

**MARÍLIA PEREIRA MACHADO**

**MICROPROPAGAÇÃO DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA  
'VR043-43' (*Vitis vinifera* L. X *Vitis rotundifolia* Michx.)**

**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 obtenção do título de Mestre em Ciências.**

**Orientador: Dr. Luiz Antonio Biasi**

**Co-Orientadores: Luciana L. F. Ribas**

**Henrique S. Kohler**

**CURITIBA**

**2006**

“Não podemos fazer coisas grandiosas – só coisas pequenas com um amor grandioso.”

(Madre Teresa)

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Luiz Antonio Biasi pela orientação, amizade e dedicação durante a realização de todo o trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal pela oportunidade de realização do curso.

Aos professores Luciana Lopes Fortes Ribas e Henrique Soares Koehler, pela co-orientação e amizade.

Aos professores do departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo pelos ensinamentos.

À professora Cleusa Bona do Departamento de Botânica pelo apoio na realização da morfo-anatomia.

Ao professor João Bernal e à pesquisadora Regina Quisen pelas sugestões na pré-defesa.

Aos colegas e amigos do curso de Pós-graduação em Agronomia / Produção Vegetal e do Laboratório de Micropropagação de Plantas, pelo apoio e incentivo.

À minha família pelo apoio e incentivo dados durante o curso.

Às amigas Juliana Mayer e Ângela Poccá pelo apoio e amizade.

À graduanda em Agronomia Marlice Ritter pela colaboração e dedicação ao trabalho.

À funcionária do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo Maria Emília pelo auxílio prestado durante a realização do trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e à Fundação Araucária pelo apoio financeiro à execução do projeto.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná pela realização da MEV.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xii
<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
1.1 REFERÊNCIAS .....	3
<b>2 DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NA MICROPROPAGAÇÃO DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’</b> .....	5
<b>RESUMO</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> .....	6
2.1 INTRODUÇÃO .....	7
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	8
2.2.1 Material vegetal e desinfestação .....	8
2.2.2 Ambiente de cultivo .....	8
2.2.3 Cultivo inicial .....	8
2.2.4 Multiplicação e enraizamento .....	11
2.2.5 Variáveis analisadas .....	11
2.2.6 Análise estatística .....	12
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	12
2.4 CONCLUSÕES .....	22
2.5 REFERÊNCIAS .....	22
<b>3 6-BENZILAMINOPURINA E CINETINA NA MULTIPLICAÇÃO DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’</b> .....	26
<b>RESUMO</b> .....	26
<b>ABSTRACT</b> .....	27
3.1 INTRODUÇÃO .....	28

3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	29
3.2.1 Material Vegetal .....	29
3.2.2 Subcultivos .....	29
3.2.3 Ambiente de cultivo .....	30
3.2.4 Variáveis analisadas .....	30
3.2.5 Análise estatística .....	30
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30
3.4 CONCLUSÕES .....	41
3.5 REFERÊNCIAS .....	41
<b>4 MORFO-ANATOMIA DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’, EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO .....</b>	<b>44</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>44</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>45</b>
4.1 INTRODUÇÃO .....	46
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	47
4.2.1 Plantas <i>in vitro</i> .....	47
4.2.2 Plantas aclimatizadas .....	47
4.2.3 Plantas <i>in vivo</i> .....	48
4.2.4 Análises morfo-anatômicas .....	48
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
4.4 CONCLUSÕES .....	57
4.5 REFERÊNCIAS .....	57
<b>5 SACAROSE E INTENSIDADE LUMINOSA <i>IN VITRO</i> NA ACLIMATIZAÇÃO DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’ .....</b>	<b>60</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>60</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>61</b>
5.1 INTRODUÇÃO .....	62
5.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	63

5.2.1 Material vegetal .....	63
5.2.2 Ambiente de cultivo .....	63
5.2.3 Transplante e ambiente <i>ex vitro</i> .....	64
5.2.4 Variáveis analisadas .....	64
5.2.5 Análise estatística .....	65
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	65
5.4 CONCLUSÕES .....	78
5.5 REFERÊNCIAS .....	78
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	82
<b>ANEXOS</b> .....	83

## LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 -	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA MICROPROPAGAÇÃO DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA 'VR043-43' .....	10
TABELA 2.2 -	COMPOSIÇÃO IÔNICA DOS MEIOS DE CULTURA MS/2, NN, WPM, QL E C <sub>2</sub> D .....	11
TABELA 2.3 -	EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, SUPLEMENTADOS COM 5µM BAP, NO CULTIVO INICIAL, PRIMEIRO E SEGUNDO SUBCULTIVOS E ISENTOS DE REGULADOR DE CRESCIMENTO NO TERCEIRO SUBCULTIVO, NO NÚMERO DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE DO PORTA-ENXERTO 'VR043-43' .....	13
TABELA 2.4 -	EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, SUPLEMENTADOS COM 5µM BAP, NO CULTIVO INICIAL, PRIMEIRO E SEGUNDO SUBCULTIVOS E ISENTOS DE REGULADOR DE CRESCIMENTO NO TERCEIRO SUBCULTIVO, NO NÚMERO DE FOLHAS POR BROTAÇÃO DO PORTA-ENXERTO 'VR043-43' .....	16
TABELA 2.5 -	EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, SUPLEMENTADOS COM 5µM BAP, NO CULTIVO INICIAL, PRIMEIRO E SEGUNDO SUBCULTIVOS E ISENTOS DE REGULADOR DE CRESCIMENTO NO TERCEIRO SUBCULTIVO, NA ALTURA DAS BROTAÇÕES DO PORTA-ENXERTO 'VR043-43' .....	18
TABELA 2.6 -	EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, SUPLEMENTADOS COM 5µM BAP, NO CULTIVO INICIAL, PRIMEIRO E SEGUNDO SUBCULTIVOS E ISENTOS DE REGULADOR DE CRESCIMENTO NO TERCEIRO SUBCULTIVO, NA PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO DAS BROTAÇÕES DO PORTA-ENXERTO 'VR043-43' .....	19
TABELA 3.1 -	EFEITO DE 6-BENZILAMINOPURINA (BAP) E CINETINA (CIN), EM MEIO DE CULTURA QL, NA PORCENTAGEM DE FORMAÇÃO DE CALO E PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO DAS MICROESTACAS DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA 'VR043-43', EM QUATRO SUBCULTIVOS .....	38

## LISTA DE FIGURA

FIGURA 2.1 -	NÚMERO DE MICROESTACAS POR EXPLANTE INICIAL POR SUBCULTIVO, ANALISADO A CADA 45 DIAS A PARTIR DO ISOLAMENTO DOS SEGMENTOS NODAIS DA PLANTA MATRIZ DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’ EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA. LETRAS IGUAIS NÃO SÃO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PELO TESTE DE DUNCAN A 5% DE PROBABILIDADE .....	15
FIGURA 2.2 -	BROTAÇÕES MICROPROPAGADAS DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’ EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA A) SUPLEMENTADOS COM 5µM DE BAP, NO SEGUNDO SUBCULTIVO E B) ISENTO DE REGULADOR VEGETAL, NO TERCEIRO SUBCULTIVO. BARRA: 1 cm .....	21
FIGURA 3.1 -	EFEITO DE 6-BENZILAMINOPURINA (BAP), EM MEIO DE CULTURA QL, NO NÚMERO DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE DO PORTA-ENXERTO ‘VR043-43’, EM QUATRO SUBCULTIVOS. LETRAS MINÚSCULAS REPRESENTAM O FATOR CONCENTRAÇÃO E MAIÚSCULAS O FATOR SUBCULTIVO, SENDO QUE LETRAS IGUAIS NÃO SÃO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PELO TESTE DE DUNCAN A 5% DE PROBABILIDADE. C.V. (%) = 29,62 .....	32
FIGURA 3.2 -	EFEITO DA CINETINA (CIN), EM MEIO DE CULTURA QL, NO NÚMERO DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE DO PORTA-ENXERTO ‘VR043-43’, EM QUATRO SUBCULTIVOS. LETRAS MINÚSCULAS REPRESENTAM O FATOR CONCENTRAÇÃO E MAIÚSCULAS O FATOR SUBCULTIVO, SENDO QUE LETRAS IGUAIS NÃO SÃO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PELO TESTE DE DUNCAN A 5% DE PROBABILIDADE. C.V. (%) = 29,62 .....	33
FIGURA 3.3 -	EFEITO DE 6-BENZILAMINOPURINA (BAP), EM MEIO DE CULTURA QL, NA ALTURA DAS BROTAÇÕES DO PORTA-ENXERTO ‘VR043-43’, EM QUATRO SUBCULTIVOS. LETRAS MINÚSCULAS REPRESENTAM O FATOR CONCENTRAÇÃO E MAIÚSCULAS O FATOR SUBCULTIVO, SENDO QUE LETRAS IGUAIS NÃO SÃO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PELO TESTE DE DUNCAN A 5% DE PROBABILIDADE. C.V.(%) = 11,13 .....	34
FIGURA 3.4 -	EFEITO DA CINETINA (CIN), EM MEIO DE CULTURA QL, NA ALTURA DAS BROTAÇÕES DO PORTA-	

	ENXERTO 'VR043-43', EM QUATRO SUBCULTIVOS. LETRAS MINÚSCULAS REPRESENTAM O FATOR CONCENTRAÇÃO E MAIÚSCULAS O FATOR SUBCULTIVO, SENDO QUE LETRAS IGUAIS NÃO SÃO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PELO TESTE DE DUNCAN A 5% DE PROBABILIDADE. C.V. (%) = 11,13	
	.....	35
FIGURA 3.5 -	FEFEITO DE 6-BENZILAMINOPURINA (BAP), EM MEIO DE CULTURA QL, NO NÚMERO DE FOLHAS POR EXPLANTE DO PORTA-ENXERTO 'VR043-43', EM QUATRO SUBCULTIVOS. LETRAS MINÚSCULAS REPRESENTAM O FATOR CONCENTRAÇÃO E MAIÚSCULAS O FATOR SUBCULTIVO, SENDO QUE LETRAS IGUAIS NÃO SÃO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PELO TESTE DE DUNCAN A 5% DE PROBABILIDADE.C.V. (%) = 11,90	36
FIGURA 3.6 -	EFEITO DA CINETINA (CIN), EM MEIO DE CULTURA QL, (B) NO NÚMERO DE FOLHAS POR EXPLANTE DO PORTA-ENXERTO 'VR043-43', EM QUATRO SUBCULTIVOS. LETRAS MINÚSCULAS REPRESENTAM O FATOR CONCENTRAÇÃO E MAIÚSCULAS O FATOR SUBCULTIVO, SENDO QUE LETRAS IGUAIS NÃO SÃO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PELO TESTE DE DUNCAN A 5% DE PROBABILIDADE.C.V. (%) = 11,90	37
FIGURA 3.7 -	EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP (6-BENZILAMINOPURINA), EM MEIO DE CULTURA QL, NO A) PRIMEIRO SUBCULTIVO E B) QUARTO SUBCULTIVO DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA 'VR043-43'. BARRA: 3 cm	39
FIGURA 3.8 -	EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CINETINA (CIN), EM MEIO DE CULTURA QL, NO A) PRIMEIRO SUBCULTIVO E B) QUARTO SUBCULTIVO DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA 'VR043-43'. BARRA: 3cm	40
FIGURA 4.1 -	SECÇÕES TRANSVERSAIS DO LIMBO DAS FOLHAS DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA 'VR043-43'. A) PLANTA CULTIVADA <i>IN VITRO</i> . B) PLANTA CULTIVADA NO AMBIENTE <i>IN VITRO</i> (NORMAL). C) PLANTA CULTIVADA NO AMBIENTE <i>IN VITRO</i> (HIPERHÍDRICA). D) PLANTA ACLIMATIZADA. BARRA: 50 µm	51
FIGURA 4.2 -	FACE ADAXIAL DE FOLHAS DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA 'VR043-43'. A) PLANTA CULTIVADA NO AMBIENTE <i>IN VITRO</i> (NORMAL). B) PLANTA CULTIVADA NO AMBIENTE <i>IN VITRO</i>	

	(HIPERHÍDRICA). C) PLANTA ACLIMATIZADA. D) PLANTA <i>IN VIVO</i> . BARRA: 5 $\mu\text{m}$ .....	53
FIGURA 4.3 -	FACE ABAXIAL DE FOLHAS DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA 'VR043-43'. A) PLANTA CULTIVADA NO AMBIENTE <i>IN VITRO</i> (NORMAL). B) PLANTA CULTIVADA NO AMBIENTE <i>IN VITRO</i> (HIPERHÍDRICA). C) PLANTA ACLIMATIZADA. D) PLANTA <i>IN VIVO</i> . BARRA: 20 $\mu\text{m}$ .....	55
FIGURA 4.4 -	FACE ABAXIAL DE FOLHAS DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA 'VR043-43'. A) PLANTA CULTIVADA NO AMBIENTE <i>IN VITRO</i> (NORMAL). B) PLANTA CULTIVADA NO AMBIENTE <i>IN VITRO</i> (HIPERHÍDRICA). C) PLANTA ACLIMATIZADA. D) PLANTA <i>IN VIVO</i> . BARRA: 5 $\mu\text{m}$ .....	56
FIGURA 4.5 -	EFEITO DA CONDIÇÃO DE CULTIVO NA DENSIDADE ESTOMÁTICA DE FOLHAS DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA 'VR043-43'. C.V. (%) = 17,91 .....	57
FIGURA 5.1 -	EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE, EM MEIO DE CULTURA QL ( $\blacktriangle$ ) NA ALTURA DAS PLANTAS MICROPROPAGADAS DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA 'VR043-43' .....	66
FIGURA 5.2 -	EFEITO DAS INTENSIDADES LUMINOSAS ( $\blacksquare$ ) 18 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ E ( $\bullet$ ) 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ NO NÚMERO DE FOLHAS POR PLANTA MICROPROPAGADA DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA 'VR043-43' .....	67
FIGURA 5.3 -	EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE, EM MEIO DE CULTURA QL, E INTENSIDADES LUMINOSAS ( $\blacksquare$ ) 18 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ E ( $\bullet$ ) 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ NA ÁREA FOLIAR DAS PLANTAS MICROPROPAGADAS DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA 'VR043-43' .....	68
FIGURA 5.4 -	EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE, EM MEIO DE CULTURA QL, ( $\blacktriangle$ ) NA MATÉRIA SECA DA PARTE AÉREA DAS PLANTAS MICROPROPAGADAS DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA 'VR043-43' .....	70
FIGURA 5.5 -	EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE ( $\blacktriangle$ ) NO NÚMERO DE RAÍZES POR PLANTA DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA 'VR043-43' .....	71
FIGURA 5.6 -	EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE, EM MEIO DE CULTURA QL, E INTENSIDADES LUMINOSAS ( $\blacksquare$ ) 18 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ E ( $\bullet$ ) 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ NA MATÉRIA SECA DAS RAÍZES	

	PRINCIPAIS DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’ .....	72
FIGURA 5.7 -	EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE, EM MEIO DE CULTURA QL, E DAS INTENSIDADES LUMINOSAS (□) 18 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ E (■) 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ NA PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’. LETRAS MINÚSCULAS REPRESENTAM O FATOR CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE E MAIÚSCULAS O FATOR INTENSIDADE LUMINOSA. C.V. (%) = 15,19.....	73
FIGURA 5.8 -	FIGURA 5.10 - MUDAS MICROPROPAGADAS DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’, APÓS QUATRO SEMANAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> , COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE, EM MEIO DE CULTURA QL, COMBINADAS COM AS INTENSIDADES LUMINOSAS DE A) 18 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ E B) 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .....	74
FIGURA 5.9 -	EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE, EM MEIO DE CULTURA QL, E DAS INTENSIDADES LUMINOSAS (□) 18 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ E (■) 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ NA PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA NA ACLIMATIZAÇÃO DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’. LETRAS MINÚSCULAS REPRESENTAM O FATOR CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE E MAIÚSCULAS O FATOR INTENSIDADE LUMINOSA. C.V. (%) = 3,26.....	76
FIGURA 5.10 -	MUDAS MICROPROPAGADAS DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’, COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE, EM MEIO DE CULTURA QL, COMBINADAS COM AS INTENSIDADES LUMINOSAS DE A) 18 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ E B) 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , APÓS 30 DIAS DE ACLIMATIZAÇÃO.....	77

## MICROPROPAGAÇÃO DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA

‘VR043-43’ (*Vitis vinifera* L. X *Vitis rotundifolia* Michx.)

### RESUMO

O porta-enxerto de videira ‘VR043-43’ (*Vitis vinifera* L. x *Vitis rotundifolia* Michx.) apresenta alta resistência a alguns nematóides, ao pulgão filoxera, ao fungo *Fusarium* e alta tolerância à pérola-da-terra. Para a videira, as técnicas de micropropagação têm demonstrado grande potencial para a propagação de plantas selecionadas. O objetivo do trabalho foi estabelecer um protocolo de micropropagação para a produção do porta-enxerto de videira ‘VR043-43’, viabilizando a rápida multiplicação do material vegetativo em larga escala. Na avaliação de diferentes meios de cultura (MS/2, C<sub>2</sub>D, QL, NN e WPM) no cultivo inicial e em três subcultivos a partir de segmentos nodais, o meio de cultura QL apresentou-se adequado para o desenvolvimento das brotações. A adição de citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) na concentração de 5 µM apresentou efeito tóxico na multiplicação, sendo necessária adição apenas no estabelecimento inicial. A retirada da citocinina dos meios de cultura promoveu até 100% de enraizamento das microestacas. Para a multiplicação das brotações foram testadas as citocininas BAP e CIN em diferentes concentrações (0; 2,5; 5,0 e 10,0 µM). A multiplicação pela obtenção de microestacas, a partir de uma única planta enraizada em meio de cultura isento de regulador de crescimento, manteve a qualidade das brotações. A BAP teve efeito positivo na produção de brotações, porém reduziu a altura e comprometeu a qualidade das brotações. Com a utilização da cinetina, as brotações apresentaram comportamento semelhante ao tratamento testemunha, formando uma única planta enraizada. As plantas cultivadas *in vitro*, com ou sem sintomas de hiperhidricidade, possuem características morfo-anatômicas distintas das plantas *in vivo*, demonstrando ser necessário promover condições favoráveis que propiciem a sobrevivência das plantas na aclimatização. Na pré-aclimatização das plantas foram testadas as intensidades luminosas de 18 e 43 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> combinadas com diferentes concentrações de sacarose (0; 15; 30; 45 g L<sup>-1</sup>). A adição de sacarose (30 g L<sup>-1</sup>) no meio de cultura promoveu melhor crescimento e desenvolvimento das microestacas *in vitro*, nas intensidades luminosas de 18 ou 43 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. A sobrevivência das plantas na aclimatização foi de 90% a 100%, quando o meio de cultura foi suplementado com 30 e 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose, combinadas com a intensidade luminosa 43 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

**Palavras-chave:** cultivo *in vitro*, multiplicação, enraizamento, aclimatização.

## MICROPROPAGATION OF GRAPEVINE ROOTSTOCK 'VR043-43'

(*Vitis vinifera* L. x *Vitis rotundifolia* Michx.)

### ABSTRACT

The grapevine rootstock 'VR043-43' (*Vitis vinifera* L. x *Vitis rotundifolia* Michx.) presents high resistance to *phylloxera*, *Fusarium* and nematodes; they also present high tolerance to *Eurhizococcus brasiliensis*. For grapevine techniques micropropagation this rootstock has shown high potential for obtaining plants. The objective of this work was to establish a micropropagation protocol of grapevine rootstock 'VR043-43' production, making feasible the quick multiplication in large scale. It was tested different culture media (MS/2, C<sub>2</sub>D, QL, NN, WPM) in initial cultivate, as well as three subcultures from nodal segments, the QL medium presented adequate responses for shoots development. The addition of cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP), at 5  $\mu\text{M}$  of concentration presented toxic effect for the multiplication, being necessary the addition just for initial establishment period. When cytokinins were withdraw from culture media, the rooting of the microcuttings were promoted 100%. To multiplication was tested different concentrations of BAP and KIN (0, 2.5, 5.0 and 10.0  $\mu\text{M}$ ). The multiplication by the obtaining of microcuttings, from only one plants rooted in culture medium without growth regulator, guaranteed the quality of the shoots. The BAP application presented positive effect for shoots outputing, however the shoots height were reduced, compromising their quality. The use of kinetin produced similar shoots behavior when compared with control treatment; producing just one plant rooted. The plants cultivated *in vitro*, with or without hyperhydricity symptoms, have different morpho-anatomical characteristics from *in vivo* plants growing, showing the necessity of promote favorable conditions that provide the survival of the plants in the acclimatization. In preacclimatization was tested luminous intensity of 18 or 43  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  combined with the sucrose (0, 15, 30 and 45  $\text{g L}^{-1}$ ). The addition of sucrose (30  $\text{g L}^{-1}$ ) to the media culture promoted better growth and development for *in vitro* microcuttings; at luminous intensities of 18 or 43  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . When media culture was supplemented with 30 and 45  $\text{g L}^{-1}$  of sucrose, the plants survival at the acclimatization were of 90% to 100%, combined with the luminous intensitie of 43  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

**Key-words:** *in vitro* culture, multiplication, rooting, acclimatization.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A videira é uma das espécies frutíferas mais importantes no Brasil, sendo que a produção nacional atingiu 1.291.382 toneladas em 2004, numa área plantada de 71.637 hectares, com uma renda estimada em aproximadamente 1.388.218 reais (IBGE, 2005).

A viticultura brasileira está concentrada principalmente nos Estados das Regiões Sul e Sudeste, onde se destacam São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (POMMER et al., 1997). Mais recentemente, a viticultura tem se desenvolvido muito em regiões mais quentes, principalmente nos Estados de Minas Gerais, Bahia e Pernambuco, onde a chamada viticultura tropical irrigada vem ganhando cada vez mais importância no cenário da fruticultura brasileira de mesa (SENTELHAS, 1998).

Apesar de ser uma cultura de inquestionável importância e retorno econômico, a videira de uma forma geral, tanto cultivares copa para mesa ou para vinho quanto cultivares porta-enxerto, são muito suscetíveis ao ataque de pragas e de doenças. As doenças que incidem na videira reduzem a qualidade, a produção e promovem a elevação dos custos de produção. As doenças mais sérias causadas por fungos debilitam e podem até matar a videira (DIAS et al., 1998). As pragas também causam grandes prejuízos à cultura da videira, sendo as de solo as mais danosas e de difícil controle, como a pérola da terra e os nematóides (REIS et al., 1998; SOUSA, 1996).

A forma mais eficiente e econômica para o controle das pragas e doenças é, sem dúvida, a utilização de cultivares resistentes. A espécie *Vitis rotundifolia*, pertencente ao subgênero Muscadínea, é a mais importante dentre as espécies deste grupo, apresentando grande resistência a pragas e doenças (LU et al., 2000; WALKER et al., 2000). As espécies desse subgênero são originadas do Sudeste dos Estados Unidos e México, e apresentam número cromossômico igual a 40, que é diferente das espécies do subgênero Euvitis, que engloba praticamente todas as cultivares copa e

porta-enxerto conhecidas e possuem  $2n=38$  (ALVARENGA et al., 1998). Esta diferença dificulta os cruzamentos e a recuperação dos híbridos, mesmo assim, já foram lançados na Califórnia híbridos entre *V. vinifera* e *V. rotundifolia*, que já estão em estudo no Brasil para serem utilizados como porta-enxertos (POMMER et al., 1997). Estes híbridos herdam da *V. rotundifolia* uma quase imunidade a alguns nematóides como *Xiphinema index* e elevada resistência ao *Fusarium* (ANDRADE et al., 1994; SCHUCK, 2003) e à filoxera, e alta tolerância à pérola-da-terra (*Eurhizococcus brasiliensis*) (BOUQUET et al., 2000; SCHUCK et al., 2001; SCHUCK, 2003).

Bons resultados na produção já estão sendo obtidos com o híbrido ‘VR043-43’ (*V. rotundifolia* x *V. vinifera*), em áreas com problemas de doenças e pragas de solo da videira. O replantio de videiras com o porta-enxerto ‘VR043-43’, em áreas com fusariose e pérola-da-terra, mostram que o híbrido de *V. rotundifolia* se apresenta como opção mais viável em função do maior vigor do mesmo, recompondo rapidamente as áreas dos vinhedos (EMBRAPA, 2003).

O método de propagação mais empregado no Brasil consiste no plantio de porta-enxertos no local definitivo do futuro vinhedo para posterior enxertia no campo das variedades de interesse (SOUZA, 1996). Assim como para as cultivares da espécie *V. rotundifolia*, a propagação do híbrido ‘VR043-43’ por meio de estacas lenhosas é muito difícil. As técnicas de micropropagação são uma importante alternativa visando à multiplicação de cultivares e à obtenção em larga escala de material vegetativo de boa qualidade fitossanitária.

A micropropagação tem demonstrado grande potencial de multiplicação de videiras, e diversos protocolos já foram estabelecidos para diferentes espécies, cultivares e híbridos. No entanto, para o híbrido ‘VR043-43’ nenhum estudo visando a multiplicação *in vitro* em larga escala para obtenção de mudas foi realizado.

A micropropagação de videiras consiste basicamente no processo de enraizamento de brotações axilares ou adventícias multiplicadas *in vitro*, para a regeneração de plantas inteiras. Este processo possibilita a rápida multiplicação de

plantas, a obtenção de plantas-matrizes livres de vírus, a propagação de híbridos e a preservação de germoplasmas de interesse (KRUL & MOWBRAY, 1984).

Diante disto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de micropropagação para a produção do porta-enxerto de videira 'VR043-43', viabilizando a rápida multiplicação do material vegetativo em larga escala.

## 1.1 REFERÊNCIAS

ALVARENGA, A. A.; ABRAHÃO, E.; REGINA, M. 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. de; DAL BÓ, M. A.; SCHUCK, E. Avaliação da resistência de germoplasma de videira ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *Herbeontis*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 16, n. 1, p. 139-145, 1994.

BOUQUET, A.; DANGLLOT, Y.; BONGIOVANNI, M.; CASTAGNONE SERENO, P.; TORREGROSA, L.; BOURSQUOT, J. M. Breeding rootstocks resistant to grape fanleaf vi rus spread, using *Vitis x Muscadinia* hybridization. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 528, p. 517-526, 2000.

DIAS, M. S. C.; SOUZA, S. M. C. PEREIRA, A. F. Principais doenças da videira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 19, n. 194, p. 76-84, 1998.

EMBRAPA. Disponível em: <http://www.scarlet.cnpuv.embrapa.br/>. Acessado em: 04 agosto 2003.

IBGE. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/>. Acessado em: 16 de dezembro de 2005.

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. Cap. 6, p. 396-434.

LU, J.; SHELL, L.; RAMMING, D. W. Interspecific hybridization between *Vitis rotundifolia* and *Vitis vinifera* and evaluation of the hybrids. **Acta Horticulturae**, v. 2, n. 528, p. 479-486, 2000.

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, 166).

REIS, P. R.; SOUZA, J. C.; GONÇALVES, N. P. Pragas da videira tropical. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 19, n. 194, p. 92-95, 1998.

SCHUCK, E.; DALBÓ, M. A.; ROSIER, J. P.; DUCROQUET, J. P. H. J. Porta-enxertos para a cultura da videira. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 4., 2001, Fraiburgo. **Anais**. Caçador: Caçador, 2001. p. 122-132.

SCHUCK, E. Porta-enxertos para a videira. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 6., 2003, Fraiburgo. **Anais**. Fraiburgo: Parque da Maçã, 2003. p. 185.

SENTELHAS, P. C. Aspectos climáticos para a viticultura tropical. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 19, n. 194, p. 9-14, 1998.

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

WALKER, M. A.; JIN, Y.; BOUQUET, A. BOURSQUOT, J. M. Breeding *Vitis rupestris* x *Muscadinia rotundifolia* rootstocks to control *Xiphinema index* and fanleaf degeneration. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 2, n. 528, p. 511-515, 2000.

## 2 DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NA MICROPROPAGAÇÃO DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’ (*Vitis vinifera* L. x *Vitis rotundifolia* Michx.)

### RESUMO

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. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito dos meios de cultura MS/2, NN, WPM, QL e C<sub>2</sub>D, no cultivo inicial e em três subcultivos do porta-enxerto de videira ‘VR043-43’, a partir de segmentos nodais. Os meios de cultura não tiveram efeito significativo sobre o número de brotações por explante, no cultivo inicial e subcultivos. Para o número de microestacas por explante inicial no primeiro subcultivo, os melhores resultados foram encontrados com os meios de cultura MS/2, QL e C<sub>2</sub>D, e no segundo subcultivo não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos. O meio de cultura C<sub>2</sub>D foi superior para o número de folhas por brotação (6,4 folhas por brotação) no cultivo inicial, enquanto o meio WPM obteve 2,8 folhas por brotação. Nos subcultivos não houve efeito significativo dos tratamentos para esta variável. A altura das brotações no cultivo inicial, primeiro e segundo subcultivos, aumentou com o meio de cultura QL. No primeiro subcultivo 83,3% das brotações enraizaram no meio de cultura QL. No cultivo inicial do porta-enxerto de videira ‘VR043-43’ *in vitro*, a partir de segmentos nodais e multiplicação das microestacas, o meio de cultura QL apresentou-se adequado para o desenvolvimento das brotações.

**Palavras-chave:** multiplicação, enraizamento, cultura de tecidos.

**CULTURE MEDIA DIFFERENT IN MICROPROPAGATION OF GRAPEVINE ROOTSTOCK 'VR 043-43' (*Vitis vinifera* L. x *Vitis rotundifolia* Michx.)**

**ABSTRACT**

The adequate culture medium selection is an essential factor for micropropagation; due to its mineral components influenced the regeneration process. This work evaluated the culture media MS/2, NN, WPM, QL and C<sub>2</sub>D, in the establishment and multiplication of grapevine rootstock 'VR043-43', from nodal segments. The culture media had not significant effect on the number of shoots for each explant in the initial culture and subcultures. For the first subculture, the best number of microcuttings per initial explant was showed for the culture media MS/2, QL and C<sub>2</sub>D. For the second subculture did not present statistical differences between treatments. The culture medium C<sub>2</sub>D was present the highest leaf number per shoot (6.4 leaves shoots<sup>-1</sup>) at the initial culture while the culture medium WPM presented 2.8 leaves per shoot. The subcultures didn't have any significant effect on the treatments for this variable. The height of the shoots in the initial, first and second subcultures increased with the culture medium QL. For the first subculture 83.3% of their shoots had taken root in the culture medium QL. Initial culture of the grapevine rootstock of 'VR043-43' *in vitro*, from nodal segments and its multiplication for microcuttings, the culture medium QL was adequate for shoots development.

**Key words:** multiplication, rooting, tissue culture.

## 2.1 INTRODUÇÃO

Na viticultura, as técnicas de micropropagação são uma importante alternativa para a obtenção, em larga escala, de material vegetativo de boa qualidade fitossanitária (DZAZIO et al., 2002; BIASI, 2003).

Os segmentos nodais, normalmente utilizados como explantes constituem-se 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 (MULLINS et al., 1979; MARTINEZ & TIZIO, 1989; GRIBAUDO & FRONDA, 1991). As gemas laterais das plantas encontram-se, geralmente, inibidas (PEIXOTO & PASQUAL, 1996) devido à dominância apical, podendo ser suprimida pelo fornecimento exógeno de BAP (6-benzilaminopurina) (BARLASS & SKENE, 1983). GRAY & FISHER (1985) obtiveram rápido desenvolvimento das brotações utilizando 5  $\mu$ M de BAP no cultivo inicial de diversas espécies, cultivares e híbridos de videira.

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).

O meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), a sua formulação com concentrações reduzidas de sais e também outros meios de cultura, foram utilizados para a micropropagação de videiras, como o NN (NITSCH & NITSCH, 1969), WPM (LLOYD & McCOWN, 1986) e o C<sub>2</sub>D (CHÉE & POOL, 1983). O meio de cultura QL (QUOIRIN & LEPOIVRE, 1977) foi desenvolvido especialmente para espécies lenhosas e tem sido usado para muitas espécies frutíferas, especialmente na Europa (ZIMMERMAN & SWARTZ, 1994).

O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes meios de cultura, para o melhor desenvolvimento das brotações cultivadas *in vitro* a partir de gema axilar de segmentos nodais do porta-enxerto de videira ‘VR043-43’.

## 2.2 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, Curitiba, Paraná.

### 2.2.1 Material vegetal e desinfestação

Os explantes foram coletados de plantas matrizes do porta-enxerto de videira ‘VR043-43’, adquiridas de um viveiro comercial de Videira – SC, mantidas em vasos contendo solo como substrato na casa-de-vegetação, em outubro de 2003. As brotações passaram por um processo de assepsia pelo tratamento com Benlate<sup>®</sup> (2 g L<sup>-1</sup>) 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 para melhorar a eficiência do agente germicida; 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.

### 2.2.2 Ambiente de cultivo

Todos os tratamentos foram mantidos em sala climatizada, com fotoperíodo de 16 horas fornecido por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia, intensidade luminosa de 20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e temperatura de  $25 \pm 2^\circ \text{C}$ .

### 2.2.3 Cultivo inicial

Após a assepsia, os segmentos nodais foram cultivados individualmente em frascos contendo 10 ml de meio de cultura, tampados com papel alumínio.

Foram testados os sais dos meios de cultura MS/2 (meio de cultura MS com a metade da concentração dos sais), QL, C<sub>2</sub>D, WPM e NN, suplementados com as

vitaminas do meio de cultura MS, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio inositol, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6g L<sup>-1</sup> de ágar (Vetec<sup>®</sup>) (Tabela 2.1 e 2.2). Foram adicionados 5 µM de BAP em todos os tratamentos, conforme descrito por GRAY e FISHER (1985). O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Os meios de cultura foram esterilizados à temperatura de 121°C, durante 20 minutos e 1,5 atm.

Tabela 2.1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA MICROPROPAGAÇÃO DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA 'VR043-43'.

Componentes	MS		NN		WPM		QL		C <sub>2</sub> D	
<b>Macronutrientes</b>	mg L <sup>-1</sup>	µM	mg L <sup>-1</sup>	µM	mg L <sup>-1</sup>	µM	mg L <sup>-1</sup>	µM	mg L <sup>-1</sup>	µM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	20612,12	720	8994,39	400	5000,00	400	5000,00	1650	20612,12
KNO <sub>3</sub>	1900	18791,41	950	9396,64	-	-	1800	17802,36	1900	18791,41
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	990	5680,40	-	-	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1249,17	68	499,67	170	1249,70	270	1983,96	170	1249,17
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	556	2354,40	1200	5080,80	709	3000,21
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	2992,59	-	-	96	652,93	-	-	-	-
CaCl <sub>2</sub>	-	-	166	1495,30	-	-	-	-	-	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	1501,01	185	750,51	370	1501,10	360	1460,45	370	1501,01
<b>Micronutrientes</b>										
Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,80	100,00	27,80	100,00	27,80	100,00	27,80	100,00	27,80	100,00
Na <sub>2</sub> EDTA	37,30	100,20	37,30	100,20	37,30	100,20	37,30	100,20	37,30	100,20
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20	100,26	10,00	161,71	6,20	100,26	6,20	100,26	6,20	100,26
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	-	-	18,90	111,83	-	-	-	-	-	-
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,30	99,97	-	-	22,30	99,97	1,00	4,48	1,12	5,02
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,60	29,91	10,00	34,77	8,60	29,91	8,60	29,91	8,60	29,91
KI	0,83	5,00	-	-	-	-	0,08	0,4 8	-	-
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	1,03	0,25	1,03	0,25	1,03	0,25	1,03	0,25	1,03
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	0,10	-	-	-	-	0,025	0,10	0,025	0,10
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,10	0,025	0,10	0,25	1,00	0,025	0,10	0,025	0,10
<b>Substâncias orgânicas</b>										
	mg L <sup>-1</sup>		mg L <sup>-1</sup>		mg L <sup>-1</sup>		mg L <sup>-1</sup>		mg L <sup>-1</sup>	
Tiamina. HCl	0,1		0,1		0,1		0,1		0,1	
Piridoxina. HCl	0,5		0,5		0,5		0,5		0,5	
Ác. Nicotínico	0,5		0,5		0,5		0,5		0,5	
Glicina	2		2		2		2		2	
Mio-inositol	100		100		100		100		100	
Sacarose	30.000		30.000		30.000		30.000		30.000	

Tabela 2.2 – COMPOSIÇÃO IÔNICA DOS MEIOS DE CULTURA MS/2, NN, WPM, QL e C<sub>2</sub>D.

ÍONS	MEIOS DE CULTURA				
	MS/2	NN	WPM	QL	C <sub>2</sub> D
<b>Macroelementos</b> (mM)					
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	10,30	8,99	5,00	5,00	20,61
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	19,70	18,39	9,71	34,00	39,40
K <sup>+</sup>	10,02	9,90	12,61	19,40	20,04
Ca <sup>+2</sup>	1,49	1,50	3,01	5,10	3,00
Mg <sup>+2</sup>	0,15	0,75	1,50	1,50	1,50
SO <sub>4</sub> <sup>=</sup>	0,86	1,00	7,41	1,50	1,64
PO <sub>4</sub> <sup>=</sup>	0,62	0,50	1,25	2,00	1,25
<b>Microelementos</b> (μM)					
Mn <sup>+2</sup>	50,00	112	100	4,50	5,0
Zn <sup>+2</sup>	14,95	34,77	30	30	30
Na <sup>+2</sup>	101,12	202,50	202,50	202,50	202,50
Fe <sup>+2</sup>	50,00	100	100	100	100
Cl <sup>-</sup>	3000	2991	1306	0,2	0,2
Co <sup>+2</sup>	0,052	-----	-----	0,100	0,100
Cu <sup>+2</sup>	0,05	0,100	1,00	0,100	0,100
MoO <sub>4</sub> <sup>=</sup>	0,51	1,03	1,03	1,03	1,03
B <sup>+3</sup>	50,00	161,7	100	100	100
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mM)	30,00	27,38	14,71	39,00	60,01
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> / NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mM)	0,52	0,49	0,51	0,15	0,52
<b>Total de íons</b> (mM)	46,46	44,63	41,06	69,08	87,88

#### 2.2.4 Multiplicação e enraizamento

A partir das brotações originadas do cultivo inicial foram realizados subcultivos a cada 45 dias, inoculando os explantes no mesmo meio de cultura anterior. As microestacas foram subcultivadas com 1 cm de comprimento e duas folhas. Os meios de cultura foram suplementados com 5 μM de BAP até o segundo subcultivo.

No terceiro subcultivo não se utilizou o meio de cultura WPM devido à baixa qualidade das brotações; não foram obtidos explantes com o padrão desejado (1 cm de comprimento e 2 folhas) e não foi acrescentado BAP nos meios de cultura.

#### 2.2.5 Variáveis analisadas

As variáveis analisadas foram número de brotos por explante, número de

folhas por explante, altura das brotações, número de microestacas por explante inicial e porcentagem de brotações enraizadas. O número de microestacas por explante inicial foi obtido pela razão entre o número de microestacas aptas para o subcultivo obtidas após 45 dias de cultivo e o número de explantes iniciais. As microestacas foram obtidas pelo seccionamento das brotações axilares e adventícias em segmentos nodais.

### 2.2.6 Análise estatística

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com quatro repetições. Para o isolamento dos segmentos nodais foram utilizados 10 explantes por parcela, e nos subcultivos foram utilizados o total de explantes originados das brotações. As avaliações foram realizadas a cada 45 dias, a partir dos explantes viáveis, sendo os oxidados e/ou contaminados desconsiderados. A comparação entre médias foi realizada pelo teste de Duncan, em nível de 5% de probabilidade. Os dados em porcentagem foram transformados em  $\text{arc sen } \sqrt{(x/100+1)}$ .

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância não apresentou significância para o efeito dos meios de cultura sobre o cultivo inicial e subcultivos das gemas axilares de segmentos nodais, para a variável número de brotações por explante (Anexo 1).

Observa-se na Tabela 2.3 que para os meios de cultura testados, com exceção do WPM, houve um aumento do número de brotações no primeiro subcultivo, e uma redução no segundo subcultivo. Isto pode ter ocorrido devido à permanência da citocinina nos meios de cultura. A concentração de 5  $\mu\text{M}$  de BAP mostrou-se excessiva para a multiplicação, pela formação de tufos e falta de alongamento das brotações, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós e hiperhidricidade generalizada (Figura 2.2A).

Quando retirada a BAP dos meios de cultura observou-se ausência de brotações adventícias, que é uma característica atribuída a esta citocinina (Figura

2.2B). Não foi observado efeito residual da citocinina de um subcultivo para outro, e isto refletiu nos resultados encontrados no número de brotações por explante e na altura das brotações (Tabelas 2.3 e 2.5), comparado com os resultados das avaliações anteriores, onde a altura foi cerca de três vezes menor. 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).

Tabela 2.3 – EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, SUPLEMENTADOS COM 5 $\mu$ M BAP, NO CULTIVO INICIAL, PRIMEIRO E SEGUNDO SUBCULTIVOS E ISENTOS DE REGULADOR DE CRESCIMENTO NO TERCEIRO SUBCULTIVO, NO NÚMERO DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE DO PORTA-ENXERTO ‘VR043-43’.

Meios de cultura	Número de brotações por explante			
	Cultivo inicial <sup>1</sup>	Primeiro subcultivo <sup>1</sup>	Segundo subcultivo <sup>1</sup>	Terceiro subcultivo <sup>1</sup>
MS/2	1,22	2,60	2,12	1,20
QL	1,57	3,40	2,12	1,35
C <sub>2</sub> D	1,07	3,37	2,40	1,37
WPM	1,50	1,62	1,97	-
NN	1,20	2,70	1,47	1,37
C.V.(%)	18,27	33,47	18,95	14,23

<sup>1</sup> Médias não diferem significativamente pelo teste F da análise de variância.

Segundo KRUL & 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, como foi observado no presente trabalho. Porém, no protocolo estabelecido por CHÉE & POOL (1983) para micropropagação de *Vitis* sp., são acrescentados 5  $\mu$ M de BAP na fase de multiplicação.

Segundo a análise de variância houve efeito significativo dos meios de

cultura no número de microestacas por explante inicial, no cultivo inicial, primeiro e segundo subcultivos (Anexo 2).

No cultivo inicial e no primeiro subcultivo o meio de cultura WPM foi o tratamento que obteve o menor número de microestacas por explante inicial, sendo este valor menor que uma microestaca por explante inicial no primeiro subcultivo. Por esta razão o meio de cultura WPM foi retirado do experimento (Figura 2.1).

No segundo subcultivo, os meios de cultura não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de comparação entre médias para o número de microestacas por explante inicial. O meio de cultura QL foi o que obteve maior média e conferiu boa qualidade as brotações (Figura 2.1). O meio de cultura QL foi desenvolvido para *Prunus* por QUOIRIN & LEPOIVRE (1977), conferindo alta proliferação das brotações, sem apresentar hiperhidricidade.

Os meios de cultura tiveram efeito significativo para a variável número de folhas por brotação somente no cultivo inicial das gemas axilares de segmentos nodais (Anexo 3).

No cultivo inicial, o maior número de folhas por brotação foi obtido com o meio de cultura C<sub>2</sub>D (aproximadamente 6 folhas por brotação) (Tabela 2.4). 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).

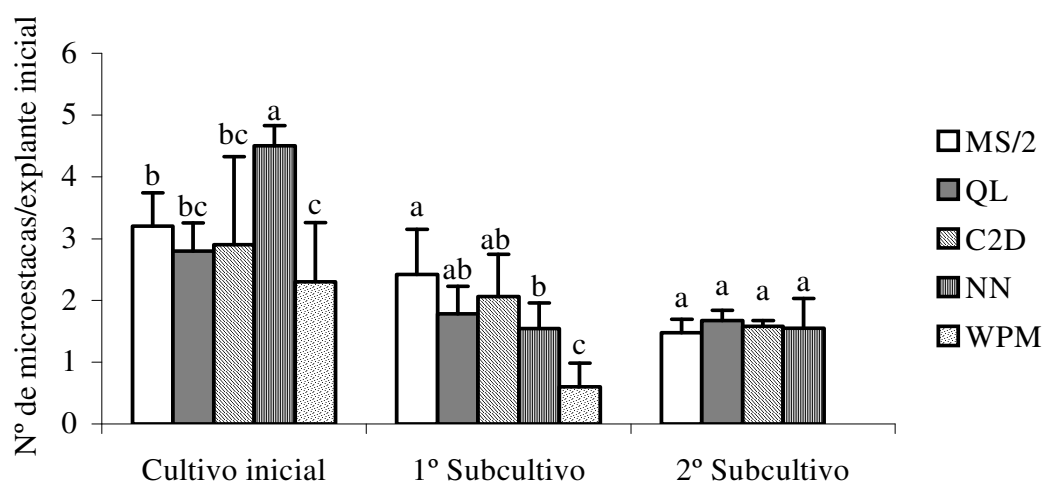


FIGURA 2.1 – NÚMERO DE MICROESTACAS POR EXPLANTE INICIAL POR SUBCULTIVO, ANALISADO A CADA 45 DIAS A PARTIR DO ISOLAMENTO DOS SEGMENTOS NODAIS DA PLANTA MATRIZ DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’ EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA. LETRAS IGUAIS NÃO SÃO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PELO TESTE DE DUNCAN A 5% DE PROBABILIDADE.

O meio de cultura WPM apresentou as menores quantidades de folhas por brotação, no cultivo inicial e subcultivos (Tabela 2.4). Resultado semelhante foi encontrado no trabalho de DZAZIO et al. (2002), com o porta-enxerto ‘420-A’, que obteve o menor número de folhas por explante quando utilizado o meio de cultura WPM no crescimento inicial da gema axilar de segmentos nodais.

GRAY & BENTON (1990), também observaram o efeito negativo do meio WPM sob o desenvolvimento de meristemas apicais de *Vitis rotundifolia*, em que estes apresentaram menor número de brotos, sintomas de hiperhidricidade e sofreram abscisão foliar. Também apresentou brotos raquíticos para os cultivares ‘Carlos’, ‘Dixie’ e ‘Fry’ (GRAY & BENTON, 1991).

A formulação salina do meio de cultura WPM apresenta na sua composição uma menor concentração de nitrogênio e potássio (HARRY & THORPE, 1994), e uma menor força iônica total quando comparada com os meios de cultura MS/2, QL, C<sub>2</sub>D e NN (Tabela 2.2 ).

Tabela 2.4 – EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, SUPLEMENTADOS COM 5  $\mu\text{M}$  BAP, NO CULTIVO INICIAL, PRIMEIRO E SEGUNDO SUBCULTIVOS E ISENTOS DE REGULADOR DE CRESCIMENTO NO TERCEIRO SUBCULTIVO, NO NÚMERO DE FOLHAS POR BROTAÇÃO DO PORTA-ENXERTO ‘VR043-43’.

Meios de cultura	Número de folhas por brotação			
	Cultivo inicial <sup>1</sup>	Primeiro subcultivo <sup>2</sup>	Segundo subcultivo <sup>2</sup>	Terceiro subcultivo <sup>2</sup>
MS/2	3,62bc	4,42	3,80	4,87
QL	4,15b	5,10	3,85	5,60
C <sub>2</sub> D	6,42a	3,65	3,77	5,60
WPM	2,80c	3,22	3,35	-
NN	3,30bc	4,75	3,60	5,17
C.V.(%)	14,59	21,32	12,83	15,86

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

<sup>2</sup> Médias não diferem significativamente pelo teste F da análise de variância.

A análise de variância apresentou diferença significativa para o efeito dos meios de cultura no cultivo inicial, primeiro e segundo subcultivos, para a variável altura das brotações (Anexo 4).

Os meios de cultura C<sub>2</sub>D e QL apresentaram maior altura das brotações no cultivo inicial, primeiro e segundo subcultivos (Tabela 2.5). Resultados semelhantes foram encontrados por CHÉÉ et al. (1984), onde o meio de cultura C<sub>2</sub>D foi superior ao meio de cultura MS, para a micropropagação de cultivares de *Vitis labrusca*.

Para árvores frutíferas de clima temperado tem sido utilizado o meio de cultura QL, que apresenta uma concentração mais baixa de cloro (0,2  $\mu\text{M}$ ), pois seu excesso pode induzir a hiperhidricidade em algumas espécies (GEORGE, 1996). Além disso, o meio de cultura QL difere dos meios de cultura MS/2, C<sub>2</sub>D e NN por conter menor quantidade de íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) (5,00 mM) e baixa razão entre  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  (0,15 mM) (Tabela 2.2). A razão entre as concentrações de amônio e nitrato parece ser

o fator determinante do crescimento, sendo que a de amônio deve ser, no máximo, um terço do nitrogênio total (CALDAS et al., 1998).

Para algumas espécies lenhosas, o meio de cultura MS não se mostrou eficiente e composições mais diluídas em macronutrientes têm sido utilizadas com sucesso (HARRY & THORPE, 1994). Muitas modificações na sua composição já foram sugeridas por diversos autores, principalmente alterações nos constituintes orgânicos (HARRIS & STEVENSON, 1982; CHÉE & POOL, 1985; LEWANDOWSKI, 1991) e reduções na concentração dos macronutrientes e micronutrientes (BLAZINA et al., 1991; BOTTI et al., 1993; FANIZZA et al., 1984). Contudo, isto não foi observado neste experimento, pois o meio de cultura MS com as concentrações de sais reduzidas pela metade, apresentou-se inferior a outros meios de cultura testados. Apesar de apresentar a mesma razão  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  do meio de cultura C<sub>2</sub>D (0,52 mM), o meio de cultura MS/2 possui a metade do total de nitrogênio (30,00 mM) (Tabela 2.2), e a quantidade de nitrogênio no meio de cultura têm grande influência na taxa de crescimento, morfologia e totipotência celular (KIRBY et al., 1987).

Não houve diferença significativa do meio NN com os meios MS/2 e WPM em todos os subcultivos na altura das brotações (Tabela 2.5). Estes meios de cultura apresentam quantidades inferiores do íon fosfato quando comparados ao meio de cultura QL (2,00 mM) (Tabela 2.2). O meio de cultura NN apresenta menor quantidade do íon fosfato na sua composição (0,50 mM), sendo o balanço de fósforo no meio de cultura importante para o crescimento (LEE & DEFOSSARD, 1977) e morfogênese do explante (RAMAGE & WILLIAMS, 2002).

Já no trabalho realizado por BIASI et al. (1998), com o porta-enxerto 'Jales', os meios de cultura MS/2 e NN apresentaram os melhores resultados para todas as variáveis analisadas.

Tabela 2.5 – EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, SUPLEMENTADOS COM 5  $\mu$ M BAP, NO CULTIVO INICIAL, PRIMEIRO E SEGUNDO SUBCULTIVOS E ISENTOS DE REGULADOR DE CRESCIMENTO NO TERCEIRO SUBCULTIVO, NA ALTURA DAS BROTAÇÕES DO PORTA-ENXERTO ‘VR043-43’.

Meios de cultura	Altura das brotações (cm)			
	Cultivo inicial <sup>1</sup>	Primeiro subcultivo <sup>1</sup>	Segundo subcultivo <sup>1</sup>	Terceiro subcultivo <sup>2</sup>
MS/2	1,35 b	1,70 b	1,85 c	5,90
QL	2,07 a	2,47 a	2,25 b	8,08
C <sub>2</sub> D	2,72 a	1,80 b	2,60 a	7,22
WPM	1,17 b	1,72 b	1,77 c	-
NN	1,17 b	1,52 b	1,85 c	6,77
C.V.(%)	25,57	19,40	8,43	10,23

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

<sup>2</sup> Médias não diferem significativamente pelo teste F da análise de variância.

Para a porcentagem de enraizamento houve diferenças significativas pela análise de variância, no primeiro subcultivo, e não houve diferenças significativas no segundo e terceiro subcultivos (Anexos 5 e 6).

Brotações de videira produzidas *in vitro* são facilmente induzidas a produzir raízes tanto pelo uso do meio de cultura contendo auxina quanto sem regulador de crescimento (GRAY & FISHER, 1985; BIASI, 2003). Pelos resultados obtidos neste estudo foi possível observar a facilidade de enraizamento *in vitro* do porta-enxerto ‘VR043-43’, que chegou a 100% no meio de cultura NN, no terceiro subcultivo (Tabela 2.6), sendo suficiente apenas a transferência das microestacas para um meio isento de regulador de crescimento. Para outros cultivares de videira como o ‘Southern Home’, foi obtido apenas 43% de brotações enraizadas em meio de cultura sem auxina (COMPTON & GRAY, 1994). Enquanto que para os cultivares Arka Neelamani e Thompson Seedless, 1  $\mu$ M de AIA promoveu maior porcentagem de enraizamento (THOMAS, 2001). Para cultivares de *Vitis rotundifolia* foram obtidos 55% de

enraizamento dos brotos cultivados em meio de cultura sem a presença de auxina e 77% com auxina (GRAY & BENTON, 1991).

O meio de cultura QL foi significativamente superior no enraizamento das plantas no primeiro subcultivo, não ocorrendo diferença entre os demais meios de cultura testados (Tabela 2.6).

Tabela 2.6 – EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, SUPLEMENTADOS COM 5 $\mu$ M BAP, NO CULTIVO INICIAL, PRIMEIRO E SEGUNDO SUBCULTIVOS E ISENTOS DE REGULADOR DE CRESCIMENTO NO TERCEIRO SUBCULTIVO, NA PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO DAS BROTAÇÕES DO PORTA-ENXERTO ‘VR043-43’.

Meios de cultura	Enraizamento (%) <sup>3</sup>		
	Primeiro subcultivo <sup>1</sup>	Segundo subcultivo <sup>2</sup>	Terceiro subcultivo <sup>2</sup>
MS/2	35,47 b	18,10	96,85
QL	83,32 a	4,08	96,60
C <sub>2</sub> D	60,00 b	17,70	67,37
WPM	38,55 b	3,57	-
NN	50,00 b	14,10	100,00
C.V.(%)	20,22	64,12	17,39

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

<sup>2</sup> Médias não diferem significativamente pelo teste F da análise de variância.

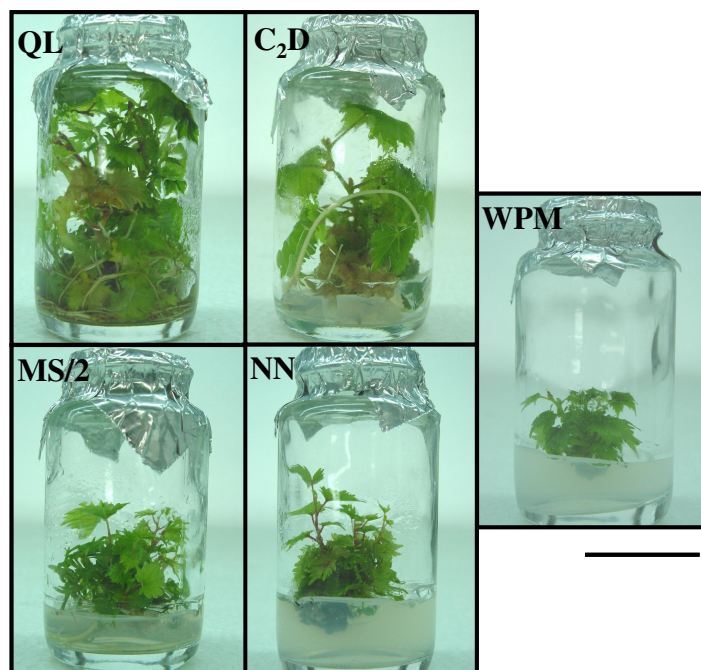
<sup>3</sup> Dados transformados para arc-sen  $\sqrt{x/100+1}$ .

A formação de raízes é geralmente inibida por altas concentrações de citocininas utilizadas na fase de multiplicação (GEORGE, 1996). Esta afirmação permite inferir que a redução do enraizamento no segundo subcultivo foi devido à concentração de 5,0  $\mu$ M de BAP adicionada aos meios de cultura (Tabela 2.6).

No terceiro subcultivo, apesar de não haver diferenças estatísticas entre os tratamentos, pode-se observar que o meio de cultura C<sub>2</sub>D apresentou a menor porcentagem de enraizamento (67,37%). 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 (Tabela 2.2). 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  $\text{NH}_4^+$  nos meios de cultura não inibiu o enraizamento das brotações, mas as quantidades mais elevadas no meio de cultura C<sub>2</sub>D podem ter influenciado nos resultados obtidos (Tabela 2.6).

A)



B)

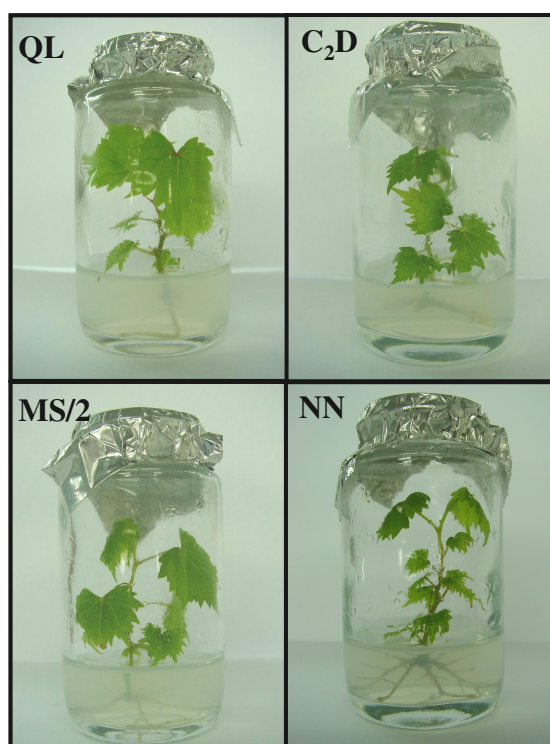


FIGURA 2.2 – BROTAÇÕES MICROPROPAGADAS DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’ EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA A) SUPLEMENTADOS COM 5  $\mu\text{M}$  DE BAP, NO SEGUNDO SUBCULTIVO E B) ISENTO DE REGULADOR VEGETAL, NO TERCEIRO SUBCULTIVO. BARRA: 1 cm.

## 2.4 CONCLUSÕES

Para o estabelecimento inicial do porta-enxerto de videira ‘VR043-43’ *in vitro*, a partir de segmentos nodais e multiplicação das microestacas, o meio de cultura QL apresentou-se adequado para o desenvolvimento das brotações, nas condições em que foram realizados os cultivos.

A citocinina BAP apresentou-se excessiva na concentração de 5 µM, para a multiplicação dos explantes.

O porta-enxerto de videira ‘VR043-43’ enraíza facilmente *in vitro*, não sendo necessário acrescentar auxina no meio de cultura.

## 2.5 REFERÊNCIAS

BARLASS, M.; SKENE, K. G. M. Studies on the fragmented shoot apex of grapevine. **Journal of Experimental Botany**, v. 34, n. 147, p. 1271-1279, 1983.

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. 1998.

BLAZINA, I.; RAVNIKAR, M.; ZOLNIR, M.; KOROSK-KORUZA, Z.; GOGALA, N. Regeneration of GFLV-free grapevines and synchronization of micropropagation *in vitro*. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, n. 289, p. 87-88, 1991.

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-SPI/Embrapa-CNPQ. 1998. v. 2. p. 87-132.

CHÉE, R.; POOL, R. M. *In vitro* vegetative propagation of *Vitis*: Application of

previously defined culture conditions to a selection of genotype. **Vitis**, Siebeldingen, v. 22, p. 363-374, 1983.

CHÉE, R.; POOL, R. M.; BUCHER, D. A method for large scale *in vitro* propagation of *Vitis*. New York. **Food Life Sci. Bul**, v. 109, p. 1-9, 1984.

CHÉE, R.; POOL, R. M. *In vitro* propagation of *Vitis*: the effects of organic substances on shoot multiplication. **Vitis**, Siebeldingen, v. 24, p. 106-118, 1985.

CLAUMANN, A. D.; MIRANDOLA, D.; STEINMACHER, D. A.; BORGHEZAN, M.; GUERRA, M. P.; SILVA, A. L. da. Efeito da sacarose no crescimento e nos parâmetros fotossintéticos de plântulas de videiras cultivadas *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18., 2004, Florianópolis. **Resumos Expandidos**. 1 CD-ROM.

COMPTON, M. E.; GRAY, D. J. Micropropagation of 'Southern Home' hybrid grape. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Wruter 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.

FANIZZA, G.; TANZARELLA, O. A.; CARROZZO, G. Influence of *Vitis* source on *in vitro* shoot apex culture. **Annals of Applied Biology**, v. 104, p. 577-578, 1984.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture** – Part 2: In practice. 2 ed. Edington: Exegetics, 1993. 1333p.

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 Press, 1981. p. 21-44.

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

GRAY, D. J.; BENTON, C. M. Micropropagation and plant establishment of muscadine grape. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Wruter Haven, v. 103, p. 300-3002, 1990.

GRAY, D. J.; FISHER, L. C. *In vitro* shoot propagation of grape, hybrids and cultivars. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Wruter Haven, v. 98, p. 172-174, 1985.

GRIBAUDO, I; FRONDA, A. Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds

cultivated *in vitro*. **HortScience**, 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.

HARRY, I. S.; THORPE, T. A. *In vitro* culture of forest trees. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. (Eds.). **Plant Cell and Tissue Culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 539-560, 1994.

KIRBY, E. G.; LEUSTEK, T.; LEE, M. S. Nitrogen Nutrition. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Eds.). **Cell and Tissue Culture in Forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. v. 1, p. 67-88.

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.

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.

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

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings International Plant Propagator's Society**, v. 30, p. 421-427, 1986.

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

MULLINS, M. G.; NAIR, Y.; SAMPET, P. Rejuvenation *in vitro*: induction of juvenile characters in na adult clone of *Vitis vinifera* L. **Annals of Botany**, London, v. 44, p. 623-627, 1979.

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.

NITSCH, J. P.; NITSCH, C. Haploid plants from pollen grains. **Science**, Washington, v. 163, p. 85-87, 1969.

PEIXOTO, P. H. P.; PASQUAL, M. Influência da origem dos explantes na multiplicação e no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de videira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 20, n. 3, p. 301-305, 1996.

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**, Wallingford, v. 38, p. 116-124, 2002.

THOMAS, P. Leaf number and position effects on the survival and performance of grape microcutting *in vitro*, and the sensitivity of the cut nodal region to the medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hauge, v. 65, p. 129-139, 2001.

ZIMMERMAN, R. H.; SWARTZ, H. J. *In vitro* culture of temperate fruits. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. (Eds.). **Plant Cell and Tissue Culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. p. 457-474.

### **3 6-BENZILAMINOPURINA E CINETINA NA MULTIPLICAÇÃO DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’ (*Vitis vinifera* L. X *Vitis rotundifolia* Michx.)**

#### **RESUMO**

A micropropagação é uma técnica que possibilita a propagação massal de plantas de interesse econômico. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina (CIN) na multiplicação do porta-enxerto de videira ‘VR043-43’. O isolamento das microestacas foi realizado em meio de cultura QL suplementado com BAP ou CIN, nas concentrações de 0; 2,5; 5,0 e 10,0  $\mu\text{M}$ . Os subcultivos foram realizados a cada 45 dias. O número de brotações por explante aumentou ao longo dos subcultivos com BAP. Esse efeito não foi observado com a CIN, que obteve resultado semelhante ao da testemunha (1,0 brotação/explante). As concentrações de 5,0 e 10,0  $\mu\text{M}$  de BAP promoveram o maior número de brotações, porém com redução da altura. A concentração mais elevada de CIN (10,0  $\mu\text{M}$ ) também teve efeito negativo na altura das brotações, assim como no número de folhas por brotação. A formação de calo (100%) foi observada com BAP e CIN em todas as concentrações e na ausência de citocinina não houve a formação de calo. A citocinina BAP reduziu a formação de raízes, que foi de 100% com a CIN e a testemunha.

**Palavras-chave:** citocinina, proliferação, enraizamento.

**6-BENZYLAMINOPURINE AND KINETIN IN MULTIPLICATION OF  
GRAPEVINE ROOTSTOCK 'VR043-43' (*Vitis vinifera* L. X *Vitis  
rotundifolia* Michx.)**

**ABSTRACT**

The micropropagation is one technique that makes possible the massal propagation of plants of economic interest. The objective of this work was to evaluate the effect of 6-benzylaminopurine (BAP) and kinetin (KIN) in grapevine rootstock 'VR043-43' multiplication. The isolation the microcuttings was made with culture medium QL, supplemented with BAP or KIN. The concentrations were 0; 2.5; 5.0 and 10.0  $\mu\text{M}$ . The subcultures was preparing each 45 days. The number of shoots per explant increased to the long one of the subcultures with BAP. However this effect was not observed with addition of KIN. Its behavior was similar to the cytokin-free treatment (1.0 shoot/explant). Concentrations of 5.0 nd 10.0  $\mu\text{M}$  of BAP had promoted the biggest number of shoots, being reduced their height. The raised concentration of KIN (10.0  $\mu\text{M}$ ) also caused negative effect for shoots height as well as leaf number per shoot. All explants presented callus formation (100%) when were treated with BAP and KIN in all concentrations; without cytokine application, callus did not were present. Cytokinin BAP reduced roots formation, while KIN and cytokinin treatments the roots formation were 100% .

**Key words:** cytokinin, proliferation, rooting.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A propagação vegetativa do porta-enxerto de videira ‘VR043-43’ (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*) pelo enraizamento de estacas lenhosas não é viável, devido a sua dificuldade de enraizamento (BOTELHO et al., 2005). O mesmo também ocorre com cultivares da espécie *Vitis rotundifolia* (PIRES & BIASI, 2003). 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* (GRAY & FISHER, 1985; CAO, 1990; GRAY & BENTON, 1990; SUDARSONO & GOLDY, 1991; COMPTON & GRAY, 1994; MEYERSON et al., 1994; WETZSTEIN & MYERS, 1994).

Para a multiplicação dos explantes de videiras, dois métodos são sugeridos, sendo 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 tufos de brotações não enraizadas (JONA & WEBB, 1978; BOUQUET & TORREGROSA, 2003).

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 (CHÉE et al., 1984; REISCH, 1986; GRAY & FISHER, 1985; GRAY & BENTON, 1990; LEE & WETZSTEIN, 1990; MEYERSON et al., 1994; DZAZIO et al., 2002). Contudo, a concentração e o tipo de citocinina, para a melhor proliferação de brotações, variou entre os diferentes genótipos estudados.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de 6-benzilaminopurina e cinetina em diferentes concentrações na multiplicação do porta-enxerto de videira ‘VR043-43’.

## 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, Curitiba, Paraná.

### 3.2.1 Material vegetal

Segmentos nodais de aproximadamente 1,0 cm de comprimento, com uma gema axilar, foram coletados de plantas matrizes do porta-enxerto de videira ‘VR043-43’ mantidas em casa-de-vegetação. A assepsia foi realizada pelo tratamento com Benlate<sup>®</sup> (2 g L<sup>-1</sup>) 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.

Para o primeiro cultivo de multiplicação os explantes utilizados foram segmentos nodais com uma gema axilar, uma folha e com aproximadamente 1,0 cm de comprimento, retirados de plantas provenientes do quinto subcultivo em meio de cultura QL (QUOIRIN & LEPOIVRE, 1977) isento de reguladores de crescimento.

### 3.2.2 Subcultivos

O isolamento das microestacas foi realizado em frascos de 250 ml contendo 30 ml do meio de cultura QL, suplementado com as vitaminas do meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar (Vetec<sup>®</sup>) e o pH foi ajustado para 5,8. Os meios de cultura foram esterilizados à temperatura de 121 °C, durante 20 minutos e 1,5 atm.

Os tratamentos consistiram de diferentes concentrações de BAP (0; 2,5; 5,0 e 10 µM) e cinetina (0; 2,5; 5,0 e 10 µM). Nos três subcultivos, as microestacas foram padronizadas com 1,0 cm de altura e duas folhas.

### 3.2.3 Ambiente de cultivo

Todos os tratamentos foram mantidos em sala climatizada, com fotoperíodo de 16 horas fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia, intensidade luminosa de aproximadamente  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e temperatura de  $25 \pm 2^\circ \text{C}$ .

### 3.2.4 Variáveis analisadas

As avaliações foram realizadas a cada 40 dias, a partir da instalação do experimento, num total de quatro avaliações. Avaliou-se número de brotações por explante, altura das brotações, número de folhas por brotação, porcentagem de enraizamento e porcentagem de formação de calo.

### 3.2.5 Análise estatística

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com parcelas subdivididas, com quatro repetições e quatro frascos por parcela com três explantes por frasco. Nas parcelas foram aplicados oito tratamentos constituídos pelas duas citocininas (BAP e CIN) em quatro concentrações (0; 2,5; 5,0 e 10,0  $\mu\text{M}$ ). Os quatro subcultivos compuseram as sub-parcelas. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

## 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância apresentou efeito significativo dos tratamentos para todas as variáveis analisadas, ocorrendo interação entre os fatores citocinina, concentração e subcultivo (Anexo 7).

Observa-se na Figura 3.1, que nos quatro subcultivos avaliados as maiores concentrações de BAP (5,0 e 10,0  $\mu\text{M}$ ) promoveram maior número de brotações por explante. Na testemunha obteve-se, em todos os subcultivos, 1,0 brotação por

explante. No terceiro e quarto subcultivos, a concentração de 10  $\mu\text{M}$  de BAP foi significativamente superior as demais, sendo obtidas aproximadamente 7,0 brotações por explante. Também para a indução de brotações de cultivares de *Vitis vinifera*, altas concentrações de BAP foram requeridas (MHATRE et al., 2000), assim como para cultivares de videiras muscadíneas (GRAY & BENTON, 1991). O meio de cultura MS/2 suplementado com 4,4  $\mu\text{M}$  de BAP promoveu alto número de brotações por explantes, para os híbridos de *Vitis X Muscadinia* (TORREGROSA et al., 1995). Para várias espécies do subgênero *Euvitis* a BAP tem demonstrado ser efetiva no aumento da proliferação da gema axilar, com nível ótimo entre 5,0 a 10,0  $\mu\text{M}$  (GOUSSARD, 1981; HARRIS & STEVENSON, 1982; GRAY & FISHER, 1985; REISCH, 1986). O número e a qualidade das brotações dos cultivares Fry, Carlos e Dixie foram altos quando o meio foi suplementado com 5 a 20  $\mu\text{M}$  BAP (GRAY & BENTON, 1991). A formação de brotações múltiplas é característica da BAP, que induz a formação de grande número de brotações e alta taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação (MARTINELLI, 1985).

Contudo, as brotações em meio de cultura contendo BAP não foram homogêneas, e apresentaram sintomas de hiperhidricidade que se acentuaram com concentrações mais elevadas (Figuras 3.7A e 3.7B). Da mesma forma, concentrações elevadas de BAP promoveram hiperhidricidade em brotações do porta-enxerto de videira '420-A' (DZAZIO et al., 2002).

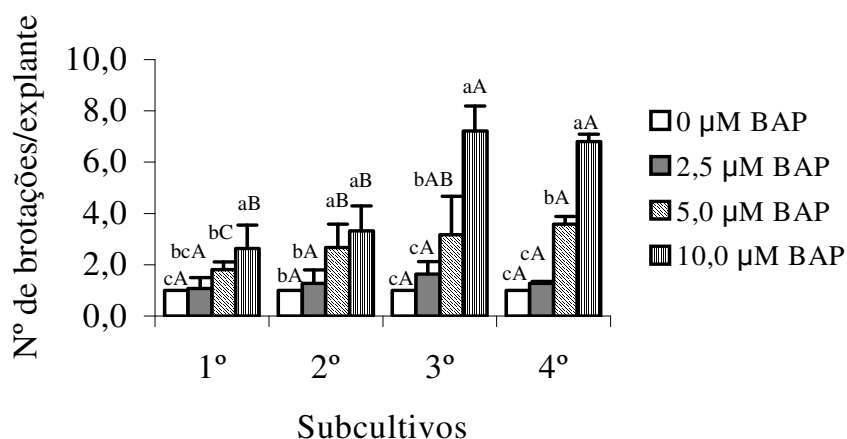


FIGURA 3.1 – EFEITO DE 6-BENZILAMINOPURINA (BAP), EM MEIO DE CULTURA QL, NO NÚMERO DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE DO PORTA-ENXERTO ‘VR043-43’, EM QUATRO SUBCULTIVOS. LETRAS MINÚSCULAS REPRESENTAM O FATOR CONCENTRAÇÃO E MAIÚSCULAS O FATOR SUBCULTIVO, SENDO QUE LETRAS IGUAIS NÃO SÃO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PELO TESTE DE DUNCAN A 5% DE PROBABILIDADE. C.V.(%) = 29,62.

Em todas as concentrações testadas, a cinetina apresentou efeito semelhante à testemunha (1,0 brotação/explante) (Figuras 3.2 e 3.8). Resultados semelhantes aos encontrados nesse trabalho foram observados na micropropagação de cultivares de *Vitis rotundifolia*, onde os meios de cultura com e sem a presença de cinetina apresentaram o mesmo efeito (GRAY & BENTON, 1991). Em trabalhos com *Vitis rotundifolia*, o efeito da cinetina na indução do crescimento e desenvolvimento de gemas axilares apresentou-se baixo (SUDARSONO & GOLDY, 1991), assim como no trabalho com ápices fragmentados (SKENE & BARLASS, 1980). Além disso, a cinetina em concentrações de 20,0 µM não teve efeito na multiplicação de *Vitis riparia* M. x *Vitis berlandieri* P. (NOVÁK & JUVOVA, 1982).

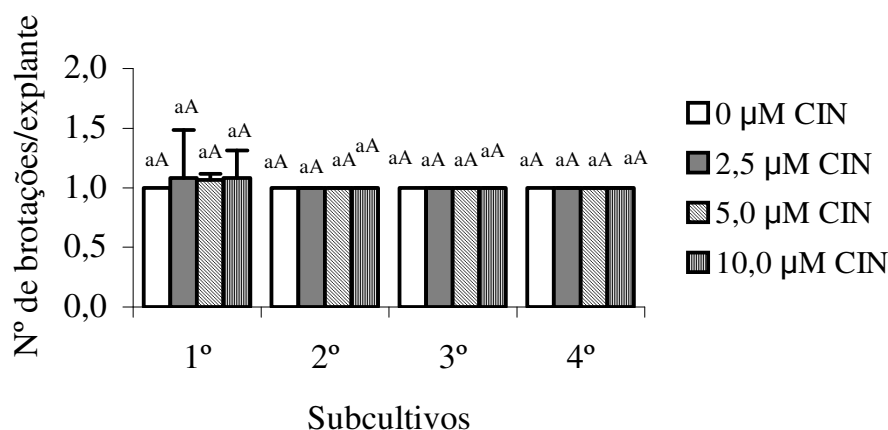


FIGURA 3.2 – EFEITO DA CINETINA (CIN), EM MEIO DE CULTURA QL, NO NÚMERO DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE DO PORTA-ENXERTO ‘VR043-43’, EM QUATRO SUBCULTIVOS. LETRAS MINÚSCULAS REPRESENTAM O FATOR CONCENTRAÇÃO E MAIÚSCULAS O FATOR SUBCULTIVO, SENDO QUE LETRAS IGUAIS NÃO SÃO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PELO TESTE DE DUNCAN A 5% DE PROBABILIDADE. C.V.(%) = 29,62.

A citocinina BAP teve efeito negativo na altura das brotações, sendo mais evidente nas maiores concentrações testadas (5,0 e 10,0 µM). Na ausência de BAP, nos quatro subcultivos, a altura das brotações foi em média de 3,6 cm, e nas concentrações de 5,0 e 10,0 µM de BAP, a altura das brotações foi em média de 2,0 e 1,6 cm, respectivamente (Figura 3.3). A produção de brotações pouco alongadas com a adição de BAP no meio de cultura também foi observada com as cultivares Thompson Seedless, Sonaka e Tas-e-Ganesh, sendo necessária uma fase de alongamento (MHATRE et al., 2000).

Além disso, concentrações muito elevadas também são prejudiciais, causando a formação de brotações anormais e hiperhídricas (HARRIS & STEVENSON, 1982; CHÉE & POOL, 1985; LEE & WETZSTEIN, 1990).

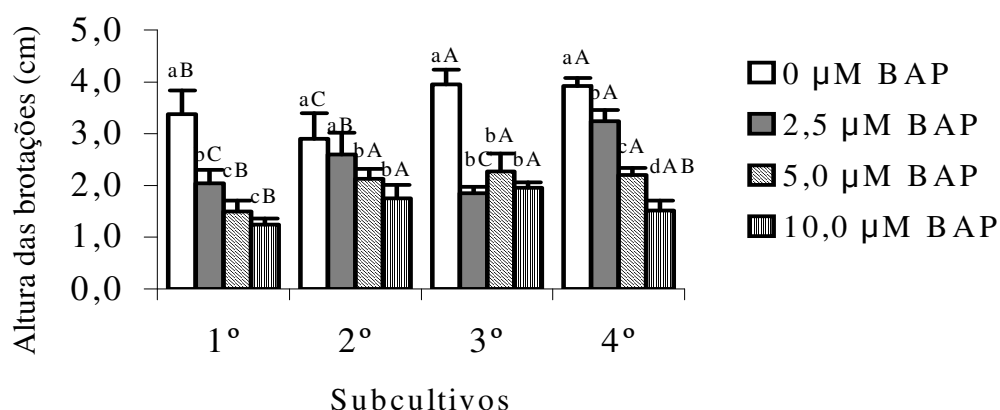


FIGURA 3.3 – EFEITO DE 6-BENZILAMINOPURINA (BAP), EM MEIO DE CULTURA QL, NA ALTURA DAS BROTAÇÕES DO PORTA-ENXERTO ‘VR043-43’, EM QUATRO SUBCULTIVOS. LETRAS MINÚSCULAS REPRESENTAM O FATOR CONCENTRAÇÃO E MAIÚSCULAS O FATOR SUBCULTIVO, SENDO QUE LETRAS IGUAIS NÃO SÃO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PELO TESTE DE DUNCAN A 5% DE PROBABILIDADE. C.V. (%) = 11,13.

Diferente do que ocorreu com a BAP, as brotações em meio de cultura contendo 2,5 μM de cinetina tiveram um aumento na altura no segundo e quarto subcultivos. Porém, assim como a BAP, as concentrações mais elevadas (5,0 e 10,0 μM) reduziram a altura das brotações (Figura 3.4). Isso mostra que a cinetina promove o crescimento das brotações, mas é necessário que seja adicionada no meio de cultura a concentração adequada, sendo para o porta-enxerto ‘VR043-43’ de 2,5 μM. Diferente do que foi observado no presente trabalho, NOVÁK & JUVOVA (1982) demonstraram que a cinetina na concentração de 20,0 μM teve efeito positivo na altura das brotações de híbridos de videira. Com isso, a concentração da citocinina para a multiplicação depende do genótipo.

Os resultados encontrados no presente trabalho estão de acordo com KORUZA & JELASKA (1993), que observaram inibição no crescimento das brotações na subcultura repetida em meio de cultura com citocinina.

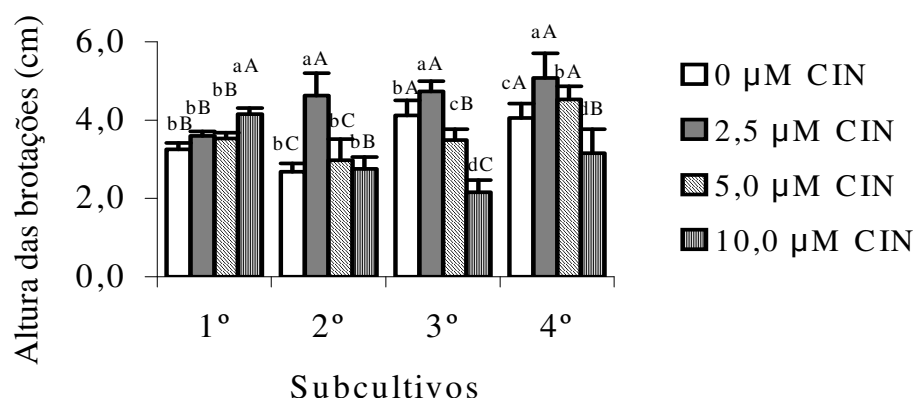


FIGURA 3.4 – EFEITO DA KINETINA (CIN) NA ALTURA DAS BROTAÇÕES DO PORTA-ENXERTO ‘VR043-43’, EM QUATRO SUBCULTIVOS. LETRAS MINÚSCULAS REPRESENTAM O FATOR CONCENTRAÇÃO E MAIÚSCULAS O FATOR SUBCULTIVO, SENDO QUE LETRAS IGUAIS NÃO SÃO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PELO TESTE DE DUNCAN A 5% DE PROBABILIDADE. C.V. (%) = 11,13.

Para a variável número de folhas por brotação, a citocinina BAP apresentou resultados inferiores à testemunha no primeiro subcultivo. Nos cultivos posteriores, o número de folhas por brotação aumentou, sendo encontrados valores próximos ao da testemunha (Figura 3.5). DZAZIO et al. (2002) obtiveram resultados semelhantes, onde o número de folhas por brotação nas concentrações de 5,0 e 10,0  $\mu\text{M}$  de BAP no primeiro subcultivo foi inferior à testemunha.

As concentrações mais elevadas de cinetina (5,0 e 10,0  $\mu\text{M}$ ) apresentaram o menor número de folhas por brotação nos quatro subcultivos (Figura 3.6). Também no trabalho com o porta-enxerto de videira ‘420-A’, obteve-se os menores números de folhas por brotação com as concentrações de 5,0 e 10,0  $\mu\text{M}$  de cinetina (DZAZIO et al., 2002).

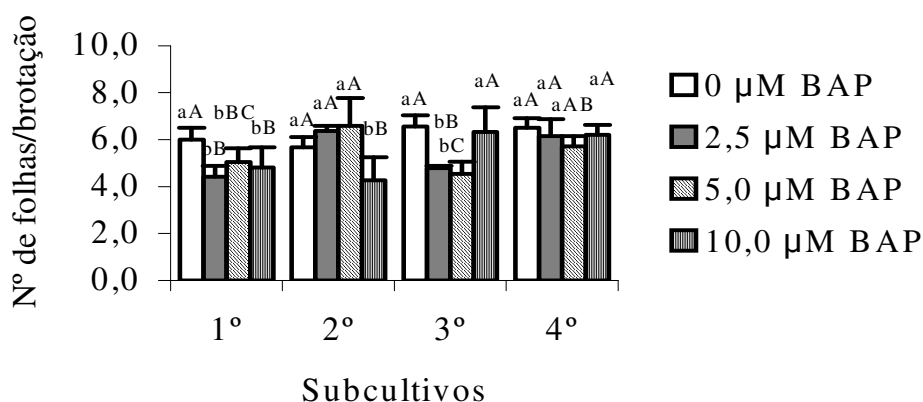


FIGURA 3.5 – EFEITO DE 6-BENZILAMINOPURINA (BAP), EM MEIO DE CULTURA QL, NO NÚMERO DE FOLHAS POR EXPLANTE DO PORTA-ENXERTO ‘VR043-43’, EM QUATRO SUBCULTIVOS. LETRAS MINÚSCULAS REPRESENTAM O FATOR CONCENTRAÇÃO E MAIÚSCULAS O FATOR SUBCULTIVO, SENDO QUE LETRAS IGUAIS NÃO SÃO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PELO TESTE DE DUNCAN A 5% DE PROBABILIDADE. C.V. (%) = 11,90.

Observou-se que 100% das microestacas tiveram formação de calo na base, tanto com a citocinina BAP em menor quantidade quanto com a cinetina. No entanto, não se verificou formação de calo nas microestacas na ausência de citocinina (Tabela 3.1 e Figuras 3.7 e 3.8).

Houve 100% de enraizamento das microestacas em meio de cultura QL isento de citocinina (Tabela 3.1), apresentando-se como uma característica do porta-enxerto de videira ‘VR043-43’. Com esse porta-enxerto é possível formar uma única planta enraizada a partir de um segmento nodal com uma gema axilar em meio de cultura sem regulador de crescimento, assim como observado por JONA & WEBB (1978) e BOUQUET & TORREGROSA (2003). Da mesma forma, BIASI et al. (1998) obtiveram resultados próximos a 100% de enraizamento com o porta-enxerto ‘Jales’ em meio de cultura sem regulador de crescimento. Entretanto, brotações de cultivares de *Vitis rotundifolia* cultivadas em meio de cultura MS sem a presença de regulador de crescimento obtiveram 55% de enraizamento (GRAY & BENTON, 1991).

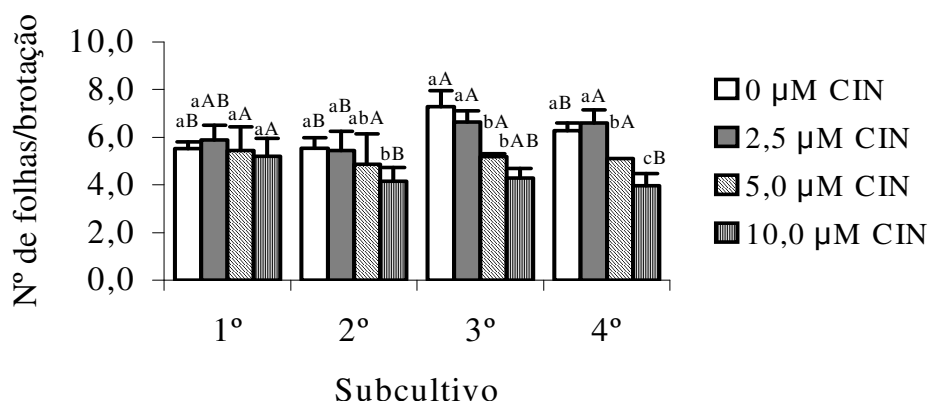


FIGURA 3.6 – EFEITO DA KINETINA (CIN), EM MEIO DE CULTURA QL, NO NÚMERO DE FOLHAS POR EXPLANTE DO PORTA-ENXERTO ‘VR043-43’, EM QUATRO SUBCULTIVOS. LETRAS MINÚSCULAS REPRESENTAM O FATOR CONCENTRAÇÃO E MAIÚSCULAS O FATOR SUBCULTIVO, SENDO QUE LETRAS IGUAIS NÃO SÃO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PELO TESTE DE DUNCAN A 5% DE PROBABILIDADE. C.V. (%) = 11,90.

As concentrações de BAP testadas reduziram a formação de raízes, inibindo totalmente o enraizamento no terceiro subcultivo. A CIN não inibiu o enraizamento das microestacas, apenas a concentração de 10,0 µM no quarto subcultivo reduziu significativamente a porcentagem de enraizamento (65,8%) (Tabela 3.1).

Para a videira, a rizogênese 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).

Tabela 3.1 – EFEITO DE 6-BENZILAMINOPURINA (BAP) E CINETINA (CIN), EM MEIO DE CULTURA QL, NA PORCENTAGEM DE FORMAÇÃO DE CALO E PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO DAS MICROESTACAS DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’, EM QUATRO SUBCULTIVOS.

Citocinina	Calo (%) <sup>1</sup>				Enraizamento (%) <sup>1</sup>			
	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°
0,0 µM BAP	0,0bA	0,0bA	0,0bA	0,0bA	100aA	100aA	100aA	100aA
2,5 µM BAP	100aA	100aA	100aA	100aA	19,3bC	40,6bB	0,0bD	57,0cA
5,0 µM BAP	100aA	100aA	100aA	100aA	0,0cC	21,6dB	0,0bC	80,0bA
10,0 µMBAP	100aA	100aA	100aA	100aA	0,0cC	24,2cB	0,0bC	43,7dA
0,0 µM CIN	0,0cA	0,0bA	0,0cA	0,0bA	100aA	100aA	100aA	100aA
2,5 µM CIN	83,4bB	100aA	66,9bC	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA
5,0 µM CIN	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA
10,0 µM CIN	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	65,8bB
C.V. (%)	0,66				1,28			

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

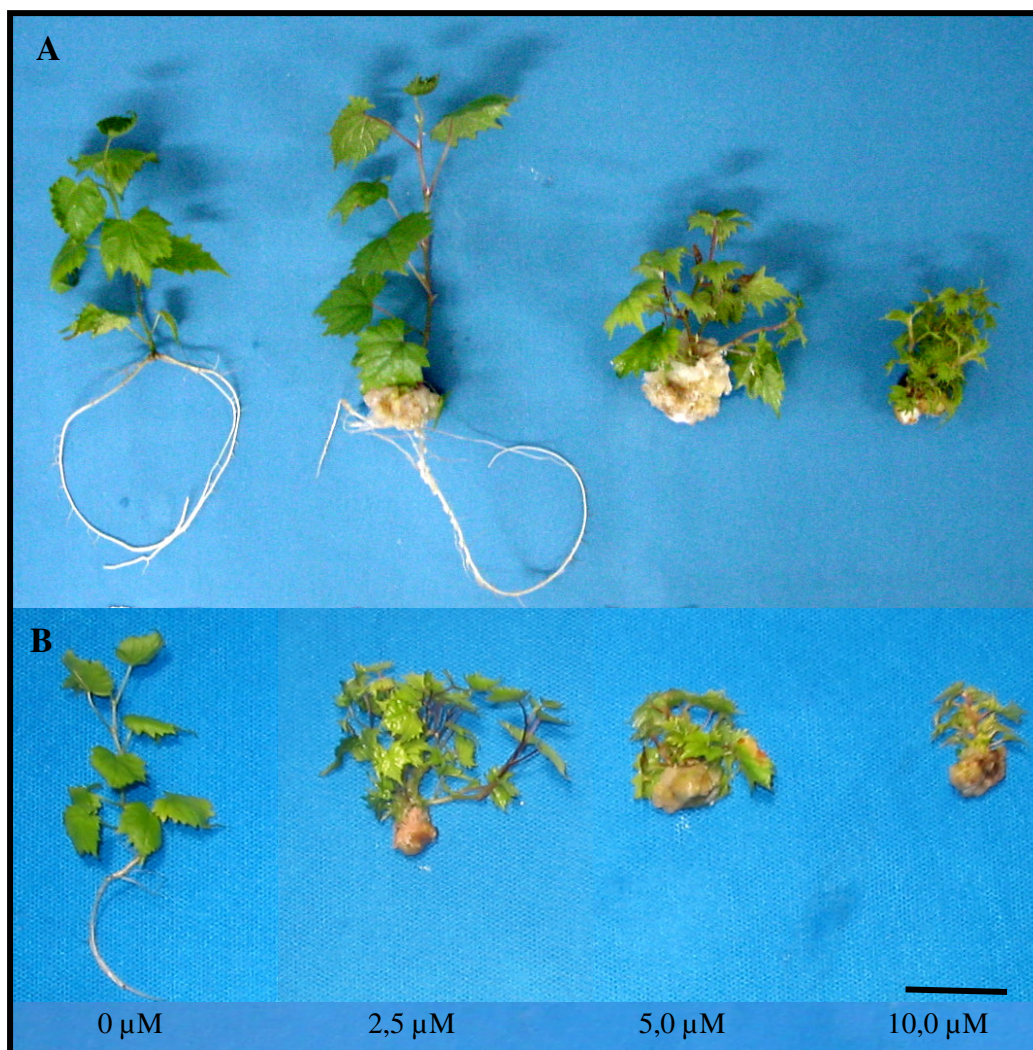


FIGURA 3.7 - EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP (6-BENZILAMINOPURINA), EM MEIO DE CULTURA QL, NO A) PRIMEIRO SUBCULTIVO E B) QUARTO SUBCULTIVO DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA 'VR043-43'. BARRA: 3 cm.

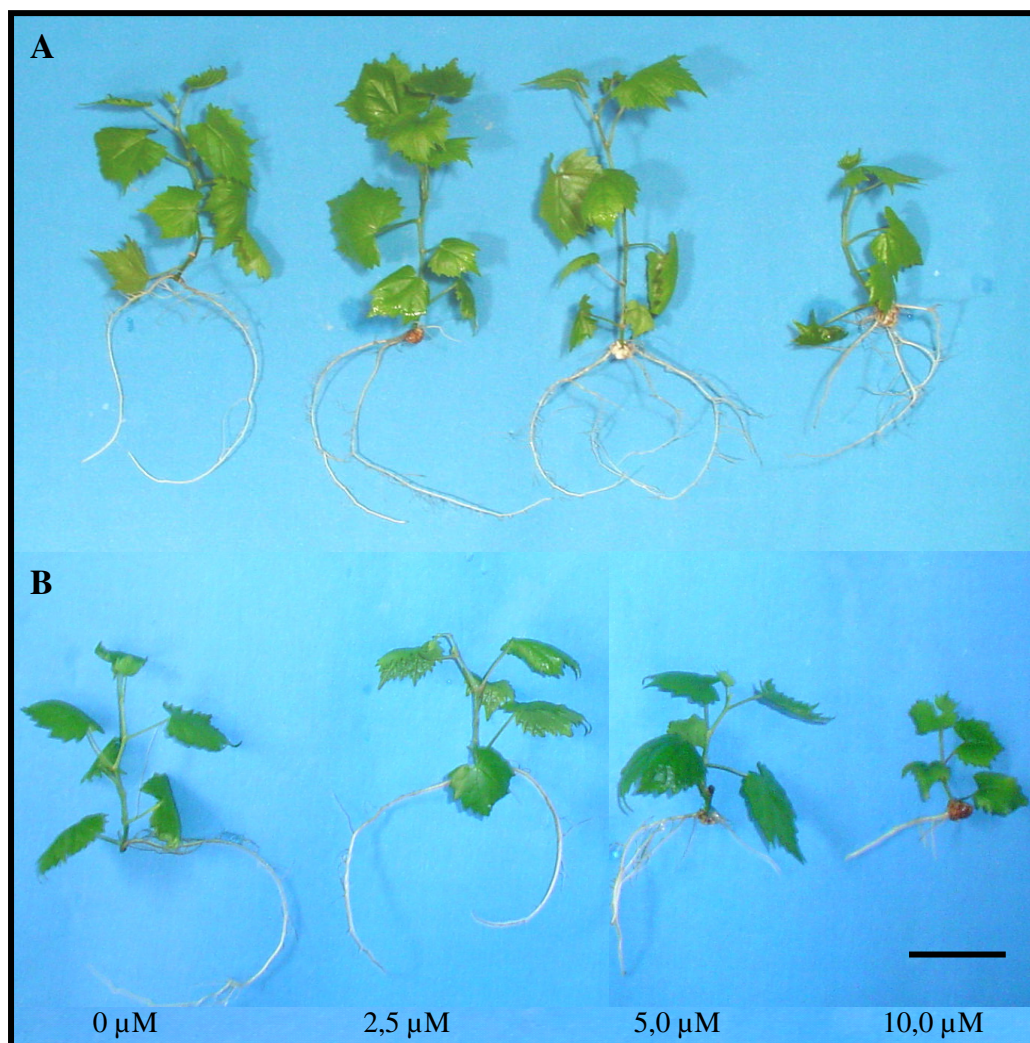


FIGURA 3.8 EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE KINETINA (CIN), EM MEIO DE CULTURA QL, NO A) PRIMEIRO SUBCULTIVO E B) QUARTO SUBCULTIVO DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA 'VR043-43'. BARRA: 3 cm.

### 3.4 CONCLUSÕES

A utilização de BAP na concentração de 5,0  $\mu\text{M}$  requer uma fase de alongamento, podendo a qualidade das brotações ser comprometida durante os repetidos subcultivos na presença da citocinina.

O porta-enxerto 'VR043-43' apresenta uma fraca resposta a cinetina para a multiplicação das brotações.

A multiplicação do porta-enxerto de videira 'VR043-43' pode ser realizada pela obtenção de microestacas, a partir de uma única planta enraizada em meio de cultura isento de regulador de crescimento.

### 3.5 REFERÊNCIAS

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, 1998.

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 'VR043-43' (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 6-8, 2005.

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

CAO, Z. Grape: Micropropagação. In: CHEN, Z.; EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, R. V.; SONDHAL, M. R. (Eds.). **Handbook of Plant Cell Culture**. Vol 6, Perennial Crops. New York: Academic. 1990. p. 321-328.

CHÉE, R.; POOL, R. M.; BUCHER, D. A method for large scale *in vitro* propagation of *Vitis*. **New York's Food and Life Sciences Bulletin**, New York, v. 109, p. 1-9, 1984.

CHÉE, R.; POOL, R. M. *In vitro* propagation of *Vitis*: the effects of organic substances on shoot multiplication. **Vitis**, Siebeldingen, v. 24, p. 106-118, 1985.

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.

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

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.

GRAY, D. J.; BENTON, C. M. Micropropagation and plant establishment of muscadine grape. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, Hruter Haven, v. 103, p. 300-302, 1990.

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

GRAY, D. J.; FISHER, L. C. *In vitro* shoot propagation of grape, hybrids and cultivars. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Wruter Haven, v. 98, p. 172-174, 1985.

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

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.

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

MARTINELLI, A. Factors affecting *in vitro* propagation of the peach almond hybrids 'Hansen 536'. **Acta Horticulture**, Amsterdam, v. 173, p. 237-244, 1985.

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.

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**, Wronter Haven, v. 107, p. 311-312, 1994.

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.

NOVÁK, F. J.; JUVOVA, Z. Clonal propagation of grapevine through *in vitro* axillary bud culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 18, p. 231-240, 1982.

PIRES, E. J. P.; BIASI, L. A. Propagação da videira. In: POMMER, C. V. **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita e mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes. 2003. p. 295-350.

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

REISCH, B. I. Influence of genotype and cytokinins on *in vitro* shoot proliferation of grapes. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 111, p. 138-141, 1986.

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

SKENE, K. G. M.; BARLASS, M. Micropropagation of grapevine. **International Plant Propagators' Society Combined Proceedings**, v. 30, p. 564-570, 1980.

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

TORREGROSA, L.; TORRES-VIÑALS, M.; BOUQUET, A. Somatic embryogenesis from leaves of *Vitis* x *Muscadinea* hybrids. **Vitis**, Siebeldingen, v. 34, p. 239-240, 1995.

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.

#### 4 MORFO-ANATOMIA DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’ (*Vitis vinifera* L. X *Vitis rotundifolia* Michx.), EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

##### RESUMO

O sucesso da micropropagação é determinado pela sobrevivência das plantas quando transferidas para o ambiente *ex vitro*. A morfo-anatomia das plantas regeneradas *in vitro* é, geralmente, diferente daquela cultivada em casa-de-vegetação ou no campo. Além disso, devido às condições que as plantas micropropagadas se desenvolvem elas estão sujeitas ao complexo fenômeno da hiperhidricidade, que pode dificultar ou inviabilizar a sua sobrevivência na aclimatização. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a morfo-anatomia de plantas do porta-enxerto de videira ‘VR043-43’ cultivadas *in vitro* (normais e hiperhídricas), aclimatizadas e *in vivo*. As plantas foram micropropagadas em meio de cultura QL, acrescido ou não de 5 µM de BAP (6-benzilaminopurina). As plantas aclimatizadas foram mantidas em casa-de-vegetação, assim como as plantas *in vivo*. Foram realizadas análises anatômicas e microscopia eletrônica de varredura. Somente as folhas *in vivo* apresentam depósito de cera na face adaxial. As folhas das plantas dos quatro tratamentos são hipoestomáticas, com epiderme unisseriada. As células da epiderme da face adaxial são mais altas no eixo anticlinal nas plantas *in vivo*. Os estômatos das folhas *in vitro* e hiperhídricas apresentam maior irregularidade no tamanho. As folhas *in vivo* apresentam parênquima paliçádico uniestratificado, parênquima lacunoso trisseriado com espaços intercelulares pequenos e células do mesofilo com conteúdo denso. As folhas *in vitro* (normais e hiperhídricas) diferem das folhas *in vivo* por apresentarem células epidérmicas semelhantes em ambas as faces e duas camadas de parênquima lacunoso. Nas folhas hiperhídricas o parênquima lacunoso apresenta espaços intercelulares maiores que as folhas *in vitro* normais. As folhas das plantas aclimatizadas possuem características semelhantes às folhas *in vivo*, porém observou-se uma fase transitória entre as plantas *in vitro* e *in vivo*.

**Palavras-chave:** micropropagação, aclimatização, hiperhidricidade.

## MORPHO-ANATOMY OF GRAPEVINE ROOTSTOCK 'VR043-43' (*Vitis vinifera* L. X *Vitis rotundifolia* Michx.) IN DIFFERENTS CULTURE CONDITIONS

### ABSTRACT

The success of micropropagation is determined by the survival of the plants when transferred to the *ex vitro* environment. To morpho-anatomy of the plants regenerate *in vitro* is generally different from cultivated in greenhouse or in the field. Due to the conditions that the plants micropropagated develop, they subject to the complex phenomenon of the hiperhydricity that can complicate or impede the survival of the plants in the aclimatization. The objective of this work was to characterize the morphoanatomy of plants of the grapevine rootstock 'VR043-43' cultivated *in vitro* (normal and hiperhydric), aclimatized and greenhouse-grown plants. The plants were micropropagated in QL culture, added or not with 5  $\mu$ M of BAP (6-benzylaminopurine). The plants aclimatized were maintained in greenhouse, as well as the greenhouse-grown plants. It was carried out analysis in scanning electron micrograph and anatomic analysis. Only the leaves of greenhouse-grown plants, present deposit of wax in the adaxial leaf surface. The leaves of the plants of the four handlings are hypostomatic, with epidermis unisseriada. The cells of the epidermis of the adaxial surface are higher in the axis anticlinal in the greenhouse-grown plants. The stomatas of the leaves *in vitro* and hiperhydric present bigger irregularity in the size. The leaves of greenhouse-grown plants present one layer of palisade, three layers of spongy parenchyma with small intercellular spaces, cells of the mesophyll with dense content. The leaves *in vitro* (normal and hiperhydricity leaves) differ of the leaves greenhouse-grown plants by present epidermic cells similar in both to the surfaces and two layers of spongy parenchyma. In the leaves hiperhydric the spongy parenchyma presents bigger intercellular spaces than the leaves *in vitro* normal. The leaves of the plants aclimatized possess similar characteristics to the leaves of greenhouse-grown plants, however observes-itself a transitory phase between the leaves *in vitro* and greenhouse-grown plants.

**Key words :** micropropagation, aclimatization, hyperhydricity.

## 4.1 INTRODUÇÃO

Para videiras, a micropropagação pode ser uma alternativa viável para a multiplicação em larga escala de plantas para porta-enxertos ou matrizes (BIASI et al., 1998), desde que sejam fornecidas condições adequadas durante todo o processo.

O cultivo *in vitro* induz a adaptações anatômicas e morfológicas, sendo a drástica redução no tamanho dos órgãos a mais evidente. A organização histológica dos tecidos é fortemente alterada (BOUQUET & TORREGROSA, 2003). DAMI & HUGES (1995) demonstraram que as folhas *in vitro* de videira contém células do mesofilo grandes e deficientes em tecido paliçádico.

O ambiente *in vitro* apresenta baixa luminosidade, alta umidade relativa, condições assépticas e alta concentração de sacarose no meio de cultura, que propicia o crescimento heterotrófico das plantas (PREECE & SUTTER, 1991), com dificuldades de sobrevivência quando transferidas para o ambiente *ex vitro* (ZIV, 1991).

O estresse hídrico que as plantas sofrem na aclimatização pode resultar da excessiva transpiração, principalmente pelas folhas, ou da inadequada absorção de água pelas raízes (PREECE & SUTTER, 1991), devido à conexão vascular deficiente entre o caule e a raiz (GROUT & ASTON, 1977). As folhas das plantas *in vitro* são geralmente finas, tenras, fotossinteticamente pouco ativas e com maior densidade estomática, por isso, mal adaptadas às condições *ex vitro* (WETZSTEIN & SOMMER, 1983; SUTTER, 1988; PIERIK, 1990).

Além disso, devido às condições que as plantas micropropagadas se desenvolvem, estão sujeitas ao complexo fenômeno da hiperhidricidade, que pode dificultar ou inviabilizar a sobrevivência das plantas na aclimatização (PREECE & SUTTER, 1991).

O estudo de estruturas anatômicas no cultivo *in vitro* é de grande importância para a correta condução da fase de aclimatização, sendo um indicativo de adaptação ao ambiente de cultivo. A avaliação da mudança estrutural durante a aclimatização é

necessária para a compreensão deste processo de adaptação.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a morfo-anatomia de plantas do porta-enxerto de videira 'VR043-43' cultivadas *in vitro* (normais e hiperhídricas), aclimatizadas e *in vivo*.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Plantas *in vitro*

A micropropagação das plantas foi realizada no Laboratório de Micropropagação de Plantas, do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

As plantas *in vitro* (normais) foram obtidas a partir de segmentos nodais do porta-enxerto 'VR043-43', com 10 mm de comprimento, uma gema e uma folha, provenientes do terceiro subcultivo. Os explantes foram isolados em meio de cultura QL (QUOIRIN & LEPOIVRE, 1977), suplementado com as vitaminas do meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar (Vetec<sup>®</sup>) e pH ajustado para 5,8. Os frascos de cultivo continham 10 ml de meio de cultura e foram tampados com papel alumínio. O meio de cultura foi esterilizado à temperatura de 121 °C, durante 20 minutos e 1,5 atm.

As folhas com sintomas de hiperhidricidade foram coletadas das plantas provenientes do segundo subcultivo, a partir de segmentos nodais, em meio de cultura QL suplementado com 5,0 µM de BAP.

### 4.2.2 Plantas aclimatizadas

As plantas foram aclimatizadas na casa-de-vegetação do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná. As mudas micropropagadas foram transferidas para o ambiente *ex vitro*,

após 30 dias de cultivo *in vitro*. No momento do transplante as raízes das plantas foram lavadas e transferidas para tubetes de 53 cm<sup>3</sup> de volume, contendo substrato comercial (Plantmax<sup>®</sup>). As plantas foram mantidas em câmara de nebulização intermitente por 10 dias e transferidas para casa-de-vegetação com irrigação manual. A coleta das folhas foi realizada após 90 dias de aclimatização.

#### 4.2.3 Plantas *in vivo*

As folhas *in vivo* foram coletadas de plantas mantidas em vasos na casa-de-vegetação do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

#### 4.2.4 Análises anatômicas

Para a análise anatômica qualitativa foram coletadas amostras de folha de dez indivíduos por tratamento. Foram coletadas folhas maduras a partir do 3° ou 4° nó, contando-se do ápice para a base do caule a partir da gema apical. As observações anatômicas da folha foram feitas na região mediana do limbo.

A fixação das amostras foi feita em F.A.A. 70 (álcool 70%, ácido acético e formoldeído, 90:5:5) (JOHANSEN, 1940), e posteriormente conservadas em álcool 70%. Lâminas semipermanentes e permanentes foram utilizadas para as análises. Os materiais destinados à preparação de lâminas permanentes foram incluídos em metacrilato-glicol (historresina-Leica), segundo a técnica de FEDER & O'BRIEN (1968) e as indicações do fabricante. Os blocos foram seccionados em micrótomo de rotação e os cortes foram obtidos com 7 µm de espessura, corados com fucsina básica e azul de astra (FEDER & O'BRIEN, 1968). As lâminas foram montadas com resina sintética (Permalte<sup>®</sup>).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná.

As folhas foram fixadas em solução de FAA 70%, desidratadas em série etílica, secas pelo método do ponto crítico, montadas sobre suportes de alumínio e recobertas com uma camada de ouro de 30 a 40 nm. As observações e fotografias foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL JSM – 6360 LV, operando a 10 KV.

A densidade estomática foi avaliada nos 10 indivíduos de cada tratamento, por meio de laminas semipermanentes. A contagem estomática foi realizada com projeção de imagem através de câmara clara, utilizando-se a objetiva de 40X. A imagem foi projetada sobre um quadrado de 8 cm de lado, correspondendo a 200  $\mu\text{m}$  de superfície foliar. Foram efetuadas 5 contagens para cada folha totalizando 1  $\text{mm}^2$  de área foliar.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 10 repetições. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância.

#### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises histológicas revelaram que as folhas das diferentes condições de cultivo são hipoestomáticas, com epiderme unisseriada (Figura 4.1).

As folhas *in vivo* apresentam parênquima paliçádico uniestratificado, parênquima lacunoso trisseriado com espaços intercelulares pequenos, células do mesofilo com conteúdo denso. As células da epiderme da face adaxial são mais altas no eixo anticlinal nas folhas *in vivo* (Figura 4.1A).

O mesofilo da folha das plantas cultivada *in vitro* (normal) apresentou-se organizado, porém mais fino quando comparado com o mesofilo de plantas *in vivo* e aclimatizadas, e parênquima lacunoso bisseriado (Figura 4.1B). Assim como observado com o porta-enxerto 'VR043-43', as folhas de *Leucaena leucocephala in vitro* normais apresentaram mesofilo organizado (DHAWAN & BHOJWANI, 1987).

As folhas hiperhídricas apresentam mesofilo desorganizado e rico em espaços intercelulares (Figura 4.1C). Isto também foi observado em folhas

hiperhídricas de diversas espécies (ZIV, 1991), como em folhas hiperhídricas de maçã 'Gala' (PASQUALETTO et al., 1988). No entanto, em *Prunus avium* não foi observada diferenças evidentes entre o mesofilo das folhas das plantas *in vitro* normais e hiperhídricas (FRANCK et al., 1977). A rápida desidratação das plantas cultivadas *in vitro* quando transferidas para casa-de-vegetação é correlacionada, dentre outros fatores, com baixa deposição de cera epicuticular e alta redução do mesofilo das folhas.

As células do parênquima paliçádico das folhas *in vivo* e aclimatizadas são mais longas comparadas com as demais, havendo características distintas entre ambas como maior espaço intercelular das folhas aclimatizadas (Figuras 4.1A e 4.1D). Assim como em morangueiro, as folhas persistentes foram mais espessas devido ao maior alongamento das células do parênquima paliçádico, mas não houve mudança no número de camadas ou na quantidade de espaços intercelulares do mesofilo (FABBRI et al., 1986). Durante a aclimatização, as folhas que iniciaram seu desenvolvimento como primórdios foliares *in vitro* possuem características morfo-anatômicas intermediárias das folhas *in vitro* e das folhas *in vivo*. Somente as folhas completamente formadas *ex vitro* são semelhantes às folhas *in vivo* (DONNELLY et al., 1985).

As folhas *in vitro* diferem das folhas *in vivo* pelas células do parênquima lacunoso perderem seu formato característico e pela hipoderme estar ausente (Figura 4.1B). As folhas de brotações hiperhídricas têm cutícula delgada ou ausente, parede celular das células epidérmicas fina e com estômatos anormais (Figura 4.1C).

Devido “à má formação anatômica” das folhas das plantas micropropagadas (normais e hiperhídricas) (Figuras 4.1B e 4.1C), o controle da transpiração pela cutícula e estômatos se dá de forma ineficiente (PÂQUES & BOXUS, 1987), dificultado a aclimatização das plantas. Entretanto, o maior problema para a excessiva transpiração é, provavelmente, má formação do aparelho estomatal, pois normalmente mais de 90% da água perdida pela transpiração na planta ocorre através dos estômatos, e o restante é perdido através da cutícula (RAVEN et al., 2001).

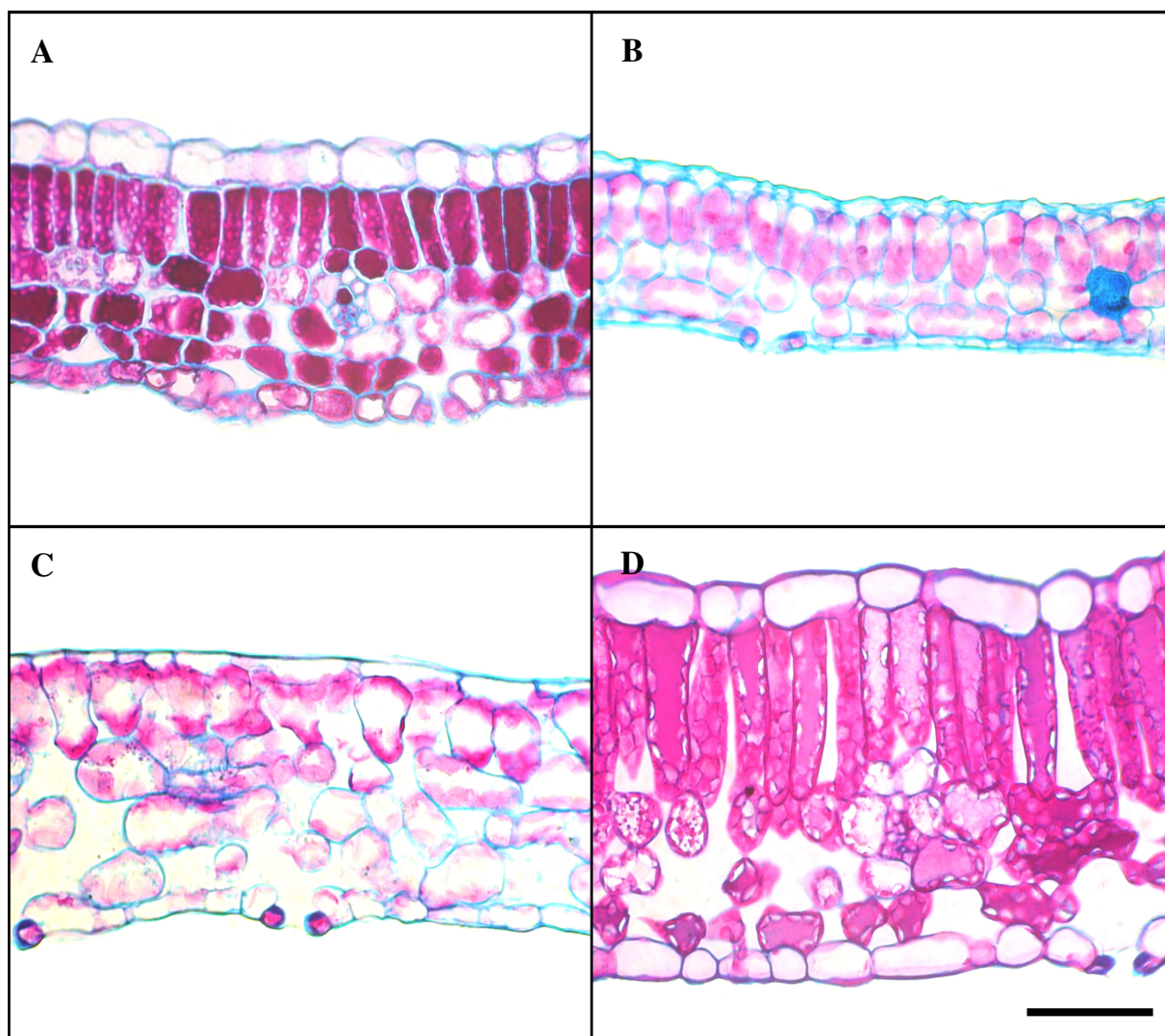


FIGURA 4.1 - SECÇÕES TRANSVERSAIS DO LIMBO DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA 'VR043-43'. A) PLANTA CULTIVADA *IN VIVO*. B) PLANTA CULTIVADA NO AMBIENTE *IN VITRO* (NORMAL). C) PLANTA CULTIVADA NO AMBIENTE *IN VITRO* (HIPERHÍDRICA). D) PLANTA ACLIMATIZADA. BARRA: 50  $\mu\text{m}$ .

Pela microscopia eletrônica de varredura observa-se que, comparativamente às plantas desenvolvidas *in vivo*, as folhas das plantas *in vitro* não apresentam estrutura cristalina da cera epicuticular na superfície da epiderme na fase adaxial (Figuras 4.2A e 4.2B). A ausência de cera epicuticular resulta na excessiva transpiração através da cutícula e isto, juntamente com a transpiração estomatal, é uma grande contribuição para a morte da muda pela dessecação após o transplante (GROUT & ASTON, 1977; WARDLE et al., 1979).

A diferença na superfície da epiderme de plantas *in vitro* e desenvolvidas *in vivo* também foi observada em diferentes espécies, como couve-flor (GROUT, 1975), cravo e repolho (SUTTER & LANGHANS, 1982), sendo observada superfície lisa da epiderme das folhas dessas espécies, assim como observado para o porta-enxerto 'VR043-43' (Figura 4.2). A espessura da cutícula varia de acordo com as condições ambientais (TAIZ & ZEIGER, 2004), e para GROUT & ASTON (1977) a carência de cera epicuticular sobre folhas de plantas *in vitro* é devido à alta umidade no frasco de cultivo. A folha das plantas aclimatizadas também apresentou diferenças na superfície da epiderme, comparada com a folha das plantas *in vivo* (Figura 4.2C).

Em muitos estudos houve uma correlação positiva entre a quantidade de cera e a sobrevivência das plantas micropropagadas quando removidas para o ambiente *ex vitro*. Contudo, somente este fator não foi um bom prognóstico da sobrevivência das plantas durante a aclimatização (SUTTER, 1985).

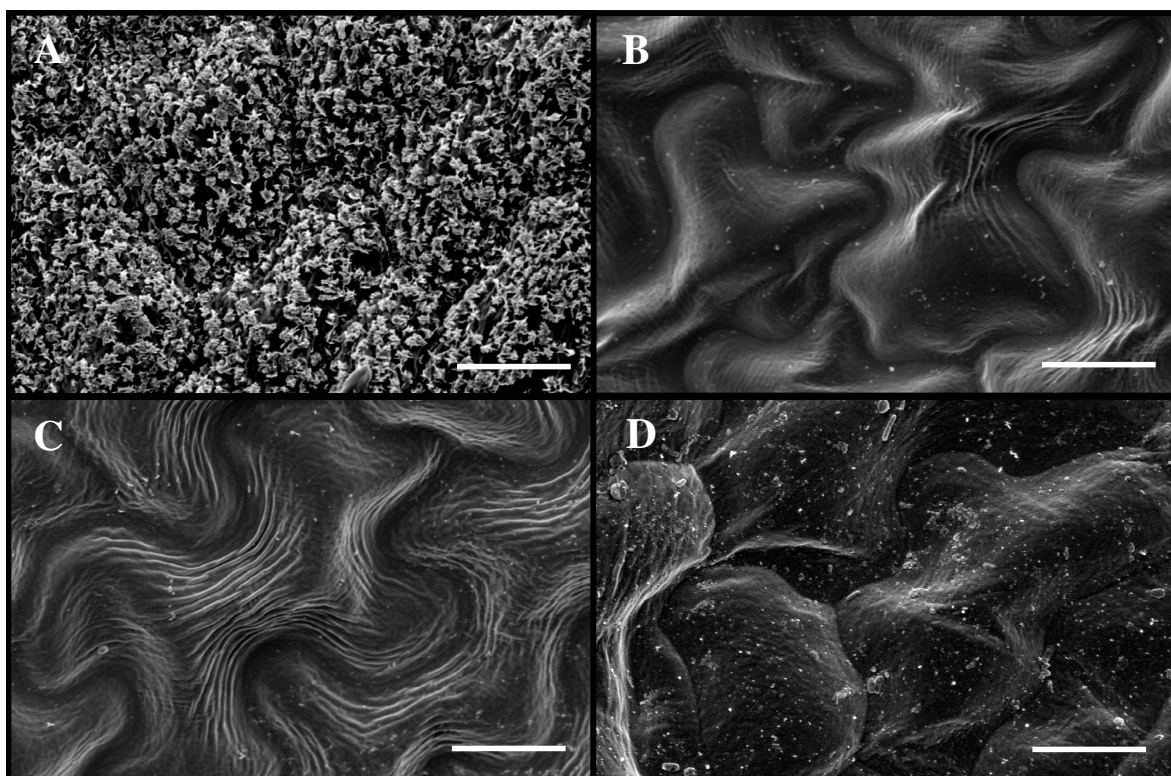


FIGURA 4.2 – FACE ADAXIAL DE FOLHAS DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’. A) PLANTA *IN VIVO*. B) PLANTA CULTIVADA NO AMBIENTE *IN VITRO* (NORMAL). C) PLANTA CULTIVADA NO AMBIENTE *IN VITRO* (HIPERHÍDRICA). D) PLANTA ACLIMATIZADA. BARRA: 5  $\mu\text{m}$ .

Os estômatos das folhas nas diferentes condições apresentam contorno elíptico característico de dicotiledôneas. No entanto, os estômatos das folhas hiperhídricas apresentaram formato arredondado (Figura 4.4C). Isso pode ser devido ao excesso de água absorvida, pois as células de plantas hiperhídricas são deficientes em celulose e lignina, que reduz a pressão da parede celular e conseqüentemente absorvem mais água (ZIV, 1991).

Os estômatos de folhas hiperhídricas são grandes e proeminentes, localizam-se acima das células da epiderme (Figura 4.3C). Essas características também foram observadas em cravo (ZIV, 1991) e abacate cv. RR-86 (VIÑA et al., 2001).

Nas folhas *in vitro* (normais e hiperhídricas), os estômatos apresentam-se completamente abertos (Figura 4.3B e Figura 4.3C). Segundo ZIV (1991), as células-guarda dos estômatos das folhas hiperhídricas não são funcionais, por isso mantêm-se sempre abertas.

A análise de variância não apresentou efeito significativo das diferentes condições de cultivo para a variável densidade estomática (Anexo 8).

Em diferentes espécies foi demonstrada a diferença na densidade estomática das plantas cultivadas *in vitro* e *in vivo*. Contudo, as diferentes condições de cultivo não tiveram efeito no número de estômatos por mm<sup>2</sup> de folha do porta-enxerto 'VR043-43' (Figura 4.5). Em macieira e roseira a densidade estomática das plantas *in vitro* foi maior do que das plantas *in vivo* (BLANKE & BELCHER, 1989; CAPELLADES et al., 1990). Porém, para ameixeira a densidade estomática das plantas *in vitro* foi menor em relação às plantas *in vivo* (BRAINERD et al., 1981).

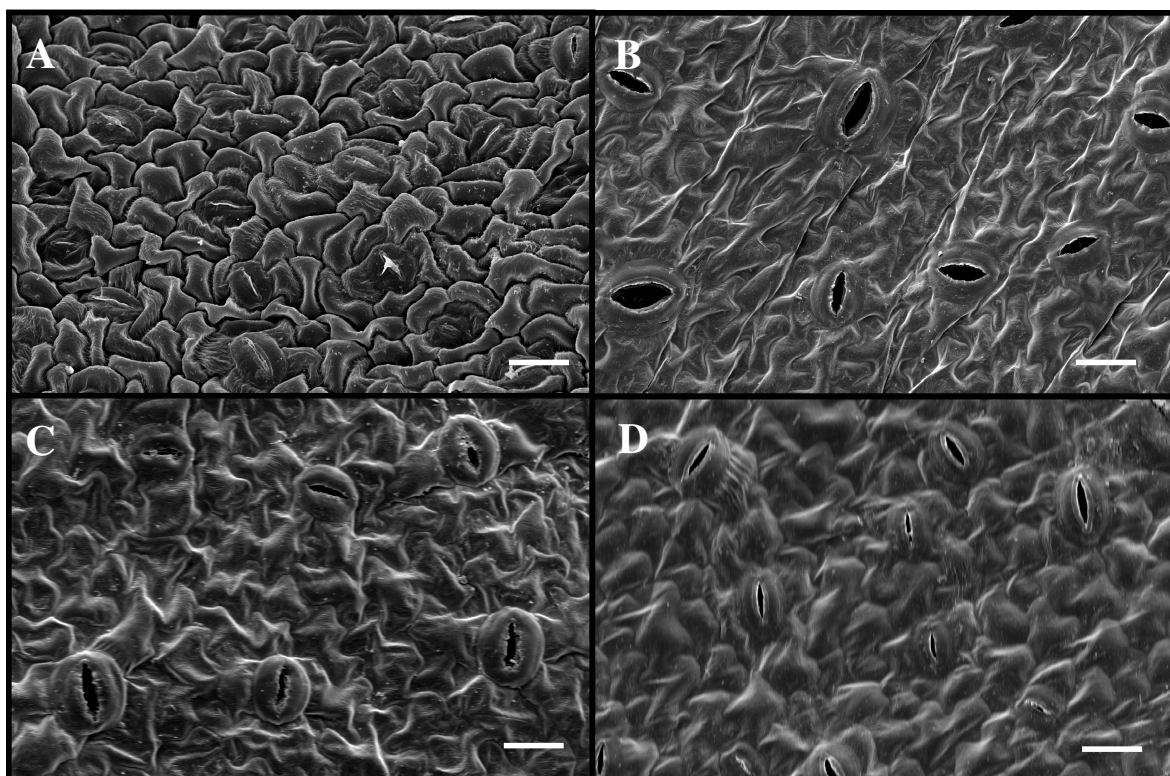


FIGURA 4.3 – FACE ABAXIAL DE FOLHAS DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’. A) PLANTA CULTIVADA *IN VIVO*. B) PLANTA CULTIVADA NO AMBIENTE *IN VITRO* (NORMAL). C) PLANTA CULTIVADA NO AMBIENTE *IN VITRO* (HIPERHÍDRICA). D) PLANTA ACLIMATIZADA. BARRA: 20  $\mu\text{m}$ .

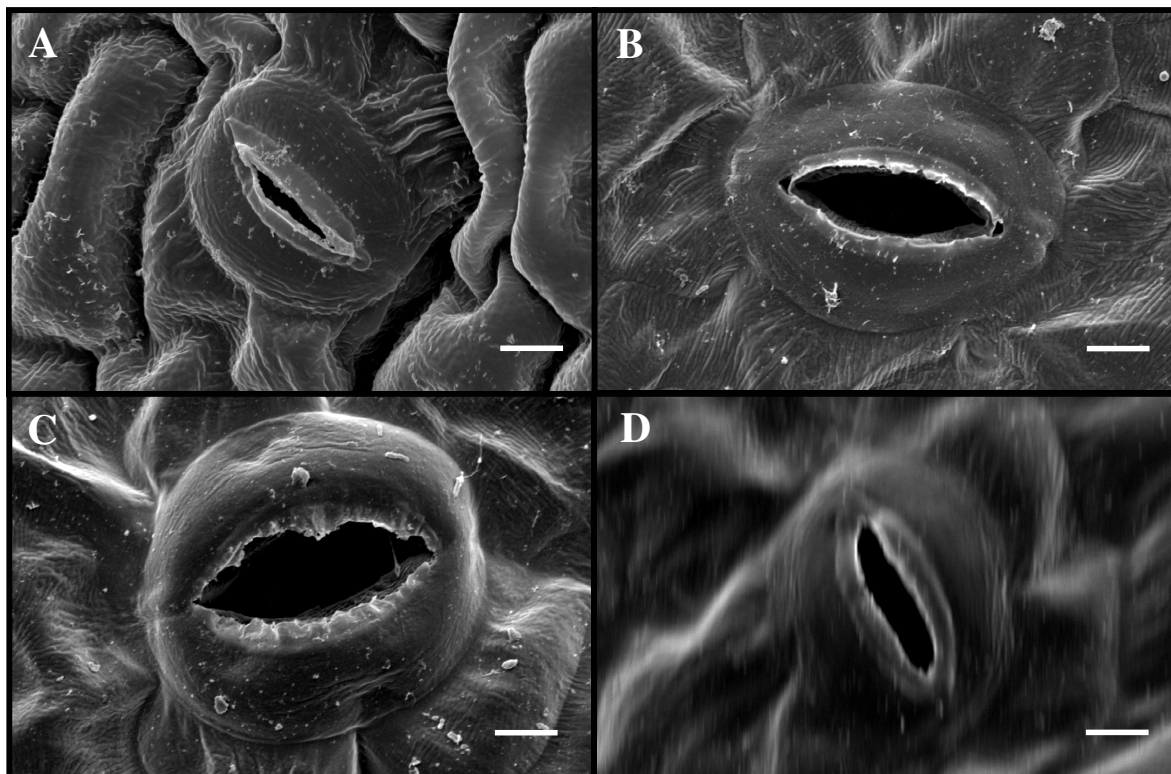


FIGURA 4.4 – FACE ABAXIAL DE FOLHAS DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’. A) PLANTA CULTIVADA *IN VIVO*. B) PLANTA CULTIVADA *IN VITRO* (NORMAL). C) PLANTA CULTIVADA *IN VITRO* (HIPERHÍDRICA). D) PLANTA ACLIMATIZADA. BARRA: 5  $\mu\text{m}$ .

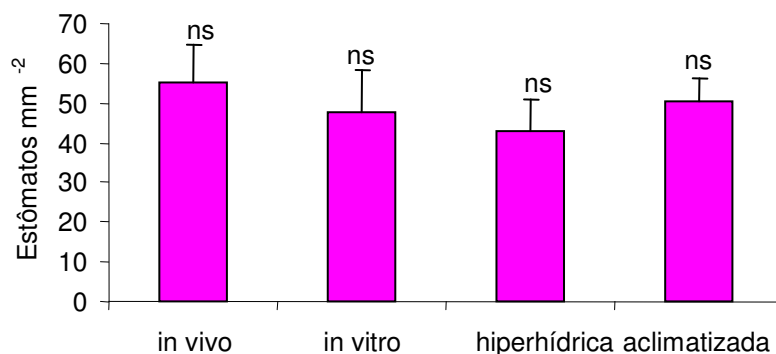


FIGURA 4.5 – EFEITO DA CONDIÇÃO DE CULTIVO NA DENSIDADE ESTOMÁTICA DE FOLHAS DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’. C.V. = 17,91%.

#### 4.4 CONCLUSÕES

As plantas *in vitro* possuem tecidos foliares pouco desenvolvidos e os estômatos mais abertos do que nas plantas *in vivo*, exigindo maiores cuidados na etapa inicial de aclimatização.

As plantas hiperhídricas apresentam mesofilo desorganizado com grandes espaços intercelulares e estômatos arredondados e proeminentes.

#### 4.5 REFERÊNCIAS

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, 1998.

BLANKE, M. B.; BELCHER, A. R. Stomata of apple leaves cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hauge, v. 19, p. 85-89, 1989.

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

BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. H.; KWIAKOWSKI, S.; CLARK, C. S. Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured ‘Pixy’ plum grown under different environments. **HortScience**, Alexandria, v. 16, p. 173-175, 1981.

CAPELLADES, M. FONTARNAU, R.; CARULLA, C.; DEBERGH, P. Environment

influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. **Journal of the American Society Horticultural Science**, Alexandria, v. 115, p. 141-145, 1990.

DAMI, J.; HUGHES, H. Leaf anatomy and water loss of *in vitro* PEG-treated 'Valiant' grape. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hauge, v. 42, p. 179-184, 1995.

DHAWAN, V.; BHOJWANI, S. S. Hardening *in vitro* and morpho-physiological changes in the leaves during acclimatization of micropropagated plants of *Leucaena leucocephala* (LAM.) de WIT. **Plant Science**, v. 53, p. 65-72, 1987.

DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W. E.; LEE, K. Y. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hauge, v. 4, p. 43-50, 1985.

FABBRI, A.; SUTTER, E.; DUNSTON, S. K. Anatomical changes in persistent leaves of tissue cultured strawberry plants after removal from culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 28, p. 331-337, 1986.

FEDER, N.; O'BRIAN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, Australian, v. 55, n. 1, p. 123-142, 1968.

FRANCK, T.; CRÈVECOEUR, M.; WUEST, J.; GREPPIN, H.; GASPAR, T. Cytological comparison of leaves and stems of *Prunus avium* L. shoots cultured on a solid medium with agar or gelrite. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 73, n. 1, 1977.

GROUT, B. W. W. Wax development of leaf surfaces of *Brassica oleracea* var. Currawong regenerated from meristem culture. **Plant Science Letters**, v. 5, p. 401-405, 1975.

GROUT, B. W. W.; ASTON, M. J. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture: I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. **Hort. Res.**, v. 17, p. 1-7, 1977.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill, 1940.

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.

PÂQUES, M.; BOXUS, P. Vitrification: review of literature. **Acta Horticulture**, Amsterdam, v. 121, p. 155-166, 1987.

PASQUALETTO, P. L.; WERGIN, W. P.; ZIMMERMAN, R. H. Changes in structure and elemental composition of vitrified leaves of 'Gala' apple *in vitro*. **Acta**

**Horticulturae**, Amsterdam, v. 227, 1988.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Mundi-Prensa. 1990. 326 p.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMANN, R. H. (Eds.). **Micropropagation: Technology and application**. Dordrecht: Kluwer, 1991, p. 71-93.

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

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6<sup>a</sup> ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 2001. 906 p.

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

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

SUTTER, E. Morphological, physical and chemical characteristics of epicuticular wax on ornamental plants regenerated *in vitro*. **Annals of Botany**, v. 55, p. 321-329, 1985.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

VIÑA, G. de la; BARCEÓ-MUÑOZ, A.; PLIEGRO-ALFARO, F. Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea Americana* Mill microcttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 65, p. 229-237, 2001.

WARDLE, K.; QUINLAN, A.; SIMPKINS, I. Absciscic acid and the regulation of water loss in plantlets of *Brassica oleracea* L. var. botrytis regenerated through apical meristem culture. **Annals of Botany**, v.43, p. 745-752, 1979.

WETZSTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E. Scanning electron microscopy of *in vitro*-cultured *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 108, p. 475-480, 1983.

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMANN, R. H. (Eds.). **Micropropagation: Technology and application**. Dordrecht: Kluwer, 1991, p. 45-70.

## 5 SACAROSE E INTENSIDADE LUMINOSA *IN VITRO* NA ACLIMATIZAÇÃO DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’ (*Vitis vinifera* L. X *Vitis rotundifolia* Michx.)

### RESUMO

Para favorecer a sobrevivência e crescimento das mudas micropropagadas na aclimatização, sugere-se uma etapa de pré-aclimatização das plantas cultivadas *in vitro*. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da sacarose e da intensidade luminosa *in vitro*, na sobrevivência das mudas do porta-enxerto de videira ‘VR043-43’, na fase de aclimatização. Microestacas obtidas de brotações *in vitro* foram cultivadas em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura QL suplementado com diferentes concentrações de sacarose (0, 15, 30 e 45 g L<sup>-1</sup>). O experimento foi mantido em sala climatizada com temperatura de 25 ± 2° C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 18 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> ou 43 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Foram realizadas duas avaliações, uma após quatro semanas de cultivo *in vitro* e outra após 30 dias em casa-de-vegetação. A altura das plantas foi influenciada pelas concentrações de sacarose, sendo a maior altura (5,0 cm) obtida com a concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Também houve aumento do comprimento das raízes principais, nas mesmas condições. A ausência de sacarose limitou o número de raízes por planta (1,3 raízes planta<sup>-1</sup>). A porcentagem de microestacas enraizadas na intensidade luminosa de 18 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e sem sacarose no meio de cultura foi superior (95%), com relação as demais concentrações testadas. Houve um incremento da matéria seca da parte aérea e das raízes com as concentrações de 30 e 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose. O bom desempenho das microestacas com a adição de sacarose no meio de cultura, nas intensidades luminosas de 18 e 43 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, também foi observado com o aumento da área foliar. A sobrevivência na aclimatização das mudas cultivadas *in vitro* foi de 100% na intensidade luminosa de 18 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> combinada com 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose e na intensidade luminosa de 43 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> combinada com 30 g L<sup>-1</sup> ou 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio de cultura. Para o porta-enxerto ‘VR043-43’ cultivado *in vitro*, concentrações mais elevadas de sacarose contribuem para a sobrevivência das mudas *ex vitro*.

**Palavras-chave:** micropropagação, enraizamento, pré-aclimatização.

**SUCROSE AND LIGHT INTENSITY *IN VITRO* IN THE  
ACCLIMATIZATION OF GRAPEVINE ROOTSTOCK 'VR043-43' (*Vitis  
vinifera* L. X *Vitis rotundifolia* Michx.)**

**ABSTRACT**

For it promoter favor the survival and growth of plantlets micropropagated in the acclimatization suggests a phase of pre-acclimatization. The objective of this work was to evaluate the influence of the sucrose and of the luminous intensity *in vitro* in the survival of plantlets of the grapevine rootstock 'VR043-43', in the phase of acclimatization. Microcuttings obtained of shoots *in vitro* were cultivated in tubes containing 10 mL culture medium QL supplemented with different concentrations of sucrose (0, 15, 30 and 45 g L<sup>-1</sup>). Plants were maintained with a 16 h daylength, at a temperature of 25° C ± 2° C and luminous intensity of 18 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> or 43 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. They were carried out two valuations an after 4 weeks of cultivate *in vitro* and another one after 30 days in greenhouse. The height of the plants was influenced by the concentrations of sucrose being to bigger height (5.0 cm) obtained with the concentration of 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose. Length of the roots increased in the same conditions. Sucrose-free culture medium limited the number of roots per plant (1.3 roots plant<sup>-1</sup>). The percentage of microcutting rooted in the luminous intensity of 18 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> and sucrose-free in the environment of culture was a superior (95%), with relation the other concentrations. Dry matter of the shoots and roots were enhanced for plants grown with the concentrations of 30 and 45 g L<sup>-1</sup> of sucrose. The good performance of the microcuttings with the addition of sucrose in the environment of culture in the luminous intensities of 18 and 43 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> also was observed with the increase of the leaf area. The survival of plantlets cultivated *in vitro* was of 100% in the luminous intensity of 18 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> combined with 45 g L<sup>-1</sup> of sucrose and in the luminous intensity of 43 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> combined with 30 g L<sup>-1</sup> or 45 g L<sup>-1</sup> of sucrose in the culture medium. For the grapevine rootstock 'VR043-43' cultivated *in vitro* concentrations more elevated of sucrose contribute for the survival of plantlets *ex vitro*.

**Key words :** micropropagation, rooting, pretreatment.

## 5.1 INTRODUÇÃO

Mudas produzidas *in vitro* são expostas a um microambiente que apresenta baixa luminosidade, condições assépticas, alta concentração de açúcares e uma atmosfera com alta umidade relativa. Este ambiente contribui para a baixa sobrevivência das mudas micropropagadas, quando transferidas para casa-de-vegetação (PREECE & SUTTER, 1991). Este fato pode inviabilizar o processo de micropropagação de videiras, pois sua eficiência é determinada pela sobrevivência das plantas na fase de aclimatização (BIASI, 2003).

Para favorecer a sobrevivência e crescimento das mudas na aclimatização sugere-se uma etapa de pré-aclimatização, que consiste de técnicas e condições que permitem tornar o ambiente *in vitro* mais semelhante ao ambiente natural (GEORGE, 1996), podendo ser utilizada para aperfeiçoar os protocolos de micropropagação e, por consequência, aumentar o rendimento na produção de mudas (HOFFMANN et al., 2001).

Segundo KOZAI (1991), a presença de açúcares no meio de cultura faz com que as plantas não desenvolvam capacidade fotoautotrófica, causando crescimento reduzido e morte das mudas na aclimatização. A presença de sacarose por um período prolongado no meio de cultura pode fazer com que as células percam a capacidade de sintetizar clorofila (GEORGE, 1996). Contudo, a presença de uma fonte de carboidrato é essencial para o enraizamento de muitas espécies *in vitro* (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; SRISKANDARAJAH & MULLINS, 1981). Isso implica no sucesso do transplante, pois também é determinado pelo tipo de sistema radicial obtido *in vitro* (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

GRIBAUDO & FRONDA (1993) sugerem que seja reduzida a concentração de sacarose no meio de cultura, na fase que antecede a transferência das mudas para o ambiente *ex vitro*, para elevar a taxa fotossintética e adaptar as plantas às condições autotróficas. Além disso, afirmam que o aumento da intensidade luminosa facilita a aclimatização por promover a fotossíntese, melhorar a relação hídrica e aumentar a

cera epicuticular. A intensidade luminosa necessária para o cultivo *in vitro* de vários órgãos e tecidos difere entre os estágios da micropropagação, o tipo de explante e as diferentes espécies vegetais (ECONOMOU & READ, 1987).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da sacarose e da intensidade luminosa *in vitro*, na sobrevivência das mudas do porta-enxerto de videira ‘VR043-43’, na fase de 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 (Curitiba-PR).

### 5.2.1 Material vegetal

Mudas do porta-enxerto de videira ‘VR043-43’ cultivadas *in vitro*, provenientes do quinto subcultivo, foram subcultivadas, pela subdivisão das partes aéreas em segmentos nodais com uma gema axilar e uma folha, em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura QL (QUOIRIN & LEPOIVRE, 1977), suplementado com as vitaminas do meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 6 g L<sup>-1</sup> de agar (Vetec<sup>®</sup>), sem a adição de regulador de crescimento e com diferentes concentrações de sacarose (0, 15, 30 e 45 g L<sup>-1</sup>). O pH foi ajustado para 5,8. Os meios de cultura foram esterilizados à temperatura de 121 °C, durante 20 minutos e 1,5 atm. Os tubos de ensaio foram tampados com papel alumínio e vedados com filme plástico.

### 5.2.2 Ambiente de cultivo

Os explantes foram mantidos por quatro semanas em sala climatizada com fotoperíodo de 16 horas fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia,

temperatura de  $25 \pm 2$  °C e intensidade luminosa de  $18 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ou  $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### 5.2.3 Transplante e ambiente *ex vitro*.

O transplante das mudas micropropagadas foi realizado após quatro semanas de cultivo *in vitro*. Os frascos de cultivo foram transferidos para câmara de nebulização intermitente dois dias antes do transplante.

No momento do transplante as raízes das plantas foram lavadas, para que o ágar fosse removido, e transferidas para tubetes de  $53 \text{ cm}^3$  de volume, contendo substrato comercial (Plantmax<sup>®</sup>).

Todos os tratamentos foram mantidos em câmara de nebulização, por um período inicial de dez dias, com a seguinte frequência de rega: 15 segundos de rega a cada 30 minutos das 08:00hs às 17:00hs, 15 segundos de rega a cada hora das 17:00hs às 23:00hs e 15 segundos de rega a cada 3 horas das 23:00hs às 08:00hs. Após esse período, permaneceram mais 20 dias em casa-de-vegetação com irrigação diária com mangueira. Durante os 30 dias do experimento, realizou-se o monitoramento da temperatura máxima e mínima e da umidade relativa do ar (Anexos 11 e 12), sendo as leituras realizadas sempre às 14:00 hs.

### 5.2.4 Variáveis analisadas

Foram realizadas duas avaliações, uma no momento da retirada das mudas dos frascos de cultivo e após 30 dias em casa-de-vegetação.

As variáveis analisadas do cultivo *in vitro* foram altura (cm), número de folhas, porcentagem de enraizamento, comprimento das raízes principais, matéria seca da parte aérea, matéria seca das raízes e área foliar.

A matéria seca da parte aérea e das raízes das plantas foi determinada pela pesagem em balança de precisão, após secagem em estufa com ar forçado e temperatura de  $65^\circ \text{C}$  por um período superior a 24 horas, até massa seca constante.

A área foliar foi determinada no Laboratório de Fitotecnia (UFPR), pelo

aparelho Win Rhizo LA 1600, versão 2001, da marca Régent Instruments Inc., com resolução de 100 Wn.

Após os 30 dias em casa-de-vegetação, avaliou-se a porcentagem de sobrevivência das mudas.

### 5.2.5 Análise estatística

O delineamento experimental foi blocos casualizados em arranjo fatorial 2x4 (duas intensidades luminosas e quatro concentrações de sacarose), com quatro repetições e 10 plantas por parcela. Os resultados foram submetidos à análise de variância e à análise de regressão. Para as variáveis porcentagem de enraizamento e porcentagem de sobrevivência, a comparação entre médias foi realizada pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade.

## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo a análise de variância, apenas as diferentes concentrações de sacarose tiveram efeito significativo na altura das plantas (Anexo 9).

A altura das plantas aumentou até a concentração estimada, segundo a equação de regressão, de 30,15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, a partir da qual houve um efeito negativo com redução da altura (Figura 5.1). Resultado semelhante foi encontrado no trabalho de CLAUMANN et al. (2004), em que o maior crescimento da parte aérea de *Vitis* spp., cultivares Paulsen 1103 e Merlot, foi obtido com a concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Para as cultivares de videira du Lot e Chardonnay, a altura as plantas foi significativamente superior quando o meio de cultura foi suplementado com sacarose comparado com a ausência de sacarose (GALZY & COMPAN, 1992). Assim como para o porta-enxerto de videira 'Gravesac' (SILVA et al., 1995).

Os fatores intensidade luminosa e concentração de sacarose tiveram efeito significativo sobre o número de folhas por planta, ocorrendo interação entre os fatores segundo a análise de variância (Anexo 9).

O número de folhas por planta aumentou até a concentração estimada, segundo a equação de regressão, de 34,2 g L<sup>-1</sup> de sacarose (5,7 folhas planta<sup>-1</sup>), na intensidade luminosa de 18 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Já na intensidade luminosa de 43 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, o ponto máximo da curva corresponde à concentração de 29 g L<sup>-1</sup> de sacarose obtendo-se 6,9 folhas planta<sup>-1</sup>. Além da maior intensidade luminosa promover maior número de folhas planta<sup>-1</sup>, requer menor concentração de sacarose para atingir seu ponto máximo (Figura 5.2).

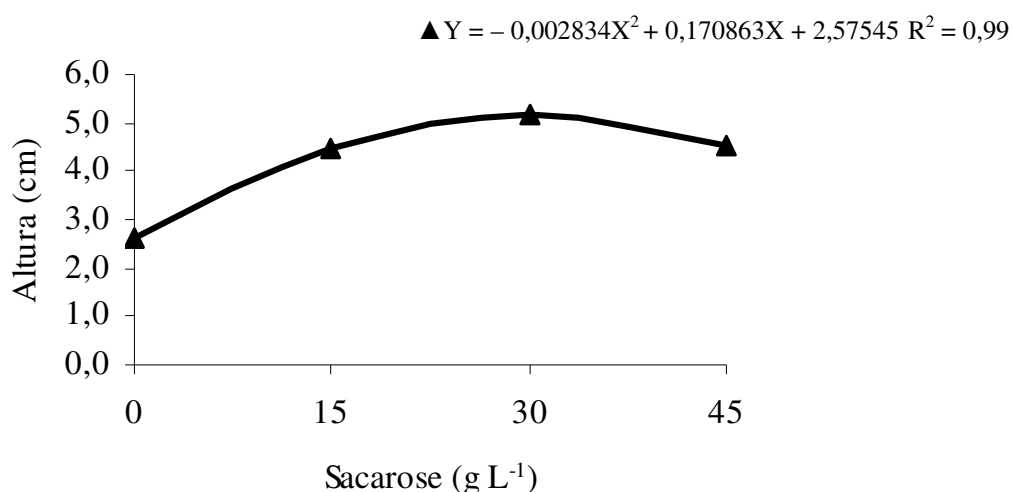


FIGURA 5.1 – EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE, EM MEIO DE CULTURA QL, (▲) NA ALTURA DAS PLANTAS MICROPROPAGADAS DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’.

Também o número de folhas por planta de *Limonium* ‘Misty Blue’ foi maior nas intensidades luminosas mais elevadas, quando combinadas com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (LIAN et al., 2002). Em contraste com os resultados apresentados, o número de folhas por planta de *Samanea saman* foi maior na ausência de sacarose no meio de cultura do que com sacarose (MOSALEEYANON et al., 2004).

Os fatores intensidade luminosa e concentração de sacarose tiveram efeito significativo sobre a área foliar, ocorrendo interação entre os fatores, segundo a análise de variância (Anexo 9).

A maior área foliar, segundo a equação de regressão, foi obtida com a

concentração de  $31,3 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose, na intensidade luminosa de  $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ( $13,3 \text{ cm}^2$ ) (Figura 5.3). Trabalhando com o porta-enxerto 'VR043-43', BORGHEZAN et al. (2003) obtiveram área foliar de  $12,5 \pm 1,3 \text{ cm}^2$  utilizando o meio de cultura DSD1 (SILVA & DOAZAN, 1995) com  $20 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose e intensidade luminosa de 40 a  $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Para o porta-enxerto 'Paulsen 1103' obteve-se maior área foliar na intensidade luminosa de  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  combinada com  $20 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose (MOREIRA, 2000). A intensidade luminosa de 40 a  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  parece ser favorável para a área foliar de videiras *in vitro* combinada com 20 a  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose no meio de cultura.

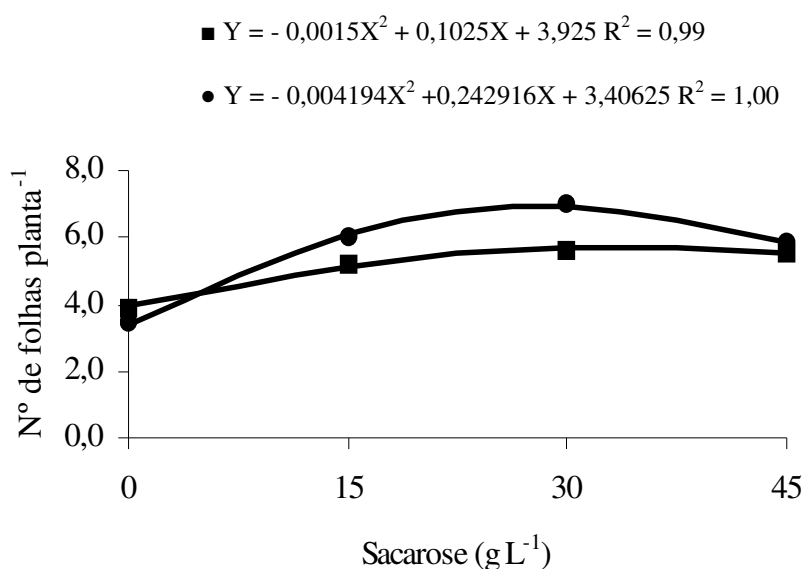


FIGURA 5.2 – EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE, EM MEIO DE CULTURA QL, E DAS INTENSIDADES LUMINOSAS (■)  $18 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  E (●)  $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  NO NÚMERO DE FOLHAS POR PLANTA MICROPROPAGADA DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA 'VR043-43'.

Na menor intensidade luminosa testada ( $18 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), seria necessário adicionar maior concentração de sacarose ( $34,2 \text{ g L}^{-1}$ ) para obter o ponto máximo da curva de regressão ( $5,7 \text{ cm}^2$ ) (Figura 5.3), sendo este valor inferior ao encontrado na maior intensidade luminosa.

Contudo, o efeito da intensidade luminosa sobre a área foliar não foi

verificado para outras espécies, como para *Persea americana*, não ocorrendo diferenças significativas nas três intensidades luminosas testadas (35, 60 e 85  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (VIÑA et al., 2001).

A ausência de sacarose no meio de cultura reduziu significativamente a área foliar das plantas, nas duas intensidades luminosas testadas (Figura 5.3). Também a área foliar das plantas de *Nicotiniana tabacum* na ausência de sacarose foi inferior quando comparada com a presença de sacarose (30  $\text{g L}^{-1}$ ) (KADLEČEK et al., 2001).

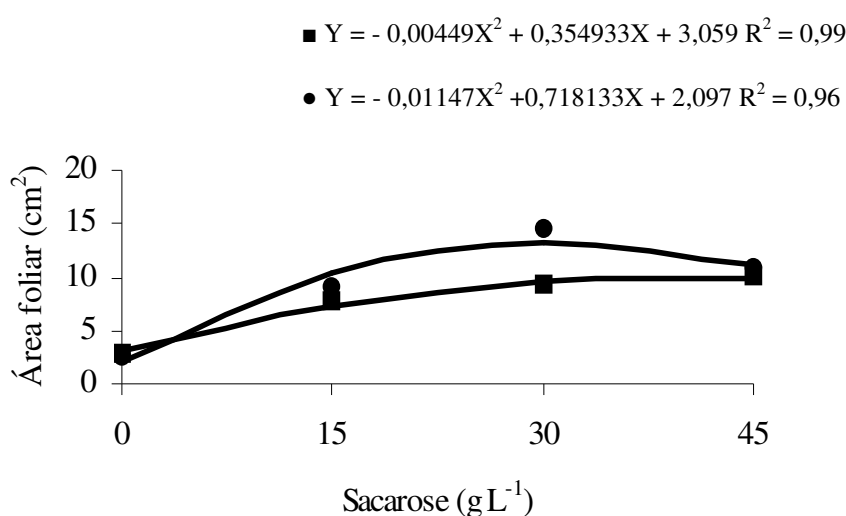


FIGURA 5.3 – EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE, EM MEIO DE CULTURA QL, E DAS INTENSIDADES LUMINOSAS (■) 18  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  E (●) 43  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  NA ÁREA FOLIAR DAS PLANTAS MICROPROPAGADAS DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’.

A análise de variância apresentou efeito significativo dos fatores concentração de sacarose e intensidade luminosa, para a variável matéria seca da parte aérea das plantas, não havendo interação entre os dois fatores estudados (Anexo 9).

Os maiores resultados da matéria seca da parte aérea foram encontrados com as concentrações 30 e 45  $\text{g L}^{-1}$  de sacarose (18 e 17  $\text{mg planta}^{-1}$ , respectivamente) (Figura 5.4). Também pode ser observado que a ausência de sacarose reduziu drasticamente a formação da parte aérea, sendo significativamente inferior a todos os tratamentos (Figura 5.8). Estes resultados sugerem que, além de interferir na produção

do sistema radical das plantas *in vitro*, a sacarose também possui importante papel na formação da parte aérea das plantas micropropagadas. Para os níveis de intensidade luminosa testados (18 e 43  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), não houve diferença estatística entre as médias (12 mg planta<sup>-1</sup> e 14 mg planta<sup>-1</sup>, respectivamente). Para plantas de *Nicotiniana tabacum*, a adição de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio de cultura teve um efeito positivo na formação de biomassa e área foliar (TICHÁ et al., 1998). GALZY & COMPAN (1992) encontraram resultados semelhantes com *Vitis rupestris*.

A necessidade de suplementar o meio de cultura com sacarose sugere que o porta-enxerto de videira 'VR043-43' não apresenta fotoautotrofismo *in vitro*. Embora, seja observado crescimento e desenvolvimento das raízes e da parte aérea das microestacas na ausência de sacarose, esse efeito pode ter ocorrido devida às reservas presentes no explante, propiciando a sua regeneração. Contudo, há necessidade de melhor esclarecimento a respeito da capacidade fotossintética desse porta-enxerto *in vitro*.

A menor produção de matéria seca da parte aérea (5,0 mg planta<sup>-1</sup>) obtida na ausência de sacarose no meio de cultura, pode ter ocorrido devido à necessidade de se aumentar, além da intensidade luminosa, a difusão de CO<sub>2</sub> e a umidade na atmosfera do frasco de cultivo (KOZAI & NGUYEN, 2003), para promover a fotossíntese, a transpiração e o acúmulo de matéria seca (AITKEN-CHRISTIE et al., 1995).

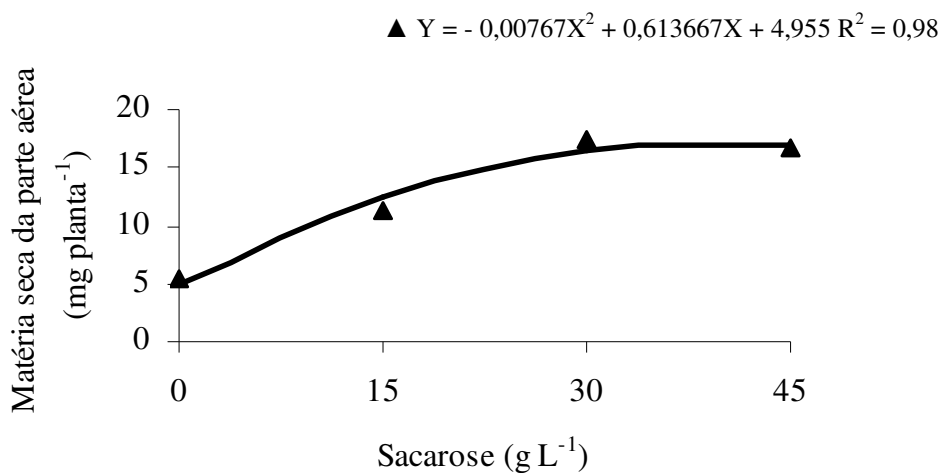


FIGURA 5.4 – EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE, EM MEIO DE CULTURA QL, (▲) NA MATÉRIA SECA DA PARTE AÉREA DAS PLANTAS MICROPROPAGADAS DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’.

Segundo a análise de variância apenas as diferentes concentrações de sacarose tiveram efeito significativo no número de raízes principais por planta (Anexo 10).

A sacarose aumentou o número de raízes principais por planta até a concentração máxima de 27,7 g L<sup>-1</sup> (2 raízes principais planta<sup>-1</sup>), a partir da qual houve redução no número de raízes (Figura 5.5). Entretanto, para o porta-enxerto de pereira OH X F91 o número de raízes primárias sofreu efeito apenas da intensidade luminosa, e a sacarose não teve efeito sobre esta variável (LEITE et al., 2000).

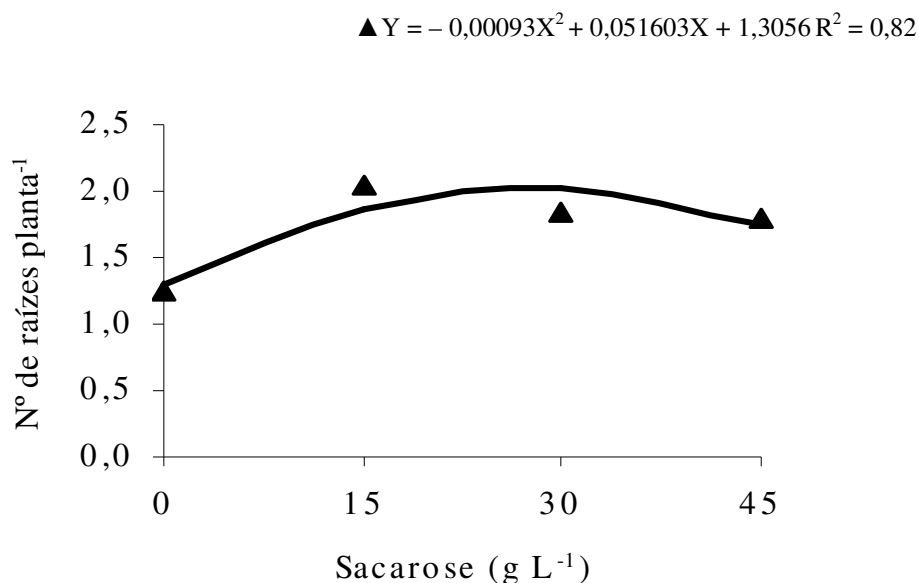


FIGURA 5.5 – EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE, EM MEIO DE CULTURA QL, ( $\blacktriangle$ ) NO NÚMERO DE RAÍZES POR PLANTA DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’.

A análise de variância apresentou significância dos fatores intensidade luminosa e concentração de sacarose, para a variável matéria seca das raízes, ocorrendo interação entre os fatores (Anexo 10).

A maior massa seca das raízes foi obtido com a concentração de 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose, na intensidade luminosa de 43  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (6 mg planta<sup>-1</sup>). A ausência de sacarose no meio de cultura reduziu a matéria seca das raízes, não havendo diferenças estatísticas significativas nas duas intensidades luminosas (aproximadamente 1,0 mg planta<sup>-1</sup>) (Figura 5.6). Segundo GEORGE (1996), para formação de raízes *in vitro* há necessidade de energia e carboidratos, sendo estes fornecidos através da fotossíntese ou por uma fonte exógena de açúcar.

Na intensidade luminosa de 18  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , segundo a equação de regressão, maior massa seca das raízes foi de 4,0 mg planta<sup>-1</sup> quando adicionado 55,3 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Figura 5.6). Da mesma forma as plantas do porta-enxerto Paulsen 1103 submetidas à intensidade luminosa mais baixa testada (35  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), obtiveram

valores inferiores para a massa seca das raízes em todas as concentrações de sacarose testadas (MOREIRA, 2000).

O aumento da intensidade luminosa sobre o incremento de matéria seca das raízes também foi observado em *Actinia deliciosa* (INFANTE et al., 1989) e *Nicotiana tabacum* (TICHÁ et al., 1998).

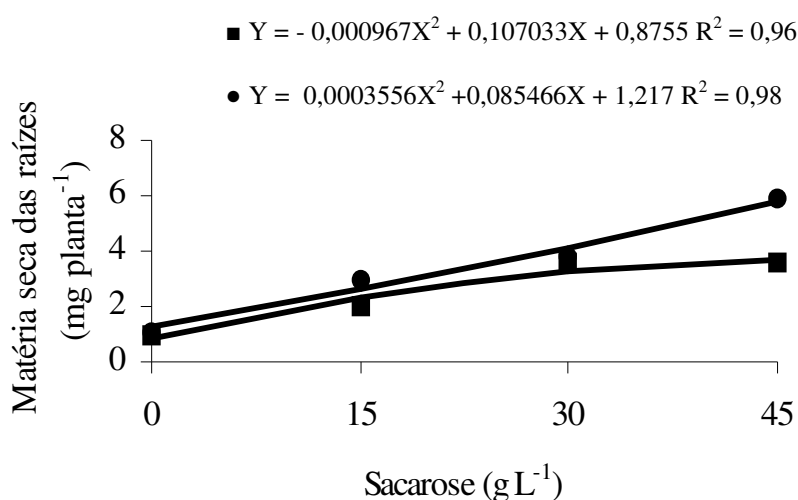


FIGURA 5.6 – EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE, EM MEIO DE CULTURA QL, E DAS INTENSIDADES LUMINOSAS (■) 18  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  E (●) 43  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  NA MATÉRIA SECA DAS RAÍZES PRINCIPAIS DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’.

Foi verificado enraizamento das microestacas em todas as concentrações de sacarose, havendo interação entre os fatores concentração de sacarose e intensidade luminosa, para a variável porcentagem de enraizamento, segundo a análise de variância (Anexo 10).

No presente trabalho foi observado que não houve regeneração das microestacas não enraizadas. A maior porcentagem de enraizamento das microestacas (95%) foi obtida na ausência de sacarose no meio de cultura, combinada com a intensidade luminosa de 18  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 5.7). Em contraste, para *Vitis spp.* cultivar Merlot, a ausência de sacarose no meio de cultura levou a não emissão de raízes (CLAUMANN et al., 2004). Nas demais concentrações de sacarose testadas não

houve diferenças estatísticas entre as intensidades luminosas (Figura 5A). No trabalho de CALVETE et al. (2002) com morangueiro, a presença de sacarose mostrou-se fundamental para o desenvolvimento das raízes *in vitro*, pois na sua ausência não houve enraizamento das plantas. Entretanto, reduzindo-se a concentração de sacarose de 30 g L<sup>-1</sup> para 10 g L<sup>-1</sup>, observou-se um aumento de 60% no enraizamento do porta-enxerto de macieira M-26 (SIMMONDS, 1983).

A intensidade luminosa, além de influenciar no crescimento e na proliferação das brotações, pode afetar diretamente a formação de raízes podendo reduzir a formação quando em excesso (ECONOMOU & READ, 1987). Com isso, não foi verificado efeito negativo da maior intensidade luminosa testada na porcentagem de enraizamento das microestacas; apenas quando combinada com a ausência de sacarose houve redução significativa na porcentagem de enraizamento (Figura 5.7).

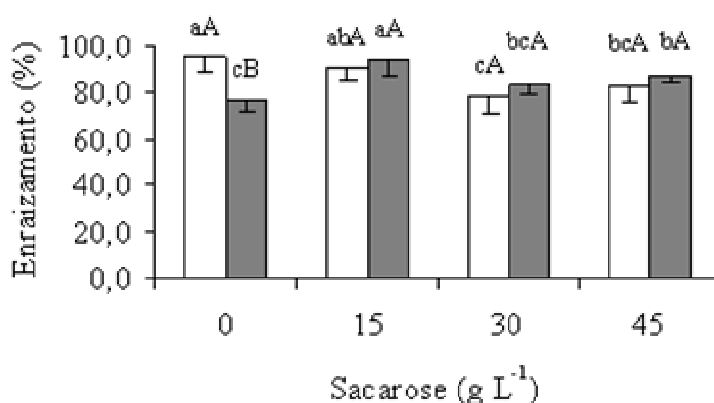


FIGURA 5.7 – EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE, EM MEIO DE CULTURA QL, E DAS INTENSIDADES LUMINOSAS (□) 18 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> E (■) 43 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> NA PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’. LETRAS MINÚSCULAS REPRESENTAM O FATOR CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE E MAIÚSCULAS O FATOR INTENSIDADE LUMINOSA. C.V. (%) = 15,19



FIGURA 5.8 – MUDAS MICROPROPAGADAS DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’, APÓS QUATRO SEMANAS DE CULTIVO *IN VITRO*, COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE, EM MEIO DE CULTURA QL, COMBINADAS COM AS INTENSIDADES LUMINOSAS DE A)  $18 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e B)  $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . BARRA: 3cm.

A análise de variância apresentou efeito significativo dos fatores concentração de sacarose e intensidade luminosa, e interação entre os fatores, para a variável porcentagem de sobrevivência das plantas aclimatizadas (Anexo 10).

A maior porcentagem de sobrevivência das plantas (100%), na aclimatização, foi obtida com a concentração de 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose, nas duas intensidades luminosas e com a concentração de 30 g L<sup>-1</sup> em combinação com a intensidade luminosa de 43 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Figura 5.9). Os resultados do estudo realizado por RIQUELME et al. (1991), demonstraram que concentrações entre 30 e 45 g L<sup>-1</sup> foram mais adequadas, durante a pré-aclimatização, para a sobrevivência das mudas após o transplante para casa-de-vegetação. Para plantas de *Nicotiana tabacum* cv. Samsun, o cultivo em meio contendo sacarose e elevada intensidade luminosa *in vitro*, foi mais adequado para o desenvolvimento das plantas *ex vitro* (KADLEČEK et al., 2001).

A ausência de sacarose resultou em baixa sobrevivência das plantas, sendo que na intensidade luminosa de 43 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> apenas 18% das plantas sobreviveram (Figura 5.9). Entretanto, no trabalho de REUTHER (1991) com *Vitis*, a redução da concentração de sacarose no meio de enraizamento e o aumento da intensidade luminosa favoreceram o metabolismo fotoautotrófico e desenvolvimento vegetativo, contribuindo para alta sobrevivência e acelerado crescimento das mudas quando transferidas para o ambiente *ex vitro*. MOSALEEYANON et al. (2004), afirmam que plantas crescidas sob condição fotomixotrófica ou heterotrófica *in vitro*, em meio contendo sacarose, possuem pouca habilidade fotossintética. Sugerem, ainda, que isso pode ser a causa do reduzido crescimento e baixa porcentagem sobrevivência das plantas, após a transferência para o ambiente *ex vitro*. Porém, não deixam de considerar que para algumas espécies ou estágio do cultivo *in vitro*, o suplemento de açúcar no meio de cultura pode ser benéfico.

Os resultados obtidos no presente trabalho concordam com LEES (1994), que concluiu que os efeitos da luz combinados com o carboidrato no meio de cultura afetam a eficiência do processo de micropropagação. A retirada da sacarose no meio

de cultura e o aumento da intensidade luminosa diminuiu a eficiência das plantas *in vitro* e na aclimatização (Figura 5.8 e Figura 5.10).

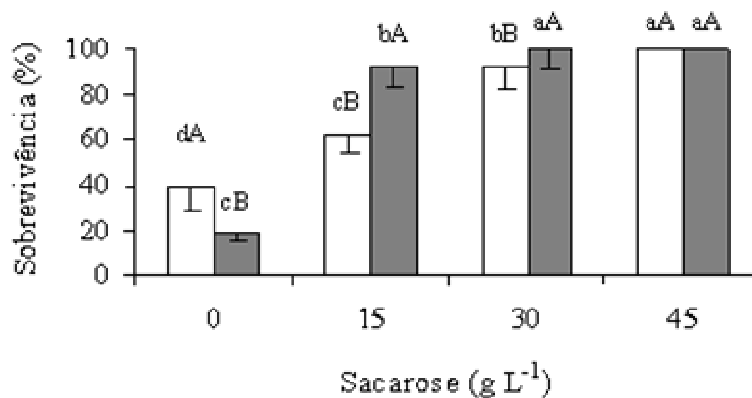


FIGURA 5.9 – EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE, EM MEIO DE CULTURA QL, E DAS INTENSIDADES LUMINOSAS ( $\square$ )  $18 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  E ( $\blacksquare$ )  $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  NA PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA NA ACLIMATIZAÇÃO DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’. LETRAS MINÚSCULAS REPRESENTAM O FATOR CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE E MAIÚSCULAS O FATOR INTENSIDADE LUMINOSA. C.V. (%) = 3,26.



FIGURA 5.10 – MUDAS MICROPROPAGADAS DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA ‘VR043-43’, COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE, EM MEIO DE CULTURA QL, COMBINADAS COM AS INTENSIDADES LUMINOSAS DE A)  $18 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  E B)  $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , APÓS 30 DIAS DE ACLIMATIZAÇÃO.

## 5.4 CONCLUSÕES

A adição de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio de cultura, combinada com a intensidade luminosa de 43  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , promove melhor crescimento e desenvolvimento de microestacas *in vitro* do porta-enxerto de videira ‘VR043-43’.

Para a aclimatização das mudas micropropagadas na intensidade luminosa de 43  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  as concentrações mais elevadas (30 e 45 g L<sup>-1</sup>) de sacarose no meio de cultura permitem 90% a 100% de sobrevivência no ambiente *ex vitro*.

## 5.5 REFERÊNCIAS

- AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; SMITH, M. A. L. (Eds.). **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht, Kluwer Academic. 1995. 574p.
- 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.
- BORGHEZAN, M.; MORAES, L. K. A. de; MOREIRA, F. M.; SILVA, A. L. da. Propagação *in vitro* e avaliação de parâmetros morfológicos de porta-enxertos de videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 783-789, 2003.
- CALVETE, E. O.; AZEVEDO, M.; BORDIGNON, M. H. SUZIN, M. Análise anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 649-653, 2002.
- CLAUMANN, A. D.; MIRANDOLA, D.; STEINMACHER, D. A.; BORGHEZAN, M.; GUERRA, M. P.; SILVA, A. L. da. Efeito da sacarose no crescimento e nos parâmetros fotossintéticos de plântulas de videiras cultivadas *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18., 2004, Florianópolis. **Resumos Expandidos**. 1 CD-ROM.
- ECONOMOU, A. S.; READ, P. E. Light treatments to improve efficiency of *in vitro* propagation systems. **Hortscience**, Alexandria, v. 22, n. 5, p. 751-754, 1987.
- GALZY, R.; COMPAN, D. Remarks on mixotrophic and autotrophic carbon nutrition of *Vitis* plantlets cultured *in vitro*. **Plant Cell**, v. 31, p. 239-244, 1992.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture – Part 1: The Technology**. 2 ed.

Edington: Exegetics, 1993. 574p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A.(Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa CNPH, 1998. 509 p.

GRIBAUDO, I; FRONDA, A. L'ambientamento delle piante fruticole micropropagate. **Rivista di Frutticoltura**, v. 1, p. 75-79, 1993.

HOFFMANN, A.; CHALFUN, N. N. J.; PASQUAL, M. Efeito do ácido giberélico e do frio na sobrevivência e crescimento inicial de plântulas micropropagadas de macieira 'Marubakaido', durante a aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.1, p.31-37, 2001.

INFANTE, R.; MAGNANINI, E.; RIGHETTI, B. The role of light and CO<sub>2</sub> in optimising the conditions for shoot proliferation of *Actinia deliciosa in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 77, p. 191-195, 1989.

KADLEČEK, P.; TICHÁ, I.; HASEL, D.; CAPKOVÁ, V.; SCHÄFER, C. Importance of in vitro pretreatment for ex vitro acclimatization and growth. **Plant Science**, Strasbourg, v. 161, p. 695-701, 2001.

KOZAI, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, T. H. **Micropropagation technology and application**. Dordrecht: Kluwer, 1991. 484 p.

KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T. Photoautotrophic micropropagation of woody and tropical plants. In: JAIN, S. M.; ISHII, K. (Eds.). **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2003. p. 757-781.

LEES, R. P. Effects of the light environment on photosynthesis and growth *in vitro*. In: LUMSDEN, P. J.; NICHOLAS, J. R.; DAVIES, W. J. (Eds.). **Physiology, growth and development of plants in culture**. Dordrecht: Kluwer, 1994. p. 31-46.

LEITE, G. B.; FINARDI, N.; FORTES, G. R. L. Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de pereira OH x F97. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 353-357, 2000.

LIAN, M.; MURTHY, H. N.; PAEK, K. Culture method and photosynthetic photon flux affect photosynthesis, growth and survival of *Limonium* 'Misty Blue' *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 95, p. 239-249, 2002.

MOREIRA, F. M. **Avaliação morfo-fisiológica e bioquímica do porta-enxerto de videira 'Paulsen 1103' *in vitro***. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, 2000. 91 p. Dissertação.

MOSALEEYANON, K.; CHA-UM, S.; KIRDMANEE, C. Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets *in vitro* under a CO<sub>2</sub> – enriched condition with decreased sucrose concentrations in the medium. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 103, p. 51-63, 2004.

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.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMANN, R. H. (Eds.). **Micropropagation: Technology and application**. Dordrecht: Kluwer, 1991, p. 71-93.

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

REUTHER, G. Stimulation of the photoautotrophy of *in vitro* plants. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 300, p. 59-75, 1991.

RIQUELME, C.; GUIÑAZU, M. E.; TIZIO, R. Pre-acondicionamiento y aclimatacion en condiciones de invernáculo de plântulas micropropagadas de frutilla, menta, papa y vid. **Phyton**, Buenos Aires, v. 52, n.1, p. 73-82, 1991.

SILVA, A. L.; DOAZAN, J. P. Une méthode d'irradiation aux rayons gamma appliquée à des porte-greffes de vigne *in vitro*. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, Bordeaux, v. 29, n.1, p. 1-9, 1995.

SILVA, A. L. da; HARISCAIN, P.; OLLAT, N.; DOAZAN, J. P. Photosynthetic abilities of *Vitis* plantlets (rootstock var. Gravesac) cultivated *in vitro* under different carbon nutrition conditions. In: CARRE, F.; CHAGVARDIEFF, P. (Eds.). **Ecophysiology and Photosynthetic *in vitro* cultures**. Cadarache, CEA, 1995. p. 203-204.

SIMMONDS, J. Direct rooting of micropropagated M26 apple rootstocks. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, n. 21, p. 233-241, 1983.

SRISKANDARAJAH, S.; MULLINS, M. G. Micropropagation of Granny apple: factors affecting root formation *in vitro*. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 56, n. 1, p. 71-71, 1981.

TICHÁ, I.; CÁP, F.; PACOVSKÁ, D.; HOFMAN, P.; HAISEL, D.; CAPKOVÁ, V.; SCHÄFER, C. Culture on sugar medium enhances photosynthetic capacity and high light resistance of plantlets grown *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 102, p. 155-162, 1998.

VIÑA, G. de la ; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; PLIEGO-ALFARO, F. Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill microcuttings. **Plant Cell, Tissue and Culture**, Hauge, v. 65, p. 229-237, 2001.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A micropropagação do porta-enxerto de videira 'VR043-43' pode ser realizada pelo isolamento de segmentos nodais em meio de cultura QL suplementado com as vitaminas do meio de cultura MS, e com adição de 5  $\mu\text{M}$  de BAP nesta fase.

Para a multiplicação dos explantes é necessário, apenas o subcultivo de microestacas com uma folha e uma gema, em meio de cultura QL suplementado com as vitaminas do meio MS, isento de regulador vegetal. A partir das microestacas subcultivadas é obtida uma única planta enraizada, não sendo necessária fase de enraizamento para as brotações.

As plantas cultivadas *in vitro* possuem tecidos foliares pouco desenvolvidos, exigindo tratamento adequado na etapa inicial de aclimatização.

Para que as plantas micropropagadas tenham melhor crescimento e desenvolvimento *in vitro*, propiciando a sobrevivência das plantas na aclimatização, sugere-se que seja adicionado ao meio de cultura 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, sendo a cultura mantida em sala climatizada com intensidade luminosa de 43  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

## **ANEXOS**

**ANEXO 1.** Resumo da análise de variância do efeito de diferentes meios de cultura no cultivo inicial, primeiro e segundo subcultivos das brotações de gemas axilares de segmentos nodais pelo número de brotações por explante.

Causas de variação	GL	QM		
		Brotações/explante (N°)		
		Cultivo inicial	Primeiro subcultivo	Segundo subcultivo
Blocos	3	0,037ns	0,355ns	0,071ns
Meio de cultura	4	0,181ns	2,103ns	0,466ns
Erro	12	0,058	0,841	0,146
Total	19			
Bartlett's (Q <sup>2</sup> )		1,417	5,500	0,2920

ns – Não significativo.

**ANEXO 2.** Resumo da análise de variância do efeito de diferentes meios de cultura no número de microestacas por explante inicial dos três subcultivos.

Causas de variação	GL	QM			
		N° de microestacas/explante inicial			
		Cultivo inicial	1° subcultivo	2° subcultivo	
Blocos	3	0,125ns	2,458*	3	0,322**
Meio de cultura	4	2,728**	2,279*	3	0,191*
Erro	12	0,186	0,536	9	0,028
Total	19			15	
Bartlett's (Q <sup>2</sup> )		3,980	2,926		0,774
C.V. (%)		20,64	30,50		13,44

ns – Não significativo.

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

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

**ANEXO 3.** Resumo da análise de variância do efeito de diferentes meios de cultura no cultivo inicial, primeiro e segundo subcultivos das brotações de gemas axilares de segmentos nodais, pelo número de folhas por explante.

Causas de variação	GL	QM		
		Folhas/brotação (Nº)		
		Cultivo inicial	Primeiro subcultivo	Segundo subcultivo
Blocos	3	0,257ns	0,131ns	1,334**
Meio de cultura	4	7,956**	2,412ns	0,168ns
Erro	12	0,351	0,813	0,222
Total	19			
Bartlett's (Q <sup>2</sup> )		8,941	3,726	3,506

ns – Não significativo.

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

**ANEXO 4.** Resumo da análise de variância do efeito de diferentes meios de cultura no cultivo inicial, primeiro e segundo subcultivos das brotações de gemas axilares de segmentos nodais, pela altura das brotações.

Causas de variação	GL	QM		
		Altura das brotações (cm)		
		Cultivo inicial	Primeiro subcultivo	Segundo subcultivo
Blocos	3	0,097ns	0,255ns	0,005ns
Meio de cultura	4	1,865**	0,537*	0,497**
Erro	12	0,189	0,128	0,030
Total	19			
Bartlett's (Q <sup>2</sup> )		8,992	6,791	4,373

ns – Não significativo.

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

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

**ANEXO 5.** Resumo da análise de variância do efeito de diferentes meios de cultura no primeiro e segundo subcultivos na porcentagem de enraizamento das brotações.

Causas de variação	GL	QM	
		Enraizamento (%)	
		Primeiro subcultivo	Segundo subcultivo
Blocos	3	0,051ns	0,023ns
Meio de cultura	4	0,211**	0,053ns
Erro	12	0,029	0,041
Total	19		
Bartlett's (Q <sup>2</sup> )		4,697	4,091

ns – Não significativo.

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

**ANEXO 6.** Resumo da análise de variância do efeito de diferentes meios de cultura no terceiro subcultivo das brotações pelo número de brotos por explante, número de folhas por explante, altura das brotações, porcentagem de enraizamento e porcentagem de necrose apical.

Causas de variação	GL	QM			
		Brotação/explante (N°)	Folhas/brotação (N°)	Altura (cm)	Enraizamento (%)
		Blocos	3	0,028ns	1,834ns
Meio de cultura	3	0,028ns	0,501ns	0,922ns	0,224ns
Erro	9	0,036	0,710	0,173	0,052
Total	15				
Bartlett's (Q <sup>2</sup> )		3,617	1,785	1,726	3,323

ns – Não significativo.

**ANEXO 7 .** Resumo da análise de variância do efeito de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina e cinetina na altura, número de brotações por explante, número de folhas e porcentagem de enraizamento das mudas micropropagadas do porta-enxerto de videira ‘VR043-43’, em quatro subcultivos.

Causas de variação	GL	QM				
		Altura (cm)	Brotações/ explante (Nº)	Folhas (Nº)	Enraizamento (%)	Calo (%)
Bloco	3	0,009ns	2,123ns	0,266ns	21,405ns	26,553**
Citocinina (A)	1	52,122**	73,341*	0,821ns	96668,59**	309,476**
Erro (a)	3	0,049	2,625	0,336	2,579	0,321
Concentração (B)	3	10,332**	26,758**	9,864**	13131,04**	75433,48**
A x B	3	6,510**	26,433**	4,029**	10766,13**	309,476**
Subcultivo (C)	3	2,949**	4,884**	2,070**	2234,738**	125,963**
A x C	3	0,797**	5,439**	3,005**	4722,802**	125,963**
B x C	9	1,410**	2,328**	1,906**	707,758**	125,963**
A x B x C	9	1,163**	2,392**	2,158**	690,273**	125,963**
Erro (b)	90	0,114	0,275	0,435	0,814	0,236
Total	127					
Bartlett's (Q <sup>2</sup> )		42,262	29,550	41,277	27,001	11,851

ns – Não significativo.

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

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

**ANEXO 8 .** Resumo da análise de variância do efeito de diferentes condições de cultivo na densidade estomática das folhas das plantas do porta-enxerto de videira ‘VR043-43’.

Causas de variação	GL	QM
		Densidade estomática (mm <sup>2</sup> )
Condições de cultivo	3	264,292 ns
Erro	36	76,775
Total	39	
Bartlett's (Q <sup>2</sup> )		3,562

ns – Não significativo.

**ANEXO 9 .** Resumo da análise de variância do efeito da sacarose e da intensidade luminosa na altura, número de folhas, área foliar, matéria seca da parte aérea e número de raízes das plantas micropropagadas do porta-enxerto de videira ‘VR043-43’.

Causas de variação	GL	QM			
		Altura (cm)	Folhas (Nº)	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Matéria seca parte aérea (mg)
Bloco	3	7,978ns	0,726ns	0,917ns	2,126ns
Intens. Luminosa (A)	1	0,451ns	5,528**	23,592**	23,290*
Sacarose (B)	3	9,056**	13,758**	130,217**	251,409**
A x B	3	0,545ns	1,405*	12,001**	10,380 ns
Erro	21	0,225	0,334	0,931	4,798
Total	31				
Bartlett's (Q <sup>2</sup> )		2,390	9,585	9,108	11,586

ns – Não significativo.

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

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

**ANEXO 10 .** Resumo da análise de variância do efeito da sacarose e da intensidade luminosa no comprimento das raízes principais, matéria seca das raízes, porcentagem de enraizamento e porcentagem de sobrevivência das plantas micropropagadas do porta-enxerto de videira ‘VR043-43’.

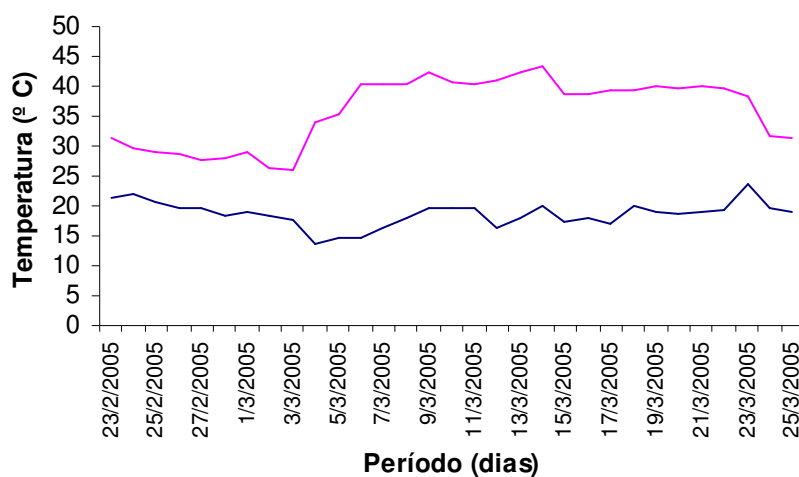
Causas de variação	G L	QM			
		Raízes (Nº)	Matéria seca das raízes (mg)	Enraizamento (%)	Sobrevivência (%)
Bloco	3	0,247ns	0,37ns	142,042ns	64,609ns
Intens. Luminosa (A)	1	0,031ns	6,480**	1,125ns	129,605ns
Sacarose(B)	3	0,596*	20,471**	835,042**	8459,022**
A x B	3	0,025ns	1,968*	1078,375**	904,164**
Erro	21	0,161	0,500	130,479	48,241
Total	31				
Bartlett's (Q <sup>2</sup> )		6,195	8,842	5,976	7,924

ns – Não significativo.

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

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

**ANEXO 11.** Temperatura máxima (—) e temperatura mínima (—) da casa-de-vegetação, medidas no período de aclimatização das mudas micropropagadas do porta-enxerto de videira ‘VR043-43’.



**ANEXO 12.** Umidade máxima (—) e Umidade mínima (—) da casa-de-vegetação, medidas no período de aclimatização das mudas micropropagadas do porta-enxerto de videira ‘VR043-43’.

