

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**APRIMORAMENTO DE UM PROTOCOLO PARA PROPAGAÇÃO
IN VITRO DE Videira *Vitis aestivalis* (Michx.) cv. NORTON**

Alexandre Parizzotto
Magister Scientiae

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2003

ALEXANDRE PARIZZOTTO

APRIMORAMENTO DE UM PROTOCOLO PARA PROPAGAÇÃO
IN VITRO DE VIDEIRA *Vitis aestivalis* (Michx.) cv. NORTON

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fitotecnia, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2003

ALEXANDRE PARIZZOTTO

APRIMORAMENTO DE UM PROTOCOLO PARA PROPAGAÇÃO
IN VITRO DE VIDEIRA *Vitis aestivalis* (Michx.) cv. NORTON

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

APROVADA: 11 de dezembro de 2003

Prof. José Maria Moreira Dias
(Conselheiro)

Prof. Cláudio Horst Bruckner
(Conselheiro)

Prof. Alexandre Pio Viana

Prof. Wagner Campos Otoni

Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike
(Orientador)

BIOGRAFIA

Alexandre Parizzotto, filho de Luiz Parizzotto e Creusa Maria Parizzotto, nasceu em 2 de dezembro de 1976, em Videira, Santa Catarina.

Ingressou na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em Florianópolis, Santa Catarina, em março de 1995, graduando-se em Agronomia, em fevereiro de 2000.

Exerceu, como autônomo, atividades relacionadas à propagação de plantas na área de Fruticultura, no município de Videira, Santa Catarina.

Em agosto de 2001 ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, defendendo tese em dezembro de 2003.

ÍNDICE

RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Propagação <i>in vitro</i> de videira	4
2.2. Seleção e preparação da planta matriz	4
2.3. Fase de estabelecimento.....	5
2.4. Fase de multiplicação de brotos	6
2.5. Fase de alongamento e enraizamento	8
2.6. Fase de aclimatização	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Definição da melhor formulação de sais.....	12
3.2. Definição da melhor dose de BAP para multiplicação	13
3.3. Efeito do DMSO no cultivo <i>in vitro</i> de Norton	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1. Definição da melhor formulação de sais.....	16
4.2. Definição da melhor dose de BAP para multiplicação	21
4.3. Efeito do DMSO no cultivo <i>in vitro</i> de Norton	27
5. CONCLUSÕES	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

RESUMO

PARIZZOTTO, Alexandre, M. S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2003. **Aprimoramento de um Protocolo para Propagação *in vitro* de Videira *Vitis aestivalis* (Michx.) cv. Norton.** Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Conselheiros: José Maria Moreira Dias, José Antônio Saraiva Grossi e Cláudio Horst Bruckner.

O presente trabalho teve por objetivo aprimorar o protocolo para multiplicação *in vitro* de videira *Vitis aestivalis* (Michx.) cv. Norton, sendo dividido em três etapas: seleção de formulações salinas; definição de doses de BAP; e teste do DMSO. As formulações MS, MS 50%, C₂D, C₂D 50%, B₅, NN e Knudson C foram testadas em meio de cultura contendo 4 µM de BAP. Às formulações C₂D e C₂D 50% foram testados diferentes níveis de BAP (0, 2, 4, 8 e 16 µM), num fatorial 2 x 5. O DMSO foi testado em dois experimentos, constituídos de três tratamentos: 2 e 4 µM de BAP dissolvido em 2 e 4 mL de DMSO, respectivamente; 2 e 4 µM de BAP dissolvido em HCl 1N; e 2 e 4 µM de BAP dissolvido em HCl 1N, com adição de alíquotas de DMSO correspondentes ao primeiro tratamento. O delineamento estatístico foi o de Blocos Casualizados, com seis repetições, nas três etapas. A unidade experimental consistiu de um frasco de cultivo com cinco explantes. O meio de cultura foi constituído de 10 mL L⁻¹ de vitaminas de Staba, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, com pH ajustado para 5,70 ± 0,01, acrescido de 10 g L⁻¹ de ágar. Distribuíram-se 30 mL de meio em frascos de vidro de 320 mL, diâmetros externo e interno de 68 mm e 65 mm, e 125 mm de altura, fechados com tampa de polipropileno e filme de PVC, que foram esterilizados em autoclave à 121°C e 1,5 atm, por 20 minutos. Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram inoculados

verticalmente no meio de cultura. Os frascos foram dispostos em sala de cultura à $27 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de 60 a 70 %, fotoperíodo de 16/8 horas e irradiância de $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A avaliação foi feita aos 30 dias, quanto ao peso fresco de calo, número e comprimento de brotos. As formulações salinas C₂D e C₂D 50% foram as melhores, destacando-se C₂D com maior taxa de multiplicação, brotos alongados e reduzido peso fresco de calo. A taxa de multiplicação aumentou linearmente nestas formulações, sendo os maiores comprimentos de brotos, 12,10 mm e 7,80 mm, respectivamente, obtidos com 6,14 μM e 5,13 μM . Níveis elevados de BAP reduziram a qualidade dos brotos, aumentando o índice de hiperhidricidade. A dissolução de BAP em DMSO aumentou significativamente o número de brotos. A presença do DMSO como componente do meio de cultura aumentou tanto a massa fresca de calo para ambas as doses, quanto o número de brotos para 4 μM de BAP. O comprimento ideal de brotos na multiplicação *in vitro* de videira é de, no mínimo 10 mm, para tanto recomenda-se 12,5 μM de BAP para o cv. Norton, nível no qual são obtidos 5,63 brotos/explante, com reduzida formação de calo.

ABSTRACT

PARIZZOTTO, Alexandre, M. S., Universidade Federal de Viçosa, December 2003. **Improvement of a Protocol for *in vitro* Propagation of Grape *Vitis aestivalis* (Michx.) cv. Norton.** Adviser: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Committee members: José Maria Moreira Dias, José Antônio Saraiva Grossi and Cláudio Horst Bruckner.

The purpose of this work was to improve a protocol for *in vitro* multiplication of grape *Vitis aestivalis* (Michx.) cv. Norton, realized into three stages: salt constitution selection; cytokinins (BAP) levels effective determination; and DMSO test on *in vitro* culture. The salt constitution MS, MS 50%, C₂D, C₂D 50%, B₅, NN and Knudson C were evaluated on medium culture containing 4 µM BAP. Different BAP levels (0, 2, 4, 8 and 16 µM), were evaluated on C₂D and C₂D 50% salt constitution, in a 2 x 5 factorial. DMSO was evaluated in two experiments with three treatments: 2 and 4 µM BAP dissolved in 2 and 4 mL DMSO, concerning; 2 and 4 µM BAP dissolved in HCl 1N; and 2 and 4 µM BAP dissolved in HCl 1N, adding the same DMSO quantity concerning at first treatment. A randomized complete-block design with six blocks was used in all stages. The experimental unit consisted of a flask containing five explants. The culture medium was composed by 10 mL L⁻¹ Staba vitamins, 100 mg L⁻¹ mio-inositol, 30 g L⁻¹ sucrose, pH adjusted to 5,70 ± 0,01, with 10 g L⁻¹ agar-agar increased. Flasks with 320 mL capacity, 2.68 and 2.56 inches external and intern diameter, 4.92 inch height, containing 30 mL culture medium, were stoppered with polipropilen top and PVC film, and after were sterilized at 121 °C and 1.5 atm, during 20 minutes. In sterile chamber, explants were vertical inoculated in culture medium. Flasks were placed in a growth room at 27 ± 2°C, under a 16-h light//8-h dark photoperiod and a

photon flux density of $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Estimation was made at 30 days, for callus fresh weight, shoot number and length. C₂D and C₂D 50% salt constitution were the best, with higher multiplication rate, length shoots and smaller callus fresh weight in C₂D salt. Multiplication rate linear increased in these salt constitutions, with greater shoot length, 0.48 and 0.31 inches, concerning, obtained at 6.14 μM and 5.13 μM . Higher BAP levels caused shoots quality reducing, with hyperhidricity index increase. BAP dissolution in DMSO expressive increased shoot number. Culture medium containing DMSO how a component increased both callus fresh weight in both levels, and shoot number at 4 μM BAP. Ideal shoot number on *in vitro* multiplication of grape is the least 0.39 inches, for which recommend 12.5 μM BAP to cv. Norton, level which obtains 5.63 shoots/explant, with reducing callusing.

1. INTRODUÇÃO

A videira (*Vitis* sp.) é uma fruteira de clima temperado, cujos frutos serviam de alimento ao homem no sudeste europeu há cerca de dez mil anos atrás. No entanto, os primeiros cultivos são datados de três mil anos, na região do Mediterrâneo (Zohary & Hopf, 1988).

Hoje, a videira é uma das mais importantes culturas frutíferas, perfazendo, em todo o mundo, mais de nove milhões de hectares plantados, sendo superada apenas por citros e banana. Dos cerca de 14 mil cultivares conhecidos, 59 ocupam, cada um, mais de 20 mil hectares em todo o planeta, abrangendo cerca de 55 % da área ocupada por vinhedos (Reisch & Pratt, 1996). A exemplo da maioria das frutas, a uva é fonte de carboidratos, vitaminas e fibra. Seu consumo dá-se na forma de fruta fresca, fruta seca, suco, geléia e vinhos. A possibilidade de estocar produtos por longos períodos faz da viticultura uma atividade de alto valor agregado.

A videira pertence à família Vitaceae, que inclui quatorze gêneros e mais de mil espécies. Dentre eles, *Vitis* é o único gênero que produz frutos comestíveis (Reisch & Pratt, 1996). Segundo classificação preconizada por Galet (1967), o gênero *Vitis* é dividido em dois subgêneros: *Euvitis* Planch., com 38 cromossomos, gavinhas bifurcadas, córtex esfoliável e nós com diafragma; e *Muscadinia* Planch., com 40 cromossomos, gavinhas simples, córtex aderente e nós sem diafragma (Winkler et al., 1974; Einset & Pratt, 1975).

A viticultura no Brasil ocupa uma área de 63.816^oha. Situa-se entre o paralelo 30^oS, no Estado do Rio Grande do Sul, e o paralelo 9^oS, na Região Nordeste do país. Em função da diversidade ambiental, existem pólos com viticultura característica de regiões temperadas, com um período de repouso hibernar definido; pólos em áreas subtropicais, onde normalmente a videira é cultivada com dois ciclos anuais, definidos em função de um período de temperaturas mais baixas, no qual há risco de geadas; e pólos de viticultura

tropical, onde é possível a realização de podas sucessivas, com dois e meio a três ciclos vegetativos por ano (Camargo, 2002; Protas et al., 2002).

A viticultura é uma atividade rentável economicamente e apresenta perspectiva de expansão, tanto pelo aumento da área cultivada nas regiões tradicionais de produção, como pelo surgimento de novos pólos vitícolas. Entretanto, o crescimento sustentável e a competitividade da viticultura brasileira, tanto nas atuais, quanto nas potenciais zonas de produção, dependem do uso de cultivares adaptados, que viabilizem a produção por meio dos sistemas orgânico e integrado, atendendo aos diferentes segmentos de mercado de vinhos, sucos e uvas de mesa. Normalmente, os cultivares comerciais, em sua maioria castas de *Vitis vinifera* L., são oriundos de zonas temperadas, onde a precipitação pluviométrica dos meses de verão é baixa. Decorrem daí os problemas de adaptação desses cultivares nas condições brasileiras. No Sul do país, apesar do clima temperado, com período hibernal definido, as condições ambientais do verão quente e chuvoso são altamente favoráveis à incidência de doenças fúngicas, especialmente de antracnose (*Elsinoe ampelina*), míldio (*Plasmopara viticola*) e podridões do cacho (*Botrytis cinerea*). Nas condições tropicais, onde a videira vegeta o ano todo, além do aspecto fitossanitário, a falta de adaptação fisiológica manifesta-se pelos problemas de dormência e baixa fertilidade das gemas, bem como pelo vigor excessivo. Esses problemas geram a necessidade de uso de técnicas especiais de manejo e significativas quantidades de insumos e mão-de-obra, elevando os custos de produção (Camargo, 1997; Camargo 2002).

Verifica-se, então, a necessidade de cultivares adaptados às diferentes regiões do país, que apresentem alta produtividade e resistência às principais doenças fúngicas, bem como qualidade compatível com as exigências do mercado (Camargo, 1997; Camargo 2002).

Norton é um cultivar de videira americana pertencente à espécie *Vitis aestivalis* (Michx.) (Tarara & Hellman, 1991). Este cultivar possui várias características interessantes, tais como elevada resistência a pragas e doenças, maior resistência a baixas temperaturas que cultivares de *Vitis vinifera* L., adaptação aos mais variados tipos de solos e reconhecida aptidão para a produção de vinho tinto sem a característica do aroma foxado, que predomina em vinhos de cultivares de *Vitis labrusca* L. (Norton & Skirvin, 2001).

A resistência deste cultivar a pragas e doenças é tão pronunciada, que ele é citado por Hedrick (1908), como planta virtualmente livre de problemas

fitossanitários. Este fato pode ser comprovado pela não necessidade de enxertia para o seu cultivo, mesmo em regiões de ocorrência de filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch.).

O vinho produzido por esta casta é outra qualidade deste cultivar. Este tem recebido premiações, tanto em competições nacionais quanto internacionais nos Estados Unidos, e tem sido comparado aos vinhos das melhores castas viníferas, tais como o Merlot e Cabernet Sauvignon (Tarara & Hellman, 1991). Outro aspecto relevante é a concentração de polifenóis, agentes antioxidantes responsáveis pelos efeitos benéficos do vinho à saúde. O teor de resveratrol em vinhos de Norton tem se mostrado superior ao de vinhos de castas viníferas (Roberts, 2002), fazendo deste produto um alimento de característica funcional.

O cultivar Norton, em função de suas características agronômicas, constitui-se como uma nova opção para a viticultura brasileira, especialmente àquela voltada para a produção de vinhos especiais. Na Universidade Federal de Viçosa, este cultivar tem expressado a sua potencialidade genética, principalmente no que se refere ao vigor e à resistência a doenças.

A videira é propagada vegetativamente por meio de métodos convencionais, notadamente estaquia e enxertia, permitindo a perpetuação de genótipos superiores (Hidalgo, 1993). O cultivar Norton, no entanto, não é explorado comercialmente, devido, principalmente, a problemas relacionados à propagação. A dificuldade de enraizamento de suas estacas resulta em índices inferiores a 50 %. Neste caso, a propagação *in vitro* surge como alternativa viável para produção de mudas (Reisch et al., 1993).

A propagação *in vitro* do cultivar Norton realizada no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais do Setor de Fruticultura da UFV, mostra-se, no entanto, problemática, pois os explantes produzidos são de qualidade inferior, apresentando elevados índices de hiperhidricidade, presença de volumosas massas de calo e pouco alongamento dos brotos, características estas, indesejáveis do ponto de vista da multiplicação *in vitro*. Evidencia-se, a partir daí, a necessidade de refinamentos do protocolo para produção de mudas *in vitro* deste cultivar.

Considerando o potencial do cultivar Norton para a produção de vinhos no Brasil e a necessidade de refinamentos no processo de propagação deste cultivar, o presente trabalho teve como objetivo aprimorar o protocolo para a sua multiplicação *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Propagação *in vitro* de videira

As técnicas de propagação *in vitro* foram desenvolvidas para diversas espécies frutíferas, incluindo as de videiras, permitindo a propagação de genótipos excepcionais em larga escala (Jones et al., 1979; Lane, 1979; Rosati et al., 1980). Essa técnica possibilita a rápida multiplicação de plantas, a obtenção de plantas matrizes livres de vírus, a propagação de híbridos e a preservação de germoplasma de interesse (Krul & Mowbray, 1984). Além do mais, a propagação *in vitro* tem sido utilizada com sucesso na produção de mudas de cultivares de videira de difícil enraizamento (Gray & Fisher, 1985; Lee & Wetzstein, 1990; Torregrosa & Bouquet, 1995, 1996; Torregrosa & Lopez, 1996).

Este método de propagação é utilizado em escala comercial em diversos países com tradição vitícola, sendo ainda de uso restrito no Brasil, onde os sistemas de propagação tradicionais são mais econômicos. A enxertia herbácea sobre porta-enxertos propagados *in vitro* é um dos sistemas utilizados na Europa para a produção de mudas de videira (Martin & Collas, 1992). Chee & Pool (1982) sugeriram a produção em larga escala de plantas matrizes de videira a partir do cultivo *in vitro*.

A propagação *in vitro* de videira consiste basicamente de cinco etapas: seleção e preparação da planta matriz, estabelecimento da cultura *in vitro*, multiplicação de brotos, alongamento e enraizamento, e aclimatização. Cada etapa tem seus próprios problemas e particularidades, que variam de acordo com a espécie, e até mesmo entre variedades (George, 1993).

2.2 Seleção e preparação da planta matriz

A seleção de determinado tecido vegetal, para ser utilizado como explante, depende do objetivo da pesquisa. As matrizes de videira selecionadas devem permanecer por dois a três meses em casa de vegetação, sob cuidados

fitossanitários, para diminuir a fonte de inóculos dos explantes que se deseja estabelecer *in vitro* (Motoike, 2001).

2.3. Fase de estabelecimento

A fase de estabelecimento consiste na introdução *in vitro* de explantes provenientes de ambientes naturais e que, preferencialmente, tenham passado pelo processo de preparação da planta matriz, discutido anteriormente. Os explantes preferidos para o estabelecimento *in vitro* de videiras, visando a produção de mudas, são as gemas axilares, que são desinfestadas com substâncias de ação germicida. As substâncias mais comuns são o etanol e os compostos à base de cloro, acrescidos de espalhante adesivo para melhorar o contato destes com os tecidos (Grattapaglia & Machado, 1998).

Lee & Wetzstein (1990) desinfestaram gemas axilares de videira *Vitis rotundifolia* (Michx.) cv. Summit através de enxaguadura em água corrente por 30 minutos, imersão em solução de hipoclorito de cálcio 2 % (v/v) contendo 0,1 % de Tween 20, seguida de três enxaguaduras em água destilada esterilizada. Gribaudo & Fronda (1991) desinfestaram gemas axilares de videira *Vitis vinifera* L. cv. Barbera através de imersão em solução aquosa 25 % (v/v) de detergente contendo 7 % de cloro, por 15 minutos. Lewandowski (1991) desinfestou gemas axilares de videira *Vitis labrusca* L. cv. Delaware através de imersão, por 15 segundos, em etanol 95 %, seguida de imersão e agitação contínua, por 20 minutos, em solução de hipoclorito de sódio 0,78 % (15 % v/v de cloro ativo acrescido de 0,1 % de Tween 20), e três enxaguaduras por 20 minutos cada, em água desionizada autoclavada. Sudarsono & Goldy (1991) desinfestaram gemas axilares de videira *Vitis rotundifolia* (Michx.) cvs. Carlos, Noble, Regale e Tarhell por meio de esterilização de suas superfícies em solução de hipoclorito de sódio 1,3 % (v/v), seguida de duas imersões nesta mesma solução, porém a 0,7 %, por 25 e 10 minutos, respectivamente, e três enxaguaduras em água destilada esterilizada. Heloir et al. (1997) desinfestaram gemas axilares de videira *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir através de imersão em solução de hipoclorito de cálcio 5 %, por 15 minutos, seguida de três enxaguaduras em água destilada esterilizada.

2.4. Fase de multiplicação de brotos

Maximizar a proliferação de brotos é o objetivo básico da fase de multiplicação. Para isto, faz-se necessária a utilização de uma metodologia eficiente, que permita a produção de partes aéreas homogêneas e de boa qualidade (Grattapaglia & Machado, 1998). Em *Vitis* sp., a metodologia mais utilizada é a multiplicação de gemas axilares, descrita por Galzy (1985), que permite manter e multiplicar *in vitro* clones de videira por tempo indeterminado, por meio de repicagens sucessivas. Este tipo de multiplicação, sem a passagem por estádios morfogenéticos de desdiferenciação e diferenciação celular, aliada à baixa taxa de utilização de reguladores de crescimento e à proliferação por gemas axilares e não adventícias, garante grande estabilidade genética, fator primordial em se tratando de propagação *in vitro* (Biasi, 2000).

A seleção ou o desenvolvimento de um meio de cultura constitui uma etapa essencial em qualquer projeto de cultura de tecidos. De todos os efeitos do ambiente em cultura de tecidos de plantas, a composição do meio de cultura tem recebido especial atenção (Cohen, 1995). O mais amplamente utilizado meio de cultura é o de MS (Murashige & Skoog, 1962), que contém todos os elementos essenciais para o crescimento das plantas. Ele é classificado como sendo de alta concentração salina, comparado a outras formulações. No geral, é apropriado para plantas herbáceas, enquanto que para as perenes, menor concentração salina é suficiente (Cohen, 1995).

No que se refere à composição dos meios de cultura para videira, diversos autores, entre eles, Letouze et al. (1991), Roubelakis-Angelakis & Zivanovitch (1991), Lima da Silva (1995), Lima da Silva & Doazan (1995), evidenciaram a necessidade de menores concentrações salinas em relação ao meio MS. Diferentes meios de cultura, entre eles MS (Murashige & Skoog, 1962), C₂D (Chee & Pool, 1983), Chee & Pool (1987), Galzy (1985), Galzy et al. (1990), e suas modificações (Roubelakis-Angelakis & Zivanovitch, 1991, Lima da Silva, 1995, Lima da Silva & Doazan, 1995), são utilizados na propagação *in vitro* de videira.

Na cultura de tecidos, a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura é de suma importância, pois reproduz o que ocorre naturalmente na planta. As citocininas são indispensáveis para quebrar a dominância apical e induzir a proliferação de gemas, sendo o tipo de citocinina e a sua concentração os fatores que mais influenciam o sucesso na multiplicação *in vitro* (Grattapaglia & Machado, 1998).

A 6-benzilaminopurina (BAP) tem sido muito eficaz para a multiplicação de diversas espécies e parece ser a citocinina por excelência para multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias (George, 1993).

Diversos trabalhos têm sido realizados para se definir a melhor concentração de reguladores de crescimento para a multiplicação de brotos, manipulando-se, basicamente, seus níveis no meio de cultura. Pasqual et al. (1991), verificando o efeito de diversas combinações dos reguladores de crescimento ácido naftaleno acético (ANA), nas concentrações de 0,0; 0,001; 0,01 e 0,1 mg L⁻¹, e BAP, nas concentrações de 0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹, adicionados em meio de cultura contendo a formulação salina de MS, observaram que, na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de videira 420-A (*Vitis berlandieri* x *Vitis riparia*), maior número de brotos por gema foram obtidos nos tratamentos que utilizaram 0,5 mg L⁻¹ de BAP, tanto combinado com 0,001 mg L⁻¹ de ANA, como na ausência deste regulador, apresentando 5,50 e 5,28 novos brotos, respectivamente.

Lee & Wetzstein (1990), testando o efeito de diferentes níveis de BAP (5, 10, 20 e 40 µM) em meio de cultura contendo os sais de MS, observaram produção superior de brotos de videira *Vitis rotundifolia* (Michx.) cv. Summit, quando se utilizou 10 µM de BAP. Estes autores observaram também que adição de níveis acima de 20 µM desta citocinina resultou em forte redução da proliferação e do alongamento dos brotos, bem como na elevação da mortalidade.

Peixoto et al. (1994) obtiveram elevadas taxas de multiplicação de brotações do porta-enxerto de videira Paulsen 1103 (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*) quando da adição, tanto de 0,5 mg L⁻¹ quanto de 1,0 mg L⁻¹ de BAP, em meio de cultura contendo os sais de C₂D (Chee & Pool, 1983). No entanto, brotações de comprimentos maiores que 10 mm foram obtidas quando se utilizou 0,5 mg L⁻¹ de BAP. Em níveis superiores a este observou-se ocorrência de hiperhidricidade generalizada.

O fato de reguladores de crescimento serem considerados de fundamental importância não significa, entretanto, que devam ser adicionados ao meio de cultura em concentrações elevadas. O BAP, por exemplo, quando em concentrações acima da ideal para determinada cultura ou genótipo, torna-se tóxico, sendo apontado como um dos causadores de hiperhidricidade e do pouco alongamento das brotações, fatores que prejudicam a taxa de multiplicação *in vitro*. Hiperhidricidade é uma desordem fisiológica que reduz a qualidade e o vigor

dos explantes. Deve-se, em parte, ao excesso de citocininas no meio de cultura, sendo, frequentemente, associada a elevadas taxas de multiplicação (Heloir et al., 1997). Diversos trabalhos relacionam o aumento do índice de hiperhidricidade dos explantes com a elevação dos níveis de BAP no meio de cultura (Debergh et al., 1981; Pasqualetto et al., 1986; Heloir et al., 1997).

Por serem pouco solúveis em água, as citocininas (bases orgânicas) são dissolvidas em ácido (HCl 1N), na proporção de 3^o gotas de ácido para cada 100 mg de citocinina (Caldas et al., 1990). Este constitui o processo usual de dissolução para o preparo de soluções estoque de grande parte das substâncias reguladoras de crescimento. O Dimetil Sulfóxido (DMSO) é um subproduto da indústria madeireira, que vem tendo uso como solvente comercial desde 1953. Constitui um dos mais estudados agentes farmacológicos da atualidade. Em 1961, ao realizar transplante de órgãos, Jacob constatou, ao utilizar o DMSO como conservante, que este produto penetrava na membrana com rapidez, sem danificá-la (Muir, 2003).

A capacidade que o DMSO tem de penetrar nos tecidos vivos, sem danificá-los, é atribuída à sua natureza polar, capacidade de formar pontes de hidrogênio e à sua estrutura relativamente pequena e compacta. A combinação destas propriedades resulta na habilidade do DMSO se associar com água, proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, substâncias iônicas e demais constituintes do sistema celular (Szmant, 2003). Além disso, o DMSO pode transportar substâncias através da membrana, dependendo do peso molecular, forma e eletroquímica das moléculas, propriedade esta que o torna capaz de atuar como um sistema carreador de drogas (Muir, 2003).

Com base nestas características do DMSO, este produto pode ser utilizado como método alternativo na dissolução de citocininas (Schmitz & Skoog, 1970), que, por sua vez, podem ser utilizadas no cultivo *in vitro* de Norton, buscando-se observar os efeitos de uma possível melhoria ou até maximização de suas funções, fato a ser manifestado no aspecto geral dos explantes produzidos.

2.5. Fase de alongamento e enraizamento

O objetivo desta fase é promover o alongamento das brotações provenientes da fase anterior, seguido do enraizamento adventício das mesmas. As plântulas, assim formadas, serão preparadas para conversão de heterotróficas

para autotróficas. De acordo com Grattapaglia & Machado (1998), tipos e concentrações de auxinas são as variáveis que, em geral, mais influenciam o enraizamento. Neste caso, as partes aéreas, em rápido crescimento, são fontes de intensa produção de auxina, a qual é translocada para a base, estimulando a rizogênese. De modo geral, quando a relação citocinina/auxina é favorável à auxina pode haver indução de raízes, caso contrário, há estímulo para formação de parte aérea (Hinojosa, 2000).

O enraizamento *in vitro* pode também ser estimulado pela modificação da concentração dos sais da formulação básica utilizada. A redução na concentração de sais do meio MS é comum na propagação *in vitro* de videiras (Ciccotti, 1982; Harris & Stevenson, 1982; Fanizza et al., 1984; Blazina et al., 1991). Frequentemente, são utilizadas concentrações salinas reduzidas a $\frac{3}{4}$, $\frac{1}{2}$ e a $\frac{1}{4}$ do meio MS, nesta fase, dependendo da espécie (Ciccotti, 1982; Harris & Stevenson, 1982; Roubelakis-Angelakis & Zivanovitch, 1991; Debergh et al., 2000). Ciccotti (1982) enraizou videira *Vitis vinifera* L. cvs. Moscato d'Amburgo e Pinot bianco em meio de cultura contendo $\frac{1}{2}$ da concentração de sais do meio MS, sem auxinas, porém com adição de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ de tiamina. O pré-tratamento de imersão em solução de ácido indol-butírico (AIB) por 15 minutos, nas concentrações de 2,46 mM para o cultivar Marechal Foch, e de 3,94 mM para o cultivar Cascade, promoveu melhor enraizamento em meio de cultura com a metade da concentração de sais do meio MS (Li & Eaton, 1984). Biasi et al. (1998a) realizaram enraizamento simultâneo à multiplicação do porta-enxerto de videira Jales, em meio de cultura contendo $\frac{1}{2}$ da concentração de sais do meio MS, isento de reguladores de crescimento, utilizando plantas já estabelecidas *in vitro*, as quais foram seccionadas em segmentos contendo uma folha.

O enraizamento pode ser realizado *in vitro* ou *ex vitro*. No enraizamento *in vitro*, as raízes são formadas em condições assépticas e a planta completa é transplantada para recipientes contendo substrato apropriado. Em condições *ex vitro*, todo o processo de enraizamento se dá em recipiente contendo substrato hortícola, constituindo uma estratégia que deve ser considerada sempre que possível, pois pode representar redução de cerca de 30 a 60 % do custo de produção das plantas. A opção por um dos sistemas depende, fundamentalmente, da qualidade das partes aéreas obtidas na multiplicação, da espécie e genótipo em questão, além da disponibilidade de infra-estrutura adequada de casa de

vegetação com controle de temperatura, túneis plásticos e sistemas de nebulização intermitente (Grattapaglia & Machado, 1998).

2.6. Fase de aclimatização

A aclimatização compreende o conjunto de técnicas e procedimentos que têm por objetivo adaptar as mudas produzidas *in vitro* às condições de ambiente natural ou em ambiente de transição, tais como casa de vegetação ou telado (Preece & Sutter, 1991).

A etapa de aclimatização, na propagação *in vitro*, consiste na transferência da plântula da condição de laboratório, onde ela é heterotrófica, para o ambiente natural, quando a plântula torna-se autotrófica. Esta transição constitui uma fase bastante crítica e representa, em alguns casos, um fator limitante do processo de propagação *in vitro* (Grattapaglia & Machado, 1998).

Neste estágio ocorre uma delicada transição da condição heterotrófica para autotrófica. O principal objetivo é diminuir ao máximo as perdas que ocorrem, principalmente pela desidratação dos tecidos da planta. A utilização de estufas, túneis plásticos, sistemas de nebulização e de antitranspirantes deve ser considerada para cada situação, tendo em vista que as plantas neste estágio normalmente não apresentam estômatos funcionais e suas folhas apresentam reduzida capacidade de formação de cutículas cerosas protetoras (Grattapaglia & Machado, 1998; Hoffmann, 2002).

Composições adequadas de substratos hortícolas também são importantes e, embora a areia, solo, vermiculita e casca de arroz carbonizada têm sido utilizados em suas formas puras, os mais altos índices de sobrevivência têm sido alcançados com misturas.

De maneira geral, este estágio inicia-se com a retirada das plântulas dos frascos, seguida de remoção, por lavagem, de resíduos de meio de cultura junto ao sistema radicular. Um segundo passo consiste em transferir estas plântulas para recipientes contendo substrato ou mistura, cuja composição fora previamente determinada. O terceiro passo consiste em manter os recipientes com as plântulas, por períodos de até 15 dias, em sala de cultura, cujo fotoperíodo, temperatura e irradiância, possam ser controlados. A manutenção de câmara úmida sobre os recipientes contendo as plântulas pode ser feita pela utilização de filmes plásticos, sendo os recipientes mantidos em condição de

ripado ou cobertura com tela que deixe passar em torno de 50 % da luminosidade. Por fim, procede-se retirada gradual da cobertura, para que as mudas sejam submetidas às condições normais que se verificam após o transplante para o local definitivo. Importante salientar que, para algumas espécies, determinadas sequências destas operações podem ser eliminadas. Torna-se necessário, portanto, estabelecer procedimentos específicos para cada espécie a ser trabalhada em laboratórios de propagação *in vitro* (Hoffmann, 2002).

Na aclimatização de videira, segundo Nozeran & Bancilhon (1972), o índice de mortalidade é baixo e não representa problema, comparado a outras espécies frutíferas. Lima da Silva (1995) obteve taxas de sobrevivência superior a 85 % para os cultivares de porta-enxertos Gravesac e Fercal multiplicados *in vitro* e aclimatizados em casa de vegetação. A taxa de sobrevivência de videira em condições de nebulização é alta, sendo, frequentemente, obtidos resultados acima de 90 % para diversos cultivares (Lewandowski, 1991).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho de pesquisa foi conduzido no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais do Setor de Fruticultura (Departamento de Fitotecnia), da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, sendo dividido em três etapas. A primeira consistiu na seleção de formulações salinas, seguida da definição de doses de citocinina (BAP) adequadas. Numa terceira etapa testou-se o Dimetil Sulfoxido (DMSO) (Grupo Química[®]), procurando verificar seu efeito no cultivo *in vitro*.

Em todas as etapas deste trabalho, utilizou-se explantes oriundos de plantas pré-estabelecidas *in vitro*, em meio de cultura C₂D (Chee & Pool, 1983), contendo 2 µM de BAP.

3.1. Definição da melhor formulação de sais

Para a definição da melhor formulação de minerais nutrientes para a multiplicação *in vitro* de videira Norton, sete diferentes formulações foram testadas em meio de cultura, seguindo o delineamento em Blocos Casualizados, com seis repetições. As formulações testadas foram os sais de MS e C₂D, ambos a 50 e a 100 % de suas respectivas concentrações e, ainda, os sais completos de Gamborg et al. (1968, B₅), Nitsch & Nitsch (1969, NN) e Knudson (1946, Knudson C), os quais constituíram os tratamentos. A unidade experimental foi representada por um frasco de cultivo com cinco explantes, sendo cada explante constituído de um único segmento nodal, com aproximadamente 10 mm de comprimento.

A todos os tratamentos foram adicionados 10 mL L⁻¹ de vitaminas de Staba (Staba, 1969), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose e 4 µM de 6-Benzilaminopurina (BAP). O pH do meio foi ajustado para 5,70 ± 0,01 com KOH 1N, acrescentando-se, posteriormente, agente solidificador na concentração de 10 g L⁻¹ de ágar (Bacto Agar[®]). Distribuíram-se 30 mL de meio de cultura em

frascos de vidro com capacidade volumétrica de 320 mL, diâmetro externo de 68 mm e interno de 65 mm, e 125 mm de altura. Estes recipientes, contendo o meio de cultura, foram fechados com tampa de polipropileno transparente, e suas bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac®). A esterilização foi feita em autoclave à 121°C e pressão de 1,5 atm, por 20 minutos.

Após a esterilização e sob condição de câmara de fluxo laminar, à temperatura ambiente, com utilização de pinça e bisturi, os explantes foram inoculados verticalmente no meio de cultura. Em seguida, os frascos foram fechados com tampa de polipropileno transparente, e suas bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac®).

Na sala de cultura, os frascos foram dispostos em estantes, distantes aproximadamente três centímetros uns dos outros. A sala de cultura foi mantida à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de 60 a 70 %, fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) e irradiância de $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, proveniente de lâmpadas fluorescentes.

A avaliação foi feita aos 30 dias da incubação, quanto às seguintes características: peso fresco de calo, número de brotos e comprimento de brotos. Os resultados das características avaliadas foram submetidos à análise de variância e, as médias dos tratamentos, comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, conforme recomendação de Gomes (1971).

3.2. Definição da melhor dose de BAP para multiplicação

Para esta etapa utilizou-se duas formulações salinas, C₂D e C₂D 50%, que se destacaram quanto às características avaliadas na etapa anterior, descrita no item 3.1. A estas formulações salinas foram testados diferentes níveis de BAP (0, 2, 4, 8 e 16 μM), em experimento fatorial 2 x 5. O delineamento estatístico utilizado foi o de Blocos Casualizados, com seis repetições. A unidade experimental foi representada por um frasco de cultivo com cinco explantes, sendo cada explante constituído de um único segmento nodal, com aproximadamente 10 mm de comprimento.

A todos os tratamentos foram adicionados 10 mL L⁻¹ de vitaminas de Staba (Staba, 1969), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 30 g L⁻¹ de sacarose. O pH do meio foi ajustado para $5,70 \pm 0,01$ com KOH 1N, acrescentando-se, posteriormente, agente solidificador na concentração de 10 g L⁻¹ de ágar (Bacto Agar®).

Distribuíram-se 30 mL de meio de cultura em frascos de vidro com capacidade volumétrica de 320 mL, diâmetro externo de 68 mm e interno de 65 mm, e 125 mm de altura. Estes recipientes, contendo o meio de cultura, foram fechados com tampa de polipropileno transparente, e suas bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac[®]). A esterilização foi feita em autoclave à 121°C e pressão de 1,5 atm, por 20 minutos.

Após a esterilização e sob condição de câmara de fluxo laminar, à temperatura ambiente, com utilização de pinça e bisturi, os explantes foram inoculados verticalmente no meio de cultura. Em seguida, os frascos foram fechados com tampa de polipropileno transparente, e suas bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac[®]).

Na sala de cultura, os frascos foram dispostos em estantes, distantes aproximadamente três centímetros uns dos outros. A sala de cultura foi mantida à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de 60 a 70 %, fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) e irradiância de $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, proveniente de lâmpadas fluorescentes.

A avaliação foi feita aos 30 dias da incubação, quanto às seguintes características: peso fresco de calo, número de brotos e comprimento de brotos. Os resultados das características avaliadas foram submetidos à análise de variância, e as médias dos tratamentos, ajustadas à equação de regressão, conforme recomendação de Gomes (1971).

3.3. Efeito do DMSO no cultivo *in vitro* de Norton

Nesta etapa, foram conduzidos dois experimentos. No primeiro, foram testados: 1.1) 2 μM de BAP dissolvido em 2 mL de DMSO; 1.2) 2 μM de BAP dissolvido em HCl 1N; e 1.3) 2 μM de BAP dissolvido em HCl 1N, porém com adição da mesma alíquota correspondente de DMSO ao do tratamento 1.1. No segundo experimento, similar ao anterior, testou-se: 2.1) 4 μM de BAP dissolvido em 4 mL de DMSO; 2.2) 4 μM de BAP dissolvido em HCl 1N; e 2.3) 4 μM de BAP dissolvido em HCl 1N, porém com adição da mesma alíquota correspondente de DMSO ao do tratamento 2.1. O delineamento estatístico utilizado foi o de Blocos Casualizados, com três tratamentos e seis repetições, para ambos experimentos. A unidade experimental foi representada por um frasco de cultivo com cinco

explantes, sendo cada explante constituído de um único segmento nodal, com aproximadamente 10 mm de comprimento.

O meio de cultura utilizado foi composto da formulação salina de C₂D, tendo como constituintes orgânicos 10 mL L⁻¹ de vitaminas de Staba (Staba, 1969), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 30 g L⁻¹ de sacarose. O pH foi ajustado para $5,70 \pm 0,01$ com KOH 1N, acrescentando-se, posteriormente, agente solidificador na concentração de 10 g L⁻¹ de ágar (Bacto Agar[®]). Distribuíram-se 30 mL de meio de cultura em frascos de vidro com capacidade volumétrica de 320 mL, diâmetro externo de 68 mm e interno de 65 mm, e 125 mm de altura. Estes recipientes, contendo o meio de cultura, foram fechados com tampa de polipropileno transparente, e suas bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac[®]). A esterilização foi feita em autoclave à 121°C e pressão de 1,5 atm, por 20 minutos.

Após a esterilização e sob condição de câmara de fluxo laminar, à temperatura ambiente, com utilização de pinça e bisturi, os explantes foram inoculados verticalmente no meio de cultura. Em seguida, os frascos foram fechados com tampa de polipropileno transparente, e suas bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac[®]).

Na sala de cultura, os frascos foram dispostos em estantes, distantes aproximadamente três centímetros uns dos outros. A sala de cultura foi mantida à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de 60 a 70 %, fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) e irradiância de $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, proveniente de lâmpadas fluorescentes.

A avaliação foi feita aos 30 dias da incubação, quanto às seguintes características: peso fresco de calo, número de brotos e comprimento de brotos. Os resultados das características avaliadas foram submetidos à análise de variância, e as médias dos tratamentos, comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, conforme recomendação de Gomes (1971).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Definição da melhor formulação de sais

A análise de variância para as diferentes formulações salinas testadas em meio de cultura demonstrou diferença significativa para as características peso fresco médio de calo, número médio de brotos e comprimento médio de brotos dos explantes do cultivar Norton (Tabela 1).

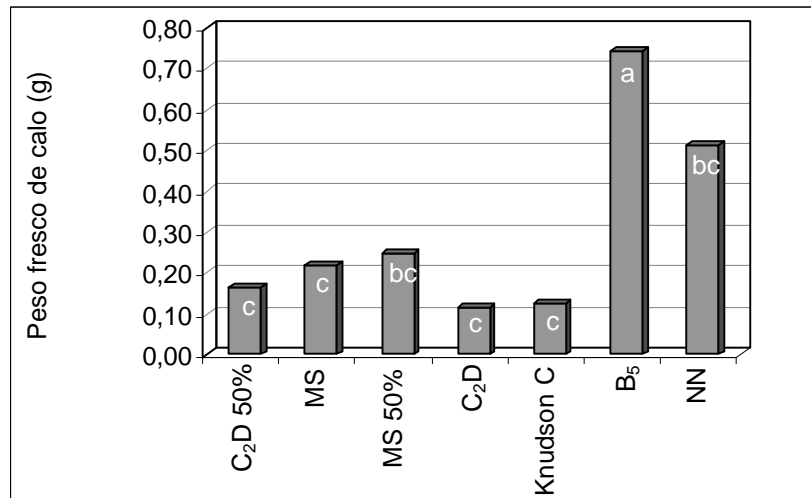
Tabela 1 – Resumo da análise de variância do efeito de diferentes formulações salinas em meio de cultura para as características peso fresco de calo (g), número de brotos e comprimento de brotos (mm) de explantes do cv. Norton

Fontes de variação	Quadrados Médios			
	GL	Peso fresco de calo	Número de brotos	Comprimento de brotos
Blocos	5	0,0092ns	0,6401ns	0,0177ns
Formulações salinas	6	0,3346**	1,3433*	0,4470**
Resíduo	30	0,0232	0,3335	0,0151
CV (%)		50,36	20,85	13,55

ns Não significativo a 5 % de probabilidade pelo teste F

* e ** Significativo, a 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F

O peso fresco médio de calo dos explantes foi superior nas formulações salinas B₅ e NN, embora essa tenha apresentado uma redução de 31,08 %, comparado à primeira, seguida da formulação salina MS 50%, na qual apresentou-se peso fresco intermediário, 66,21 % menor, comparado a B₅. Já, com as formulações salinas MS, C₂D 50%, Knudson C e C₂D, a massa de calo formado foi menor, sendo seus respectivos pesos frescos reduzidos em 70,27; 77,03; 83,78 e 85,14 %, em relação a B₅ (Figura 1).



Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade

Figura 1 – Peso fresco médio de calo (g) de explantes do cv. Norton em meio de cultura constituído de diferentes formulações salinas, aos 30 dias de cultivo.

Do ponto de vista da propagação *in vitro*, a formação de calo é indesejável, não só pela dificuldade de manuseio na separação de brotos e, danos à conexão vascular e funcionalidade das raízes, mas também devido à possibilidade de ocorrência de variação somaoclinal, pondo em risco a fidelidade genética das plantas produzidas por esta via (Biasi, 2000).

Uma das diferenças notáveis nas formulações salinas utilizadas no experimento está relacionada com o teor de cálcio. Os sais de C₂D, MS e de Knudson C contém cálcio em concentrações mais elevadas que nas formulações B₅ e NN (Tabela 2). O cálcio é um importante componente da lamela média das células, cuja função é unir células contíguas, estando presente na forma de pectatos de cálcio, os quais, juntamente com pectatos de magnésio, agem como substância cimentante. Além disso, o cálcio possui outras funções, tais como a ativação de centros enzimáticos, e a manutenção da integridade das membranas celulares e de sua permeabilidade e capacidade de seletividade, durante a divisão celular (Marschner, 1995).

Tabela 2 – Composição química, em mg L⁻¹, de substâncias inorgânicas das formulações salinas utilizadas em meio de cultura.

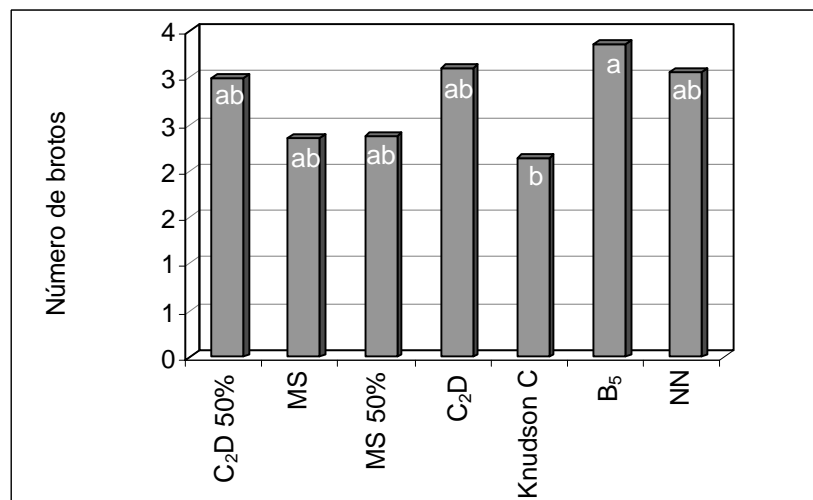
Macronutrientes	MS	C ₂ D	B ₅	NN	Knudson C
NH ₄ NO ₃	1.650	1.650	-	720	-
KNO ₃	1.900	1.900	2.500	950	-
KH ₂ PO ₄	170	170	-	68	250
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	708,5	-	-	1.000
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	-	150	220	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370	250	185	250
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	134	-	500
Micronutrientes					
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	0,845	13,2	25,0	7,5
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	3,0	10,0	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	8,6	2,0	10,0	-
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,25	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	-
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025	0,025	-	-
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	27,1	27,8	27,8	25,0
Na ₂ .EDTA	37,3	37,3	37,3	37,3	-
KI	0,83	-	0,75	-	-

MS= Murashige & Skoog (1962); C₂D (Chee & Pool, 1983); B₅= Gamborg et al. (1968); NN= Nitsch & Nitsch (1969); Knudson C= Knudson (1946)

Visto a importância do cálcio no desempenho destas funções celulares, é possível formular a hipótese de que a partir do momento em que o teor deste elemento for insuficiente para atender a demanda dos processos metabólicos dos explantes *in vitro* e, continuamente na multiplicação, possa haver alguma desordem fisiológica, que se expressa em anormalidade morfológica. Com deficiência de cálcio, as células multiplicadas não teriam boa estrutura de sustentação, sendo que a multiplicação contínua resultaria em agrupamento desordenado de células, que constitui a massa de calo. Esta pode ser a provável causa da formação de calo nos explantes do cultivar Norton, nas formulações salinas B₅ e NN em meio de cultura. Assim, na definição de formulações salinas para multiplicação *in vitro* deste cultivar, é recomendável optar entre as que apresentem elevada concentração de cálcio.

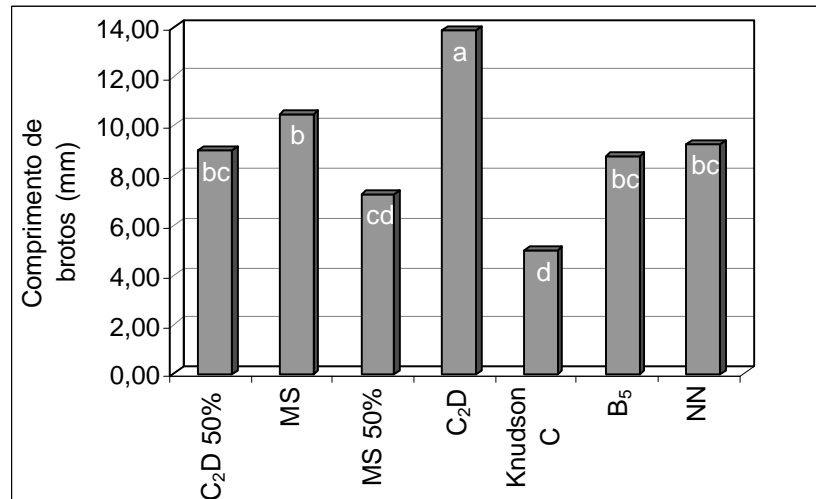
O número médio de brotos foi superior nos explantes cultivados em meio de cultura contendo a formulação salina B₅, sendo o menor nos sais de Knudson C, com uma redução de 36,79 %. Valores intermediários foram observados em explantes na presença dos sais de C₂D, NN, C₂D 50%, MS 50% e MS, sendo seus respectivos números de brotos reduzidos em 8,01; 8,90; 10,97; 29,67 e 29,97 %, em relação a B₅ (Figura 2). Já, o comprimento médio dos brotos

foi superior em explantes cultivados em meio de cultura contendo a formulação salina C₂D, enquanto que na formulação salina de Knudson C, observou-se o valor mais baixo, 64,02 % menor. Para explantes em meio de cultura contendo sais de MS observou-se a segunda melhor média, reduzida em apenas 25,18 %, seguida das observadas nos explantes em meio de cultura contendo as formulações salinas NN, C₂D 50% e B₅, com seus respectivos comprimentos de brotos reduzidos em 33,81; 35,25 e 36,69 %, em relação a C₂D (Figura 3).



Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade

Figura 2 – Número médio de brotos de explantes do cv. Norton em meio de cultura constituído de diferentes formulações salinas, aos 30 dias de cultivo.



Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade

Figura 3 – Comprimento médio de brotos (mm) de explantes do cv. Norton em meio de cultura constituído de diferentes formulações salinas, aos 30 dias de cultivo.

Apesar do número de brotações ter sido o mais alto em meio de cultura contendo a formulação salina B₅, o comprimento médio dos brotos foi considerado insatisfatório, do ponto de vista da multiplicação *in vitro* de videiras, que, segundo Biasi (2000), deve ser de, no mínimo 10 mm. Este fato pode ser atribuído a um possível aumento na competição entre as brotações, por nutrientes do meio de cultura e por espaço para o desenvolvimento. Já, na formulação salina C₂D, ambos número e comprimento de brotos foram elevados, provavelmente, devido à concentração de nutrientes ser maior nesta formulação, comparada a B₅.

Explantes em meio de cultura contendo sais de Knudson C tiveram os menores valores para número e comprimentos médios dos brotos, que se mostraram subdesenvolvidos, de coloração avermelhada. Esta formulação é a mais pobre do ponto de vista nutricional, o que justifica estes resultados. Lacerda da Silva & Teixeira (1994), cultivando *Eucalyptus grandis* (Hill Ex Maiden) em meio de cultura contendo sais macronutrientes de Knop (1865), obtiveram brotações finas e avermelhadas. As formulações de Knudson C e de Knop têm em comum um baixo teor de sais. Contudo, é importante salientar que a resposta morfogénica em meios de cultura difere em função do genótipo, havendo variação não somente entre espécies, como também entre cultivares da mesma espécie (Roubelakis-Angelakis & Zivanovitch, 1991; Biasi et al., 1998a).

4.2. Definição da melhor dose de BAP para multiplicação

A análise de variância para os diferentes níveis de BAP testados em meios de cultura contendo as formulações salinas C₂D e C₂D 50% demonstrou diferença significativa para as características peso fresco médio de calo, número médio de brotos e comprimento médio de brotos dos explantes do cultivar Norton. Já, para a interação formulações salinas x doses de BAP, houve diferença significativa somente para comprimento médio de brotos (Tabela 3).

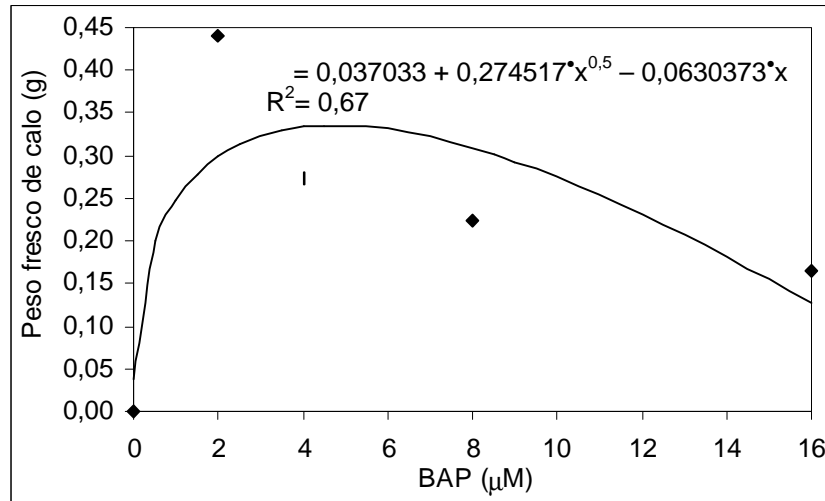
Tabela 3 – Resumo da análise de variância do efeito de duas formulações salinas e de diferentes doses de BAP em meio de cultura para as características peso fresco de calo (g), número de brotos e comprimento de brotos (mm) de explantes do cv. Norton.

Fontes de variação	Quadrados Médios			
	GL	Peso fresco de calo	Número de brotos	Comprimento de brotos
Formulações salinas (A)	1	0,0104ns	1,9260ns	1,5488*
Doses BAP (B)	4	0,3091*	69,5658*	2,0201*
Interação A x B	4	0,0102ns	1,2810ns	0,1009*
Doses BAP/C ₂ D	4	0,1192*	29,692*	0,6689*
Linear	1	-	23,4983*	-
Quadrática	1	0,0125	13,6517**	0,2228
Raiz Quadrada	1	0,0394	13,4788*	0,4238
Doses BAP/C ₂ D 50%	4	0,2002*	41,1549*	1,4520*
Linear	1	-	16,7703*	-
Quadrática	1	0,0122	9,1928	0,0952
Raiz Quadrada	1	0,0305	9,6935*	0,1934
A/BAP 0	1	-	-	-
A/BAP 2	1	0,0494	0,12	0,4219*
A/BAP 4	1	0,0010	0,189 x 10 ⁻¹³	0,5125*
A/BAP 8	1	0,0008	5,88	0,3924*
A/BAP 16	1	0,00007	1,0502	0,6256*
Resíduo	45	0,0096	1,5243	0,0142
CV (%)		44,31	37,05	17,51

* e ** Significativo, a 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F
 ns Não significativo a 5 % de probabilidade pelo teste F

O efeito de doses crescentes de BAP para o peso fresco médio de calo de explantes do cultivar Norton seguiu a função raiz quadrada (Figura 4). A curva mostra um aumento no peso fresco de calo até o nível de 4,74 µM de BAP,

equivalendo a 0,34 g, que corresponde ao ponto de máximo na equação, a partir do qual há decréscimo gradativo, à medida em que se aumentam as doses desta citocinina.



* significativo a 0,1 % de probabilidade pelo teste t

Figura 4 – Peso fresco médio de calo (g) de explantes do cv. Norton em meio de cultura constituído pelas formulações salinas C₂D e C₂D 50%, contendo diferentes níveis de BAP (0, 2, 4, 8 e 16 µM), aos 30 dias de cultivo.

Biasi et al. (1998b), testando o efeito de diferentes concentrações de BAP sobre o crescimento de gemas axilares de segmentos nodais de porta-enxerto de videira Jales, verificaram que, para todos os níveis testados houve formação de calo na base dos explantes, exceto para explantes cultivados na ausência desta citocinina.

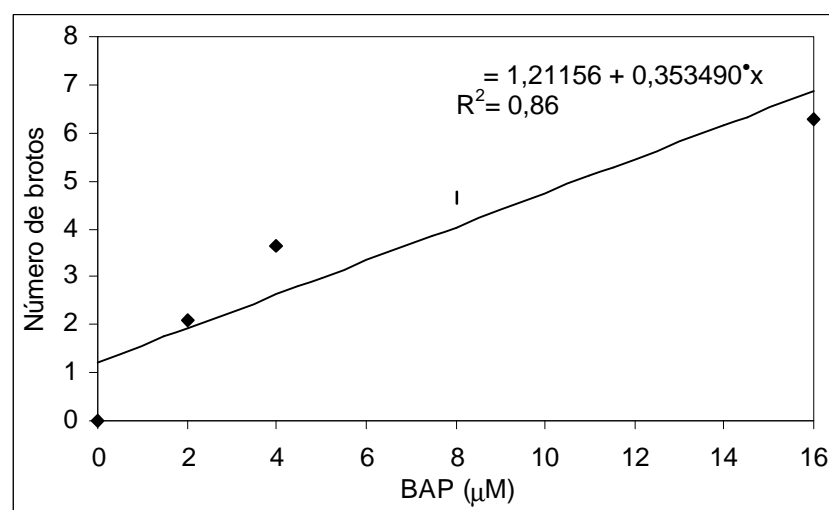
Sudarsono & Goldy (1991), multiplicando *in vitro* videira *Vitis rotundifolia* (Michx.) cvs. Carlos, Noble, Regale e Tarhell, verificaram que a adição ao meio de cultura de níveis entre 5 a 10 µM de BAP promoveu excessiva formação de calo na base dos explantes, dificultando a individualização de brotos, afetando assim, sua multiplicação e alongamento, além de ser prejudicial à conexão vascular e funcionalidade das raízes. Peixoto et al. (1994) fizeram a mesma observação com relação à dificuldade de manuseio de explantes assim caracterizados.

O padrão observado pelos autores acima mencionados se repetiu no cultivar Norton, demonstrando a capacidade de indução calogênica desta citocinina em videiras. Entretanto, neste experimento observou-se que com o aumento de doses de BAP houve redução gradativa na formação de calo.

Segundo Caldas et al. (1990), um balanço auxina/citocinina menor que 1 é necessário para se obter taxa de multiplicação satisfatória e de qualidade. Balanço auxina/citocinina maior que 1 pode inibir a multiplicação ou favorecer demasiadamente o enraizamento ou a formação de calo, em detrimento da multiplicação. Uma provável hipótese para explicar a diminuição das massas de calo dos explantes do cultivar Norton, quando se eleva o nível de BAP no meio de cultura, seria a produção endógena de auxina pelo explante e a sua interação com a citocinina exógena, uma vez que não houve aplicação de auxina. Assim, a diminuição do peso fresco de calo observado em explantes com o aumento de doses de BAP pode ser devido à diminuição da relação auxina/citocinina, à medida em que se aumenta a dose de BAP no meio de cultura.

Uma hipótese alternativa para a resposta calogênica dos explantes de Norton a doses crescentes de BAP no meio de cultura, observado neste experimento, é o possível efeito tóxico das elevadas concentrações desta citocinina ao tecido vegetal, tendo como resultado a diminuição da multiplicação celular e, conseqüentemente, a diminuição da calogênese (Qi-Guang et al., 1986).

O efeito de doses crescentes de BAP para número médio de brotos de explantes do cultivar Norton foi linear. A curva mostra aumento linear do número de brotos com a elevação das doses de BAP (Figura 5).



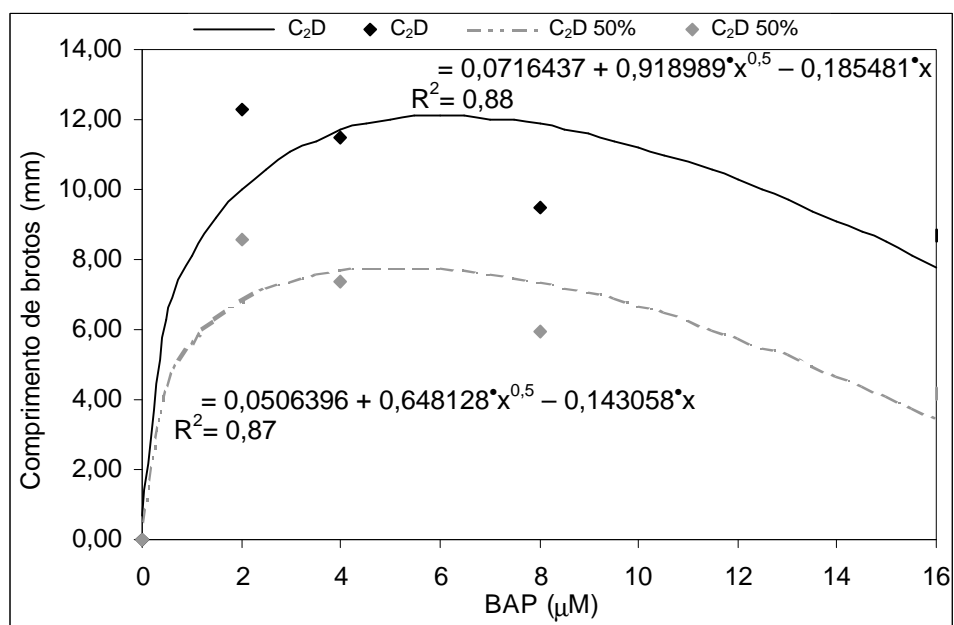
* significativo a 0,1 % de probabilidade pelo teste t

Figura 5 – Número médio de brotos de explantes do cv. Norton em meio de cultura constituído pelas formulações salinas C₂D e C₂D 50%, contendo diferentes níveis de BAP (0, 2, 4, 8 e 16 µM), aos 30 dias de cultivo.

Na multiplicação *in vitro* de videira, o BAP tem sido a citocinina mais utilizada e também a mais efetiva para um grande número de cultivares (Gray & Fisher, 1985; Bass et al., 1988; Blazina et al., 1991). Diversos autores também observaram a superioridade de BAP em relação a outras citocininas (Barlass & Skene, 1980; Goussard, 1982; Gray & Benton, 1990).

O BAP atua, principalmente, na quebra da dominância apical de gemas axilares (Grattapaglia & Machado, 1998). A produção de brotos é inerente ao número de primórdios de gemas axilares pré-existentes no explante original. O aumento linear do número de brotos do cultivar Norton, em resposta a níveis crescentes de BAP no meio de cultura, pode ser explicado pela magnitude com que os diferentes níveis desta citocinina atuam na promoção de crescimento dos primórdios das gemas axilares pré-existentes. O BAP foi determinante na indução da multiplicação do cultivar Norton, uma vez que em sua ausência não houve produção de brotações.

O efeito de doses crescentes de BAP no comprimento médio de brotos de explantes do cultivar Norton seguiu a função raiz quadrada, tanto em meio salino C₂D, quanto em C₂D 50% (Figura 6).



* significativo a 0,1 % de probabilidade pelo teste t

Figura 6 – Comprimento médio de brotos (mm) de explantes do cv. Norton em meio de cultura constituído pelas formulações salinas C₂D e C₂D 50%, contendo diferentes níveis de BAP (0, 2, 4, 8 e 16 µM), aos 30 dias de cultivo.

A curva mostra um aumento no comprimento médio de brotos até o nível de 6,14 μM e 5,13 μM de BAP, equivalendo a 12,10 mm e 7,80 mm, respectivamente, nos meios de cultura contendo as formulações C₂D e C₂D 50%, correspondendo aos pontos de máximo nas respectivas equações, a partir dos quais há redução gradativa dos comprimentos, à medida em que se aumentam as doses desta citocinina. Esta redução foi devida, provavelmente, à competição dos brotos por nutrientes e espaço, uma vez que o número de brotos aumentou linearmente com o aumento das doses de BAP.

A elevação das doses de BAP incrementou as taxas de multiplicação das brotações, reduzindo, porém, o crescimento das mesmas (Jona & Webb, 1978; Lee & Wetzstein, 1990). Segundo esses autores, concentrações excessivas de BAP promovem o desbalanceamento endógeno dos fitormônios, reduzindo o crescimento das brotações, além de aumentar o índice de hiperhidricidade.

Lee & Wetzstein (1990), testando o efeito de diferentes níveis de BAP em meio de cultura contendo sais de MS, obtiveram maior produção de brotos de videira *Vitis rotundifolia* (Michx.) cv. Summit utilizando 10 μM de BAP. Já, em níveis acima de 20 μM , a produção de brotos foi excessiva, com drástica redução de seus comprimentos, além de ter elevado o índice de mortalidade.

O comprimento médio das brotações foi superior em todos os tratamentos com BAP em meio de cultura contendo a formulação C₂D (Tabela 4).

Tabela 4 – Comprimento médio de brotos (mm) de explantes do cv. Norton em meio de cultura constituído pelas formulações salinas C₂D e C₂D 50%, contendo diferentes níveis de BAP (0, 2, 4, 8 e 16 μM), aos 30 dias de cultivo.

Formulações salinas	BAP (μM)					Média geral
	0	2	4	8	16	
C ₂ D	0,00	12,3	11,5	9,6	8,7	8,4
C ₂ D 50%	0,00	8,6	7,4	5,9	4,2	5,2
Significância	ns	*	*	*	*	*

ns Não significativo a 5 % de probabilidade pelo teste F

* Diferença significativa entre as médias na coluna, a 5 % de probabilidade pelo teste F

Esta superioridade do meio C₂D foi devida, provavelmente, a maior concentração de sais neste meio. Diluições na concentração da formulação salina, neste caso em 50 % (C₂D 50%), implicam em variação na magnitude das

respostas morfogénicas, devido à modificação do conteúdo de nutrientes, mantendo-se uma proporcionalidade em relação à concentração inicial. Esta pode ser uma provável explicação para o comportamento similar do comprimento de brotos, que para ambas formulações salinas, em todas as doses de BAP testadas, manteve proporção na variação.

Considerando que o comprimento ideal de brotos na multiplicação *in vitro* de videira é de, no mínimo 10 mm (Biasi, 2000), a dose de BAP recomendada para Norton, baseado nos resultados deste experimento, é de 12,5 μM , nível no qual são estimadas a obtenção de um bom número de brotos (5,63 brotos/explante) e reduzida formação de calo.

4.3. Efeito do DMSO no cultivo *in vitro* de Norton

A análise de variância para os diferentes métodos de dissolução de BAP testados em meio de cultura contendo a formulação salina C₂D, demonstrou diferença significativa para as características número e comprimento médios de brotos dos explantes do cultivar Norton, no nível de 2 µM, e para peso fresco médio de calo, número e comprimento médios de brotos, no nível de 4 µM (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5 – Resumo da análise de variância do efeito de diferentes métodos de dissolução de BAP, adicionado na dose de 2 µM em meio de cultura contendo a formulação salina C₂D, para as características peso fresco de calo (g), número de brotos e comprimento de brotos (mm) de explantes do cv. Norton.

Fontes de variação	Quadrados Médios			
	GL	Peso fresco de calo	Número de brotos	Comprimento de brotos
Blocos	5	0,3671ns	0,2028ns	0,0391ns
Formulações salinas	2	0,7071**	2,9735*	0,1532**
Resíduo	10	0,3165	0,3138	0,0211
CV (%)		55,66	25,25	12,53

ns Não significativo a 5 % de probabilidade pelo teste F

* e ** Significativo, a 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F

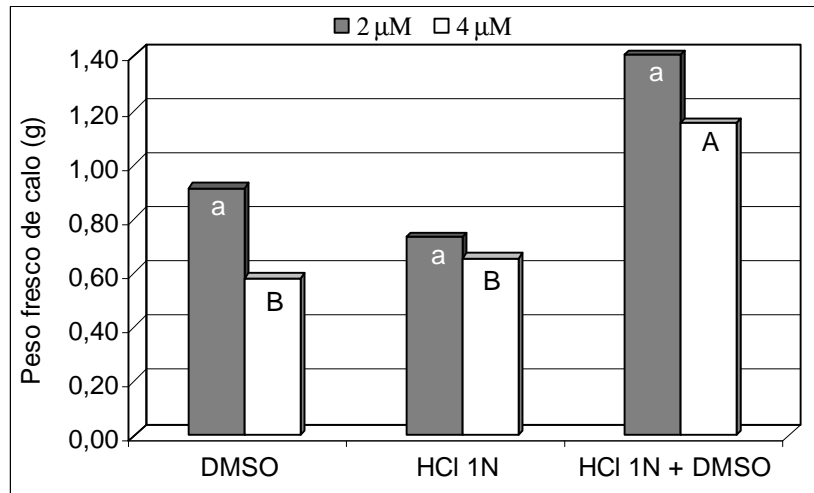
Tabela 6 – Resumo da análise de variância do efeito de diferentes métodos de dissolução de BAP, adicionado na dose de 4 µM em meio de cultura contendo a formulação salina C₂D, para as características peso fresco de calo (g), número de brotos e comprimento de brotos (mm) de explantes do cv. Norton.

Fontes de variação	Quadrados Médios			
	GL	Peso fresco de calo	Número de brotos	Comprimento de brotos
Blocos	5	0,1166ns	1,4272ns	0,0148ns
Formulações salinas	2	0,5703**	37,5139*	0,1943**
Resíduo	10	0,0146	1,4072	0,0041
CV (%)		15,20	20,55	6,56

ns Não significativo a 5 % de probabilidade pelo teste F

* e ** Significativo, a 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F

Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos nos quais se utilizou 2 μM de BAP, quanto ao peso fresco médio de calo. Contudo, quando se utilizou 4 μM , o peso fresco médio de calo foi superior no tratamento que utilizou BAP dissolvido em HCl 1N, com adição da alíquota de 4 mL de DMSO (Figura 7).



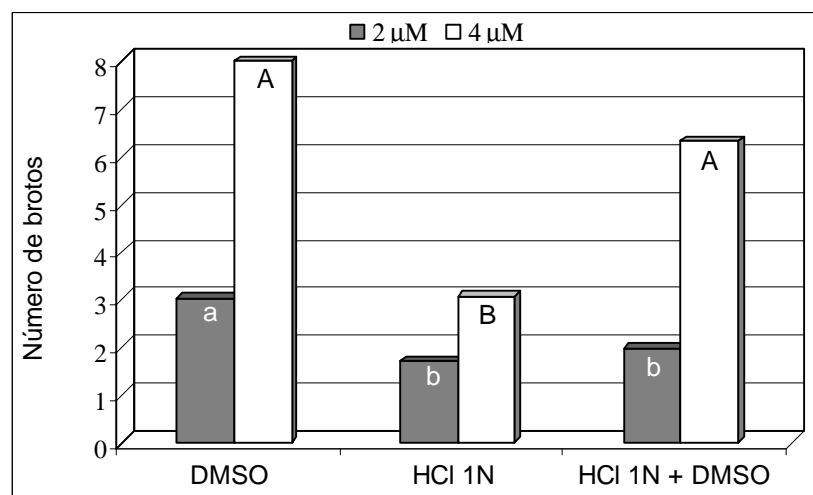
Médias seguidas das mesmas letras, tanto minúsculas, para 2 μM de BAP, quanto maiúsculas, para 4 μM de BAP, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade

Figura 7 – Peso fresco médio de calo (g) de explantes do cv. Norton em meio de cultura constituído pela formulação salina C₂D, contendo 2 e 4 μM de BAP sob diferentes métodos de dissolução, aos 30 dias de cultivo.

Em geral, pode-se observar maior formação de calo nos explantes quando da utilização de ambas doses de BAP, tanto no tratamento em que o DMSO foi adicionado ao meio de cultura, como componente, quanto no que utilizou o BAP dissolvido em HCl 1N. Estes tratamentos têm em comum o modo como foi dissolvida a citocinina. Esta tendência à maior formação de calo destes tratamentos pode ser devido à qualidade da molécula formada durante a reação de dissolução do BAP. Pode-se formular a hipótese de que a molécula do BAP dissolvido em HCl 1N forma um composto que induz formação de calo numa magnitude maior, em cultivo *in vitro* de videira, comparado àquele formado na reação de dissolução do BAP em DMSO. Este efeito torna-se evidente quando ao meio de cultura adiciona-se DMSO, uma vez que este produto pode aumentar a permeabilidade da membrana celular, facilitando o transporte do composto BAP/HCl para dentro das células, potencializando o seu efeito (Muir, 2003).

Keil (1967) observou diferença significativa no controle de mancha bacteriana em pessegueiro ao aplicar 0,25 e 0,50 % de DMSO juntamente com 66 mg L⁻¹ de oxitetraciclina. Esta aplicação proporcionou controle da doença similar ao produzido por 132 mg L⁻¹ de oxitetraciclina pura. Leonard (1967), estudando diferentes concentrações de diversas soluções utilizadas como veículo na aplicação de ferro, na adubação foliar de laranjeira e videira, observou, ao utilizar o DMSO, que a aplicação foi seguida de imediato e intenso enverdecimento das folhas, com maior concentração de clorofila. Tanto os resultados observados por Keil (1967), quanto os de Leonard (1967), foram associados à capacidade do DMSO de aumentar a permeabilidade da membrana celular, potencializando o efeito dos produtos aplicados.

O número médio de brotos emitidos pelos explantes foi superior no tratamento em que 2 mL de DMSO foram utilizados como solvente para dissolver o BAP, na dose de 2 µM. Já, para 4 µM, esta característica mostrou-se superior, tanto no tratamento em que 4 mL de DMSO foram utilizados como solvente para dissolver o BAP, quanto para o tratamento que utilizou BAP dissolvido em HCl 1N, com adição da alíquota de 4 mL de DMSO (Figura 8).

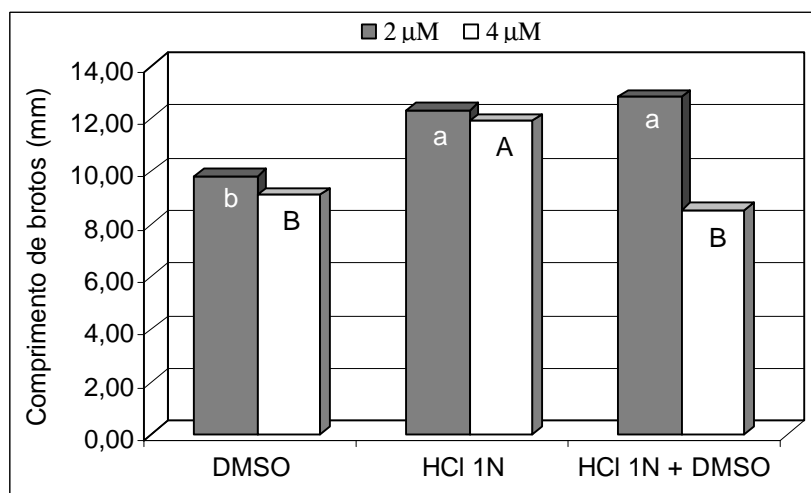


Médias seguidas das mesmas letras, tanto minúsculas, para 2 µM de BAP, quanto maiúsculas, para 4 µM de BAP, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade

Figura 8 – Número médio de brotos de explantes do cv. Norton em meio de cultura constituído pela formulação salina C₂D, contendo 2 e 4 µM de BAP sob diferentes métodos de dissolução, aos 30 dias de cultivo.

O BAP, entre outros efeitos, induz a multiplicação de brotos em videira (Jona & Webb, 1978; Peixoto et al., 1994). O DMSO apresenta a capacidade de penetrar em tecidos vivos, sem danificá-los (Szmant, 2003). Além disso, este solvente é capaz de transportar substâncias através da membrana, dependendo do peso molecular, forma e eletroquímica das moléculas, propriedade esta que o torna capaz de atuar como um sistema carreador de drogas (Muir, 2003). Neste trabalho, o aumento do número de brotações pode estar relacionado com o aumento da permeabilidade das membranas das células às substâncias presentes no meio de cultura, incluindo o BAP. Este efeito explica o aumento do número de brotações do cv. Norton, quando o DMSO foi adicionado ao meio de cultura como componente. Neste caso, o DMSO serviria como carreador do BAP para dentro das células, aumentando o aproveitamento desta substância no meio de cultura (Schmitz & Skoog, 1970). Uma segunda hipótese é a formação de um novo composto (BAP/DMSO) de maior atividade biológica do que o BAP/HCl (Jacob & Herschler, 2003). Este efeito explica o aumento do número de brotos observado quando se utilizou alíquotas, tanto de 2 mL, quanto de 4 mL de DMSO para dissolver BAP nas doses de 2 μ M e 4 μ M, respectivamente.

Nos tratamentos em que se utilizou 2 μ M de BAP, o comprimento médio de brotos foi superior tanto no caso de dissolução de BAP em HCl 1N, quanto para este mesmo modo de dissolução, porém com adição da alíquota de 2 mL de DMSO. Já, nos tratamentos nos quais se utilizou 4 μ M de BAP, o comprimento médio de brotos foi superior quando BAP foi dissolvido em HCl 1N (Figura 9). Nestas mesmas situações, o número de brotos obtidos foi inferior (Figura 8). A obtenção de brotos mais alongados, no caso de taxa de multiplicação menor, é um fenômeno esperado, comportamento este evidenciado no experimento do item anterior. A obtenção de brotações não alongadas, em consequência de uma taxa de multiplicação muito elevada, é atribuída à competição entre as brotações por nutrientes do meio de cultura e por espaço para o desenvolvimento (Peixoto & Pasqual, 1994).



Médias seguidas das mesmas letras, tanto minúsculas, para 2 μM de BAP, quanto maiúsculas, para 4 μM de BAP, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade

Figura 9 – Comprimento médio de brotos (mm) de explantes do cv. Norton em meio de cultura constituído pela formulação salina C₂D, contendo 2 e 4 μM de BAP sob diferentes métodos de dissolução, aos 30 dias de cultivo.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- A formulação salina C₂D foi a melhor, por ter proporcionado boa taxa de multiplicação e brotações alongadas, além de reduzida formação de calo nos explantes, tendo-se destacado no quesito qualidade de brotos.
- Considerando que o comprimento ideal de brotos na multiplicação *in vitro* de videira é de, no mínimo 10 mm, a dose de BAP recomendada para Norton, baseado no resultado do experimento, é de 12,5 µM, nível no qual são estimadas a obtenção de um bom número de brotos (5,63 brotos/explante) e reduzida formação de calo.
- A dissolução de BAP em DMSO aumentou significativamente o número de brotos dos explantes do cultivar Norton. A presença do DMSO como componente do meio de cultura aumentou a formação de calo para ambas as doses de BAP, e o número de brotos na dose de 4 µM de BAP.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barlass, M. & Skene, K. G. M. Studies on the fragmented shoot apex of grapevine. II. Factors affecting growth and differentiation *in vitro*. **Journal of Experimental Botany**, v. 31, n. 121, p. 489-495, 1980.
- Bass, P.; Clog, E.; Walter, B. Improvements in apex culture in *Vitis* species. **Acta Horticulturae**, v. 227, p. 485-488, 1988.
- Biasi, L. A. Multiplicação rápida de videiras. **Agropecuária Catarinense**, v. 13, n. 2, p. 05-07, 2000.
- Biasi, L. A.; Passos, I. R. da S.; Pommer, C. V. Micropropagação do porta-enxerto de videira Jales. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 10, p. 1587-1594, 1998a.
- Biasi, L. A.; Passos, I. R. da S.; Pommer, C. V. Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de videira através de ápices meristemáticos e segmentos nodais. **Scientia Agricola**, v. 55, n. 2, p. 196-202, 1998b.
- Blazina, I.; Ravnkar, M.; Zolnir, M.; Korosec-Koruza, Z.; Gogala, N. Regeneration of GFLV-free grapevines and synchronization of micropropagation *in vitro*. **Acta Horticulturae**, v. 289, p. 87-88, 1991.
- Caldas, L. S.; Haridasan, P.; Ferreira, M. E. Meios nutritivos. In: Torres, A.C. e Caldas, L.S. (eds.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 37-70. 433p.
- Camargo, U. A. O Melhoramento Genético da Videira na EMBRAPA - CNPUV. Donadio, L. C.; Ruggiero, C.; Martins, A. B. G.; Oliveira, J. C.; Lemos, E. G. M.; Rezende, L. P.; Gottardi, M. V. C.; Travençolo, F. F. (Eds.). In: I SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE FRUTEIRAS. Jaboticabal: FCAVJ-UNESP, 1997, **Anais...** p. 28-30.
- Camargo, U. A. Cultivares: Demanda do Agronegócio Vitivinícola Brasileiro. Kreuz, C. L.; Petri, J. L.; Correa, T.; Hoffmann, A.; Pereira, A.; Suzuki, A.; Seidel, C.; Basso, C.; Nachtigall, G. R.; Boneti, J. I.; Palladini, L. A.; Ramos Filho, L.; Conceição, M. Z.; Dal Bó, M. A.; Botton, M.; Vieceli, M.; Palladini, N. D.; Bonin, V. (Eds.). In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO. Caçador - SC: Epagri, 2002, **Anais...** p. 235-240.
- Chee, R. *In vitro* micropropagation of *Vitis*. **PhD Diss.**, Cornell Univ., Ithaca, N.Y. 1982.

- Chee, R. & Pool, R. M. *In vitro* vegetative propagation of *Vitis*: Application of previously defined culture conditions to a selection of genotypes. **Vitis**, v. 22, p. 363-374, 1983.
- Chee, R. & Pool, R. M. Improved inorganic media constituents for *in vitro* shoot multiplication of *Vitis*. **Scientia Horticulturae**, v. 32, p. 85-95, 1987.
- Ciccotti, A. M. Micropropagazione di *Vitis vinifera* L. cvs. Moscato d'Amburgo e Pinot bianco. **Esperienze e Ricerche**, v. 11, p. 73-81, 1982.
- Cohen, D. The culture medium. **Acta Horticulturae**, v. 393, p. 15-24, 1995.
- Debergh, P.; Harbaoui, Y.; Lemeur, R. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. **Physiologia Plantarum**, v. 53, p. 181-187, 1981.
- Debergh, P. C.; Topoonyanont, N.; Van Huylenbroeck, J.; Moreira da Silva, H.; Oyaert, E. Preparation of microplants for *ex vitro* establishment. **Acta Horticulturae**, v. 530, p. 269-275, 2000.
- Einset, J. & Pratt, C. Grapes. In: Janick, J. and Moore, J. N. (ed.). **Advances in Fruit Breeding**, Purdue University Press, West Lafayette, p. 130-153. 1975.
- Fanizza, G.; Tanzarella, O. A.; Carozzo, G. Influence of *Vitis* source on *in vitro* shoot apex culture. **Annals of Applied Biology**, v. 104, p. 577-578, 1984.
- Galet, P. **Recherches sur les méthodes d'identification et de classification des Vitacées des zones tempérées**. [s.l. : s.n.], 2 tomes. Thèse Doctorat Sci., 566 p. 1967.
- Galzy, R. Les possibilités de conservation *in vitro* d'une collection de clones de vignes. **Bulletin de l'Office International de la Vigne et du Vin**, v. 650, p. 378-390, 1985.
- Galzy, R.; Haffner, V.; Compan, D. Influence of three factors on the growth and nutrition of grapevine microcutting. **Journal of Experimental Botany**, v. 41, p. 295-331, 1990.
- Gamborg, O. L.; Miller, R. A.; Ojima, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean roots. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.
- George, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 1. The technology. 2nd ed. Edington, Exegetics, 1993. 574p.
- Gomes, F. P. **Curso de Estatística Experimental**. 12. Ed, Nobel, São Paulo. 1971.
- Goussard, P. G. Morphological responses of shoot apices of grapevine cultured *in vitro*. Effects of cytokinins in routine subculturing. **Vitis**, v. 21, n. 4, p. 293-298, 1982.

- Grattapaglia, D & Machado, M. A. Micropropagação. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S. & Buso, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, EMBRAPA/CNPq, 1998. p. 183-260.
- Gray, D. J. & Benton, C. M. Micropropagation and plant establishment of muscadine grape. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v. 103, p. 300-302, 1990.
- Gray, D. J. & Fisher, L. C. *In vitro* shoot propagation of grape species, hybrids and cultivars. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v. 98, p. 172-174, 1985.
- Gribaudo, I. & Fronda, A. Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated *in vitro*. **HortScience**, v. 26, n. 8, p. 1083, 1991.
- Harris, R. E. & Stevenson, J. H. *In vitro* propagation of *Vitis*. **Vitis**, v. 21, n. 1, p. 22-32. 1982.
- Hinojosa, G. F. Auxinas. In: Cid, L. P. B. (ed). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília, EMBRAPA. 2000. p. 15-53.
- Hedrick, U. P. **The grapes of New York**. State of NY, Dept. Agr. Vol. 3: Part II 564 pp. J.B. Lyon Co., Albany, New York, 1908.
- Heloir, M. C.; Fournioux, L.; Oziol, L.; Bessis, R. An improved procedure for the propagation *in vitro* of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir) using axillary-bud microcuttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 49, p. 223-225, 1997.
- Hidalgo, L. **Tratado de viticultura general**. Madrid: Mundi-Prensa, 1993. 983p.
- Hoffmann, A. Aclimação de mudas produzidas *in vitro* e *in vivo*. **Informe Agropecuário**, v. 23, n. 216, p. 21-24, 2002.
- Jacob, S. W. & Herschler, R. 2003. Pharmacology of DMSO. Disponível em: <<http://www.dmsso.org/articles/information/herschler.htm>> Acesso em: 09/08/2003.
- Jona, R. & Webb, J. Callus and axillary-bud culture of *Vitis vinifera* 'Sylvaner Riesling'. **Scientia Horticulturae**, v. 9, p. 55-60, 1978.
- Jones, O. P.; Pontikis, C. A.; Hopgood, M. E. Propagation *in vitro* of five apple scion cultivars. **Journal of Horticultural Science**, v. 54, p. 155-158, 1979.
- Keil, H. L. Enhanced bacterial spot control on peach when dimethyl sulfoxide is combined with sprays of oxytetracycline. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 141, p. 131-138, 1967.
- Knop, W. Quantitative untersuchungen über die ernährungsprozesse der pflanzen. **Landwirtsch. Vers. Stn.**, v. 7, p. 93, 1865.
- Knudson, L. A new nutrient solution for the germination of orchids seeds. **American Orchid Society Bulletin**, v. 14, p. 214-217, 1946.

- 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 Pub. Co., 1984. ch.6, p. 396-434.
- Lacerda da Silva, L. & Teixeira, S. L. Influência da associação de diferentes formulações de macronutrientes com diferentes formulações de vitaminas, sobre a propagação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* Hill Ex Maiden, a partir de gemas epicórmicas. **Revista Ceres**, v. 41, n. 237, p. 528-536, 1994.
- Lane, W. D. Regeneration of pear plants from shoot meristem-tips. **Plant Sci. Lett.** v. 16, p. 337-342, 1979.
- Lee, N. & Wetzstein, H. Y. *In vitro* propagation of muscadine grape by axillary shoot proliferation. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 115, p. 324-329, 1990.
- Leonard, C. D. Use of dimethyl sulfoxide as a carrier for iron in nutritional foliar sprays applied to citrus. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 141, p. 148-158, 1967.
- Letouze, R., Daguin, F., Descamps, F., Chakir, S. Physiologie du vitroplant: contrôle de l'assimilation de l'azote minéral au cours du cycle clonal chez la vigne (*Vitis vinifera*). **C. R. Acad. Agr. Fr.**, v. 77, n. 2, p. 99-108, 1991.
- Lewandowski, V. T. Rooting and acclimatization of micropropagated *Vitis labrusca* 'Delaware'. **HortScience**, v. 26, n. 5, p. 586-589, 1991.
- Li, J. & Eaton, G.W. Growth and rooting of grape shoot apices *in vitro*. **HortScience**, v. 19, n. 1, p. 64-66. 1984.
- Lima da Silva, A. **Mutagenèse *in vitro* de porte-greffes de la Vigne: méthodologie d'irradiation, d'isolement et caractérisation de mutants**. Thèse Doctorat. Université de Bordeaux II, 135p. 1995.
- Lima da Silva, A. & Doazan, J. P. Une méthode d'irradiation aux rayons gamma appliquée à des porte-greffes de vigne *in vitro*. **J. Int. Sc. Vigne Vin**, v. 29, p. 01-09. 1995.
- Martin, C. & Collas, A. De la culture *in vitro* a la production de greffés-soudés issus du greffage herbacé de la vigne. **Progrès Agricole et Viticole**, v. 109, n. 3, p. 61-68, 1992.
- Marschner, H. **Mineral nutrition of higher plants**. Academic Press, Second Edition, New York, 889p. 1995.
- Motoike, S. Y. **Developing a genetic transformation protocol for american grapes (*Vitis x labruscana*) and transforming *Vitis* to produce parthenocarpic fruits**. Ph.D. Thesis. University of Illinois at Urbana-Champaign, 98p. 2001.
- Muir, M. 2003. DMSO: Many Uses, Much Controversy. Disponível em: <<http://www.dmsso.org/articles/information/pmuir.htm>> Acesso em 09/08/2003.

- Murashige, T. & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- Nitsch, J. P. & Nitsch, C. Haploid plants from pollen grains. **Science**, v. 163, p. 85-87, 1969.
- Norton, M. A. & Skirvin, R. M. Micropropagation of "Norton" winegrape. **HortTechnology**, v. 11, n. 2, p. 206-208, 2001.
- Nozeran, R. & Bancilhon, L. Les cultures *in vitro* en tant que technique pour l'approche de problèmes posés par l'amélioration des plantes. **Ann. Amélior. Plantes**, v. 22, p. 167-185, 1972.
- Pasqual, M.; Menezes, J. F. S.; Pinto, J. E. B. P.; Chalfun, N. N. J. Influência da benzilaminopurina e do ácido naftaleno acético na propagação do porta-enxerto de videira "420-A" (*Vitis berlandieri* x *Vitis riparia*) através da cultura de tecidos. **Ciênc. Prát. Lavras**, v. 15, n. 2, p. 163-169, 1991.
- Pasqualetto, P. L.; Zimmerman, R. H.; Fordham, I. Gelling agent and growth regulator effects on shoot vitrification of 'Gala' apple *in vitro*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 111, n. 6, p. 976-980, 1986.
- Peixoto, P. H. P. & Pasqual, M. Efeitos de benzilaminopurina e ácido naftaleno acético na multiplicação *in vitro* de brotações do porta-enxerto de videira (*Vitis* spp. L.) 'RR-101-14'. **Revista Ceres**, v. 41, n. 236, p. 358-365, 1994.
- Peixoto, P. H. P.; Pasqual, M.; Chalfun, N. N. J.; Alvarenga, A. A. de. Enraizamento e multiplicação "in vitro" de porta-enxertos de videira (*Vitis* spp. L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 16, n. 1, p. 178-184, 1994.
- Preece, J. E. & Sutter, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: Debergh, P. C. & Zimmerman, R. H. (Eds.). **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 71-93.
- Protas, J. F. S.; Camargo, U. A.; Melo, L. M. R. de. A viticultura brasileira: realidade e perspectivas. In: Regina, M. A.; Antunes, L. E. C.; Duarte Filho, J.; Fadini, M. A. M.; Cancado, G. M. A.; Alvarenga, A. A.; Amorin, D. A.; Souza, C. M.; Pádua, J. G. (Eds.). **Viticultura e enologia - atualizando conceitos**. Caldas: EPAMIG, 2002. p. 263-273.
- Qi-Guang, Y.; Read, P. E.; Fellman, C. D.; Hosier, M. A. Effect of cytokinin, IBA and rooting regime on chinese chestnut cultured *in vitro*. **HortScience**, v. 21, p. 133-133, 1986.
- Reisch, B. I.; Goodman, R. N.; Martens, M. H.; Weeden, N. F. The relationship between Norton and Cynthiana, red wine cultivars derived from *Vitis aestivalis*. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 44, n. 4, p. 441-444, 1993.
- Reisch, B. I. & Pratt, C. Grapes, p. 297-369. In: Janick, J. and Moore, J. N. (eds.). **Fruit breeding**, Vol. II. John Wiley and Sons, New York. 1996.

- Roberts, P. L. 2002. Norton, America's True Grape: Whence, and Whither? Disponível em: <<http://www.chrysaliswine.com/norton.htm>> Acesso em: 02/06/2003.
- Rosati, P.; Marino, G.; Swierczewski, C. *In vitro* propagation of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl. cv. Calita). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 105, p. 126-129, 1980.
- Roubelakis-Angelakis, K. A. & Zivanovitch, S. B. A new culture medium for *in vitro* rhizogenesis of grapevine (*Vitis* spp.) genotypes. **HortScience**, v. 26, n. 12, p. 1551-1553, 1991.
- Schmitz, R. Y. & Skoog, F. The use of dimethylsulfoxide as a solvent in the tobacco bioassay for cytokinins. **Plant Physiology**, v. 45, p. 537-538, 1970.
- Staba, J. E. Plant tissue culture as a technique for the phytochemist. **Recent Adv. Phytochemistry**, v. 2, p. 80, 1969.
- Sudarsono & Goldy, R. G. Growth regulator and axillary bud position effects on *in vitro* establishment of *Vitis rotundifolia*. **HortScience**, v. 26, n. 3, p. 304-307, 1991.
- Szmant, H. H. 2003. Physical Properties of Dimethyl Sulfoxide and its Function in Biological Systems. Disponível em: <<http://www.dmsso.org/articles/information/pszmant.html>> Acesso em: 09/08/2003.
- Tarara, J. M. & Hellman, E. W. "Norton" and "Cynthiana" - Premium native wine grapes. **Fruit Varieties Journal**, v. 45, n. 2, p. 66-69, 1991.
- Torregrosa, L. & Bouquet, A. *In vitro* propagation of *Vitis x Muscadinia* hybrids by microcuttings or axillary budding. **Vitis**, v. 34, n. 4, p. 237-238, 1995.
- Torregrosa, L. & Bouquet, A. Adventitious bud formation and shoot development from *in vitro* leaves of *Vitis x Muscadinia* hybrids. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 45, n. 3, p. 245-252, 1996.
- Torregrosa, L. & Lopez, G. *In vitro* culture of *Vitis x Muscadinia* hybrids: interest in axillary micropropagation from the yield from micropropagation of cuttings. **Progres Agricole et Viticole**, v. 113, n. 8, p. 176-181, 1996.
- Winkler, A. J.; Cook, J. A.; Kliewer, W. M.; Lider, A. **General Viticulture**. Berkeley: University of California Press, 1974. 710p.
- Zohary, D. & Hopf, M. **Domestication of Plants in the Old World**. Oxford University Press, Oxford. 1988.