5,59 aA
QL	4,21 aB	4,37 aB	5,98 aA
C.V. (%)	Parcela = 20,85		Subparcela = 17,06

¹ As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A porcentagem de explantes enraizados aumentou ao longo dos subcultivos, os híbridos IC125, BC161 e BM573 demonstraram não ter problemas de enraizamento em todos os meios de cultura testados (Tabelas 9 e 10). Os híbridos IB481, IM628 e IR423 mostraram diferenças significativas no enraizamento no primeiro subcultivo, onde o meio de cultura MS/2 foi superior aos outros, chegando a 81,25, 90 e 92,5% respectivamente (Tabela 9). Na micropropagação de videiras geralmente são utilizadas concentrações reduzidas a 3/4, 1/2 e 1/4 do meio básico de MS, principalmente na fase de enraizamento das brotações (CICCOTTI, 1982; HARRIS; STEVENSON, 1982; BOTTI; GARAY; REGINATO, 1993). De acordo com DZAZIO; BIASI e ZANETTE (2002), para o porta enxerto de videira ‘420-A’ o meio MS/2 foi o que apresentou maior índice de enraizamento chegando a 97,5% em 30 dias.

TABELA 7 – Porcentagem de explantes com calo de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos, Bountiful, Magnólia e Regale) submetidos a diferentes meios de cultura ao longo de três subcultivos.

Calos (%)			
Meio de cultura	Primeiro subcultivo ¹	Segundo subcultivo ¹	Terceiro subcultivo ¹
Isabel x Carlos (IC125)			
C ₂ D	28,50 ± 24,1	17,50 ± 28,7	0,00 ± 0,0
MS/2	50,75 ± 14,9	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0
QL	2,75 ± 5,5	0,00 ± 0,0	12,75 ± 4,9
Isabel x Bountiful (IB481)			
C ₂ D	100,00 ± 0,0	-	-
MS/2	16,25 ± 14,3	2,50 ± 5,0	5,00 ± 10,0
QL	100,00 ± 0,0	23,89 ± 17,5	7,50 ± 15,0
Isabel x Magnólia (IM628)			
C ₂ D	100,00 ± 0,0		
MS/2	20,00 ± 14,1	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0
QL	100,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0
Isabel x Regale (IR423)			
C ₂ D	94,25 ± 6,7	-	-
MS/2	11,00 ± 8,4	-	-
QL	90,50 ± 7,0	-	-

¹Dados originais.

O meio C₂D foi prejudicial para o enraizamento dos híbridos IB481 e IM628 chegando a apenas 5,00 e 7,50% respectivamente (Tabela 9), este meio de cultura possui a maior concentração de íon amônio na sua composição (20,61 mM), quando comparado aos demais meios de cultura testados (Anexo 2). Em algumas plantas a presença do íon amônio favorece o crescimento de raízes, enquanto para outras pode ser inibitório (GEORGE, 1996). Contudo, a presença do íon NH₄⁺ nos meios de cultura não inibiu o enraizamento das brotações, mas as quantidades mais elevadas no meio de cultura C₂D podem ter influenciado nos resultados obtidos.

Esse resultado é semelhante ao encontrado por MACHADO *et al.* (2007), em que o meio de cultura C₂D proporcionou a menor porcentagem de enraizamento para o porta-enxerto ‘VR-043-43’ em relação aos outros meios de cultura testados. Apesar disso, a partir

dos resultados obtidos neste estudo foi possível observar a facilidade de enraizamento *in vitro* dos híbridos testados, diferente do observado em outros cultivares de videira como o ‘Southern Home’, onde foi obtido apenas 43% de brotações enraizadas em meio de cultura sem auxina (COMPTON; GRAY, 1994).

TABELA 8 – Porcentagem de explantes com calo de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia) submetidos a diferentes meios de cultura ao longo de três subcultivos.

Calos (%)			
Meio de cultura	Primeiro subcultivo ¹	Segundo subcultivo ¹	Terceiro subcultivo ¹
Bordô x Carlos (BC161)			
C ₂ D	2,50 ± 5,0	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0
MS/2	2,50 ± 5,0	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0
QL	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0
Bordô x Magnólia (BM573)			
C ₂ D	16,50 ± 16,8	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0
MS/2	12,50 ± 9,6	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0
QL	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0

¹Dados originais.

Os resultados observados demonstram que, em geral, os meios MS/2 e QL obtiveram melhores resultados para as variáveis analisadas, esses resultados são semelhantes aos obtidos por DZAZIO, BIASI E ZANETTE (2002) em que meios mais concentrados como o MS, apresentaram resultados inferiores para comprimento da brotação principal, número de folhas do explante e porcentagem de gemas axilares brotadas, para o porta-enxerto de videira ‘420-A’, indicando que, para esta fase, menores concentrações de sais são requeridas, demonstrando que meios mais diluídos como o MS/2 podem ser mais eficientes para o desenvolvimento das brotações nas fases de alongamento e multiplicação. O meio MS/2 também mostrou-se superior para a micropropagação do porta enxerto de videira ‘Jales’, apresentando maior número de folhas por explante (3,91) e maior altura de brotações (2,11 cm) em comparação com os outros meios de cultura testados (BIASI; PASSOS; POMMER, 1998b). Já o meio QL possui a maior quantidade do íon fosfato em sua composição (2,00 mM) (Anexo 2), quando comparado aos outros meios de cultura testados, o balanço de

fósforo no meio de cultura importante para o crescimento (LEE; DEFOSSARD, 1977) e morfogênese do explante (RAMAGE; WILLIAMS, 2002).

TABELA 9 – Porcentagem de explantes enraizados de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos, Bountiful, Magnólia e Regale) submetidos a diferentes meios de cultura ao longo de três subcultivos.

Enraizamento (%)			
Meio de cultura	Primeiro subcultivo ¹	Segundo subcultivo ¹	Terceiro subcultivo ¹
Isabel x Carlos (IC125)			
C ₂ D	93,00 ± 8,7	87,50 ± 9,6	100,00 ± 0,0
MS/2	87,00 ± 12,5	100,00 ± 0,0	100,00 ± 0,0
QL	91,25 ± 6,1	100,00 ± 0,0	100,00 ± 0,0
Isabel x Bountiful (IB481)			
C ₂ D	5,00 ± 10,0	-	-
MS/2	81,25 ± 18,7	89,25 ± 9,0	92,25 ± 9,7
QL	50,75 ± 12,7	100,00 ± 0,0	97,50 ± 5,0
Isabel x Magnólia (IM628)			
C ₂ D	7,50 ± 5,0	-	-
MS/2	90,00 ± 8,2	97,00 ± 6,0	100,00 ± 0,0
QL	38,00 ± 16,4	87,78 ± 9,6	100,00 ± 0,0
Isabel x Regale (IR423)			
C ₂ D	68,00 ± 6,3	-	-
MS/2	92,50 ± 9,6	-	-
QL	43,50 ± 9,4	-	-

¹Dados originais

TABELA 10 – Porcentagem de explantes enraizados de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia) submetidos a diferentes meios de cultura ao longo de três subcultivos.

Enraizamento (%)			
Meio de cultura	Primeiro subcultivo ¹	Segundo subcultivo ¹	Terceiro subcultivo ¹
Bordô x Carlos (BC161)			
C ₂ D	93,75 ± 12,5	97,50 ± 5,0	100,00 ± 0,0
MS/2	100,00 ± 0,0	97,50 ± 5,0	100,00 ± 0,0
QL	87,50 ± 5,0	88,75 ± 9,0	100,00 ± 0,0
Bordô x Magnólia (BM573)			
C ₂ D	90,75 ± 11,9	77,00 ± 10,2	86,00 ± 4,0
MS/2	92,50 ± 9,6	95,00 ± 5,8	100,00 ± 0,0
QL	93,00 ± 5,0	100,00 ± 0,0	97,5,0 ± 5,0

¹Dados originais.

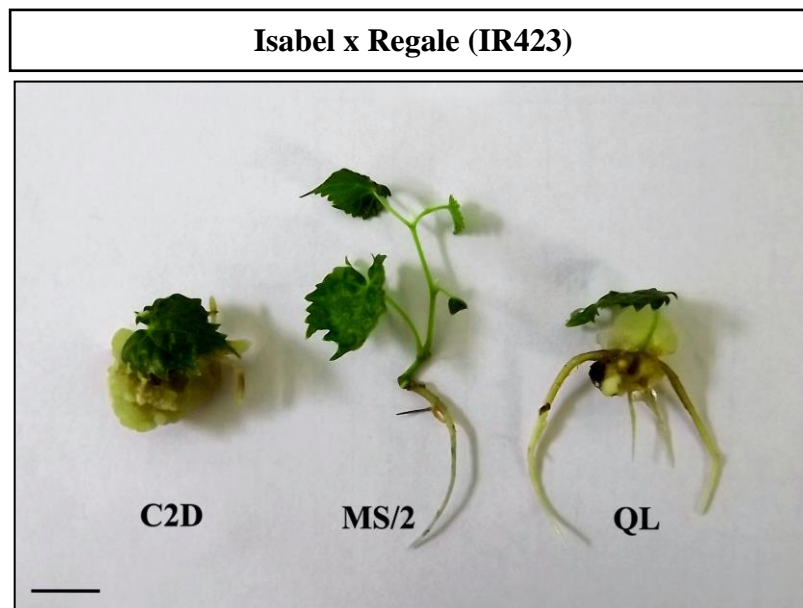


FIGURA 1 – Brotações do híbrido de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivar Regale) em diferentes meios de cultura no primeiro subcultivo. Barra = 1cm.

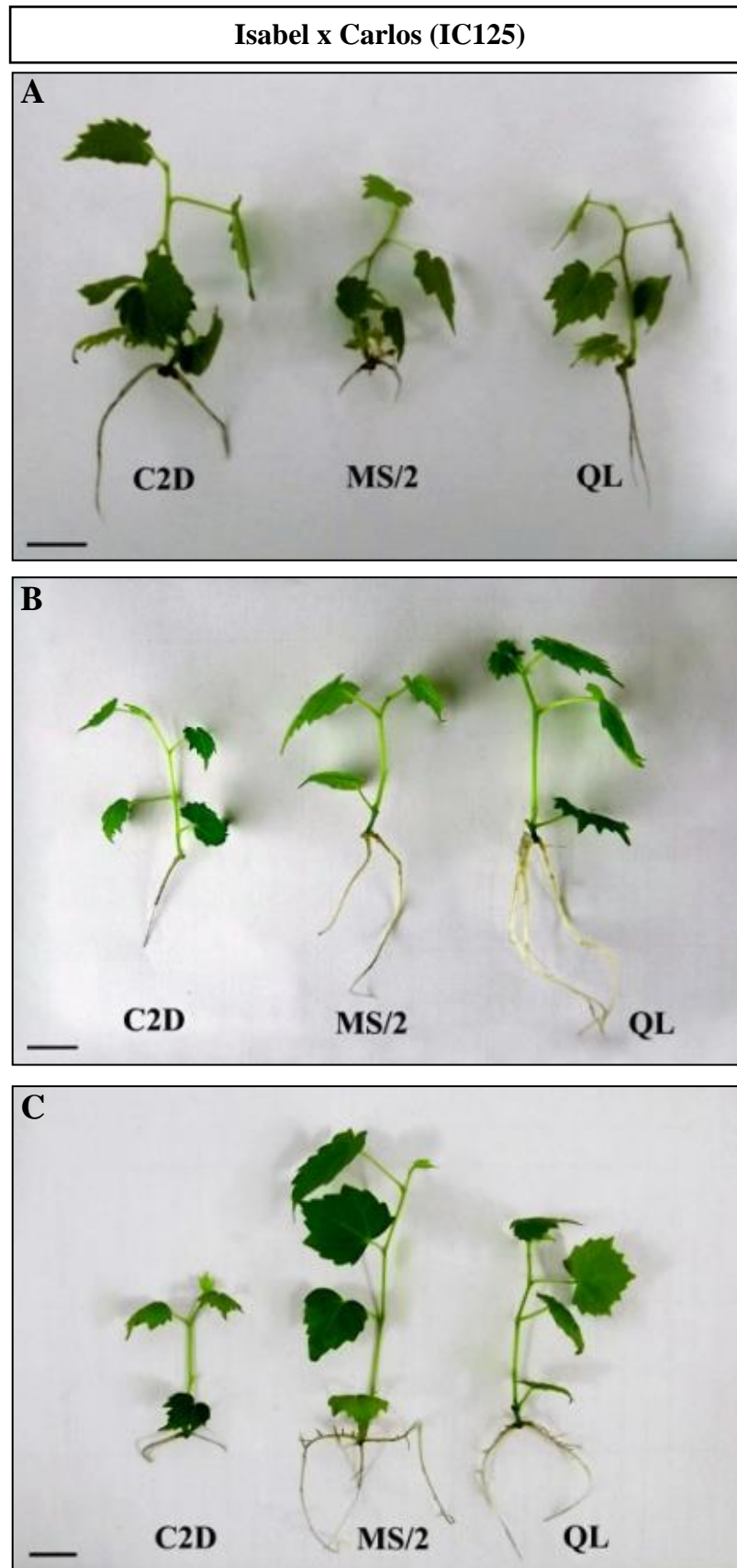


FIGURA 2 – Brotações do híbrido de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivar Carlos) em diferentes meios de cultura. (A) Primeiro subcultivo, (B), segundo subcultivo, (C) terceiro subcultivo. Barra = 1cm.

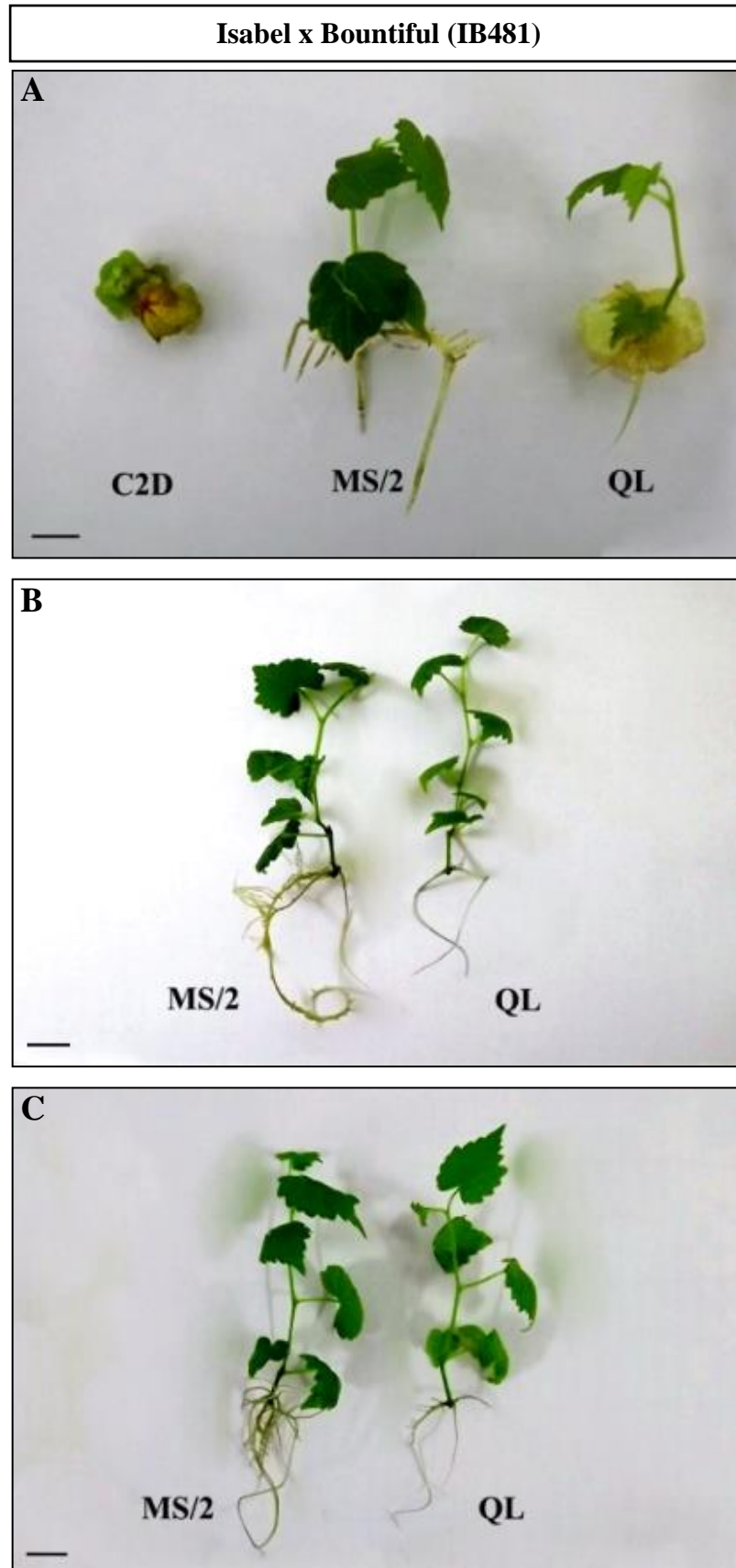


FIGURA 3 – Brotações do híbrido de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivar Bountiful) em diferentes meios de cultura. (A) Primeiro subcultivo, (B), segundo subcultivo, (C) terceiro subcultivo. Barra = 1cm.

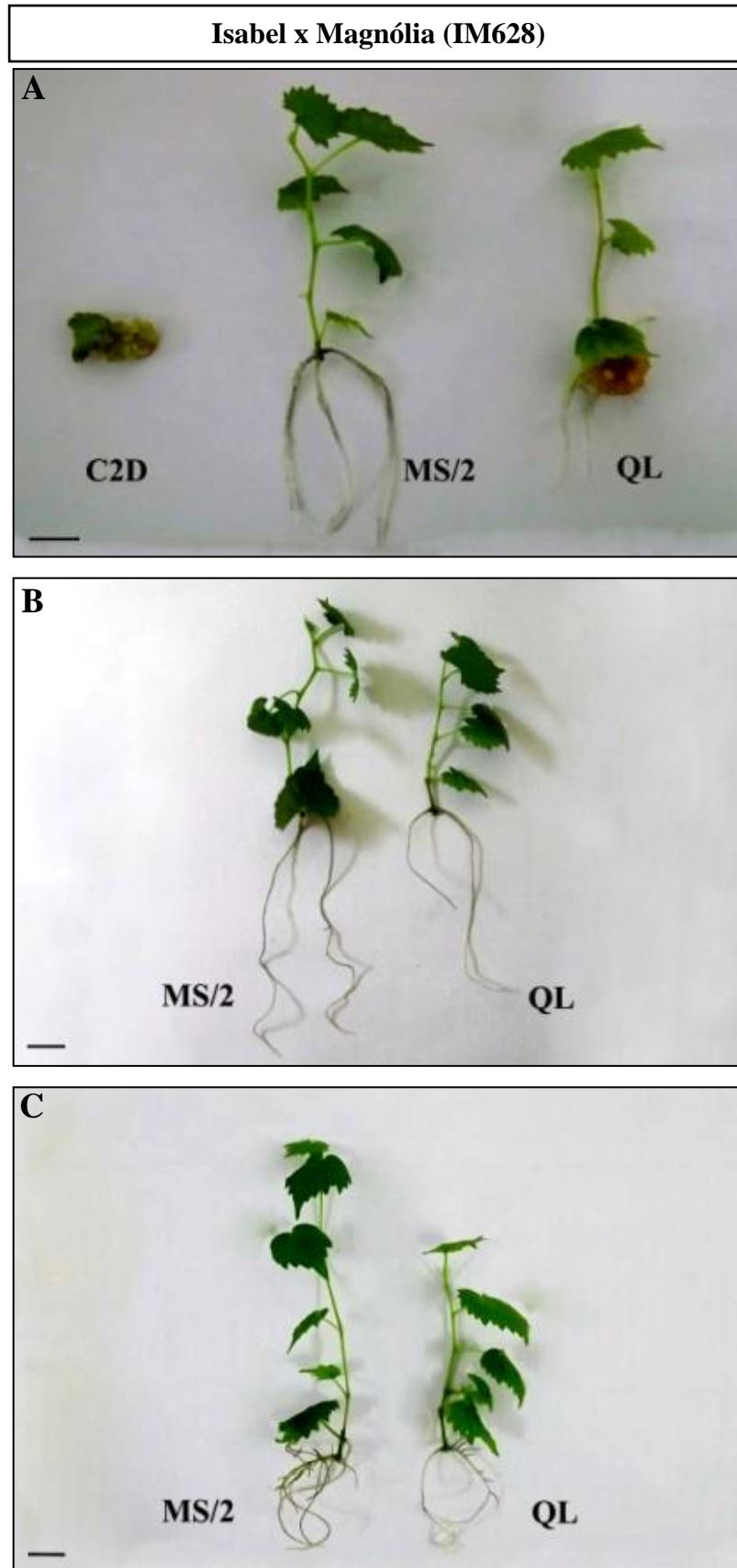


FIGURA 4 – Brotações do híbrido de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivar Magnólia) em diferentes meios de cultura. (A) Primeiro subcultivo, (B), segundo subcultivo, (C) terceiro subcultivo. Barra = 1cm.

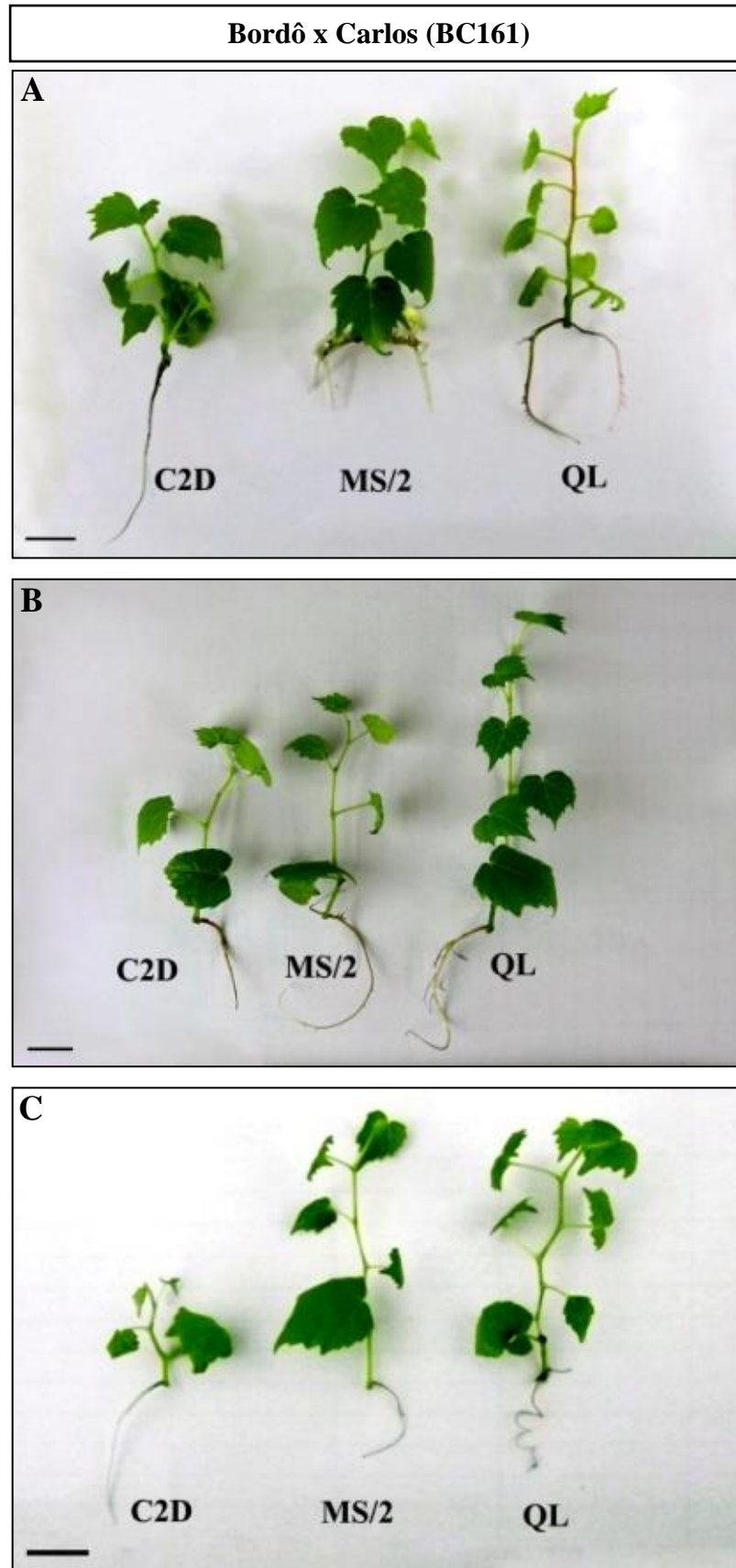


FIGURA 5 – Brotações do híbrido de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivar Carlos) em diferentes meios de cultura. (A) Primeiro subcultivo, (B), segundo subcultivo, (C) terceiro subcultivo. Barra = 1cm.

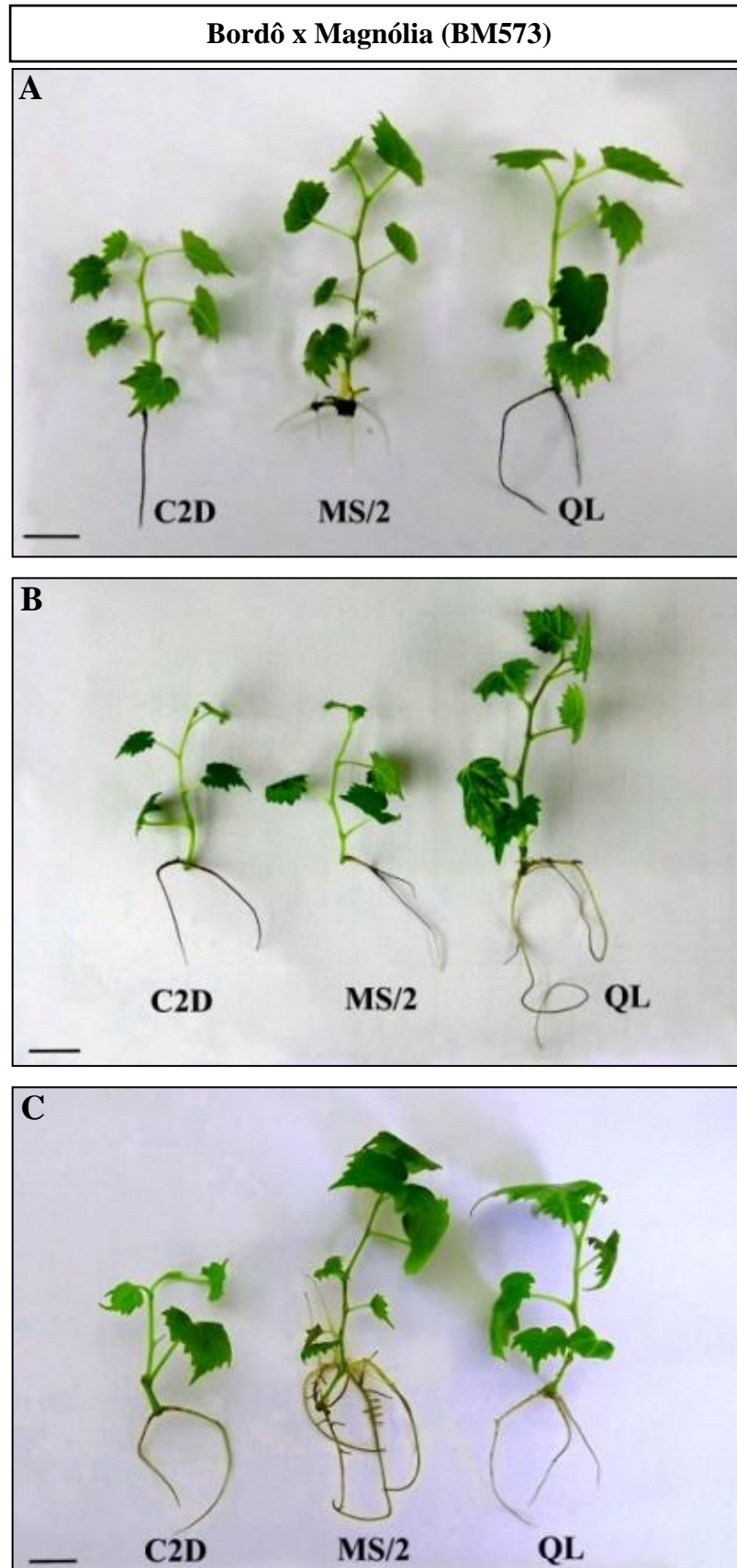


FIGURA 6 – Brotações do híbrido de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivar Magnólia) em diferentes meios de cultura. (A) Primeiro subcultivo, (B), segundo subcultivo, (C) terceiro subcultivo. Barra = 1cm.

3.4 CONCLUSÕES

O meio de cultura C₂D prejudica o desenvolvimento *in vitro* dos híbridos IB481 e IM628. Os meios C₂D e QL prejudicam o desenvolvimento *in vitro* do híbrido IR423.

O meio MS/2 é adequado para o cultivo *in vitro* dos híbridos de *V. labrusca* x *V. rotundifolia* testados.

3.5 REFERÊNCIAS

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, 1980.

BIASI, L.A.; PASSOS, I.R.S.; POMMER, C.V. Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de videira através de ápices meristemáticos e segmentos nodais. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.55, n.2, p.45-49, 1998a.

BIASI, L.A.; PASSOS, I.R.S.; POMMER, C.V. Micropropagação do porta-enxerto de videira Jales. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.33, n.10, p.1587-1594, 1998b.

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**, Siebeldingen, v.32, n.2, p.125-126, 1993.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília; EMBRAPA/ CNPH. p.87-132, 1998.

CHÉE, R.; POOL, R.M. *In vitro* vegetative propagation of *Vitis*: Application of 23 previously defined culture conditions to a selection of genotype. **Vitis**, Siebeldingen, v.22, p.363-374, 1983.

CLAUMANN, A.D.; MIRANDOLA, D.; STEINMACHER, D.A.; BORGHEZAN, M.; GUERRA, M.P.; SILVA, A.L. Efeito da sacarose no crescimento e nos parâmetros fotossintéticos de plântulas de videiras cultivadas *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18., Florianópolis. **Resumos Expandidos**. CD-ROM. 2004.

COELHO, M.C.F. Germinação de sementes e propagação *in vitro* de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.]. **Dissertação de mestrado**. Lavras, Universidade Federal de Lavras. 1999, 119p.

COLETTI, L.S.; MARTINS, C.R.; GOULART, M. Micropropagation of stock for grafting of grapevine Paulsen 1103 *in vitro*, with different citocinina concentrations. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v.15, n.1, p. 102-108, 2008.

COMPTON, M.E.; GRAY, D.J. Micropropagation of 'Southern Home' hybrid grape. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Wruiter Haven, v.107, p.308-310, 1994.

DZAZIO, P.M.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira 420-A. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.3, p. 759-764, 2002.

GAMBORG, O.L.; SHYLUK, J.P. Nutrition, media, and characteristics of plant cell and tissue cultures. In: THORPE, T.A. (Ed). **Plant tissue culture: methods and applications in agriculture**. New York: Academic, 1981. p.21-44.

HARRIS, R.E.; STEVENSON, J.H. *In vitro* propagation of *Vitis*. **Vitis**, Siebeldingen, v.21, n.1, p.22-32, 1982.

LEWANDOWSKI, V.T. Rooting and acclimatization of micropropagated *Vitis labrusca* 'Delaware'. **Hort Science**, Alexandria, v.26, n.5, p.586-589, 1991.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-479, 1962.

QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus*. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v.78, p.437-442, 1977.

RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallinghord, v.38, p.116-124, 2002.

SCHUCK, M.R.; BIASI, L.A.; MARIANO, A.M.; LIPSKI, B.; RIAZ, S.; WALKER, M.A. Obtaining interspecific hybrids, and molecular analysis by microsatellite markers in grapevine. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n.46, p.1480-1488, 2011.

SILVA, F.A.S.E.; AZEVEDO C.A.V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: World Congress on Computers in Agriculture, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

4 CAPÍTULO II

DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP NA MICROPROPAGAÇÃO DE PORTA-ENXERTOS HÍBRIDOS DE Videira *Vitis labrusca* x *Vitis rotundifolia*

RESUMO

O sucesso da micropropagação é dependente da escolha adequada dos reguladores vegetais que controlam a morfogênese *in vitro*. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), 0,0; 1,0; 2,5 e 5,0 μM , em três subcultivos de híbridos de videira provenientes de segmentos nodais. Os híbridos utilizados foram: Isabel x Carlos (IC125), Isabel x Bountiful (IB481), Isabel x Magnólia (IM628), Bordô x Carlos (BC161) e Bordô x Magnólia (BM573) preestabelecidos *in vitro*, provenientes do sétimo subcultivo em meio MS/2 isento de reguladores vegetais. Os subcultivos foram realizados a cada 40 dias. Todas as culturas foram submetidas a luz com fotoperíodo de 16 horas por dia. As variáveis analisadas mostraram comportamento semelhante para todos os híbridos testados, sendo que a concentração de 5,0 μM de BAP promoveu o maior número de brotações que aumentaram também ao longo dos subcultivos, e maior número de folhas, mas com redução na altura das brotações ao longo dos subcultivos. O enraizamento diminuiu e a formação de calos aumentou gradualmente com o aumento da concentração de BAP. Concluiu-se que para a multiplicação *in vitro* dos híbridos *V. labrusca* x *V. rotundifolia* é recomendado o cultivo em meio de cultura MS/2 suplementado com 5,0 μM de BAP.

Palavras-chave: muscadínia, citocinina, multiplicação.

**DIFFERENT BA CONCENTRATIONS DURING MICROPOPAGATION OF
GRAPEVINE HYBRID ROOTSTOCKS *Vitis labrusca* x *Vitis rotundifolia***

ABSTRACT

Micropropagation success depends on the proper choice of plant growth regulators that control *in vitro* morphogenesis. The aim of this work was to evaluate the effect of different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP), 0.0; 1.0; 2.5 and 5.0 μM , in three subcultures of grapevine hybrids from nodal segments. Hybrids used were: Isabel x Carlos (IC125), Isabel x Bountiful (IB481), Isabel x Magnólia (IM628), Bordô x Carlos (BC161), and Bordô x Magnólia (BM573) pre-established *in vitro* from the seventh subculture in medium MS/2 without plant growth regulators. Subcultivations were performed every 40 days. All cultures were subjected to light with photoperiod of 16 hours a day. The variables analyzed showed similar behavior for all hybrids tested. 5.0 μM of BAP promoted the highest number of shoots, which also increased along subcultivations, and the highest number of leaves. However, shoot height decreased over subcultivations. Rooting decreased and callus formation increased gradually with the increasing BAP concentration. In conclusion, for multiplying the hybrids *V. labrusca* x *V. rotundifolia* *in vitro* the cultivation in medium MS/2 supplemented with 5.0 μM of BAP is recommended.

Key words: muscadine, cytokinin, multiplication.

4.1 INTRODUÇÃO

A videira é propagada normalmente por via vegetativa. A micropropagação apresenta vantagens em relação aos métodos tradicionais de propagação, dentre as quais se destacam a rapidez do processo e a possibilidade de obtenção e manutenção de plantas matrizes livres de vírus (PEIXOTO; PASQUAL, 1996).

Para a multiplicação dos explantes de videiras dois métodos são sugeridos, um é baseado na formação de uma única planta enraizada em meio de cultura isento de regulador vegetal, a partir de um segmento nodal utilizado como explante. O outro visa aumentar a eficiência da micropropagação, pela proliferação de gemas axilares com altos níveis de citocinina no meio de cultura, resultando na formação de múltiplas brotações não enraizadas (BOUQUET; TORREGROSA, 2003; JONA; WEBB, 1978).

As citocininas são utilizadas para estimular a divisão celular, atuando desta forma na morfogênese (GEORGE, 1996). A concentração e o tipo de citocinina, para a melhor proliferação de brotações, podem variar entre os diferentes genótipos (DZAZIO; BIASI; ZANETTE, 2002), sendo a 6-benzilaminopurina (BAP) a mais utilizada e a mais efetiva para um grande número de cultivares (BIASI; PASSOS; POMMER, 1998a; NOVÁK; JUVOVÁ, 1983; GRAY; BENTON, 1991).

Para NOVÁK e JUVOVÁ (1983), a citocinina BAP mostrou-se mais eficiente em comparação com a cinetina e a 2-isopenteniladenina (2ip), para estimular o crescimento de meristemas e a proliferação de novas brotações, em oito clones de videira, assim como BERND *et al.* (2007), observou que o regulador vegetal BAP apresentou os melhores resultados na produção de brotos, em concentrações variáveis e específicas, para cada variedade ou híbrido de videira (*V. labrusca* x *V. rotundifolia*) em estudo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes concentrações da citocinina BAP para o melhor desenvolvimento das brotações cultivadas *in vitro* a partir da gema axilar de segmentos nodais dos porta-enxertos híbridos de videira *V. labrusca* x *V. rotundifolia*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

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

4.2.1 Condições de cultivo *in vitro*

Todas as culturas *in vitro* foram mantidas em sala de crescimento, sob luz fluorescente branca fria com densidade de fluxo de fótons de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 h e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Todos os meios de cultura tiveram o pH ajustado para 5,8 e foram esterilizados em autoclave durante 20 min a 120°C .

4.2.2 Diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) na micropropagação das brotações

Segmentos nodais obtidos do sétimo subcultivo em meio de cultura QL, isento de reguladores vegetais, suplementado com 6 g L^{-1} de ágar (Vetec®), dos híbridos Isabel x Carlos, Isabel x Bountiful, Isabel x Magnólia, Bordô x Carlos e Bordô x Magnólia (SCHUCK *et al.*, 2011), padronizadas com 0,5 cm de comprimento e uma folha, foram cultivados em meio de cultura MS/2, suplementado com as vitaminas do meio MS, 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 30 g L^{-1} de sacarose, e 6 g L^{-1} de ágar (Vetec®). Os tratamentos consistiram de diferentes concentrações de BAP (0; 1,0; 2,5 e $5,0 \mu\text{M}$) em três subcultivos. Foram utilizados tubos de ensaio, contendo 10 mL de meio de cultura, tampados com alumínio.

As avaliações foram realizadas a cada 40 dias de cultivo, em um total de três, após cada avaliação as brotações foram seccionadas em segmentos nodais e reinoculados em meio de cultura com a mesma concentração de BAP do anterior. As variáveis analisadas foram altura das brotações (cm), número de folhas, número de brotações por explante, porcentagem de explantes enraizados e porcentagem de explantes com formação de calo.

4.2.3 Análise estatística e delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema de parcela subdividida (parcela = concentrações de BAP; subparcela = subcultivos) em um total de três subcultivos com quatro repetições e 10 explantes por unidade experimental para cada híbrido

testado. Os dados foram submetidos à análise de variância e análise de regressão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa ASSISTAT versão 7.6 (SILVA; AZEVEDO, 2009).

4.2.4 Identificação dos híbridos

Para organização e manuseio dos híbridos em laboratório e casa de vegetação, foram estabelecidos os seguintes códigos para a identificação dos cruzamentos:

- Isabel x Carlos = IC125
- Isabel x Bountiful = IB481
- Isabel x Magnólia = IM628
- Bordô x Carlos = BC161
- Bordô x Magnólia = BM573

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se nas Figuras 7 e 8 que o número de brotações por explante aumentou ao longo dos subcultivos, a concentração mais alta de BAP (5,0 μM) proporcionou o maior número de brotações para todos os híbridos testados, chegando a 3,1 brotações para o híbrido IC125 (Figura 7D), 3,3 para o IB481 (Figura 7E), 2,67 para o BC161 (Figura 8C) e 3,83 para o BM573 (Figura 8D) no terceiro subcultivo e 1,9 para o IM628, no segundo subcultivo (Figura 7F), esse resultado é esperado, devido ao efeito das citocininas na morfogênese *in vitro*, que estimula as brotações laterais, diminuindo o crescimento apical.

Esses resultados são semelhantes aos obtidos por AYUB *et al.* (2009), que observaram para a cultivar Bordô que o maior de número de brotações por microestaca foram obtidos no meio MS/2 com 5 μM de BAP. Para TORREGROSA e BOUQUET (1995), o meio de cultura MS/2, suplementado com 4,4 μM de BAP, promoveu alto número de brotações por explantes, para os híbridos de *Vitis x Muscadinia*. Já COLETTO *et al.* (2008) observaram, na micropropagação do porta-enxerto ‘Paulsen 1103’, que a concentração de 1 μM de BAP, apresentou maior número de brotações. MACHADO *et al.* (2006) observaram para o porta-enxerto ‘VR 043-43’ que as concentrações de 5 e 10 μM de BAP, com subcultivos a cada 45 dias, promoveram o maior número de brotações. BERND *et al.* (2007) induziram multibrotação a partir de gemas axilares de híbridos *V. labrusca x V. rotundifolia* em meio Galzy, acrescido de 3 μM de BAP.

O número de folhas também aumentou ao longo dos subcultivos devido ao aumento no número de brotações, chegando a 9,0, 10,8, 7,95 e 11,97 para os híbridos IC125, IB481, BC161 e BM573 respectivamente no terceiro subcultivo (Figura 7G e 7H e Figura 8E e 8F) e 5,6 folhas para o IM628 no segundo subcultivo (Figura 7I), ambos na maior concentração de BAP (5,0 μM). Observa-se que o aumento no número de folhas acompanhou o aumento no número de brotações, demonstrando que houve a formação de tufos de brotações na concentração de 5,0 μM de BAP (Figuras 9, 10, 11, 12 e 13), a formação de tufos é desejável na fase de multiplicação dos explantes, pois gera maior eficiência na produção de brotações por explante.

Outros autores também observaram o incremento no número de folhas com a adição de BAP no meio de cultura, para a cultivar Bordô AYUB *et al.* (2010), constataram que a concentração de 2,5 μM de BAP, em meio MS, proporcionou o maior número de folhas por microestaca de videira. BERND *et al.* (2007) observaram para dois híbridos de *Vitis labrusca*

x *V. rotundifolia* que o meio de cultura MS, acrescido de 5 μ M de BAP, apresentaram melhor desenvolvimento da parte aérea, com caule levemente mais grosso e vigoroso.

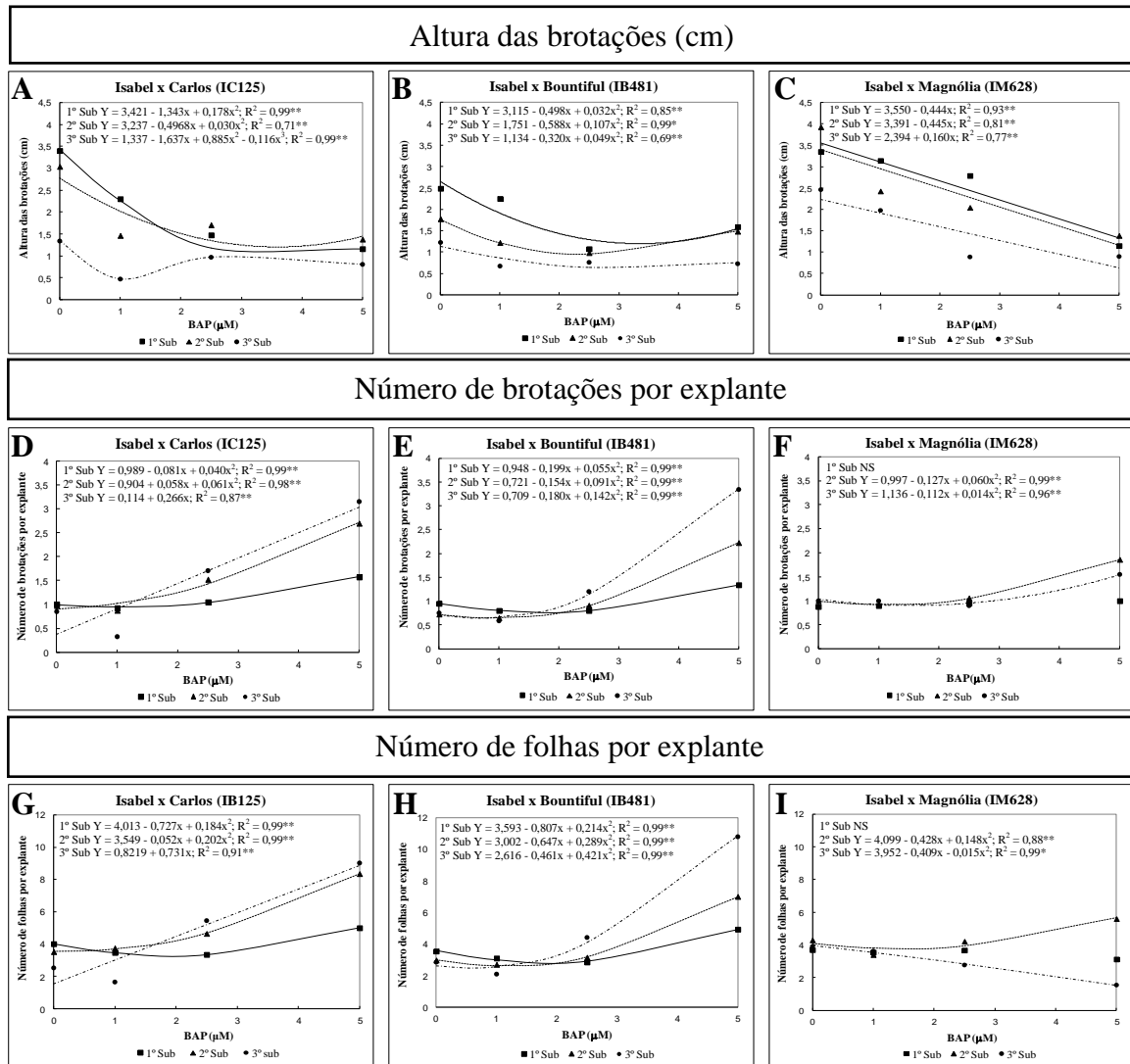


FIGURA 7 – Altura das brotações (A, B e C), número de brotações por explante (D, E e F) e número de folhas por explante (G, H e I) de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos, Bountiful e Magnólia) em diferentes concentrações de BAP ao longo de três subcultivos.

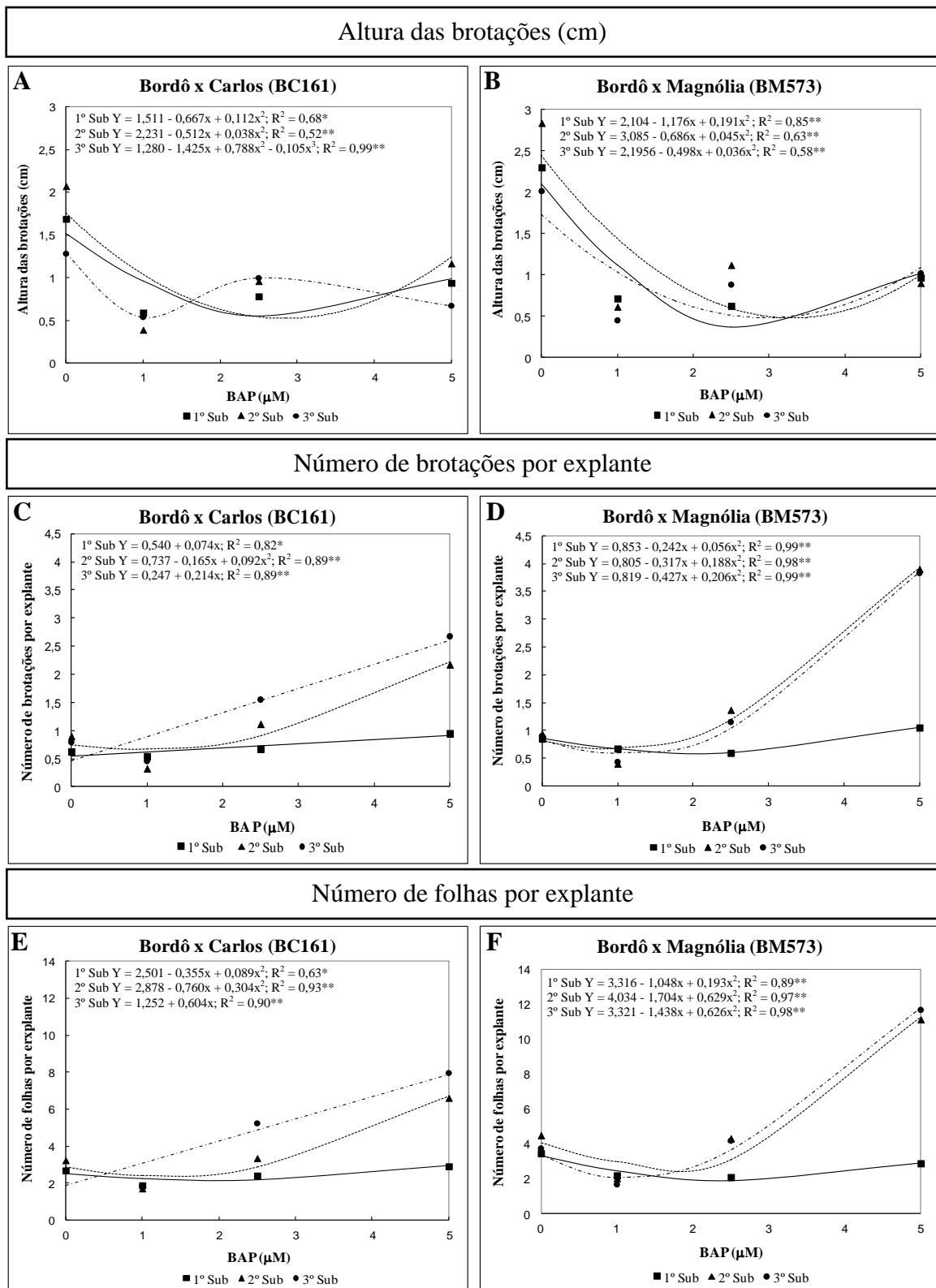


FIGURA 8 – Altura das brotações (A e B), número de brotações por explante (C e D) e número de folhas por explante (E e F) de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia) em diferentes concentrações de BAP ao longo de três subcultivos.

MACHADO *et al.* (2006) observaram que a citocinina BAP apresentou resultados inferiores à testemunha do porta-enxerto 'VR 043-43', no primeiro subcultivo e nos cultivos posteriores, o número de folhas por brotação aumentou, contudo os valores foram próximos ao da testemunha. DZAZIO, BIASI e ZANETTE (2002) encontraram maior número de folhas para o porta-enxerto de videira '420-A' nos tratamentos com ausência de BAP e na concentração de 1 μM de BAP. Também observaram que concentrações muito altas diminuiriam a quantidade de folhas, afetando seu desenvolvimento, resultados diferentes dos observados neste estudo.

A altura das brotações diminuiu ao longo dos subcultivos para todos os híbridos testados (Figura 7A, 7B e 7C e Figura 8A, 8B e 8C). O menor crescimento dos explantes na ausência de BAP pode ser atribuído ao efeito desse fitorregulador na morfogênese *in vitro*, pois o mesmo aumenta a taxa de multiplicação dos explantes, porém reduz o crescimento das brotações (PEIXOTO; PASQUAL, 1996). Esse efeito pode ser observado nas figuras 9, 10, 11, 12 e 13.

MACHADO *et al.* (2006) afirmaram que a citocinina BAP teve efeito negativo na altura das brotações do porta-enxerto de videira 'VR 043-43', sendo mais evidente nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM . Na ausência de BAP, nos quatro subcultivos, a altura em média das brotações foi maior que nas concentrações de 5,0 e 10 μM . A produção de brotações pouco alongadas com a adição de BAP no meio de cultura, também foi observada com as cultivares de videira Thompson Seedless, Sonaka e Tas-e-Ganesh, sendo necessária uma fase de alongamento (MHATRE; SALUNKHE; RAO.,2000). COLETTO *et al.* (2008) observaram para o porta-enxerto de videira 'Paulsen 1103' que adicionando 2,5 μM BAP ao meio de cultura tem-se um aumento no crescimento dos explantes, porém, aumentando essa concentração para 5,0 μM BAP ocorreu um efeito tóxico e conseqüentemente promoveu uma redução no crescimento dos porta-enxertos.

A porcentagem de explantes com calo aumentou gradativamente com o aumento da concentração de BAP chegando a 100% para os híbridos IC125, IB481 (Tabela 11) e BC161 (Tabela 12) no primeiro subcultivo e para o IB628 (Tabela 11) e BM573 (Tabela 12) no segundo subcultivo. MACHADO *et al.* (2006) observaram formação de calo em 100% das microestacas, na presença de duas citocininas testadas, enquanto, não se verificou formação de calo nas microestacas na ausência de citocinina.

TABELA 11 - Porcentagem de explantes com calo de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos, Bountiful e Magnólia) em diferentes concentrações de BAP ao longo de três subcultivos.

Calos (%)			
BAP (μM)	Primeiro subcultivo ¹	Segundo subcultivo ¹	Terceiro subcultivo ¹
Isabel x Carlos (IC125)			
0,0	0,00 \pm 0,0	0,00 \pm 0,0	0,00 \pm 0,0
1,0	43,00 \pm 5,3	75,00 \pm 12,9	40,00 \pm 14,1
2,5	80,00 \pm 18,3	97,50 \pm 5,0	87,50 \pm 15,0
5,0	100,00 \pm 0,0	92,50 \pm 9,6	84,50 \pm 10,4
Isabel x Bountiful (IB481)			
0,0	7,75 \pm 9,7	0,00 \pm 0,0	0,00 \pm 0,0
1,0	86,67 \pm 12,5	80,00 \pm 18,3	77,00 \pm 4,8
2,5	100,00 \pm 0,0	92,75 \pm 14,5	100,00 \pm 0,0
5,0	100,00 \pm 0,0	100,00 \pm 0,0	94,75 \pm 6,1
Isabel x Magnólia (IM628)			
0,0	15,00 \pm 12,9	0,00 \pm 0,0	2,50 \pm 5,0
1,0	36,25 \pm 17,3	72,50 \pm 35,9	47,50 \pm 5,0
2,5	90,00 \pm 8,2	100,00 \pm 0,0	97,50 \pm 5,0
5,0	95,00 \pm 10,0	100,00 \pm 0,0	97,50 \pm 5,0

¹ Dados originais.

Como era de se esperar a porcentagem de enraizamento foi maior na testemunha, sem adição de BAP, e diminui gradativamente com o aumento da concentração da citocinina (Tabelas 13 e 14), o que comprova o efeito negativo das citocininas no enraizamento, devido ao desbalanceamento dos níveis endógenos entre citocininas e auxinas. Este resultado difere do obtido por BERND *et al.* (2007) e LEE e WETZSTEIN (1990) onde o melhor enraizamento foi verificado no meio MS com 5 μM de BAP.

Porém, TORREGROSA e BOUQUET (1995), em estudo com diferentes híbridos de *V. rotundifolia*, observaram que a concentração de 4,4 μM de BAP, que apresentou os melhores índices de multibrotação em meio MS/2, reduziu em 70% o posterior enraizamento, quando comparada à concentração de 1,1 μM BAP, sendo o enraizamento completamente inibido na concentração de 8,8 μM de BAP. MACHADO *et al.* (2006) observaram que para o porta-enxerto 'VR 043-43' as concentrações de BAP testadas reduziram a formação de raízes,

inibindo totalmente o enraizamento no terceiro subcultivo. Para LEE e WETZSTEIN (1990) a redução da concentração de BAP de 10 μM , em meio MS completo, onde obtiveram o maior número de brotações após 16 semanas de cultivo, para 5 μM de BAP para *V. rotundifolia* ‘Summit’ proporcionou melhor enraizamento, com raízes maiores e mais ramificadas.

TABELA 12 - Porcentagem de explantes com calos, de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia) em diferentes concentrações de BAP ao longo de três subcultivos.

Calos (%)			
BAP (μM)	Primeiro subcultivo ¹	Segundo subcultivo ¹	Terceiro subcultivo ¹
Bordô x Carlos (BC161)			
0,0	2,50 \pm 5,0	0,00 \pm 0,0	0,00 \pm 0,0
1,0	92,25 \pm 5,2	97,50 \pm 5,0	46,33 \pm 17,3
2,5	92,50 \pm 9,6	100,00 \pm 0,0	82,50 \pm 9,6
5,0	100,00 \pm 0,0	97,50 \pm 5,0	95,00 \pm 5,8
Bordô x Magnólia (BM573)			
0,0	0,00 \pm 0,0	0,00 \pm 0,0	0,00 \pm 0,0
1,0	89,75 \pm 8,2	100,00 \pm 0,0	29,00 \pm 24,3
2,5	97,00 \pm 6,0	100,00 \pm 0,0	60,00 \pm 21,6
5,0	97,50 \pm 5,0	96,67 \pm 4,7	76,75 \pm 10,4

¹ Dados originais.

TABELA 13 - Porcentagem de explantes enraizados, de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos, Bountiful e Magnólia) em diferentes concentrações de BAP ao longo de três subcultivos.

Enraizamento (%)			
BAP (μM)	Primeiro subcultivo ¹	Segundo subcultivo ¹	Terceiro subcultivo ¹
Isabel x Carlos (IC125)			
0,0	100,00 \pm 0,0	97,50 \pm 5,0	100,00 \pm 0,0
1,0	100,00 \pm 0,0	80,00 \pm 8,2	50,00 \pm 8,2
2,5	90,00 \pm 8,2	40,00 \pm 14,1	20,25 \pm 7,8
5,0	0,00 \pm 0,0	10,00 \pm 8,2	0,00 \pm 0,0
Isabel x Bountiful (IB481)			
0,0	100,00 \pm 0,0	90,00 \pm 11,5	92,50 \pm 5,0
1,0	80,00 \pm 8,2	80,00 \pm 8,2	79,25 \pm 9,4
2,5	52,50 \pm 9,6	30,25 \pm 21,4	10,25 \pm 8,2
5,0	2,75 \pm 5,5	0,00 \pm 0,0	5,00 \pm 5,8
Isabel x Magnólia (IM628)			
0,0	97,50 \pm 5,0	100,00 \pm 0,0	97,50 \pm 5,0
1,0	94,75 \pm 6,1	100,00 \pm 0,0	100,00 \pm 0,0
2,5	92,50 \pm 9,6	87,50 \pm 9,6	90,00 \pm 8,2
5,0	45,00 \pm 20,8	33,50 \pm 10,8	7,75 \pm 9,7

¹ Dados originais.

TABELA 14 - Porcentagem de explantes enraizados, de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia) em diferentes concentrações de BAP ao longo de três subcultivos.

Enraizamento (%)			
BAP (μM)	Primeiro subcultivo ¹	Segundo subcultivo ¹	Terceiro subcultivo ¹
Bordô x Carlos (BC161)			
0,0	100,00 \pm 0,0	100,00 \pm 0,0	92,25 \pm 5,2
1,0	82,00 \pm 5,4	30,00 \pm 20,0	13,33 \pm 12,5
2,5	30,00 \pm 14,1	13,00 \pm 15,4	0,00 \pm 0,0
5,0	5,00 \pm 5,8	0,00 \pm 0,0	2,50 \pm 5,0
Bordô x Magnólia (BM573)			
0,0	100,00 \pm 0,0	100,00 \pm 0,0	92,50 \pm 9,6
1,0	55,75 \pm 11,4	30,00 \pm 8,2	59,25 \pm 19,6
2,5	15,50 \pm 16,1	3,67 \pm 5,2	7,50 \pm 5,0
5,0	2,50 \pm 5,0	10,00 \pm 8,2	8,00 \pm 10,5

¹ Dados originais.

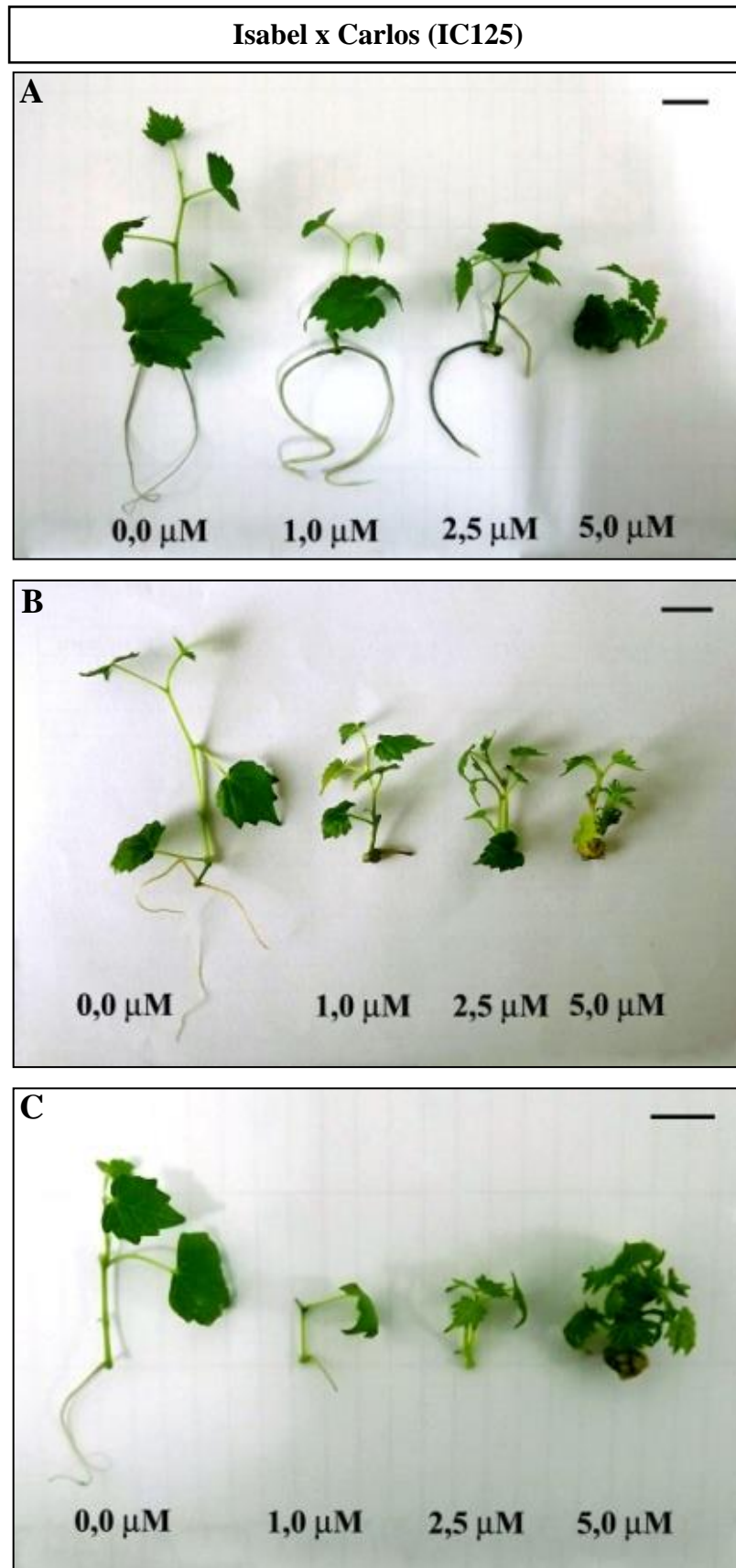


FIGURA 9 – Brotações do híbrido de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivar Carlos) em diferentes concentrações de BAP. (A) Primeiro subcultivo, (B), segundo subcultivo, (C) terceiro subcultivo. Barra = 1cm.

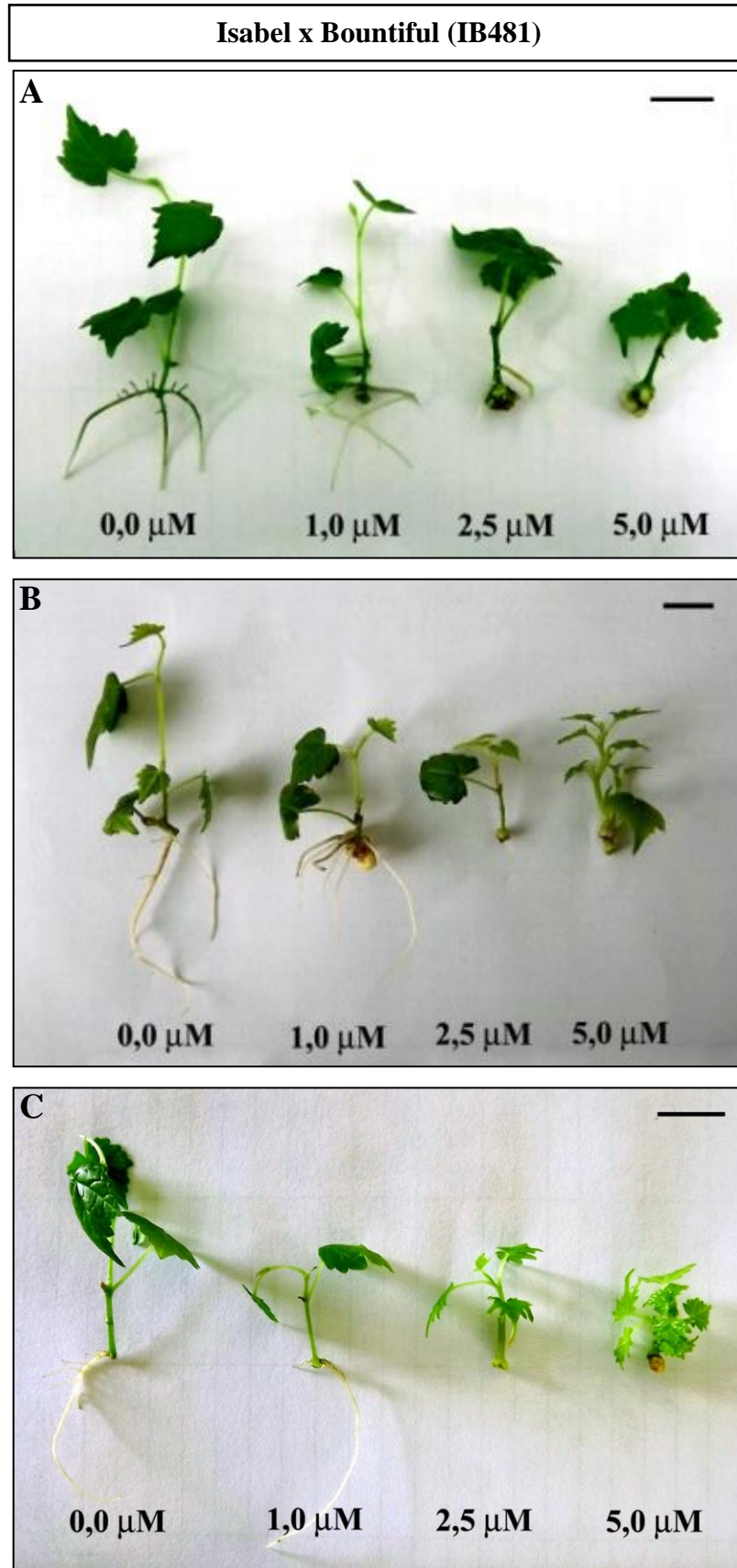


FIGURA 10 – Brotações do híbrido de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivar Bountiful) em diferentes concentrações de BAP. (A) Primeiro subcultivo, (B), segundo subcultivo, (C) terceiro subcultivo. Barra = 1cm.

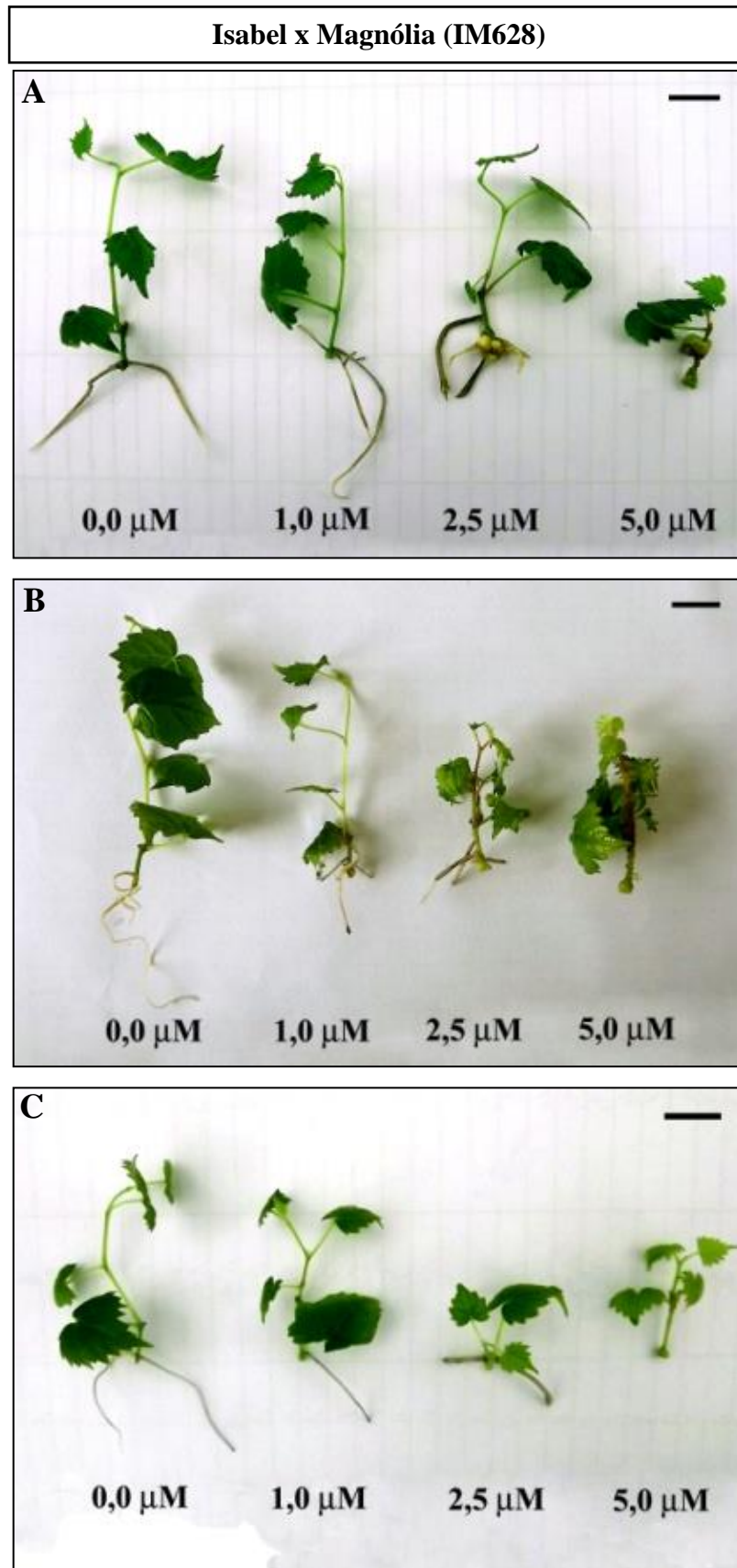


FIGURA 11 – Brotações do híbrido de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivar Magnólia) em diferentes concentrações de BAP. (A) Primeiro subcultivo, (B), segundo subcultivo, (C) terceiro subcultivo. Barra = 1cm.

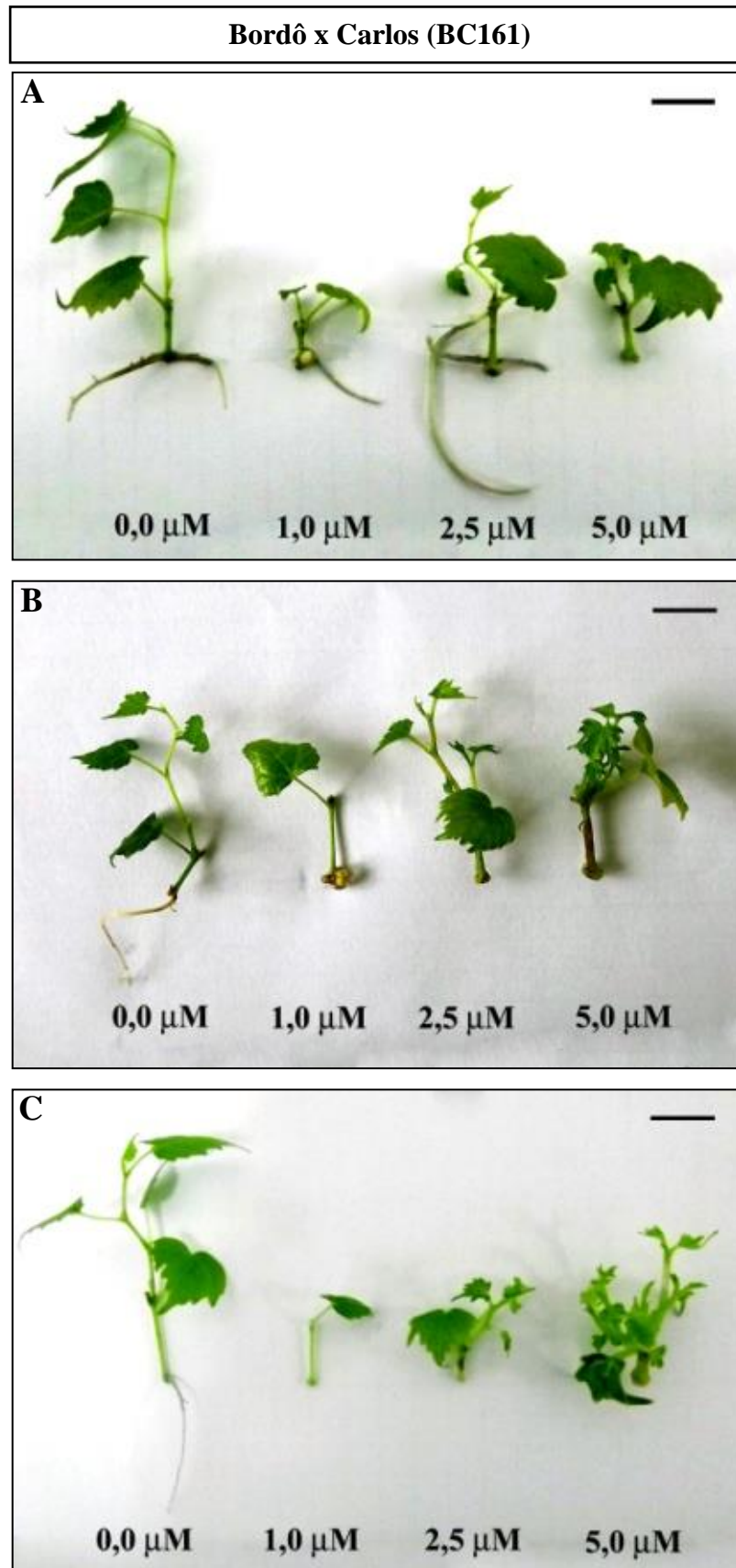


FIGURA 12 – Brotações do híbrido de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivar Carlos) em diferentes concentrações de BAP. (A) Primeiro subcultivo, (B), segundo subcultivo, (C) terceiro subcultivo. Barra = 1cm.

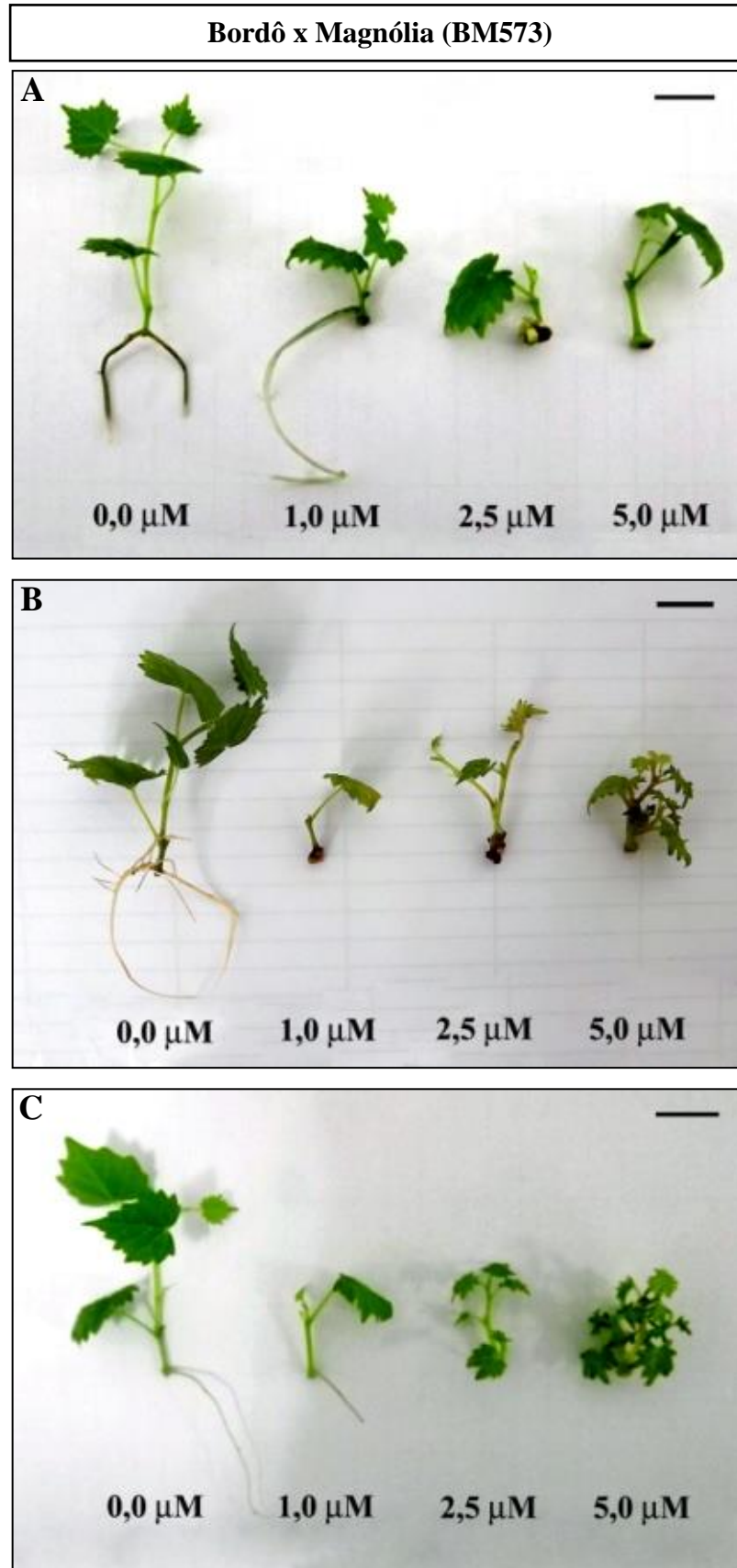


FIGURA 13 – Brotações do híbrido de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivar Magnólia) em diferentes concentrações de BAP. (A) Primeiro subcultivo, (B), segundo subcultivo, (C) terceiro subcultivo. Barra = 1cm.

4.4 CONCLUSÕES

O meio de cultura MS/2 suplementado com 5,0 μM de BAP é adequado para a multiplicação *in vitro* dos híbridos de videira *V. labrusca* x *V. rotundifolia* testados.

4.5 REFERÊNCIAS

- AYUB, R.A.; SPINARDI, B.; BASSO, M.F.; BIASI, L.A. Indução de multibrotação *in vitro* em videira cv. Bordô. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.32, n.3, p.675-681.
- BERND, R.B.; TRIVILIN, A.P.; CAMARGO, U.A.; CZERMAINSKI, A.B.C. Micropropagação de porta-enxertos híbridos de *Vitis labrusca* x *Vitis rotundifolia* com resistência à pérola-da-terra (*Eurhizococcus brasiliensis* Hempel, hemiptera: margarodidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.29, n.2, p.350-354, 2007.
- 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. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.55, n.2, p.45-49, 1998a.
- BOUQUET, A.; TORREGROSA, L. Micropropagation of the grapevine (*Vitis spp.*). In: JAIN, S. M. (Ed.). **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic, p.319-352, 2003.
- COLETTI, L.S.; MARTINS, C.R.; GOULART, M. Micropropagation of stock for grafting of grapevine Paulsen 1103 *in vitro*, with different citocinina concentrations. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v.15, n.1, p. 102-108, 2008.
- DZAZIO, P.M.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira 420-A. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.3, p. 759-764, 2002.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 2.ed. Edington: Exegetics, 1996, 1574p.
- 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, 1991.
- JONA, R.; WEBB, K. J. Callus and axillary-bud culture of *Vitis vinifera*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 9, p.55-60, 1978.

LEE, N.; WETZSTEIN, H.Y. *In vitro* propagation of muscadine grape by axillary shoot proliferation. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mont Vernon, v.115, n.2, p.324-329, 1990.

MACHADO, M.P.; BIASI, L.A.; RITTER, M.; RIBAS, L.L.F.; KOEHLER, H.S. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de videira VR 043-43 (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.4, p.648-655, 2006.

MHATRE, M.; SALUNKHE, C. K.; RAO, P. S. Micropropagation of *Vitis vinifera* L: towards an improved protocol. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 84, p. 357-363, 2000.

NOVAK, F.J.; JUVOVÁ, Z. Clonal propagation of grapevine through *in vitro* axillary bud culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.18, n.3, p.231-240, 1983.

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**, v. 20, p.293-300, 1996.

SCHUCK, M.R.; BIASI, L.A.; MARIANO, A.M.; LIPSKI, B.; RIAZ, S.; WALKER, M.A. Obtaining interspecific hybrids, and molecular analysis by microsatellite markers in grapevine. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n.46, p.1480-1488, 2011.

SILVA, F. de A.S.E.; AZEVEDO C.A.V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: World Congress on Computers in Agriculture, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

TORREGROSA, L.; BOUQUET A. *In vitro* propagation of *Vitis* x *Muscadinia* hybrids by microcuttings or axillary budding. **Vitis**, Geneva, v.34, n.4, p.237-238, 1995.

5 CAPITULO III

ENRAIZAMENTO *in vitro*, *ex vitro* E ACLIMATIZAÇÃO DE PORTA-ENXERTOS HÍBRIDOS DE VIDEIRA *V. labrusca* x *V. rotundifolia*

RESUMO

A rizogênese é uma importante etapa na micropropagação, pois é essencial para a sobrevivência das brotações durante a aclimatização. O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes concentrações de ácido naftaleno acético (ANA), 0,0; 0,2; 0,4 e 0,8 μM , no enraizamento *in vitro* e diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) 0, 500, 1000 e 1500 mg L^{-1} no enraizamento *ex vitro*, de híbridos de videira provenientes de segmentos nodais e sua posterior porcentagem de sobrevivência após aclimatização. Os híbridos utilizados foram: Isabel x Carlos (IC125), Isabel x Bountiful (IB481), Isabel x Magnólia (IM628), Bordô x Carlos (BC161) e Bordô x Magnólia (BM573) preestabelecidos *in vitro*, provenientes do décimo subcultivo em meio MS/2 isento de reguladores vegetais. Para o enraizamento *in vitro* após 30 dias de cultivo nas diferentes concentrações de ANA foi realizada a pré-aclimatização dos explantes, com abertura parcial dos frascos de cultivo no 30º dia, abertura total no 31º dia, os quais permaneceram abertos por mais dois dias. Após as avaliações no 34º dia, as brotações foram transferidas para tubetes contendo vermiculita e deixados em câmara de nebulização intermitente por 21 dias, após esse período foi avaliada a porcentagem de sobrevivência das brotações. Para o enraizamento *ex vitro* foram utilizadas brotações obtidas do décimo subcultivo em meio MS/2 isento de reguladores vegetais padronizadas em microestacas com duas folhas e tratadas com as diferentes soluções de AIB. As microestacas foram transplantadas em tubetes contendo vermiculita e mantidas em câmara de nebulização intermitente por 30 dias, após esse período foram realizadas as avaliações. Houve 100 % de enraizamento em todos os tratamentos para todos os híbridos testados. No enraizamento *in vitro* a sobrevivência foi alta para todos os híbridos, exceto para IB481 onde a maior taxa de sobrevivência observada foi de 42,11 % no tratamento sem ANA. Para os híbridos IC125 e BC161 a taxa de sobrevivência diminuiu gradualmente com o aumento da concentração de ANA, sendo a menor taxa observada na concentração de 0,8 μM . No enraizamento *ex vitro* as maiores taxas de sobrevivência foram observadas na testemunha e no tratamento de 500 mg L^{-1} de AIB para os híbridos IM628 e BC161, para os híbridos IC125 e BM573 os tratamentos não tiveram efeito para essa variável. Conclui-se que os híbridos de *V. labrusca* x *V. rotundifolia* testados enraízam facilmente tanto *in vitro*, quanto *ex vitro* sem a necessidade de auxinas exógenas.

Palavras-chave: muscadínia, ácido naftaleno acético, ácido indolbutírico.

***in vitro*, *ex vitro* ROOTING AND ACCLIMATIZATION OF GRAPEVINE HYBRID
ROOTSTOCKS *V. labrusca* x *V. rotundifolia***

ABSTRACT

Rhizogenesis is an important phase in micropropagation once it is essential for shoot survival during acclimatization. This study was aimed at evaluating different concentrations of naphthalene acetic acid (NAA), 0.0; 0.2; 0.4 and 0.8 μm , in *in vitro* rooting and different concentrations of indolebutyric acid (IBA), 0, 500, 1,000, and 1500 mg L^{-1} in *ex vitro* rooting, from grapevine hybrids from nodal segments and their subsequent survival rates after acclimatization. Hybrids used were: Isabel x Carlos (IC125), Isabel x Bountiful (IB481), Isabel x Magnólia (IM628), Bordô x Carlos (BC161), and Bordô x Magnólia (BM573) pre-established *in vitro* from the tenth subculture in medium MS/2 without plant growth regulators. For *in vitro* rooting after 30 days of cultivation at different NAA concentrations, pre-acclimatization of explants was carried out with partial opening of flasks on the 30th day, total opening on the 31st day, which remained open for the following two days. After evaluations on the 34th day, shoots were transferred to tubes containing vermiculite and left in intermittent mist for 21 days. After this period, shoot survival rate was evaluated. For *ex vitro* rooting, shoots from the tenth subculture were used in the medium MS/2 without plant growth regulators, standardized in micropiles with two leaves and treated with different IBA solutions. Micropiles were transplanted in tubes with vermiculite and kept in intermittent mist for 30 days. After this period, evaluations were carried out. There was 100% rooting in all treatments for hybrids tested. For *in vitro* rooting, survival was high for all hybrids, except for IB481, for which the highest survival rate observed was 42.11% in the treatment without NAA. For IC125 and BC161, the survival rate decreased gradually with the increasing NAA concentration and the lowest rate observed was 0.8 μm . For *ex vitro* rooting, the highest survival rates were observed in the control and in the treatment with 500 mg L^{-1} of IBA for IM628 and BC161. For hybrids IC125 and BM573, treatments had no effect for this variable. It is possible to conclude that the hybrids tested, *V. labrusca* x *V. rotundifolia*, can easily root both *in vitro* and *ex vitro* without exogenous auxins.

Key words: muscadine, naphthalene acetic acid, indolebutyric acid.

5.1 INTRODUÇÃO

A formação de raízes adventícias nas partes aéreas obtidas no estágio de multiplicação permite a constituição de plantas completas, para posterior transferência a condições *ex vitro*. Muitas vezes, as raízes formadas não apresentam características adequadas às funções de absorção, determinando, dentre outros fatores, a morte das mudas, quando transferidas para o solo. O processo de enraizamento é muito complexo, incluindo fatores fisiológicos, bioquímicos e biológicos (fatores internos) que interagem com os fatores externos. Além disso, a complexidade é aumentada pela variabilidade genética devido à multiplicidade das espécies e cultivares (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

O enraizamento *ex vitro* reduz o custo de produção das mudas, podendo viabilizar economicamente, o processo de micropropagação. Além disso, o enraizamento *ex vitro* tem a vantagem de diminuir as dificuldades associadas à sobrevivência e ao desenvolvimento das plantas cultivadas *in vitro* (GARCÍA; GONZÁLEZ, 1992; AUGUSTO; BIASI; TELLES, 2006).

O controle do desenvolvimento de raízes adventícias é influenciado por substâncias reguladoras de crescimento e as auxinas promovem a formação de primórdios radiciais adventícios (TAIZ; ZEIGER, 2013). As auxinas controlam processos distintos, tais como crescimento e alongação celular, sendo muito utilizadas em micropropagação para promover a formação e crescimento de calos e de suspensão de células ou órgãos, bem como para regular a morfogênese, especialmente associadas com citocininas. As auxinas sintéticas mais comumente usadas na micropropagação de videira são o ANA (ácido naftaleno acético) e o AIB (ácido indolbutírico) (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998; PASQUAL *et al.*, 1997).

O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes concentrações de ANA no enraizamento *in vitro* das brotações de porta-enxertos híbridos de videira *V. labrusca* x *V. rotundifolia*, e a posterior porcentagem de sobrevivência na aclimatização.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micropropagação de Plantas e na casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

5.2.1 Condições de cultivo *in vitro*

Todas as culturas *in vitro* foram mantidas em sala de crescimento, sob luz fluorescente branca fria com densidade de fluxo de fótons de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 h e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Os meios de cultura tiveram o pH ajustado para 5,8 e foram esterilizados em autoclave durante 20 min a 120°C .

5.2.2 Fonte de explantes

Para confecção dos explantes para o enraizamento *in vitro* foram utilizadas brotações de híbridos de videira *V. labrusca* x *V. rotundifolia*, oriundas dos cruzamentos das seguintes cultivares: Isabel x Carlos, Isabel x Bountiful, Isabel x Magnólia, Bordô x Carlos e Bordô x Magnólia (SCHUCK *et al.*, 2011) já preestabelecidas *in vitro* provenientes do décimo subcultivo em meio de cultura MS/2 isento de reguladores vegetais.

5.2.3 Fonte de microestacas

Para confecção das microestacas foram utilizadas brotações de híbridos de videira *V. labrusca* x *V. rotundifolia*, oriundas dos cruzamentos das seguintes cultivares: Isabel x Carlos, Isabel x Magnólia, Bordô x Carlos e Bordô x Magnólia (SCHUCK *et al.*, 2011) já preestabelecidas *in vitro* provenientes do décimo subcultivo em meio de cultura MS/2 isento de reguladores vegetais.

5.2.4 Diferentes concentrações de ANA (ácido naftaleno acético) no enraizamento *in vitro* e aclimatização das brotações

Segmentos nodais obtidos do décimo subcultivo em meio MS/2 isento de reguladores vegetais suplementado com 6 g L^{-1} de ágar (Vetec®), dos híbridos Isabel x Carlos, Isabel x Bountiful, Isabel x Magnólia, Bordô x Carlos e Bordô x Magnólia (SCHUCK *et al.*, 2011), padronizados com 0,5 cm de comprimento e uma folha, foram cultivados em meio de cultura

MS/2, suplementado com as vitaminas do meio MS, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, e 6 g L⁻¹ de ágar (Vetec®). Os tratamentos consistiram de diferentes concentrações de ANA (0,0; 0,2; 0,4 e 0,8 µM). Foram utilizados frascos individuais contendo 10 mL de meio de cultura, tampados com alumínio.

Após 30 dias de cultivo foi realizado o processo de pré-aclimatização, que consistiu da abertura parcial dos frascos no 30º dia e abertura total dos frascos no 31º, após 2 dias com os frascos abertos (34º dia) foi realizada a avaliação, as variáveis analisadas foram: porcentagem de explantes com brotação, número de raízes por explante e comprimento médio de raízes (cm) por explante.

Após a avaliação as brotações foram transplantadas em tubetes plásticos de 53 cm³ contendo vermiculita e mantidas em câmara de nebulização intermitente por 21 dias e em seguida foram levadas para casa de vegetação, onde foi avaliada a porcentagem de sobrevivência das brotações.

5.2.5 Diferentes concentrações de AIB (ácido indolbutírico) no enraizamento *ex vitro* das microestacas

As brotações obtidas do décimo subcultivo em meio MS/2 isento de reguladores vegetais foram padronizadas em microestacas com duas folhas, a base das estacas foi imersa por 10 segundos em solução de AIB diluído em etanol 50%. Os tratamentos consistiram de diferentes concentrações de AIB (0; 500; 1000 e 1500 mg L⁻¹).

As microestacas foram transplantadas em tubetes plásticos de 53 cm³ contendo vermiculita e mantidas em câmara de nebulização intermitente por 30 dias, após esse período foi realizada a avaliação, as variáveis analisadas foram: porcentagem de microestacas brotadas, número de raízes por microestaca, comprimento médio de raízes por microestaca (cm) e porcentagem de sobrevivência de microestacas.

5.2.6 Análise estatística e delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições e 10 explantes por parcela para cada híbrido testado. Os dados foram submetidos à análise de variância e análise de regressão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa ASSISTAT versão 7.6 (SILVA; AZEVEDO, 2009).

5.2.7 Identificação dos híbridos

Para organização e manuseio dos híbridos em laboratório e casa de vegetação, foram estabelecidos os seguintes códigos para a identificação dos cruzamentos:

- Isabel x Carlos = IC125
- Isabel x Bountiful = IB481
- Isabel x Magnólia = IM628
- Bordô x Carlos = BC161
- Bordô x Magnólia = BM573

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Diferentes concentrações de ANA (ácido naftaleno acético) no enraizamento *in vitro* e aclimatização das brotações

A porcentagem de explantes brotados diminuiu com o aumento da concentração de ANA para todos os híbridos testados, exceto para o IM628 onde as concentrações de ANA não demonstraram efeito para essa variável (Figura 14A, 14B e 14C e Figura 15A E 15B), PEIXOTO e PASQUAL (1992) também observaram que o aumento na concentração de ANA reduziu o número de brotações produzidas do porta-enxerto de videira 'Paulsen 1103'. Esses resultados concordam com os obtidos por NOVAK e JUVOVÁ (1983), que verificaram efeitos prejudiciais da adição de ANA em meio de cultura para regeneração de segmentos nodais de videira.

A diminuição no número de brotações com o aumento da concentração de ANA pode-se dever ao fato de que o estresse salino pode afetar o crescimento celular e a expansão das folhas, tanto pela redução na pressão de turgescência como na extensibilidade da parede celular (PRISCO, 1980). A adição de ANA ao meio também provoca desbalanceamento da relação endógena de auxinas e citocininas, reduzindo o número de brotações produzidas.

A porcentagem de enraizamento atingiu 100 % para todos os híbridos testados e em todos os tratamentos, incluindo a testemunha, demonstrando que não há necessidade de adição de auxinas exógenas no meio de cultura para promover a rizogênese.

Esse resultado é semelhante ao obtido por DZAZIO; BIASI e ZANETTE (2002) em que 80 % dos segmentos nodais apresentaram raízes nos meios de cultura MS/2 e MS/2 mais carvão ativado. BIASI; PASSOS e POMMER (1998) obtiveram em segmentos nodais do porta-enxerto 'Jales', taxas de enraizamento próximas de 100 %, no meio MS/2 sem auxina.

Vários autores obtiveram enraizamento em meio de cultura sem a adição de reguladores vegetais, apesar da adição de auxinas, em geral, promover o aumento da porcentagem de enraizamento, que não atingiu 100 % nos trabalhos encontrados na literatura com uvas muscadíneas (LEE; WETZSTEIN, 1990; GRAY; BENTON, 1991; TORREGROSA; LOPEZ, 1996; NASR EL-DIN; RIZK; MADKOUR, 1997).

Já para algumas cultivares, a presença de auxina no meio é importante para o bom enraizamento, como no trabalho de GRAY e KLEIN (1989) que obtiveram 94% de enraizamento da cultivar Orlando Seedless, utilizando o meio C₂D com 0,4 µM ANA e também no trabalho de GRAY e BENTON (1991) que obtiveram 55 % de enraizamento de

brotações de cultivares de *V. rotundifolia* cultivadas em meio MS sem auxina e 77% com auxina.

O número de raízes por explante aumentou linearmente com o aumento da concentração de ANA, chegando a 2,88, 2,10, 3,1, 2,47 e 3,46 raízes por explante para os híbridos IC125, IB481 e IM628, BC161 e BM573 respectivamente na concentração de 0,8 μM de ANA (Figura 14D, 14E e 14F e Figura 15D e 15D). Esse resultado é semelhante aos encontrados por GRAY e BENTON (1991) em que a cultivar Carlos obteve 2,6 raízes por explante em meio de cultura com 1,0 μM de ANA, porém para as cultivares Welder e Jumbo essa concentração de ANA não se mostrou eficiente, apresentando apenas 1,2 e 0,8 raízes por explante.

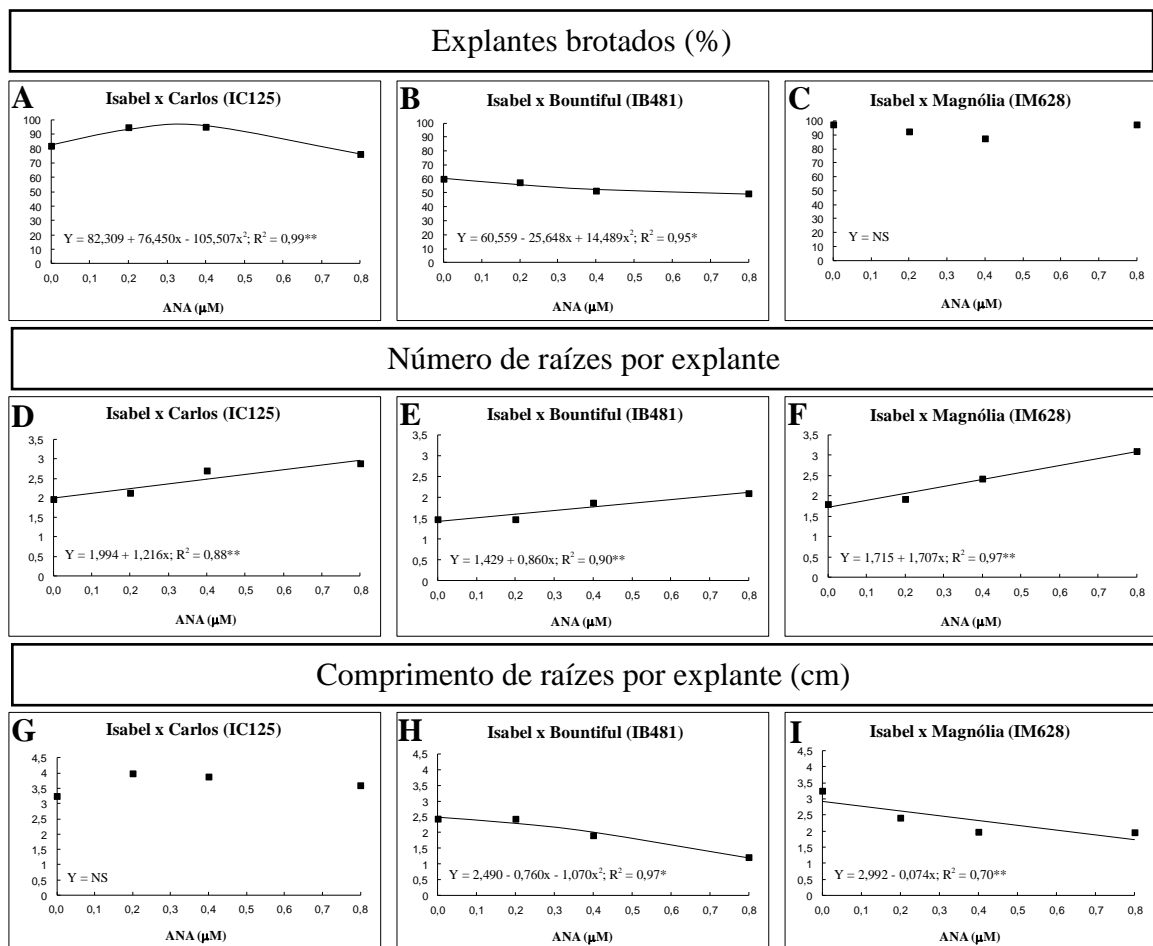


FIGURA 14 – Diferentes concentrações de ANA na porcentagem de explantes com brotação (A, B e C), número de raízes por explante (D, E e F) e comprimento de raízes (G, H e I) de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos, Bountiful e Magnólia) após 30 dias de cultivo *in vitro* e 4 dias de pré-aclimatização.

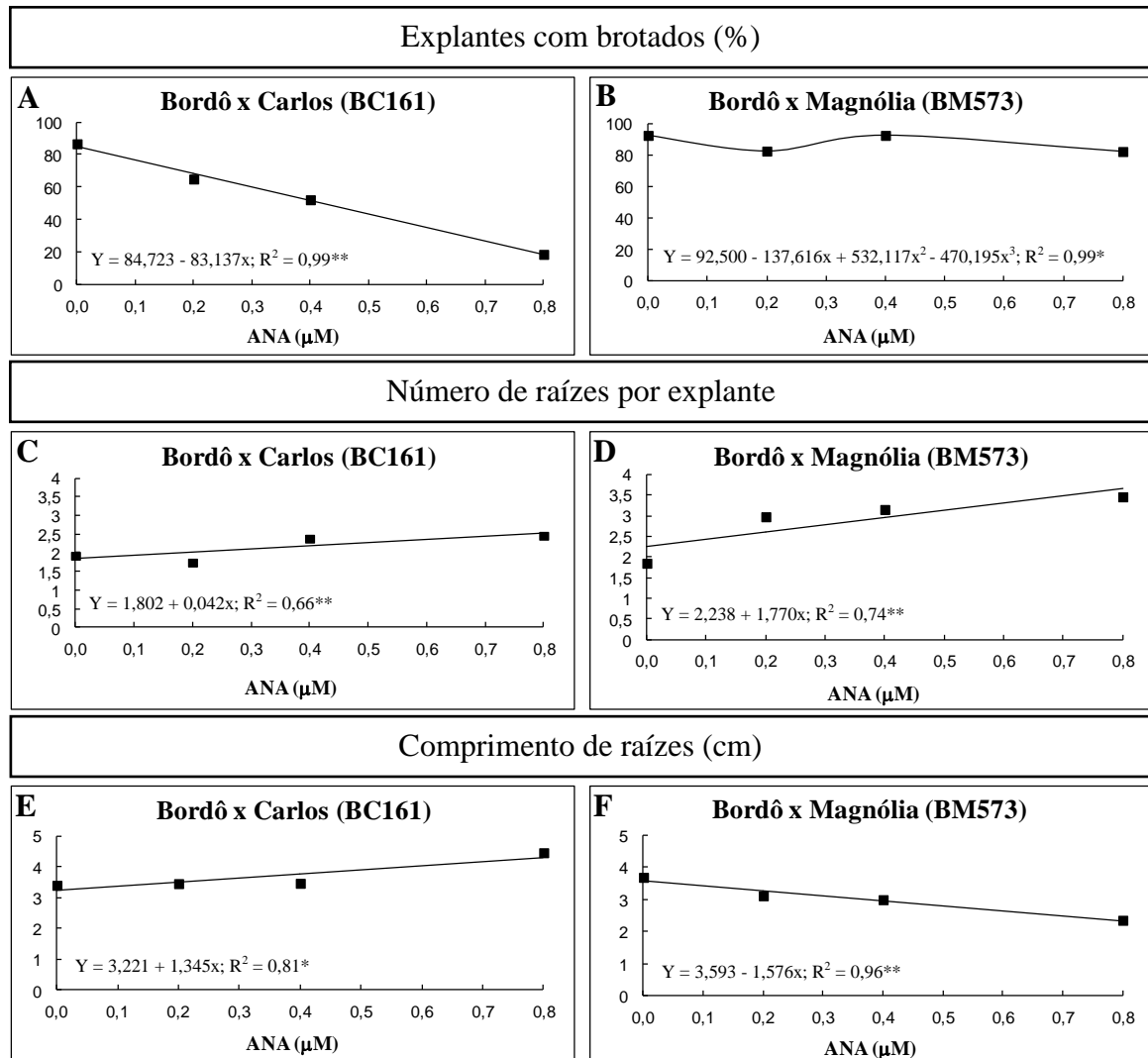


FIGURA 15 - Diferentes concentrações de ANA na porcentagem de explantes com brotação (A e B), número de raízes por explante (C e D) e comprimento de raízes (E e F) de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia) após 30 dias de cultivo *in vitro* e 4 dias de pré-aclimatização.

Já VILLA *et al.* (2008), observaram que com o aumento das concentrações de ANA ocorreu um decréscimo de forma quadrática no número de raízes do porta-enxerto 'VR 043-43'. PEIXOTO *et al.*, (1994) obtiveram resultados inferiores a este estudo com 1,42 e 1,35 raiz por explante do porta-enxerto 'R99', nos tratamentos com 0,22 µM e 0,44 µM de ANA respectivamente.

Apesar do aumento no número de raízes com o aumento da concentração de ANA, os híbridos testados demonstraram enraizar mesmo sem a presença dessa auxina no meio de cultura. Outros autores também observaram resultados semelhantes como SILVA *et al.* (2003), que obtiveram 1,3, 1,6 e 2,3 raízes para os porta-enxertos 'Paulsen', 'VR 043-43' e

‘Gravesac’ respectivamente em meio DSD1 sem reguladores vegetais e AYUB *et al.* (2010), que obtiveram em meio MS/2 sem auxina 2,3 raízes por explante da cultivar Bordô.

O comprimento de raízes diminuiu com o aumento da concentração de ANA para os híbridos IB481, IM628 e BM573 apresentando raízes com 2,43, 3,25 e 3,69 cm respectivamente em meio MS/2 sem auxina e 1,21, 1,96 e 2,35 cm respectivamente, na maior concentração de ANA (0,8 μM) (Figura 14H e 14I e Figura 15F). Porém, não houve efeito significativo para o híbrido IC125 (Figura 14G) e para o híbrido BC161 houve um aumento linear no número de raízes com ao aumento da concentração de ANA (Figura 15E).

A diminuição no comprimento de raízes pode ser explicada pelo fato de que as auxinas são necessárias apenas na fase de indução da rizogênese, sendo prejudiciais na fase de alongamento das mesmas. Por esta razão é, às vezes, recomendada a utilização de dois meios de cultura para a rizogênese. Primeiramente, as partes aéreas permanecem em meio com auxina, favorecendo a indução e posteriormente passaria para meio sem auxina, estimulando assim a rizogênese e o crescimento das raízes. Este processo tem sido adotado com frequência em espécies lenhosas, coníferas e frutíferas (FETT NETO *et al.*, 1992).

A aclimatização é uma fase da micropropagação que pode ser crítica se não permitir elevada taxa de sobrevivência das plantas (SILVA *et al.*, 2007). Na aclimatização as plantas sofrem muitos estresses durante as condições *in vitro* para as condições *ex vitro*, pois apresentam conexões vasculares entre caule e raízes ainda deficientes, além de excessiva transpiração devido aos estômatos não funcionais e à precária camada de cera epicuticular. Devido a esses fatores é realizada a pré-aclimatização das brotações, para que estas se adaptem ao ambiente *ex vitro*. As Figuras 16 e 17 demonstram que o método de pré-aclimatização utilizado neste estudo não prejudicou a integridade das brotações a serem aclimatizadas.

A porcentagem de sobrevivência após a aclimatização foi alta em todos os tratamentos para o híbrido IC125, sendo a maior porcentagem observada no tratamento sem auxina (95,83%) diminuindo com o aumento da concentração de ANA (Tabela 15). Essa diminuição também foi observada para o híbrido BC161 onde a maior porcentagem de sobrevivência foi observada no tratamento sem auxina (76,19%) e a menor porcentagem foi observada na maior concentração de ANA (25%) (Tabela 16). Para o IM628 as maiores porcentagens de sobrevivência foram observadas no tratamento sem auxina (95%) e na concentração de 0,8 μM de ANA (97,5%) (Tabela 15). Para o BM573 as maiores porcentagens de sobrevivência

foram observadas nos tratamentos sem auxina e 0,4 μM de ANA com 87,5 e 90% respectivamente (Tabela 16).

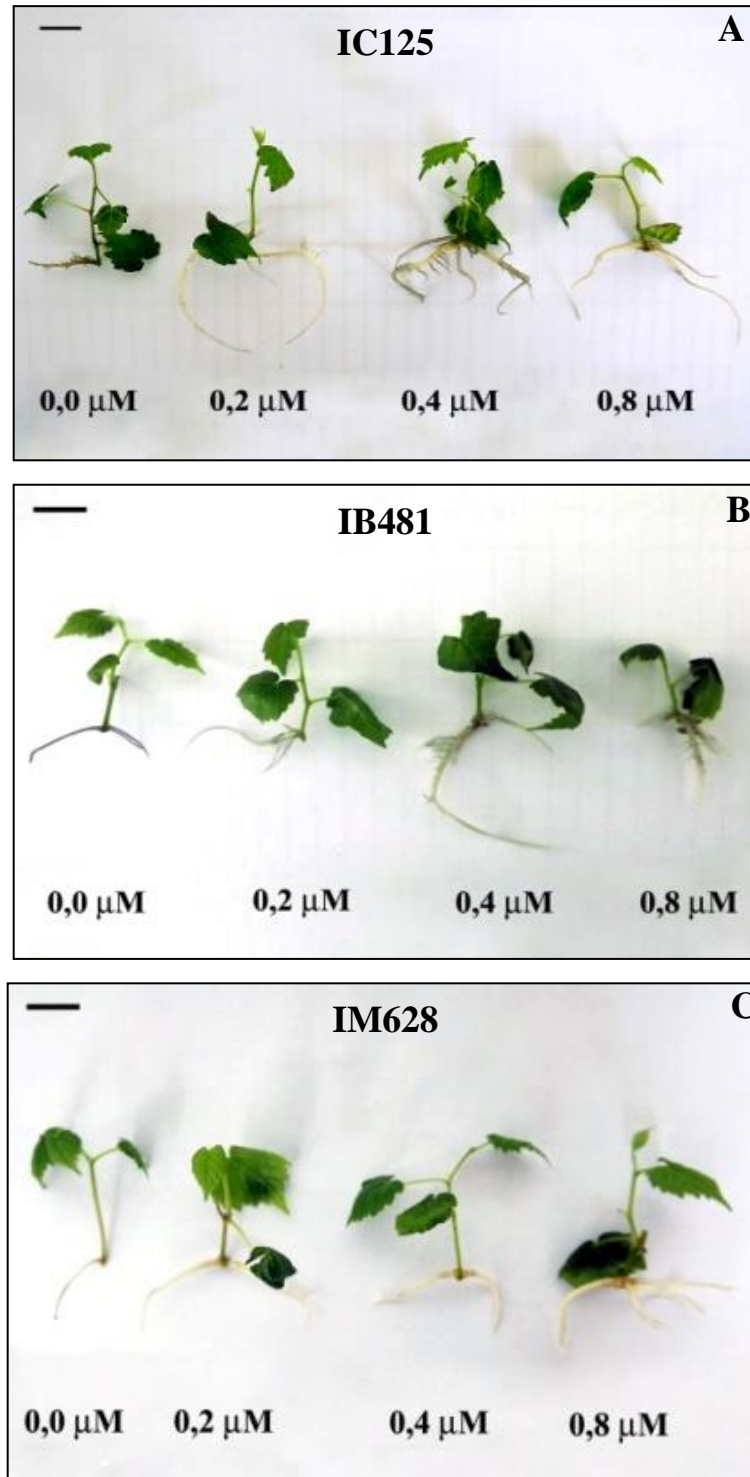


FIGURA 16 – Brotações de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos (A), Bountiful (B) e Magnólia (C)) após 30 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de ANA e 4 dias de pré-aclimatização. Barra = 1cm.

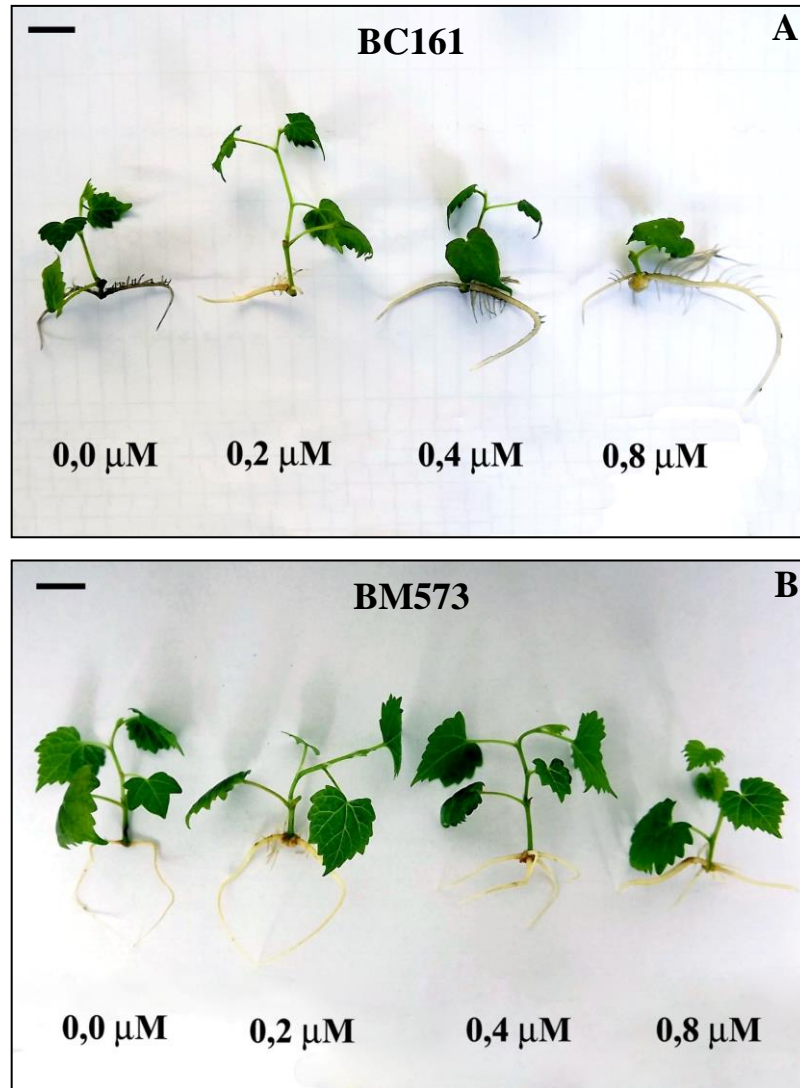


FIGURA 17 – Brotações de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos (A) e Magnólia (B)) após 30 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de ANA e 4 dias de pré-aclimatização. Barra = 1 cm.

O híbrido IB481 apresentou a menor porcentagem de sobrevivência entre todos os testados, sendo 42,11% a maior taxa observada (no tratamento sem auxina) (Tabela 15), observa-se também que esse híbrido foi o que apresentou a menor porcentagem de explantes com brotações (apenas 60%) (Figura 14B), o que é um número baixo comparado aos outros híbridos testados. Esse resultado demonstra a importância das brotações e das folhas na sobrevivência durante a aclimatização, pois são responsáveis pela realização da fotossíntese, e pela produção e translocação de substâncias necessárias ao desenvolvimento das brotações.

As altas porcentagens de sobrevivência após aclimatização encontradas nesse estudo são semelhantes às encontradas por SILVA *et al.*, (2003) de 96% para o porta-enxerto

‘Paulsen 1103’, 95% para o ‘Gravesac’ e 93% para o ‘VR 043-43’ e por BIASI, PASSOS e POMMER (1998) de 92,5% para o porta-enxerto ‘Jales’.

TABELA 15 – Porcentagem de sobrevivência de explantes de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos, Bountiful e Magnólia) em diferentes concentrações de ANA após 21 dias de aclimatização em câmara de nebulização.

Sobrevivência (%)			
ANA (μM)	Isabel x Carlos (1C125) ¹	Isabel x Bountiful (IB481) ¹	Isabel x Magnólia (IM628) ¹
0,0	95,83 a	42,11 a	95,00 a
0,2	83,78 b	34,21 a	65,00 c
0,4	79,49 c	21,62 b	85,00 b
0,8	74,19 d	21,43 b	97,50 a
C.V. (%)	2,34	13,27	3,17

¹ As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 16 – Porcentagem de sobrevivência de explantes de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia) em diferentes concentrações de ANA após 21 dias de aclimatização em câmara de nebulização.

Sobrevivência (%)		
ANA (μM)	Bordô x Carlos (BC161) ¹	Bordô x Magnólia (BM573) ¹
0,0	76,19 a	87,50 a
0,2	75,00 a	80,00 b
0,4	41,67 b	90,00 a
0,8	25,00 c	77,50 b
C.V. (%)	4,99	3,24

¹ As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

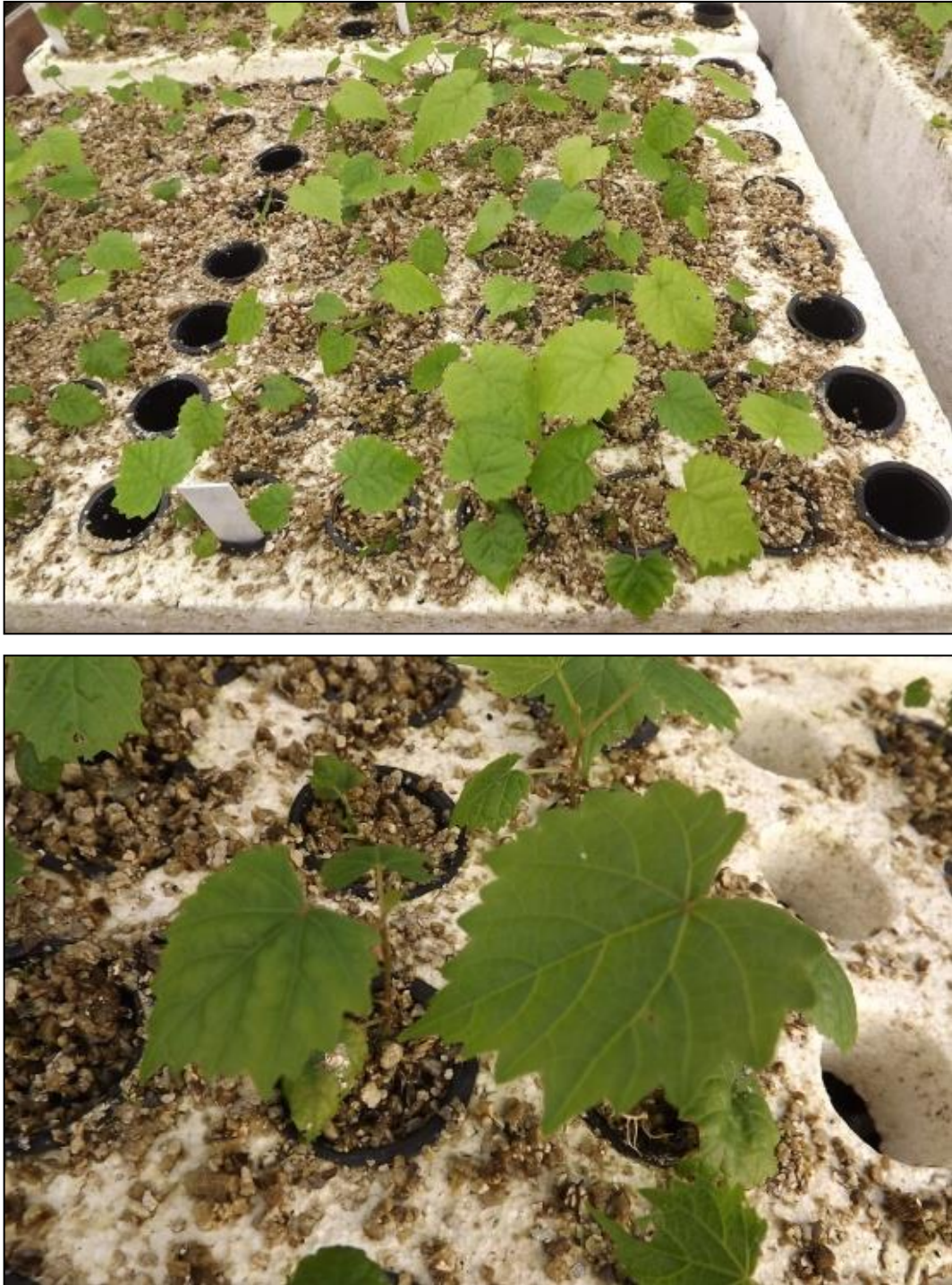


FIGURA 18 – Brotações dos híbridos de videira *V. labrusca* x *V. rotundifolia* após 21 dias de aclimatização em câmara de nebulização.

5.3.2 Diferentes concentrações de AIB (ácido indolbutírico) no enraizamento *ex vitro* das microestacas

Observa-se nas tabelas 17 e 18 que não houve efeito dos tratamentos quanto a porcentagem de brotações para os híbridos testados, exceto para o híbrido BC161, onde o tratamento sem AIB obteve a maior porcentagem de microestacas brotadas (95,83%) e os tratamentos com 1.000 mg L⁻¹ e 1.500 mg L⁻¹ de AIB as menores com 42,08 e 43,75% respectivamente. Essa tendência de redução das brotações em estacas herbáceas, pode ocorrer, possivelmente, quando a auxina sintética mobiliza nutrientes, inibindo a brotação quando aplicada na base da microestaca (FELIPPE, 1986).

TABELA 17 – Porcentagem de microestacas brotadas de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia) em diferentes concentrações de AIB após 30 dias em câmara de nebulização.

AIB (mg L ⁻¹)	Isabel x Carlos (IC125) ^{ns}	Isabel x Magnólia (IM628) ^{ns}
Microestacas brotadas (%)		
0	72,92	75,00
500	50,00	62,26
1000	75,00	29,47
1500	20,83	58,82
C.V. (%)	58,98	38,28

ns = não significativo.

TABELA 18 – Porcentagem de microestacas brotadas de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia) em diferentes concentrações de AIB após 30 dias em câmara de nebulização.

AIB (mg L ⁻¹)	Bordô x Carlos (BC161) ¹	Bordô x Magnólia (BM573) ^{ns}
Microestacas brotadas (%)		
0	95,83 a	83,03
500	61,31 ab	70,98
1000	42,08 b	85,42
1500	43,75 b	79,38
C.V. (%)	34,45	20,56

¹ As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ns = não significativo.

De acordo com ZUFFELLATO-RIBAS e RODRIGUES (2001), a auxina sintética, dependendo da concentração e tempo de exposição, inibe ou estimula o crescimento e a diferenciação dos tecidos, existindo um nível ótimo para estas respostas fisiológicas, dependendo diretamente dos níveis endógenos dessas substâncias.

Houve 100% de enraizamento para todos os híbridos testados em todos os tratamentos, o que demonstra a facilidade de enraizamento desses genótipos, sem a necessidade de auxinas exógenas, ou seja, os níveis endógenos de auxinas das microestacas são satisfatórios para promover a rizogênese.

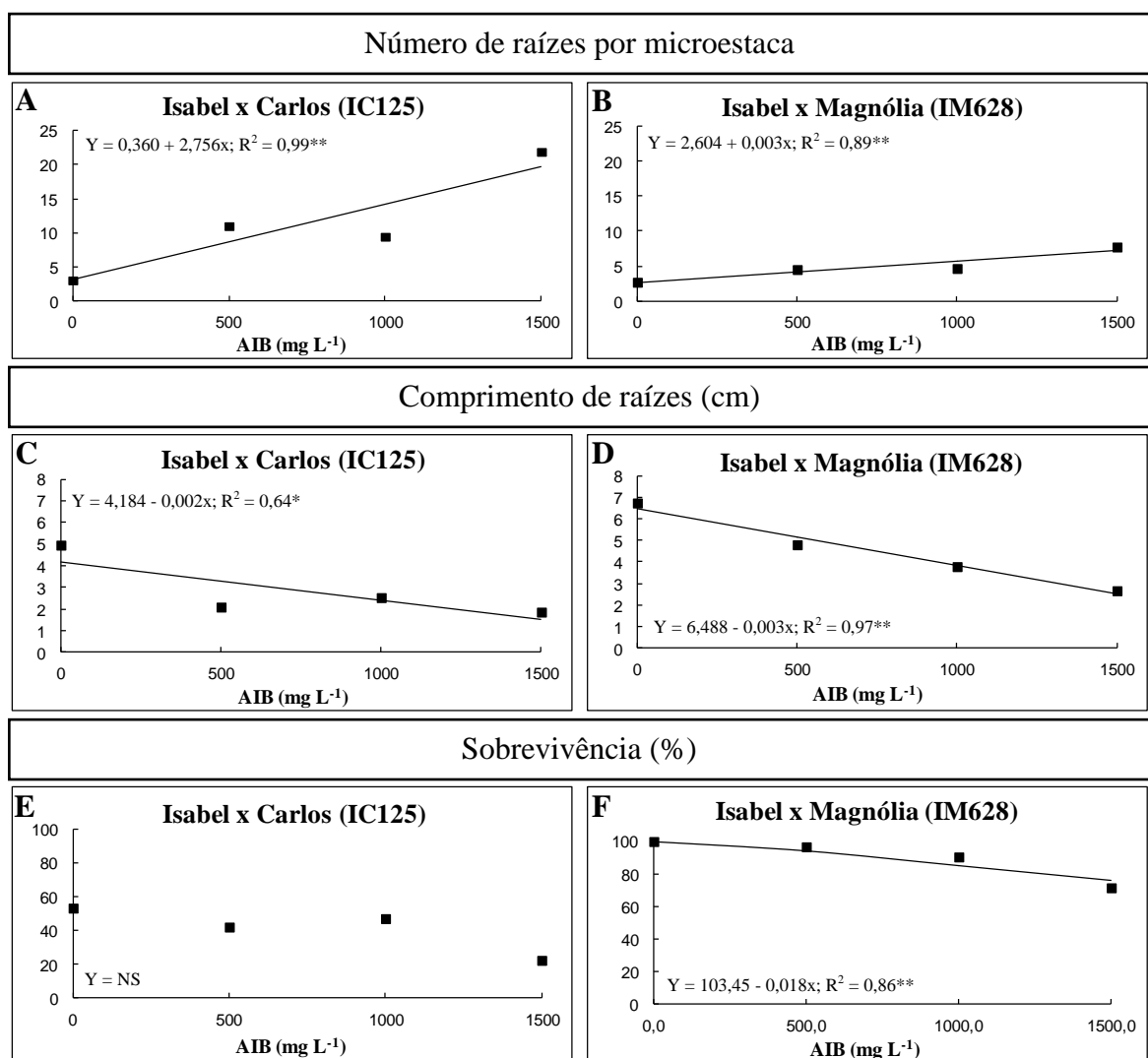


FIGURA 19 – Diferentes concentrações de AIB no número de raízes por microestaca (A e B), comprimento de raízes (cm) por microestaca (C e D) e sobrevivência (%) de microestacas (E e F) após 30 dias de enraizamento *ex vitro* de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia).

O número de raízes por microestaca aumentou com o aumento da concentração de AIB para todos os híbridos (Figuras 21 e 22), chegando a 21,96 raízes para o híbrido IC125 (Figura 19A), 7,74 raízes para o IM628 (Figura 19B), 10,25 raízes para o BC161 (Figura 20A) e 6,23 raízes para o BM573 (Figura 20B), na concentração de 1500 mg L⁻¹ de AIB.

BOTELHO *et al.* (2005a) também observaram o incremento no número de raízes em estacas herbáceas do porta-enxerto 'VR 043-43' tratadas com AIB, que chegou a 21,2 raízes por estaca na dose de 1000 mg L⁻¹.

O comprimento de raízes diminuiu linearmente com o aumento das concentrações de AIB para todos os híbridos testados (Figuras 21 e 22), sendo o maior comprimento de raízes observado na testemunha, 4,95 cm para o híbrido IC125 (Figura 19C), 6,74 cm para o IM628 (Figura 19D), 3,29 cm para o BC161 (Figura 20C) e 5,85 para o BM573 (Figura 20D). Nos estágios iniciais de indução do enraizamento, altas concentrações de auxinas são necessárias, mas são inibitórias à organização e crescimento dos primórdios radiciais (TAIZ; ZEIGER, 2013).

BOTELHO *et al.* (2005b) também observaram para o porta-enxerto 'VR 043-43' o efeito negativo das concentrações de AIB em estaquia, onde a testemunha também apresentou comprimento de raízes superior ao das estacas tratadas com AIB (9,29 cm). Já em outros trabalhos como o de FARIA *et al.* (2007) com estaquia do porta-enxerto 'Jales', as concentrações de AIB não mostraram diferença estatística, porém apesar de não haver diferença a testemunha apresentou maior comprimento de raízes (3,3 cm) em comparação com a concentração de 2000 mg L⁻¹ de AIB (1,6 cm).

A porcentagem de sobrevivência diminuiu linearmente com a concentração de AIB para os híbridos IM628 (Figura 19F) e BC161 (Figura 20E). BIASI, POMMER e PINO (1997) também observaram que o aumento da concentração de AIB causou uma elevação na mortalidade das estacas dos porta-enxertos 'Jales', 'Campinas', 'Ripária do Traviú' e 'Kober 5BB', sendo encontrada uma regressão linear significativa para essa variável. Isso evidencia um efeito tóxico das concentrações mais elevadas de AIB. LONE *et al.* (2010) encontraram para o porta-enxerto 'VR 043-43' um resultado semelhante onde para as doses aplicadas de AIB foi verificada maior porcentagem de sobrevivência no grupo controle (sem aplicação de AIB).

MACHADO *et al.* (2005) encontraram um resultado semelhante com estacas do porta-enxerto 'VR 043-43', em que a porcentagem de estacas mortas teve um comportamento quadrático crescente, de acordo com a análise de regressão. A menor porcentagem de estacas

mortas ocorreu na ausência de AIB (2,5 %), enquanto com a maior concentração da auxina (3.000 mg L⁻¹) utilizada, obtiveram-se 43,8 % de estacas mortas.

Já para os híbridos IC125 e BM573 não houve efeito dos tratamentos para essa variável, porém, para o IC125, observa-se que houve diminuição de 53% para 22% de sobrevivência da testemunha para a maior concentração de AIB utilizada (Figura 19E), enquanto que para o BM573 as porcentagens de sobrevivência foram próximas a 100% em todos os tratamentos (Figura 20F).

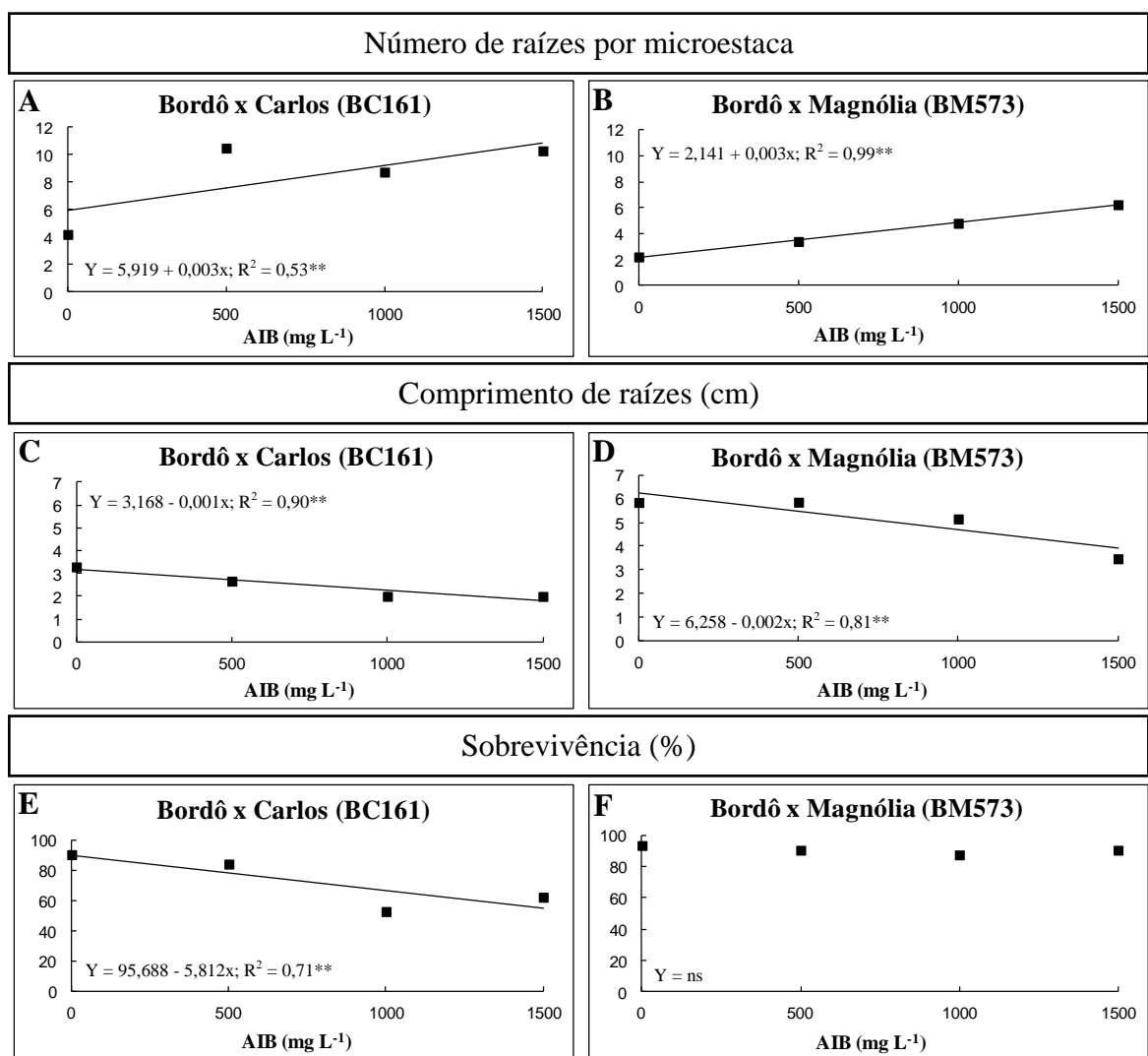


FIGURA 20 – Diferentes concentrações de AIB no número de raízes por microestaca (A e B), comprimento de raízes (cm) por microestaca (C e D) e sobrevivência (%) de microestacas (E e F) após 30 dias de enraizamento *ex vitro* de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia).

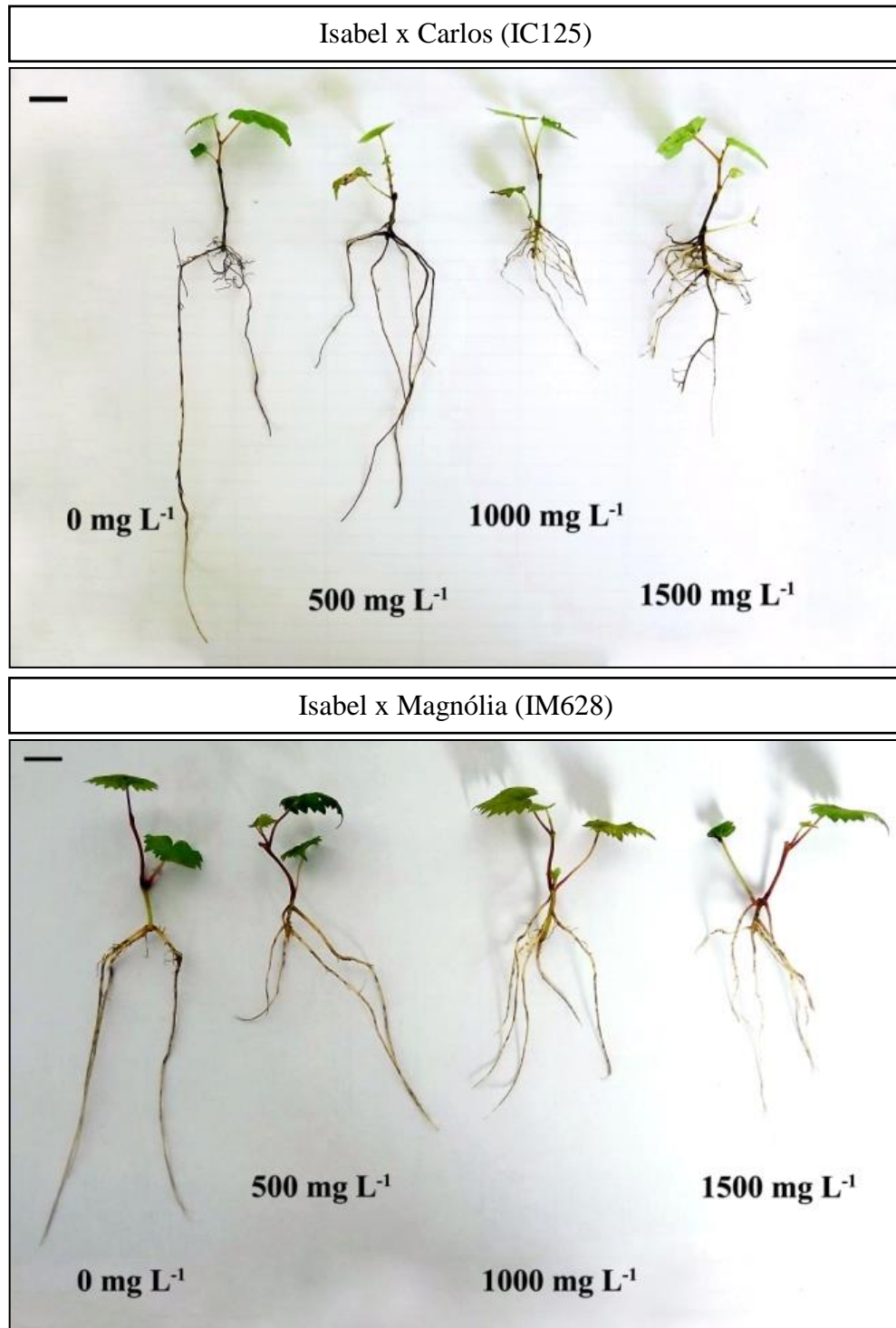


FIGURA 21 – Microestacas de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Isabel) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia) em diferentes concentrações de AIB, após 30 dias de enraizamento *ex vitro*. Barra = 1 cm.

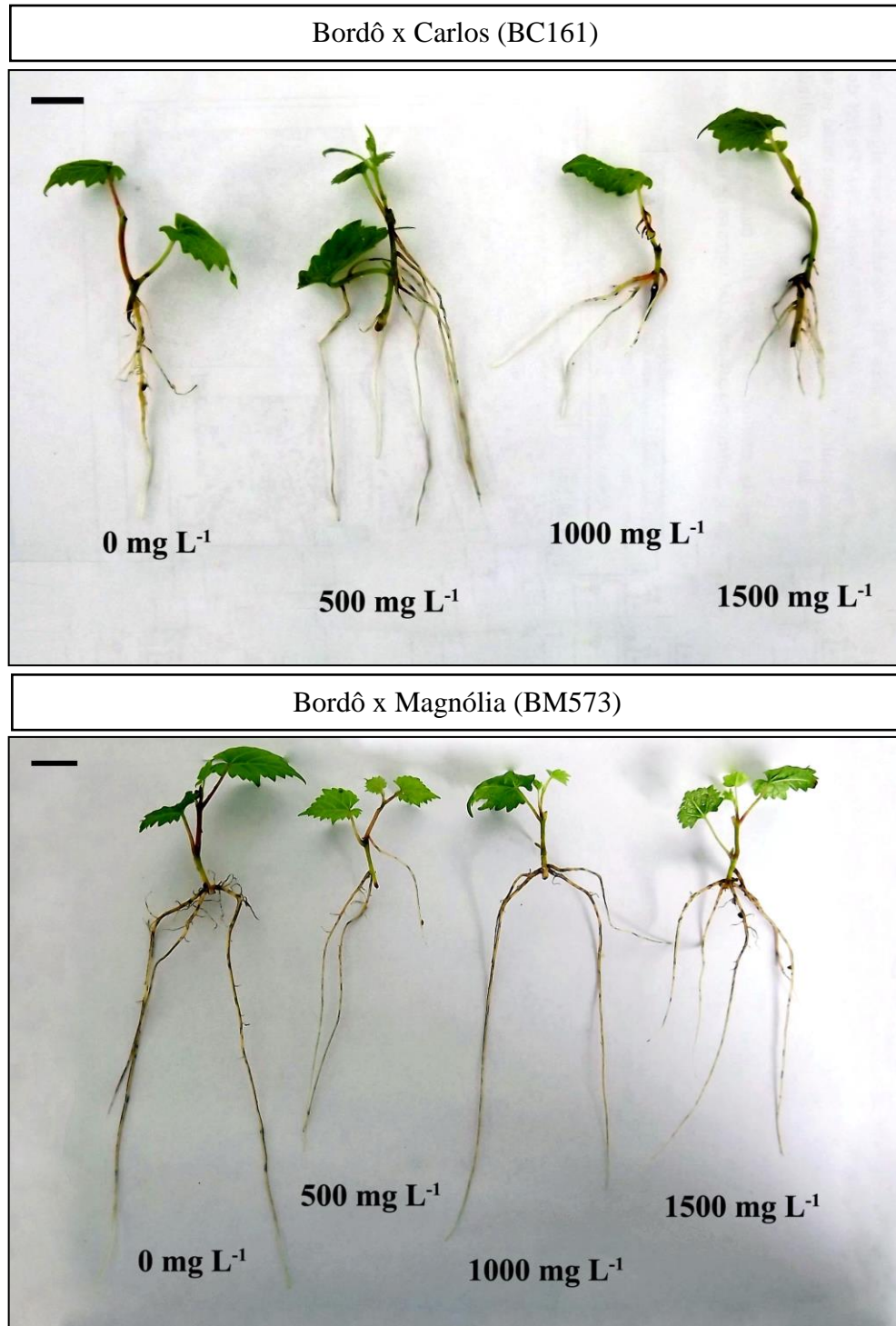


FIGURA 22 – Microestacas de híbridos de videira *V. labrusca* (cultivar Bordô) x *V. rotundifolia* (cultivares Carlos e Magnólia) em diferentes concentrações de AIB, após 30 dias de enraizamento *ex vitro*. Barra = 1 cm.

5.4 CONCLUSÕES

Os híbridos *V. labrusca* x *V. rotundifolia* testados enraízam facilmente tanto *in vitro*, quanto *ex vitro*, sem a necessidade de adição de auxinas exógenas no meio de cultura ou de sua aplicação nas microestacas.

5.5 REFERÊNCIAS

AYUB, R.A.; SPINARDI, B.; BASSO, M.F.; BIASI, L.A. Indução de multibrotação *in vitro* em videira cv. Bordô. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.32, n.3, p.675-681, 2010.

ASSIS, T.F. de; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa CNPH, 1998. p. 261-296.

AUGUSTO, C.S.S.; BIASI, L.A.; TELLES, C.A. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de Amoreira-preta cv. 'Brazos'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.3, p.473-476, 2006.

BIASI, L.A.; POMMER, C.V.; PINO, P.A.G.S Propagação de porta-enxertos de videira mediante estaquia semilenhosa. **Bragantia**, Campinas, v.56, n.2, p. 367-376, 1997.

BOTELHO, R.V.; MAIA, A.J.; PIRES, E.J.P.; TERRA, M.M.; SCHUCK, E. Efeitos de reguladores vegetais na propagação vegetativa do porta-enxerto de videira '43-43' (*Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n.1, p.6-8, 2005a.

BOTELHO, R.V.; MAIA, A.J.; PIRES, E.J.P.; TERRA, M.M.; SCHUCK, E. Estaquia do porta-enxerto de videira '43-43' (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*) resistente à *Eurhizococcus brasiliensis*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n.3, p.480-483, 2005b.

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

DÍAZ-PÉREZ, J.C.; SUTTER, E.G.; SHACKEL, K.A. Acclimatization and subsequent gas-exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.95, p. 225-232, 1995.

DZAZIO, P.M.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira 420-A. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.3, p. 759-764, 2002.

FETT NETO, A.G.; TEIXEIRA, S.L.; SILVA, E.A.M.; SANTNNA, R. Biochemical and morphological changes during *in vitro* rhizogenesis in cuttings of *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.140, p.720-728, 1992.

FARIA, A.P.; ROBERTO, S.R.; SATO, A.J.; RODRIGUES, E.B.; SILVA, J.V.; SACHS, P.J.D.; CAMOLESI, M.R.; UNEMOTO, L.K. Enraizamento de estacas semilenhosas do porta-enxerto de videira 'IAC 572-Jales' tratadas com diferentes concentrações de ácido indolbutírico. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina v.28, n.3, p.393-398, 2007.

FELIPPE, G.M. Desenvolvimento. In: FERRI, M.G. (coord.). **Fisiologia Vegetal 2**. São Paulo: E.P.U., 1986. p.1-38.

GARCÍA, E.A.; GONZÁLEZ, A.M. Enraizamento *ex vitro* de quatro cultivares de zarzamora (*Rubus* spp.). **Revista Chapingo**, v.16, n.78, p.107-109, 1992.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, Embrapa-CNPq, v.1, p.43-76, 1998.

GRAY, D. J.; BENTON, C. M. *In vitro* micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (*Vitis rotundifolia*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.27, n.1, p.7-14, 1991.

GRAY, D.J.; KLEIN, C.M. *In vitro* micropropagation and plant establishment of 'Blanc du Bois' grape. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Hruiter Haven, v.102, p.221-223, 1989.

LEE, N.; WETZSTEIN, H. Y. *In vitro* propagation of muscadine grape by axillary shoot proliferation. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v.115, n.2, p.324-329, 1990.

LONE, A.B.; LÓPEZ, E.L.; ROVARIS, S.R.S.; KLESENER, D.F.; HIGASHIBARA, L.; ATAÍDE, L.T.; ROBERTO, S.R. Efeito do AIB no enraizamento de estacas herbáceas do porta-enxerto de videira VR 43-43 em diferentes substratos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.31, n.3, p.599-604, 2010.

MACHADO, M.P.; MAYER, J.L.S.; RITTER, M.; BIASI, L.A. Ácido indolbutírico no enraizamento de estacas semilenhosas do porta-enxerto de videira ‘VR043-43’ (*Vitis labrusca* x *Vitis rotundifolia*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 476-479, 2005.

McCLELLAND, M.T.; SMITH, M.A.L.; CAROTHERS, Z.B. The effects of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.23, p.115-123, 1990.

NASR EL-DIN, T.; RIZK, I. A.; MADKOUR, M. *In vitro* propagation of muscadine grapes (*Vitis rotundifolia*). **Bulletin of the Faculty of Agriculture**, Cairo, v.48, n.1, p.129-142, 1997.

NOVAK, F.J.; JUVOVÁ, Z. Clonal propagation of grapevine through *in vitro* axillary bud culture. **Scientia Horticulturae**. Amsterdam, v.18, n.3, p.231-240, 1983.

PASQUAL, M.; RAMOS, J.D.; HOFFMANN, A.; CARVALHO, G.R. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações. Meios de cultura**. Lavras-MG: UFLA/FAEPE, 1997. 127p.

PEIXOTO, P.H.P.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* de brotações do porta-enxerto de videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, n.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**, Cruz das Almas, v.16, n.1, p.178-184, 1994.

PRISCO, J.T. Alguns aspectos da fisiologia do “stress” salino. **Revista Brasileira de Botânica**, v.3, p.85-94, 1980.

SCHUCK, M.R.; BIASI, L.A.; MARIANO, A.M.; LIPSKI, B.; RIAZ, S.; WALKER, M.A. Obtaining interspecific hybrids, and molecular analysis by microsatellite markers in grapevine. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n.46, p.1480-1488, 2011.

SILVA, A.L.; FRANCO, E.T.H.; HORBACH, M.A.; BISOGNIN, D.A.; QUOIRIN, M. Aclimatização de *Dyckia maritima* Baker em hidroponia (Bromeliaceae). **Caderno de Pesquisa Série Biologia**, n.19, p.16-23, 2007.

SILVA, A.L.; SCHUCK, E.; BORGES, R.; MOREIRA, F.M.; BORGHEZAN, M.; MORAES, L.K.A.; MIKULSKI, C.A.; VELLOSO, C.Q. Propagação de videira *in vitro*: produção de plantas matrizes básicas de porta-enxertos. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.16, n.3, p.74-78, 2003.

SILVA, F. de A.S.E.; AZEVEDO C.A.V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: World Congress on Computers in Agriculture, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SUTTER, E. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Washington, v.113, n.2, p.234-238, 1988.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 719p.

TORREGROSA, L.; LOPEZ, G. Culture *in vitro* des hybrides *Vitis* x *Muscadinia*: Intérêt de la micropropagation axillaire par rapport au microboturage. **Progrès Agricole et Viticole**, Montpellier, v.113, n.8, p.176-181, 1996.

VANTELGEN, H.J.; VANMIL, A.; KUNNEMAN, B. Effect of propagation and rooting condition on acclimatization of micropropagated plants. **Acta Botanica Neerlandica**, Amsterdam, v.41, n.4, p.453-459, 1992.

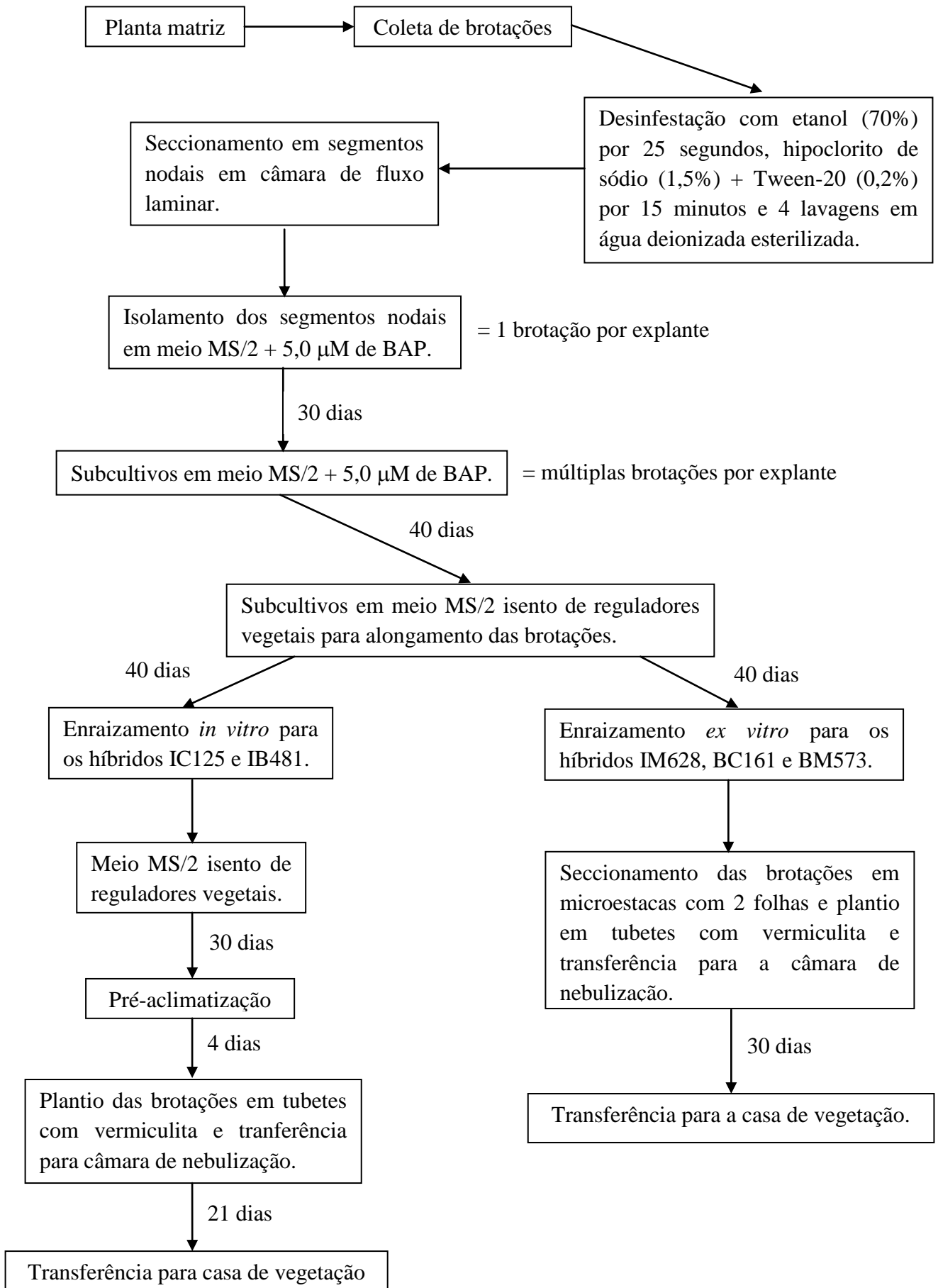
VILLA, F.; PASQUAL, M.; FRÁGUAS, C.B.; REZENDE, J.C. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de videira 'VR043-43': efeito do ANA e NaCl. **Agrarian**, v.1, n.2, p.103-111, 2008.

ZUFFELLATO-RIBAS, K.C.; RODRIGUES, J.D. Estaquia: uma abordagem dos principais aspectos fisiológicos. Curitiba: UFPR, 2001. 39p.

6 CONCLUSÕES FINAIS

A propagação dos híbridos de videira *V. labrusca* x *V. rotundifolia* pode ser realizada por micropropagação, a partir de segmentos nodais, cultivados em meio de cultura MS/2. Para a multiplicação das brotações é recomendado o meio de cultura MS/2 suplementado com 5,0 µM de BAP, com subcultivos a cada 40 dias. O enraizamento dos híbridos IM628, BC161 e BM573 pode ser realizado *ex vitro* sem tratamento com auxinas. Durante um período de 30 dias as microestacas devem permanecer em câmara de nebulização, e após esse período podem ser transferidas para a casa de vegetação. O enraizamento dos híbridos IC125 e IB481 pode ser realizado *in vitro* sem adição de auxinas. Durante a aclimatização as brotações devem permanecer em câmara de nebulização por 21 dias, e após esse período devem ser transferidas para casa de vegetação.

FIGURA 23 – Esquema representativo do protocolo de micropropagação para os híbridos de *V. labrusca* x *V. rotundifolia* testados.



7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de micropropagação é uma alternativa eficiente para a propagação massal de híbridos de *V. labrusca* x *V. rotundifolia*, visto que, tratando-se de híbridos oriundos de sementes, há apenas uma matriz para cada genótipo, logo, há pouco material vegetal disponível para propagação, impossibilitando o uso da técnica de estaquia.

A morfogênese *in vitro* é afetada por vários fatores, os quais devem ser controlados para não limitar o uso da técnica. Os híbridos IB481 e IM628 apresentaram alta formação de calo na base dos explantes no meio de cultura C₂D. A formação de calos na micropropagação de videiras não é desejável, pois prejudicam a absorção de nutrientes pelo explante, prejudicando seu desenvolvimento e também o enraizamento. Os resultados obtidos demonstram que o meio de cultura mais diluído (MS/2) foi eficiente para a redução da formação de calos, até mesmo quando citocininas foram adicionadas ao meio de cultura. A partir desse estudo, outros trabalhos poderão ser realizados testando diferentes diluições do meio MS, procurando a alternativa mais econômica para propagação desses híbridos.

O enraizamento *ex vitro* sem utilização de auxinas exógenas foi satisfatório para os híbridos IM628, BC161 e BC573, sendo a melhor opção para a obtenção de mudas, uma vez que gera economia de tempo e mão de obra, já que as fases de aclimatização e enraizamento ocorrem simultaneamente. Os híbridos IC125 e IB481 necessitam de mais estudos com enraizamento *ex vitro*, pois a taxa de sobrevivência não foi considerada adequada quando comparada com os outros híbridos testados. Para resolver esse problema, podem ser utilizadas brotações maiores, com mais de duas folhas, pois as folhas exercem um importante papel no enraizamento, translocando e produzindo hormônios e nutrientes necessários a essa fase. Outro fator é a escolha do substrato, que deve ser adequado para a formação de um sistema radicial de qualidade. O tempo de permanência em câmara de nebulização também é um fator a ser considerado, pois o excesso ou a falta de umidade pode ser prejudicial à sobrevivência das mudas.

A partir desses resultados, pode-se realizar a propagação massal dos híbridos de videira *V. labrusca* x *V. rotundifolia*, obtendo material vegetal suficiente para as próximas fases do trabalho, onde serão avaliadas a resistência a doenças e pragas e seu potencial como novos porta-enxertos para a viticultura.

8 REFERÊNCIAS

ALLEWELDT, G.; SPIEGEL-ROY, P.; REISCH, B.I. Grapes (*Vitis*). In: Moore J.R., Ballington J.R. (Eds). Genetic resources of temperate fruit and nut crops. **Acta Horticulture**, v.290, p.291-337, 1990.

ALVARENGA, A.A.; ABRAHÃO, E.; REGINA, M de A.; ANTUNES, L.E.C.; PEREIRA, A.F. Origem e classificação botânica da videira. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v.19, n.194, p.5-8, 1998.

ANDRADE, E. R.; SCHUCK, E.; DALBÓ, M. A. Avaliação da resistência de *Vitis* spp a *Fusarium oxysporum* f.sp. *herbemontis* em condições controladas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.28, n.11, p.1287-1290, 1993.

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, 1980.

BERND, R.B.; TRIVILIN, A.P; CAMARGO, U.A.; CZERMAINSKI, A.B.C. Micropropagação de porta-enxertos híbridos de *Vitis labrusca* x *Vitis rotundifolia* com resistência à pérola-da-terra (*Eurhizococcus brasiliensis* Hempel, hemiptera: margarodidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.29, n.2, p.350-354, 2007.

BIASI L.A. Micropropagação de videiras. In: POMMER, C.V. **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita e mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes. p.320-350, 2003.

BIASI L.A., PASSOS I.R.S., POMMER C.V. Micropropagação do porta-enxerto de videira Jales. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.33, n.10, p.1587-1594, 1998a.

BIASI, L.A.; PASSOS, I.R.S.; POMMER, C.V. Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de videira através de ápices meristemáticos e segmentos nodais. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 55, n. 2, p. 45-49, 1998b.

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**, Wageningen, n.300, p.123-126, 1991.

BORGHEZAN, M.; MORAES, L. K. A. de; MOREIRA, F. M.; SILVA, A. L. da. Propagação *in vitro* e avaliação de parâmetros morfofisiológicos de porta-enxertos de videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.8, p.783-789, 2003.

BOTELHO, R.V.; MAIA, A.J.; PIRES, E.J.P.; TERRA, M.M.; SCHUCK, E. Efeitos de reguladores vegetais na propagação vegetativa do porta-enxerto de videira '43-43' (*Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n.1, p.6-8, 2005.

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**, Siebeldingen, v.32, n.2, p.125-126, 1993.

BOTTON, M.; COLLETA, V.D. Avaliação da resistência de cultivares de *Vitis rotundifolia* à pérola-da-terra (Hemiptera: Margarodidae) na região sul do Brasil. **Acta Scientiarum**, n.32, p.213-216, 2010.

BOTTON, M.; HICKEL, E.R.; SORIA, S.J.; SCHUCK, E. Pérola-da-terra. In: SALVADORI, J.R.; ÁVILA, C.J.; SILVA, M.T.B. (Org.). **Pragas de solo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa, 2004. p.457-476.

BOTTON, M.; MELO, G.W.B.; OLIVEIRA, O.L.P.; ONZI, I. Efeito da cobertura vegetal sobre a pérola-da-terra (Hemiptera: Margarodidae) na cultura da videira. **Acta Scientiarum**, n.32, p.681-684, 2010.

BOUQUET, A.; TORREGROSA, L. Micropropagation of the grapevine (*Vitis spp.*). In: JAIN, S. M. (Ed.). **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic, p.319-352, 2003.

CARVALHO, D.C de; SILVA, A.L.L. da; TANNO, G.N.; PURCINO, M.; BIASI, L.A. Organogênese a partir de segmentos foliares e internodais de videira cv. Merlot. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.1, p. 108-114, 2011.

CARVALHO, J.M.F.C.; SILVA, M.M.A.; MEDEIROS, M.J.L. **Fatores inerentes à micropropagação**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 5p. (Documentos 148).

CICCOTTI, A.M. Micropropagazione di *Vitis vinifera* L. cvs. Moscato d.Amburgo e Pinot bianco. **Esperienze e Ricerche**, v.11, p.73-81, 1982.

DALBÓ, M.A.; PERUZZO, E.L.; SCHUCK, E. Alternativas de manejo para o controle do declínio da videira. **Agropecuária Catarinense**, v.20, n.1, p.58-61, 2007.

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**, Amsterdam, 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.

COLETTI, L.S.; MARTINS, C.R.; GOULART, M. Micropropagation of stock for grafting of grapevine *Paulsen 1103* “*in vitro*”, with different citocinina concentrations. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v.15, n.1, p. 102-108, 2008.

COMPTON, M.E.; GRAY, D.J. Micropropagation of ‘Southern Home’ hybrid grape. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Wruiter Haven, v.107, p.308-310, 1994.

DE CÉSARO, A. **Caracterização histológica e fisiológica do ataque de pérola-da-terra (*Eurhizococcus brasiliensis* Wille, 1922) (Hemiptera: Margarodidae) em videiras**. 89p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2008.

DELAS, J.J. Criteria used for rootstock selection in France. In: Rootstock Seminar: A Worldwide Perspective, 1992. Reno. **Proceedings**... Davis: ASEV, 1992. p.1-14.

DZAZIO, P.M.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira 420-A. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.3, p. 759-764, 2002.

FEYISSA, T.; WELANDER, M.; NEGASH, L. Genetic stability, *ex vitro* rooting and gene expression studies in *Hagenia abyssinica*. **Biologia Plantarum**, v.51, n.1, p.15-21, 2007.

GALET, P. **Précis de viticulture**. Paris: Dehan, 1993. 582p.

GALET, P.; SMITH, J. **Grape Varieties and Rootstock Varieties**. Oenoplurimedia: Chaintré, France, 1998. 315p.

GAMBORG, O.L.; SHYLUK, J.P. Nutrition, media, and characteristics of plant cell and tissue cultures. In: THORPE, T.A. (Ed). **Plant tissue culture: methods and applications in agriculture**. New York: Academic, p.21-44, 1981.

GARRIDO, L.R.; SÔNEGO, O.R.; GOMES V.N. Fungos associados com o declínio e morte de videiras no Estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.3, p.322-324, 2004.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 2.ed. Edington: Exegetics, 1996, 1574p.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G.J. **Plant propagation by tissue culture**. The Background. 3. ed., vol.1, 2008, 473 p.

GHEORGHE, R.N.; VISOIU, E.; POPESCU, C.F.; PAMFIL, D. Assesment of Genetic Stability and Fidelity of Some Micropropagated *Vitis Vinifera* L. "Feteasca neagra" Clones by Ampelometric and RAPD Markers. **Bulletin UASVM Horticulture**, n.66, v.1, p.51-57, 2009.

GOODE JUNIOR, D.K.; KREWER, G.W.; LANE, R.P.; DANIEL, J.W. Rooting studies of dormant muscadine grape cuttings. **Hort Science**, Alexandria, 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**, Siebeldingen, 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, M.A. micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: ABCTP/Embrapa-CNPQ, 509 p., 1998.

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, 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* micropropagation and plant establishment of 'Blanc du Bois' grape. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Hruiter Haven, v.102, p.221-223, 1989.

GRIBAUDO, I; FRONDA, A. Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated *in vitro*. **Hort Science**, Alexandria, v.26, n.8, p.1083, 1991.

HARRIS, R.E.; STEVENSON, J.H. *In vitro* propagation of *Vitis*. **Vitis**, Siebeldingen, v.21, n.1, p.22-32, 1982.

HIRATA, M.H.; MANCINI FILHO, J. **Manual de biossegurança**. Barueri: Ed. Manole, 2002. 496p.

IBGE. Censo Agropecuário 2011. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br/>. Acessado em: 23 de abril de 2013.

JONA, R.; WEBB, K. J. Callus and axillary-bud culture of *Vitis vinifera*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 9, p.55-60, 1978.

KORUZA, B.; JELASKA, S. Influence of meristem culture and virus elimination on phenotypical modifications of grapevine (*Vitis vinifera* L., cv. Refosk). **Vitis**, Siebeldingen, v.32, n.1, p.59-60, 1993.

KRUL, W. R.; MOWBRAY, G. H. Grapes. In: SHARP, W. R.; EVANS, D. A.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Eds.). **Handbook of Plant Cell Culture**. New York: Macmillan Publishing Company, 1984. 6, p. 396-434.

LATTIN, G. de. On the origin and distribution of grapes. **Züchter**, Berlin, v.11, p. 217-225, 1939.

LEÃO, P.C. de S. **O cultivo da uva**. Trabalho apresentado na 8ª Semana Internacional da Fruticultura, Floricultura e Agroindústria, FRUTAL, Fortaleza, Ceará, 2001.

LEÃO, P.C. de S.; BORGES, R.M.E. **Melhoramento genético da videira**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2009. 61p. (Embrapa Semiárido Série de Documentos, 224). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br>. Acesso em 17/03/2013.

LEE, E. C. M.; DEFOSSARD, R. A Some factors affecting multiple bud formation of strawberry (x *Fragaria ananassa* Duchesne) *in vitro*. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 78, p. 187-195, 1977.

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'. **Hort Science**, Alexandria, v.26, n.5, p.586-589, 1991.

LIU, Z.; LI, Z. Micropropagation of *Camptotheca acuminata* Decaisne from axillary buds, shoots tips, and seed embryos in a tissue culture system. ***In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant***, v.37, p.84-88, 2001.

LOPES DA SILVA, A. L.; FRANCO, E. T. H.; WALTER, J. M.; BISOGNIN, D. A.; CALGAROTO, N. S. Aclimatização de clones de *Dyckia Maritima* em diferentes substratos - Bromeliaceae. ***Revista Brasileira de Agrociência***, n.12, p.495-498, 2006.

LOPES DA SILVA, A. L.; FRANCO, E. T. H.; HORBACH, M. A.; BISOGNIN, D. A.; QUOIRIN, M. Aclimatização de *Dyckia maritima* Baker em hidroponia (Bromeliaceae). ***Caderno de Pesquisa Série Biologia***, n.19, p.16-23, 2007.

MACHADO, M.P.; BIASI, L.A.; RITTER, M.; RIBAS, L.L.F.; KOEHLER, H.S. Multiplicação in vitro do porta-enxerto de videira VR 043-43 (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). ***Ciência e Agrotecnologia***, Lavras, v.30, n.4, p 648-655, 2006.

MACHADO, M.P.; BIASI, L.A.; RITTER, M.; RIBAS, L.L.F.; KOEHLER, H.S.; ZANETTE, F. Meios de cultura na micropropagação do porta-enxerto de videira “VR043-43” (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). ***Ciência Rural***, Santa Maria, v.37, n.1, p.277-280, 2007.

MARTIN, K.P. Rapid *in vitro* multiplication and *ex vitro* rooting of *Rotula aquatica* Lour., a rare rhoeophytic woody medicinal plant. ***Plant Cell Reports***, v.21, p.415-420, 2003.

MARTIN, K.P.; BENNA, M.R.; JOSEPH, D. High frequency axillary bud multiplication and *ex vitro* rooting of *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. – A medicinal plant. ***Indian Journal Experimental Biology***, v.41, n.3, p.262-266, 2003.

MARTINEZ, E.A.; TIZIO, R. Grapevine micropropagation through shoot tips and minicuttings from *in vitro* cultured one-node cuttings. ***Hort Science***, Alexandria, v.24, n.3, p. 513, 1989.

MEYERSON, M.E.; BENTON, C.M.; GRAY, D.J.A. A comparison of shoot micropropagation among bunch and muscadine grape species and cultivars. Proceedings of the Florida State. **Horticultural Society**, Wrunter Haven, v.107, p.311-312, 1994.

MEZZETTI, B.; PANDOLFINI, T.; NAVACCHI, O.; LANDI, L. Genetic transformation of *Vitis vinifera* via organogenesis. **BMC Biotechnology**, v.2, n.18, p.1-10, 2002.

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**, London, v.44, p.623-627, 1979.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NASR EL-DIN, T.; RIZK, I. A.; MADKOUR, M. *In vitro* propagation of muscadine grapes (*Vitis rotundifolia*). **Bulletin of the Faculty of Agriculture**, Cairo, v.48, n.1, p.129-142, 1997.

NOVAK, F.J.; JUVOVÁ, Z. Clonal propagation of grapevine through *in vitro* axillary bud culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.18, n.3, p.231-240, 1983.

PEDROTTI, E.L.; VOLTOLINI, J.A. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização dos porta-enxertos de macieira Marubakaido e M9. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2., 1997. **Anais...** Gramado - RS: FAO-REDBIO, v.1, p.67, 1997.

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**, v. 20, p.293-300, 1996.

POMMER, C.V. **Uva Tecnologia de Produção, Pós-colheita, Mercado**. In: POMMER, C.V. (Ed.) Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003. 778p.

POMMER, C.V.; PASSOS, I.R.S.; TERRA, M.M.; PIRES, E.J.P. **Variedades de videira para o Estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1997, 59p. (Boletim técnico).

RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In vitro Cellular & Developmental Biology* - **Plant**, Wallingford, v.38, p.116-124, 2002.

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.

RIBAS, L.L.F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M.P. Estabelecimento de culturas assépticas de *Aspidosperma polyneuron*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.13, n.1, p.115-122, 2002.

ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A.; ZIVANOVITC, S.B. A new culture medium for *in vitro* rhizogenesis of grapevine (*Vitis* spp.) genotypes. **Hort Science**, Alexandria, v.26, n.12, p.1551-1553, 1991.

SCHUCK, E.; ANDRADE, R.; GALLOTTI, G.J.M.; DAL BÓ, M.A. Novas alternativas na busca de soluções para o controle do declínio da videira. **Agropecuária Catarinense**, v. 6, n. 4, p.48-50, 1993.

SCHUCK, E.; ROSIER, J.P.; DALBÓ, M.A. Porta-enxertos de videira influenciam a produtividade e composição dos frutos da cv. de videira Niágara branca em solos com pérola-da-terra (*Eurhizococcus brasiliensis*) em Santa Catarina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18., Florianópolis, 2004. **CD ROM**. Florianópolis: SBF, 2004.

SCHUCK, M.R.; BIASI, L.A.; MARIANO, A.M.; LIPSKI, B.; RIAZ, S.; WALKER, M.A. Obtaining interspecific hybrids, and molecular analysis by microsatellite markers in grapevine. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n.46, p.1480-1488, 2011.

SCHUCK, M.R.; DALBÓ, M.A.; ANDRADE, E.R. de.; ROSIER, J.P. Uva. In: EPAGRI. **Avaliação de cultivares para o estado de Santa Catarina 2007/2008**. Florianópolis: EPAGRI, p.139-143, 2007. (EPAGRI, Boletim Técnico n.137).

SMITH, J. Micro-propagation of the *Gynerium* Lily: a report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Kingston: **RIRDC**, 2000. 59p.

SMITH, B.P. Genetic and molecular mapping studies on a population derived from *Vitis vinifera* x *Muscadinia rotundifolia* and genetic diversity of wild *Muscadinia rotundifolia*. **Dissertation (Doctor)** - University of California, Davis. 277p., 2010.

SÔNAGO, O.R.; GARRIDO, L.R.; GRIGOLETTI JÚNIOR. **Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil**. Bento Gonçalves: EMBRAPA, 2005, 32p. (Circular Técnica, 56).

SORIA, S.J.; BRAGHINI, L.C. Controle químico da pérola-da-terra *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel in Wille, 1922) (Homoptera: Margarodidae). Avaliação da bioeficácia do vamidotiom na cultura da videira. **Entomologia y Vectores**, v.6, p.555-561, 1999.

SORIA, S.J.; CAMARGO, U.A.; FAO, V.M.; BRAGHINI, L.C. Avaliação no campo da resistência de videiras americanas à pérola-da-terra *Eurhizococcus brasiliensis*, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 7, Bento Gonçalves, 1999. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa-CNPUV, p.19-23, 1999.

SOUZA, J.S.I. **Uvas para o Brasil**. Piracicaba: FEALQ, 1996. 791p.

SOUZA, J.S.I.; MARTINS, F.P. **Viticultura brasileira: principais variedades e suas características**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 368 p.

STAMP, J.A.; COLBY, S.M.; MEREDITH, C.P. Improved shoot organogenesis from leaves of grape. **Journal of American Horticultural Science**, Geneva, v.115, p.1038-1042, 1990.

SUDARSONO, A.; GOLDY, R. G. Growth regulator and axillary bud position effects on *in vitro* establishment of *Vitis rotundifolia*. **Hort Science**, Alexandria, v.26, n.3, p.304-307, 1991.

SUTTER, E.; LANGHANS, R. W. Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip culture. **Canadian Journal of Botany**, n.60, p.2896-2902, 1982.

TORREGROSA, L.; BOUQUET A. *In vitro* propagation of *Vitis x Muscadinia* hybrids by microcuttings or axillary budding. **Vitis**, Geneva, v.34, n.4, p.237-238, 1995.

TORREGROSA, L.; LOPEZ, G. Culture *in vitro* des hybrides *Vitis x Muscadinia*: Intérêt de la micropropagation axillaire par rapport au microboturage. **Progrès Agricole et Viticole**, Montpellier, v.113, n.8, p.176-181, 1996.

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**, Wageningen, n 227, p.358-362. 1988.

WALKER, M.A.; LIDER, L.A.; GOHEEN, A.C.; OLMO, H.P. 1991. VR 039-16 grape rootstock. **HortScience**, n.26, p.1224-1225, 1991.

WALKER, M.A.; WOLPERT, J.A.; WEBER, E. Field screening of grape rootstock selections for resistance to fanleaf degeneration. **Plant Disease**, v.78, n.2, p.134-136, 1994.

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.

ANEXOS

ANEXO 1 – Composição química dos meios de cultura MS/2, QL e C₂D.

Componenetes	MS/2		QL		C₂D	
Macronutrientes	mg L ⁻¹	μM	mg L ⁻¹	μM	mg L ⁻¹	μM
NH ₄ NO ₃	825	10306,06	400	5000,00	1650	20612,12
KNO ₃	950	9395,71	1800	17802,36	1900	18791,41
KH ₂ PO ₄	42,5	624,59	270	1983,96	170	1249,17
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	1200	5080,80	709	3000,21
CaCl ₂ .2H ₂ O	220	1496,30	-	-	-	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	185	750,51	360	1460,45	370	1501,01
Micronutrientes						
Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O	13,9	50,00	27,80	100,00	27,80	100,00
Na ₂ EDTA	18,65	50,10	37,30	100,20	37,30	100,20
H ₃ BO ₃	3,1	50,13	6,20	100,26	6,20	100,26
MnSO ₄ .4H ₂ O	11,15	49,99	1,00	4,48	1,12	5,02
ZnSO ₄ .7H ₂ O	4,3	14,96	8,60	29,91	8,60	29,91
KI	0,415	2,50	0,08	0,48	-	-
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,125	0,52	0,25	1,03	0,25	1,03
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0125	0,05	0,025	0,1	0,025	0,1
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0125	0,05	0,025	0,1	0,025	0,1
Substâncias orgânicas	mg L ⁻¹		mg L ⁻¹		mg L ⁻¹	
Tiamina HCl	0,1		0,1		0,1	
Piridoxina HCl	0,5		0,5		0,5	
Ácido Nicotínico	0,5		0,5		0,5	
Glicina	2		2		2	
Mio-inositol	100		100		100	
Sacarose	30.000		30.000		30.000	

ANEXO 2 – Composição iônica dos meios de cultura MS/2, QL e C₂D.

MEIOS DE CULTURA			
ÍONS	MS/2	QL	C ₂ D
Macroelementos (mM)			
NH ₄ ⁺	10,30	5,00	20,61
NO ₃ ⁻	19,70	34,00	39,40
K ⁺	10,02	19,40	20,04
Ca ⁺²	1,49	5,10	3,00
Mg ⁺²	0,15	1,50	1,50
SO ₄ ⁻²	0,86	1,50	1,64
PO ₄ ⁻²	0,62	2,00	1,25
Microelementos (μM)			
Mn ⁺²	50,00	4,50	5,00
Zn ⁺²	14,95	30,00	30,00
Na ⁺²	101,12	202,50	202,50
Fe ⁺²	50,00	100,00	100,00
Cl ⁻	3000,00	0,20	0,20
Co ⁺²	0,05	0,10	0,10
Cu ⁺²	0,05	0,10	0,10
MoO ₄ ⁻²	0,51	1,03	1,03
B ⁺³	50,00	100,00	100,00
NH ₄ ⁺ + NO ₃ ⁻ (mM)	30,00	39,00	60,01
NH ₄ ⁺ / NO ₃ ⁻ (mM)	0,52	0,15	0,52
Total de íons (mM)	46,46	69,08	87,88

ANEXO 3 - Resumo da análise de variância de diferentes meios de cultura na altura e número de folhas do porta-enxerto híbrido de videira IC125 *in vitro* ao longo de três subcultivos.

Isabel x Carlos (IC125)			
Causas de variação	QM		
	GL	Altura (cm)	Folhas (n°)
Meios	2	0,8016*	3,0931**
Erro (a)	9	0,1574	0,2830
Parcelas	11		
Subcultivos	2	11,1468**	2,9993**
Meios x Subcultivos	4	0,5689**	2,7782**
Erro (b)	18	0,1154	0,2200
Total	35		
Bartlett's (Q^2)		9,93324	7,62923

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 4 - Resumo da análise de variância de diferentes meios de cultura na altura e número de folhas do porta-enxerto híbrido de videira IB481 *in vitro* ao longo de três subcultivos.

Isabel x Bountiful (IB481)			
Causas de variação	QM		
	GL	Altura (cm)	Folhas (n°)
Meios	1	1,7496*	1,0753*
Erro (a)	6	0,2141	0,1631
Parcelas	7		
Subcultivos	2	14,8097**	14,1305**
Meios x Subcultivos	2	0,7460*	2,4012**
Erro (b)	12	0,1834	0,0989
Total	23		
Bartlett's (Q^2)		0,37497	1,46110

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 5 - Resumo da análise de variância de diferentes meios de cultura na altura e número de folhas do porta-enxerto híbrido de videira IM628 *in vitro* ao longo de três subcultivos.

Isabel x Magnólia (IM628)			
Causas de variação	QM		
	GL	Altura (cm)	Folhas (n°)
Meios	1	7,1068*	2,9260**
Erro (a)	6	0,5901	0,0662
Parcelas	7		
Subcultivos	2	16,8146**	18,5864**
Meios x Subcultivos	2	0,6444ns	0,9493**
Erro (b)	12	0,36720	0,1315
Total	23		
Bartlett's (Q^2)		3,50114	4,44984

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 6 - Resumo da análise de variância de diferentes meios de cultura na altura e número de folhas do porta-enxerto híbrido de videira IR423 *in vitro* ao longo de três subcultivos.

Isabel x Regale (IR423)			
Causas de variação	QM		
	GL	Altura (cm)	Folhas (n°)
Meios	2	3,6683*	2,4687**
Erro	9	0,6360	0,1954
Total	11		
Bartlett's (Q^2)		3,24474	3,03252

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 7 - Resumo da análise de variância de diferentes meios de cultura na altura e número de folhas do porta-enxerto híbrido de videira BC161 *in vitro* ao longo de três subcultivos.

Bordô x Carlos (BC161)			
Causas de variação	QM		
	GL	Altura (cm)	Folhas (n°)
Meios	2	0,6634ns	3,3991**
Erro (a)	9	0,2856	0,1999
Parcelas	11		
Subcultivos	2	14,8164**	4,8808**
Meios x Subcultivos	4	0,6190ns	1,6196*
Erro (b)	18	0,2953	0,4180
Total	35		
Bartlett's (Q^2)		17,08489	12,94451

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 8 - Resumo da análise de variância de diferentes meios de cultura na altura e número de folhas do porta-enxerto híbrido de videira BM573 *in vitro* ao longo de três subcultivos.

Bordô x Magnólia (BM573)			
Causas de variação	QM		
	GL	Altura (cm)	Folhas (n°)
Meios	2	2,2305*	11,2760**
Erro (a)	9	0,4132	0,6328
Parcelas	11		
Subcultivos	2	10,8115**	14,7224**
Meios x Subcultivos	4	0,2920ns	1,3095*
Erro (b)	18	0,1942	0,4233
Total	35		
Bartlett's (Q^2)		11,37223	17,98064

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 9 - Resumo da análise de variância de diferentes concentrações de BAP na altura, número de folhas e número de brotações por explante do porta-enxerto híbrido de videira IC125 *in vitro* ao longo de três subcultivos.

Isabel x Carlos (IC125)				
Causas de variação	QM			
	GL	Altura (cm)	Brotação/ explante	Folhas (n°)
Concentração BAP	3	5,4476**	7,3917**	49,6550**
Erro (a)	12	0,0759	0,0300	0,5581
Parcelas	15			
Subcultivos	2	5,9672**	0,7566**	5,0435**
BAP x Subcultivos	6	1,0551**	0,9398**	8,4982**
Erro (b)	24	0,0721	0,0205	0,3683
Total	47			
Bartlett's (Q ²)		20,28830	16,94281	16,10766

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 10 - Resumo da análise de variância de diferentes concentrações de BAP na altura, número de folhas e número de brotações por explante do porta-enxerto híbrido de videira IB481 *in vitro* ao longo de três subcultivos.

Isabel x Bountiful (IB481)				
Causas de variação	QM			
	GL	Altura (cm)	Brotação/ explante	Folhas (n°)
Concentração BAP	3	1,6249**	6,7741**	62,1133**
Erro (a)	12	0,1314	0,0211	0,5650
Parcelas	15			
Subcultivos	2	4,0365**	1,0341**	8,8745**
BAP x Subcultivos	6	0,3736*	1,0914**	10,2653**
Erro (b)	24	0,1161	0,0656	0,6311
Total	47			
Bartlett's (Q ²)		22,03725	24,17679	21,88735

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 11 - Resumo da análise de variância de diferentes concentrações de BAP na altura, número de folhas e número de brotações por explante do porta-enxerto híbrido de videira IM628 *in vitro* ao longo de três subcultivos.

Isabel x Magnólia (IM628)				
Causas de variação	QM			
	GL	Altura (cm)	Brotação/ explante	Folhas (n°)
Concentração BAP	3	9,5660	0,7948	0,6908
Erro (a)	12	0,1599	0,0113	0,1784
Parcelas	15			
Subcultivos	2	5,1302	0,3245	8,1607
BAP x Subcultivos	6	0,7778	0,1643	3,6887
Erro (b)	24	0,2994	0,0245	0,3704
Total	47			
Bartlett's (Q ²)		16,96152	11,54363	14,15928

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 12 - Resumo da análise de variância de diferentes concentrações de BAP na altura, número de folhas e número de brotações por explante do porta-enxerto híbrido de videira BC161 *in vitro* ao longo de três subcultivos.

Bordô x Carlos (BC161)				
Causas de variação	QM			
	GL	Altura (cm)	Brotação/ explante	Folhas (n°)
Concentração BAP	3	2,8796**	4,9243**	34,7397**
Erro (a)	12	0,1266	0,0577	0,2796
Parcelas	15			
Subcultivos	2	0,3016ns	1,8548**	15,6546**
BAP x Subcultivos	6	0,2218ns	0,7286**	6,8119**
Erro (b)	24	0,0915	0,0697	0,5182
Total	47			
Bartlett's (Q ²)		20,28830	13,67137	17,93361

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 13 - Resumo da análise de variância de diferentes concentrações de BAP na altura, número de folhas e número de brotações por explante do porta-enxerto híbrido de videira BM573 *in vitro* ao longo de três subcultivos.

Bordô x Magnólia (BM573)				
Causas de variação	QM			
	GL	Altura (cm)	Brotação/ explante	Folhas (n°)
Concentração BAP	3	7,7410**	14,0258**	97,0650**
Erro (a)	12	0,0573	0,0298	0,2672
Parcelas	15			
Subcultivos	2	0,3406**	3,6298**	40,4458**
BAP x Subcultivos	6	0,2305**	2,5543**	21,4633**
Erro (b)	24	0,0601	0,0292	0,1660
Total	47			
Bartlett's (Q ²)		19,08600	13,31717	16,65112

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 14 - Resumo da análise de variância de diferentes concentrações de ANA na porcentagem de explantes com brotação, número de raízes e comprimento de raízes (cm) por explante do porta-enxerto híbrido de videira IC125 *in vitro*, e porcentagem de sobrevivência após aclimatização.

Isabel x Carlos (IC125)					
Causas de variação	QM				
	GL	Brotação (%)	Raiz (n°)	Raiz (cm)	Sobrevivência (%)
Concentração ANA	3	358,8404*	0,7799**	0,4421ns	340,5100**
Erro	12	63,1132	0,0550	0,3343	3,80758
Total	15				
Bartlett's (Q ²)		2,18332	1,66960	1,52665	0,51163

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 15 - Resumo da análise de variância de diferentes concentrações de ANA na porcentagem de explantes brotados, número de raízes e comprimento de raízes (cm) por explante do porta-enxerto híbrido de videira IB481 *in vitro*, e porcentagem de sobrevivência após aclimatização.

Isabel x Bountiful (IB481)					
Causas de variação	QM				
	GL	Brotação (%)	Raiz (n°)	Raiz (cm)	Sobrevivência (%)
Concentração ANA	3	97,5833ns	0,3830**	1,3399**	407,7459**
Erro	12	295,4167	0,0302	0,0905	16,1458
Total	15				
Bartlett's (Q^2)		7,08546	7,33220	3,27504	0,15787

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 16 - Resumo da análise de variância de diferentes concentrações de ANA na porcentagem de explantes com brotação, número de raízes e comprimento de raízes (cm) por explante do porta-enxerto híbrido de videira IM628 *in vitro*, e porcentagem de sobrevivência após aclimatização.

Isabel x Magnólia (IM628)					
Causas de variação	QM				
	GL	Brotação (%)	Raiz (n°)	Raiz (cm)	Sobrevivência (%)
Concentração ANA	3	0,0092ns	1,3942*	1,4625**	872,9167**
Erro	12	0,0092	0,2546	0,1527	7,3750
Total	15				
Bartlett's (Q^2)		4,47969	6,98930	2,77370	0,91979

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 17 - Resumo da análise de variância de diferentes concentrações de ANA na porcentagem de explantes brotados, número de raízes e comprimento de raízes (cm) por explante do porta-enxerto híbrido de videira BC161 *in vitro*, e porcentagem de sobrevivência após aclimatização.

Bordô x Carlos (BC161)					
Causas de variação	QM				
	GL	Brotação (%)	Raiz (n°)	Raiz (cm)	Sobrevivência (%)
Concentração ANA	3	3244,29**	0,4864**	1,0386*	2567,4135**
Erro	12	179,4093	0,0433	0,2192	7,3750
Total	15				
Bartlett's (Q ²)		1,74817	1,60046	1,67586	1,61089

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 18 - Resumo da análise de variância de diferentes concentrações de ANA na porcentagem de explantes brotados, número de raízes e comprimento de raízes (cm) por explante do porta-enxerto híbrido de videira BM573 *in vitro*, e porcentagem de sobrevivência após aclimatização.

Bordô x Magnólia (BM573)					
Causas de variação	QM				
	GL	Brotação (%)	Raiz (n°)	Raiz (cm)	Sobrevivência (%)
Concentração ANA	3	137,1103ns	1,9659**	1,2086**	145,8958**
Erro	12	57,0228	0,2191	0,1772	7,3958
Total	15				
Bartlett's (Q ²)		4,44590	9,40989	10,49784	2,39841

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 19 - Resumo da análise de variância de diferentes concentrações de AIB na porcentagem de microestacas brotadas, número de raízes, comprimento de raízes (cm) e porcentagem de sobrevivência de microestacas no enraizamento *ex vitro* do porta-enxerto híbrido de videira IC125.

Isabel x Carlos (IC125)					
Causas de variação	QM				
	GL	Brotação (%)	Raiz (n°)	Raiz (cm)	Sobrevivência (%)
Concentração AIB	3	2550,75ns	246,3864**	8,1160ns	718,0833ns
Erro	12	1040,23	13,5823	2,8032	398,2917
Total	15				
Bartlett's (Q^2)		1,71252	3,79662	8,11106	1,84218

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 20 - Resumo da análise de variância de diferentes concentrações de AIB na porcentagem de microestacas brotadas, número de raízes, comprimento de raízes (cm) e porcentagem de sobrevivência de microestacas no enraizamento *ex vitro* do porta-enxerto híbrido de videira IM628.

Isabel x Magnólia (IM628)					
Causas de variação	QM				
	GL	Brotação (%)	Raiz (n°)	Raiz (cm)	Sobrevivência (%)
Concentração AIB	3	1482,18ns	17,5311**	12,0255**	650,2292*
Erro	12	465,88	1,3321	1,2500	132,7292
Total	15				
Bartlett's (Q^2)		4,52400	5,47459	3,15653	41,07703

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 21 - Resumo da análise de variância de diferentes concentrações de AIB na porcentagem de microestacas brotadas, número de raízes, comprimento de raízes (cm) e porcentagem de sobrevivência de microestacas no enraizamento *ex vitro* do porta-enxerto híbrido de videira BC161.

Bordô x Carlos (BC161)					
Causas de variação	QM				
	GL	Brotação (%)	Raiz (nº)	Raiz (cm)	Sobrevivência (%)
Concentração AIB	3	2491,428*	34,2301*	1,5356*	1276,2292**
Erro	12	437,898	5,8177	0,2834	133,2708
Total	15				
Bartlett's (Q^2)		4,10195	2,82725	2,61056	0,09337

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 22 - Resumo da análise de variância de diferentes concentrações de AIB na porcentagem de microestacas brotadas, número de raízes, comprimento de raízes (cm) e porcentagem de sobrevivência de microestacas no enraizamento *ex vitro* do porta-enxerto híbrido de videira BM573.

Bordô x Magnólia (BM573)					
Causas de variação	QM				
	GL	Brotação (%)	Raiz (nº)	Raiz (cm)	Sobrevivência (%)
Concentração AIB	3	1482,18ns	12,1175**	5,0490*	24,0000ns
Erro	12	465,88	0,3440	0,9935	192,5000
Total	15				
Bartlett's (Q^2)		4,52400	4,32053	2,04935	2,31091

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.