DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA A OBTENÇÃO DE
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM VIDEIRA

ILENE ROBEIRO DA SILVA PASSOS
Engenheira Agrônoma

Orientador: PROF. DR. PAULO ROBERTO DE CAMARGO E CASTRO

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia, Área de Con-
centração: Fitotecnia. -

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Fevereiro - 1991

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

P289d Passos, Ilene Ribeiro da Silva
Desenvolvimento de metodologia para obtenção de em
briogênese somática em videira, Piracicaba, 1991.
188 p. ilus.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia,

1. Uva - Cultura "in vitro" 2. Uva - Embriogênese
somática 3. Uva - Forçamento de brotação I. Escola Su
perior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba

CDD 634.8

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA A OBTENÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM VIDEIRA

OLIVIA ROBEIRO DA SILVA PASSOS

Aprovada em: 25/05/1991

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Paulo Roberto de Camargo e Castro ESALQ/USP
Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves ESALQ/USP
Dr. Celso Valdevino Pommer IAC

PROF. DR. PAULO ROBERTO DE CAMARGO E CASTRO

Orientador

*Senhor, vós me perscrutais e me conheceis
Sabeis tudo de mim, quando me sento ou me levanto.*

*De longe penetrais meus pensamentos
Conhecimento assim maravilhoso me ultrapassa
Ele é tão sublime que não posso atingi-lo
Para onde irei, longe de vosso Espírito?*

(EXCERTOS DO SALMO 138)

A todos os meus Professores, que
com seus exemplos e ensinamentos
construíram parte da minha vida

Em particular às minhas queridas
Professoras do curso primário:
Araybe de Campos Camargo Couto e
Iraclyara de C. Machado

A minha mais terna HOMENAGEM

Aos meus pais, Fernando e Wilma e

Aos meus filhos Mateus Yuri e Indira Clara

OFEREÇO

Ao meu esposo,

Francisco Antonio Passos

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A autora expressa os seus sinceros agradecimentos:

- Ao Professor Dr. Paulo Roberto de Camargo e Castro, pela orientação, apoio e estímulo para a realização do presente trabalho.
- Ao Instituto Agronômico do Estado de São Paulo (IAC), de cujo corpo técnico faz parte, e à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", que tornaram possível sua participação no Curso de Pós-Graduação.
- À Chefia da Seção de Viticultura do IAC, na pessoa do Dr. Maurilo Monteiro Terra, pelo apoio recebido.
- À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pelo financiamento de parte dos trabalhos realizados.
- Aos proprietários da Chácara Extra-Vitis, pelo fornecimento de grande parte do material vegetal.
- Aos Pesquisadores Científicos João Baptista Fornasier e Rogério Salles Lisboa, pelo empréstimo da Câmara Fria.
- Ao Dr. Hilton Silveira Pinto da UNICAMP, pela medição da intensidade luminosa das prateleiras da sala de cultura.

- À Pesquisadora Científica Violeta Nagai pela colaboração e orientação nas análises estatísticas.
- Aos Pesquisadores Científicos Erasmo José Paioli Pires e Celso Valdevino Pommer e à Engenheira Agrônoma Maria Cristina Falco, pela colaboração na documentação fotográfica.
- Aos Pesquisadores Científicos Celso Valdevino Pommer e Francisco Antonio Passos, pela revisão do texto e sugestões apresentadas.
- À Pesquisadora Científica Ângela Maria Cangiani Furlani, pela revisão do Summary.
- Às Seções de Genética, Hortaliças Diversas, Técnica Experimental e Cálculo, Fitopatologia, Fisiologia Vegetal, Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, ao Setor Computação, à Estação Experimental de Jundiaí, e à Biblioteca do IAC; à Seção de Radiogenética do CENA/USP, pela valiosa colaboração.
- Aos estagiários sob nossa orientação, Eng^o Agr^o Maria Cristina Falco, André Camargo Pereira da Silva e Valéria Rocha Ramos e às Biologistas Monica Maria de Castro e Marinez Ferreira de Siqueira, pela colaboração na execução dos trabalhos.

- Aos amigos Pesquisador Científico Ivan José Antunes Ribeiro e à Sra. Alvorina Casagrande Piovesana, pelos constantes estímulos e apoio à realização deste trabalho.

- Aos funcionários da Seção de Viticultura, do IAC, Meire Correia da Silva Ferrari, Irene Domingos Schio, Sandra Aparecida Manoel, Nereu Pedro dos Santos e a todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

S U M A R I O

	Página
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xix
RESUMO	xx
SUMMARY	xxiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1. Fontes de material experimental	6
2.1.1. Estacas com forçamento de brotação	7
2.1.2. Cultura de ápices meristemáticos de caule	23
2.2. Metodologia da cultura de óvulos não fertili- zados	25
2.3. Metodologia da cultura de anteras	36
2.4. Metodologia da cultura de folhas, pecíolos e caules	66
3. MATERIAL E MÉTODOS	81
3.1. Genealogia dos cultivares utilizados	82
3.1.1. 'Itália'	82
3.1.2. 'Niagara Rosada'	82
3.1.3. 'Paulistinha', sinônimo: 'Iracema'	82
3.1.4. 'Maria'	83
3.1.5. 'A Dona'	83

	Página
3.2. Fontes de Material Experimental	84
3.2.1. Estacas com forçamento de brotação	84
3.2.1.1. Experimento nº 1	84
3.2.1.2. Experimento nº 2	86
3.2.1.3. Experimento nº 3	88
3.2.1.4. Experimento nº 4	89
3.2.2. Plântulas originadas de ápices meriste- máticos cultivados <i>in vitro</i>	91
3.3. Cultura de óvulos não fertilizados	92
3.3.1. Grupo de Experimentos nº 1	92
3.3.2. Grupo de Experimentos nº 2	94
3.3.3. Experimento nº 3	97
3.3.4. Experimento nº 4	98
3.4. Cultura de anteras	101
3.4.1. Grupo de Experimentos nº 1	101
3.4.2. Grupo de Experimentos nº 2	103
3.5. Cultura de plântulas	106
3.5.1. Experimento nº 1	106
3.5.2. Experimento nº 2	108
4. RESULTADOS	111
4.1. Estacas com Forçamento de Brotação	111
4.1.1. Experimento nº 1	111
4.1.2. Experimento nº 2	113
4.1.3. Experimento nº 3	116
4.1.4. Experimento nº 4	119

	Página
4.2. Cultura de óvulos não fertilizados	121
4.2.1. Grupo de Experimentos nº 1	121
4.2.2. Grupo de Experimentos nº 2	124
4.2.3. Experimento nº 3	126
4.2.4. Experimento nº 4	128
4.3. Cultura de anteras	129
4.3.1. Grupo de Experimentos nº 1	129
4.3.2. Grupo de Experimentos nº 2	131
4.4. Cultura de plântulas	134
4.4.1. Experimento nº 1	134
4.4.2. Experimento nº 2	141
5. DISCUSSÃO	149
5.1. Estacas com forçamento de brotação	149
5.1.1. Efeitos da 6-benzilaminopurina	151
5.1.2. Efeitos da calciocianamida e da ciana- mida hidrogenada	152
5.1.3. Efeito do GA_3	154
5.1.4. Efeito do ácido naftalenacético	154
5.1.5. Efeito da extensão da área transversal das estacas	155
5.2. Metodologia da cultura de óvulos não fertili- zados	155
5.3. Metodologia da cultura de anteras	159
5.4. Metodologia da cultura de plântulas, folhas, pecíolos e caule	162

	Página
6. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	169
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	174
APENDICE	185

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Estacas do cultivar Maria, 15 dias após o tratamento de suas bases com 200ppm de NAA po 48h, no experimento nº 2	116
2 Explante do cultivar de videira Maria, inoculado em meio primário, no experimento nº 1 de cultura de plântulas, mostrando, após dois meses de incubação a formação de embriões: a) dois embriões desenvolvendo-se separadamente; b) aglomerado de embriões; c) parte do explante de cor branco-leitosa; d) formação de raiz.	135
3 Fotografia tirada 7 dias após a da Figura 2, mostrando o desenvolvimento dos embriões: (a) e (b) são os embriões mais desenvolvidos da Figura 2a e (c) um embrião menos desenvolvido.	135
4 Plântula em frasco com terra mais vermiculita, aclimatando-se; desenvolvida a partir do embrião mostrado na Figura 3a.	138
5 Plântula originada de embrião do experimento nº 1, mostrando aparência normal.	138
6 Plântula originada de embrião do experimento nº 1, mostrando aparência anormal (a); embrião desenvolvido anormalmente (b); grupo de embriões secundários aglomerados (c).	138
7 Plântulas desenvolvidas em um frasco de cultura, mostradas individualmente nas Figuras 5 e 6. ...	

Figura		Página
8	Plantas provenientes de cultura <i>in vitro</i> de plântulas do cultivar Maria, através da embriogênese somática, desenvolvendo-se em casa de vegetação.	140
9	Embrióides do experimento nº 2 desenvolvendo-se em meio de indução; a) embrióides desenvolvendo-se diretamente do explante; b) grupo de embrióides originados provavelmente do calo de cor creme, que se apresenta na parte posterior.	144
10	Estádios sequenciais de desenvolvimento dos embrióides: a) globular; b) coração, já adiantado; c) e d) torpedo.	147
11	Embrióides germinando, em estádios progressivos até uma plântula.	147
12	Proliferação de embrióides em meio NN com 1,5ppm de NOA, 0,4ppm de 6-BA e 1g.l^{-1} de caseína hidrolisada, 2 meses após a incubação.	148
13	Embrióides com desenvolvimento anormal, que ao ser incubado em meio idêntico ao citado na Figura 12, passou a produzir embrióides secundários.	148

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 Escala de notas para os diferentes estádios do desenvolvimento vegetativo da videira 'Niagara Rosada' (Segundo PEDRO JR. <i>et alii</i> , 1989).	85
2 Substratos, em solução aquosa, utilizados no experimento nº 1 de estacas com forçamento de brotação.	86
3 Substratos, em solução aquosa, utilizados no experimento nº 2 de estacas com forçamento de brotação.	87
4 pH das soluções utilizadas no experimento nº 2 de estacas com forçamento de brotação.	88
5 Substratos, em solução aquosa, utilizados no experimento nº 3 de estacas com forçamento de brotação.	89
6 Substratos, em solução aquosa, utilizados no experimento nº 4 de estacas com forçamento de brotação.	90
7 Número de óvulos inoculados, por ensaio, em meio de placa no Grupo de Experimentos nº 1.	93
8 Concentrações de 2,4-D e de 6-BA utilizadas no Grupo de Experimentos nº 1 de óvulos não fertilizados.	93
9 Número de óvulos inoculados, por ensaio, no Grupo de Experimentos nº 2.	95

Tabela	Página
10 Concentrações de reguladores vegetais utilizadas em meio primário no Grupo de Experimentos nº 2 de cultura de óvulos não fertilizados.	96
11 Concentrações de reguladores vegetais utilizadas em meio secundário, no Grupo de Experimentos nº 2 de cultura de óvulos não fertilizados.	96
12 Tratamentos utilizados em meio primário, para o experimento nº 3 de cultura de óvulos não fertilizados.	98
13 Tratamentos utilizados em meio primário para o experimento nº 4 de cultura de óvulos não fertilizados.	99
14 Distribuição dos óvulos por frasco e por tratamento no experimento nº 4 de cultura de óvulos não fertilizados.	100
15 Particularidades dos ensaios do Grupo de Experimentos nº 1, de cultura de anteras.	102
16 Concentrações de NOA e de 6-BA (ppm) utilizadas em meio primário no Grupo de Experimentos nº 1 de cultura de anteras.	102
17 Tratamentos aplicados, em meio primário, no Grupo de Experimentos nº 2 de cultura de anteras. .	105
18 Particularidades dos ensaios do Grupo de Experimentos nº 2 de cultura de anteras.	105

Tabela	Página
19 Distribuição das anteras nos tratamentos, dentro de cada ensaio no Grupo de Experimentos nº 2. ...	106
20 Número de plântulas da classe 5 provenientes de cultura de ápices meristemáticos de caule do cultivar Maria, utilizados no experimento nº 1 de cultura de plântulas e sua distribuição quando em meio primário.	107
21 Tratamentos e composições do meio primário para o experimento nº 2 de cultura de plântulas, bem como o número de repetições utilizadas em cada tratamento.	110
22 Número de gemas brotadas em diferentes épocas, a partir da instalação do experimento nº 1 de estacas com forçamento de brotação.	112
23 Número de brotações com nota maior ou igual a 6, em diferentes épocas, a partir da instalação do experimento nº 1 de estacas com forçamento de brotação.	112
24 Número de gemas brotadas aos 10 e 15 dias após a instalação do experimento nº 2 de estacas com forçamento de brotação.	114
25 Número de brotações com nota maior ou igual a 6, 15 dias após a instalação do experimento nº 2 de estacas com forçamento de brotação.	115

Tabela	Página
26 Número de gemas brotadas 9 dias após a instalação do experimento nº 3 de estacas com forçamento de brotação.	117
27 Número de brotações com nota maior ou igual a 6, 9 dias após a instalação do experimento nº 3 de estacas com forçamento de brotação.	117
28 Efeito de blocos para o número de gemas brotadas no experimento nº 3 de estacas com forçamento de brotação.	118
29 Efeito de blocos para o número de gemas com nota maior ou igual a 6, no experimento nº 3 de estacas com forçamento de brotação.	119
30 Número de gemas brotadas 10 dias após a instalação do experimento nº 4 de estacas com forçamento de brotação.	120
31 Número de brotações com nota maior ou igual a 6, 10 dias após a instalação do experimento nº 4 de estacas com forçamento de brotação.	120
32 Número de inflorescências, 10 dias após a instalação do experimento nº 4 de estacas com forçamento de brotação.	121
33 Primeira avaliação do Grupo de Experimentos nº 1, referente ao número e porcentagem de óvulos contaminados, oxidados e sadios.	122

Tabela	Página
34 Grupo de Experimentos nº 2 de cultura de óvulos: tempo de permanência em meio de placa (MP) e em meio primário (M 1º). Perdas por oxidação e contaminação em meio primário e secundário (M 2º).	125
35 Avaliação aos 15 dias de incubação em meio primário do experimento nº 3 de cultura de óvulos. Porcentagem de óvulos que se desenvolveram e racharam; média de quatro frascos.	127
36 Avaliação dos óvulos em meio secundário no experimento nº 3, após um mês. Óvulos observados (oxidados + verdes) e % de óvulos ôcos.	128
37 Porcentagem de anteras que deram calos e de frascos perdidos por contaminação no Grupo de Experimentos nº 1.	130
38 Resultados da 1ª avaliação e da 1ª mais a 2ª avaliações no Grupo de Experimentos nº 2 de cultura de anteras. Porcentagem de anteras que produziram calos e de anteras perdidas por contaminação.	133
39 Porcentagem de frascos com explantes apresentando calo, oxidação e branqueamento, ocorrendo isoladamente ou em conjunto, com incubação na luz (L) e no escuro (E), na primeira avaliação do experimento nº 2 de cultura de plântulas. Porcentagem de frascos com explantes normais e de frascos com contaminação.	142
40 Tratamentos do meio primário que produziram embrióides, a partir de dois meses de incubação em meio secundário, no experimento nº 2 de cultura de plântulas.	146

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	- ácido abscísico.
BA	- benziladenina.
6-BA	- 6-benzilaminopurina.
BAP	- benzilaminopurina.
2,4-D	- ácido 2-4-diclorofenoxiacético.
DNA	- ácido desoxiribonucléico.
GA ₃	- ácido giberélico.
GAs	- ácidos giberélicos (outros inclusive o GA ₃).
IAA	- ácido indolilacético.
IBA	- ácido indolbutírico.
2-iP	- 2-isopentiladenina.
MP	- meio de placa ou de pré-incubação.
MS	- meio básico de MURASHIGE & SKOOG (1962).
NAA	- ácido naftalenacético.
NN	- meio básico de NITSCH & NITSCH (1969).
NOA	- ácido β -naftoxiacético.
PBA	- 6-(benzilamino)-9-(2-tetrahidropiranyl)-9H-purina.
SDS ₃₃₀	- 6-(benzilamino)-9-(2-tetrahidropiranyl)-9H-purina.
US\$FOB	- Preço em dólares, livres de taxas subseqüentes.

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA A OBTENÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM VIDEIRA

Autora: ILENE RIBEIRO DA SILVA PASSOS

Orientador: PROF. DR. PAULO ROBERTO DE CAMARGO E CASTRO

RESUMO

Visando à obtenção de um protocolo de desenvolvimento *in vitro* de embriões somáticos de videira para utilização em Programas de Melhoramento Genético, realizou-se este trabalho buscando verificar: a) o substrato mais adequado para a brotação rápida e uniforme de estacas de videira, sendo as brotações uma das fontes de explantes para os experimentos e b) o explante e meios de cultura mais adequados para a obtenção de embriões *in vitro*.

Para atender ao primeiro objetivo, efetuaram-se 4 experimentos com estacas com forçamento de brotação, sendo que o primeiro com o cultivar IAC 457-11 Iracema e os demais com o cultivar IAC 514-6 Maria. No primeiro experimento testaram-se em relação ao controle (água) os seguintes substratos em solução aquosa: a) cianamida hidrogenada (245,0; 367,5 e 490,0ppm); b) 6-BA (10, 15, 20 e 25µM). No segundo experimento os substratos testados foram:

a) NAA (200ppm); b) GA_3 (20ppm); c) cianamida hidrogenada (9,8ppm); d) calciocianamida (200ppm) e 6-BA (100ppm). No terceiro experimento, os substratos testados foram: a) 6-BA (20ppm); b) calciocianamida (20ppm) e c) NAA (20ppm). No quarto experimento testou-se apenas a 6-BA (10 e 20ppm). No terceiro experimento verificou-se também o efeito da extensão da área transversal das estacas da videira 'Maria' na rapidez de brotação dessas estacas.

Para atender ao segundo objetivo, estudaram-se vários explantes: óvulos não fertilizados, anteras e plântulas em combinação com diversos procedimentos de cultura, que incluíram condições ambientais de incubação, tipo e constituição de meios de cultura. Os meios de cultura básicos utilizados foram os de NN e MS.

Dos experimentos com estacas com forçamento de brotação concluiu-se que para uma brotação rápida e homogênea de estacas de videira 'Maria' em laboratório, foi importante utilizar-se estacas estocadas a frio, com uma área transversal média de $59,5mm^2$, utilizando-se como substrato apenas água.

Nos experimentos com cultura de anteras verificou-se que a 6-BA, independentemente da concentração utilizada, foi um regulador vegetal essencial para a produção de calos. No que diz respeito à auxina NOA, as concentrações de 0,0; 0,5 e 1,0ppm foram mais adequadas para a produção de calos do que as concentrações mais elevadas de 1,5 e 2,0ppm utilizadas.

Neste trabalho, a embriogênese somática foi obtida com um tipo de explante ainda não descrito na literatura, ou seja, plântulas de videira 'Maria', desprovidas de raízes, provenientes de cultura *in vitro* de ápices meristemáticos de caule. Embrióides foram obtidos quando esses explantes foram inoculados em meio de cultura sólido (como se estivessem sendo plantados) que constou do meio básico de NN, acrescido de 1,5 ppm de NOA e 0,4ppm de 6-BA, após incubação no escuro por dois meses.

DEVELOPMENT OF METHODOLOGY FOR OBTAINING SOMATIC EMBRYOGENESIS ON GRAPEVINE

Author: ILENE RIBEIRO DA SILVA PASSOS

Advisor: PROF. DR. PAULO ROBERTO DE CAMARGO E CASTRO

SUMMARY

This reasearch work was carried out in order to obtain a series of *in vitro* development procedures for grapevine somatic embryogenesis as an aim to genetic breeding programmes. The main objectives were: a) the best substrate to promote fast and uniform grapevine woody stems cuttings bud bursting, being these buds one of the sources of explants for the experimentation, and b) the best explant and culture medium to induce *in vitro* embryoids.

To attain the first objective, four experiments were done using grapevine woody stems cuttings submitted to forced bud bursting: the first one with the cultivar IAC 457-11 'Iracema' and the others with the cultivar IAC 514-6 'Maria'. In the first experiment the following water solution substrates were tested against the control: a) hydrogen cyanamide (245.0, 367.5 and 490.0ppm); b) 6-BA (10, 15, 20 and 25 μ M). In the second experiment the

substrates tested were: a) NAA (200ppm); b) GA_3 (20ppm); c) hydrogen cyanamide (9,8ppm); d) calcium cyanamide (200ppm) and e) 6-BA(100ppm). In the third experiment, the substrates tested were: a) 6-BA (20ppm); b) calcium cyanamide (20ppm) and NAA (20ppm). In the fourth experiment only 6-BA (10 and 20ppm) was tested. In the third experiment, the effect of transversal area size of 'Maria' grapevine woody stems cuttings on bud bursting fastness was also studied.

To attain the second objective of this work, several explants were studied, namely, non-fertilized ovules, anthers and plantlets combined to several culture procedures, including environmental incubation conditions and culture medium composition. The basic culture media used were NN and MS's.

Results from experiments with woody stems cuttings submitted to forced bud bursting allowed to conclude that for fast and uniform woody stems cuttings bud bursting of grapevine cultivar 'Maria', in the laboratory, it was important to use cold stored woody stems, with an average transversal area of $59.5mm^2$, using only water substrate.

In the experiments with anther culture it was verified that 6-BA, regardless of its concentration, was an essential growth regulator for callus production. With regard to the NOA auxin, low concentrations of this growth regulator (0.0, 0.5 and 1.0ppm) were better for callus production than the higher ones (1.5 and 2.0ppm).

In this work, somatic embryogenesis was obtained with a kind of explant not yet described in the literature, that is rootless plantlets of 'Maria' grapevine cultivar, from *in vitro* culture of shoot apex. Embryoids were obtained when those explants were cultivated in solid culture medium (simulating their planting in the medium) made up of basic medium NN, plus NOA (1.5ppm) and 6-BA (0.4ppm) after dark incubation for two months.

1. INTRODUÇÃO

O Estado de São Paulo é tradicionalmente o maior produtor de uvas para mesa do Brasil. A área cultivada com videiras no Estado de São Paulo, tendo por base o quinquênio 1983/1987, é de 8.220ha. Nessa área são produzidas mais de 100.000t com uma produtividade média de 13.098kg/ha, colocando São Paulo em segundo lugar em área plantada e em primeiro em rendimento por metro quadrado, no Brasil (TERRA *et alii*, 1989).

Embora a produtividade dos vinhedos paulistas encontre-se em níveis satisfatórios, é marcante o predomínio das chamadas uvas rústicas, comuns ou americanas de mesa, levando a um produto de qualidade inferior. Como consequência dessa qualidade inferior e ainda, das restrições climáticas, o Estado e o País importam anualmente bom volume de uvas frescas de qualidade superior. Além disso, como as uvas rústicas de mesa não se prestam à produção de passas, o Brasil tem importado anualmente cerca de dez milhões de dólares do produto (TERRA *et alii*, 1989).

Existe para o Brasil, um bom mercado para exportação de uvas finas desde que sejam melhoradas as suas qualidades. Em 1985 o Brasil exportou uva para 18 países,

num total de 1.483.824 quilos com valor correspondente a US\$FOB 1.302.056 (PIRES *et alii*, 1986).

Os principais cultivares de uvas para mesa no Estado de São Paulo são as rústicas: Niagara Branca (*Vitis vinifera* L. x *Vitis labrusca* L.) introduzida dos E.U.A. e Niagara Rosada, seu mutante para cor de baga, ocorrido aqui no Brasil; e os cultivares de uvas finas Itália (*Vitis vinifera* L.) de cor branca, introduzida da Europa e Rubi, seu mutante, também para coloração de baga, ocorrido aqui no Brasil.

A Seção de Viticultura, do Instituto Agrônômico de Campinas, desde a década de 1940 tem concentrado esforços para obtenção de outros cultivares, através do melhoramento genético, visando à obtenção de uvas para vinho, mesa, passas, suco e porta-enxertos. O programa de melhoramento genético desenvolvido, que se pode denominar "tradicional", através de cruzamentos e seleção no campo deu muitas contribuições; foi através dele que surgiram os cultivares para vinho Rainha (IAC 116-31) e Máximo (IAC 138-22), os cultivares de porta-enxerto IAC 766 e Tropical (IAC 313), muito utilizados atualmente, bem como os cultivares de uvas finas para mesa Patrícia (IAC 871-41), Piratininga (IAC 842-4v), e Traviú (IAC 1398-21), os apirenos Iracema (IAC 457-11), Maria (IAC 514-6) e A Dona (IAC 871-13), sendo, estes últimos, plantados em pequena escala. Apenas os apirenos possuem uma certa importância no Nordeste, no Vale do Rio São Francisco.

Todos esses cultivares de videira citados, apesar de suas inegáveis qualidades de sabor, aroma e produtividade, apresentam em comum uma alta susceptibilidade às diferentes moléstias, exigindo, para que a cultura seja viável, um rigoroso e intenso programa de pulverizações com fungicidas, principalmente no Estado de São Paulo, aumentando o custo de produção e a possibilidade de contaminação do produto, o que às vezes o torna inaceitável para o consumo.

A utilização de cultivares resistentes seria uma maneira de controle, porém ocorre a dificuldade de se encontrar fonte de resistência dentro de *V. vinifera* L., visto que essa espécie possui poucos genes para resistência e, que as outras espécies de *Vitis* que possuem tais genes, têm-nos ligados a características desfavoráveis. Assim, a possível introdução de genes de resistência em *V. vinifera* L., através de cruzamentos com outras espécies, fatalmente levará à obtenção de híbridos com características distantes daquelas desejadas.

As técnicas de cultura *in vitro* apresentam um grande potencial para o melhoramento genético da videira. Como no caso de muitas culturas perenes lenhosas, o longo tempo de geração, o grande tamanho da planta e a heteroziosidade gase genética das videiras limitam a efetividade e eficiência da metodologia do melhoramento tradicional (STAMP & MEREDITH, 1988).

A formação de embrióides, a partir de células somáticas de videira, abre caminho para a modificação gené-

tica e obtenção de tipos de plantas desejáveis em nível celular e também tem implicação significativa na produção, em grande escala, de videiras livres de vírus (KRUL & WORLEY, 1977).

Entretanto, a aplicação desses novos métodos depende da disponibilidade de procedimentos de regeneração adventícia eficiente, aplicáveis aos vários sistemas de culturas de células e tecidos que devem ser empregados.

A regeneração de plantas a partir de tecidos de videira cultivados foi relatada pela primeira vez em 1976, apesar de que trabalhos dessa natureza com essa planta tenham sido iniciados em 1944. A videira tem se mostrado recalcitrante em regenerar plantas a partir de tecidos. A embriogênese somática foi relatada em culturas derivadas de anteras, óvulos, ovários, folhas, pecíolos e caules, mas até hoje não há nenhuma metodologia que seja altamente eficiente para um determinado explante e que sirva para um grande número de cultivares, principalmente porque os fatores intrínsecos à planta ou explante que controlam a obtenção de embriogênese somática são ainda desconhecidos.

No Brasil não existe nenhum trabalho publicado sobre este assunto, para os cultivares nacionais ou introduzidos, mas existe uma considerável demanda para a aplicação dessas técnicas modernas no melhoramento genético da videira.

Desse modo, resolveu-se realizar estudos comparativos, com os seguintes objetivos:

- a) Verificar qual o substrato mais adequado para a brotação rápida e uniforme de segmentos de estacas de videira, uma das fontes de explantes para os experimentos e,
- b) Obter embriogênese somática de videira, testando-se vários cultivares, explantes e meios de cultura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fontes de material experimental

Para se trabalhar com cultura *in vitro*, ou seja, para se desenvolver ou adaptar metodologias para cultura *in vitro*, a quantidade e a fonte de material experimental (explantes) são dois aspectos muito importantes. Em primeiro lugar precisa-se de bastante material experimental para que se possa testar uma grande quantidade de meios de culturas e concentrações de reguladores vegetais, porque já se notou que os genótipos respondem diferentemente aos meios de cultura *in vitro*. Isto se verifica claramente nos trabalhos de desenvolvimento de metodologia de embriogênese somática em videira. Em segundo lugar, a fonte de material experimental é muito importante pois esse deve ser fisiologicamente o mais homogêneo possível, sendo esse estágio fisiológico propício para o seu desenvolvimento *in vitro* devido às respostas que se esperam aos reguladores vegetais exógenos.

Um outro aspecto a ser considerado na fonte de explante é a sua facilidade de esterilização para que fiquem livres de patógenos e, dessa forma, não contaminem o meio de cultura.

2.1.1. Estacas com forçamento de brotação

O primeiro trabalho que se teve conhecimento sobre o forçamento da brotação de estacas para estudos com cultura *in vitro* foi o de GOUSSARD (1981), no qual o autor utilizou estacas dormentes de *V. vinifera* L. cv. Chenin Blanc coletadas durante o inverno, de videiras selecionadas. As estacas foram cortadas em segmentos de cerca de 40 cm, tratadas com Captan (2%) e estocadas em sacos plásticos selados a 2-3°C até o uso.

Após serem removidas da câmara fria, as estacas foram seccionadas em segmentos de 12-15cm, compreendendo 2 internódios com 3 gemas. Esses segmentos foram colocados em béqueres, com as bases mergulhadas em cerca de 80ml de água (GOUSSARD, 1981). O autor relata ainda que obteve um aumento na ativação do primórdio do caule a uma temperatura ambiente de 28-30°C sob iluminação constante, embora não tenha indicado a intensidade luminosa utilizada. A brotação, seguida do rápido alongamento do caule, ocorreu após 5-8 dias. Dessa forma o autor conseguiu obter grandes quantidades de caules alongados numa pequena bancada, dentro de um curto período e, segundo ele, em qualquer época do ano (GOUSSARD, 1981). O autor utilizou essas estacas com forçamento de brotação como fonte de ápices meristemáticos de caule para estudos de efeitos de citocininas no seu desenvolvimento *in vitro*.

MULLINS (1966) desenvolveu uma técnica para obtenção de plantas testes para experimentação sobre fisio-

logia da frutificação, utilizando cultivares de *Vitis vinifera*, de forma similar à citada anteriormente. Estacas obtidas de ramos de videira brotados no ano anterior, foram estocadas sob refrigeração (4°C) em recipientes plásticos selados até a sua utilização. Nesse trabalho, o autor tomou um grande cuidado para uniformizar os segmentos de caule com uma gema, que seriam utilizados como plantas testes (mais de 60% das plantas iniciais foram descartadas). O objetivo foi utilizá-los na avaliação inicial do efeito de novas substâncias de crescimento na frutificação da videira, uma vez que o comportamento delas é similar às estacas do campo (MULLINS, 1966).

Após o trabalho inicial, MULLINS (1967 e 1968) realizou mais dois trabalhos preocupado com os fatores que influem no desenvolvimento de inflorescências de segmentos de caule de videira. MULLINS (1967) testou segmentos dormentes enraizados em oito soluções de citocininas. Dessas, apenas a 6-BA estimulou o crescimento das inflorescências. Em segmentos tratados com 6-BA não houve diferenças aparentes na taxa de brotação da gema comparada com os controles, mas diferenças no tamanho da inflorescência foram evidentes, assim que as gemas brotaram. Em soluções contendo 10 ou mais ppm de 6-BA, as inflorescências foram maiores que as dos controles, e a diferença tornou-se mais pronunciada com uma concentração aumentada para 20ppm. Em altas concentrações, a 6-BA foi tóxica e causou redução na brotação da gema e morte das brotações, que se alongavam. Após tratamen-

to por 25 dias, os pesos frescos das inflorescências de segmentos tratados com 20ppm de 6-BA foram quase dez vezes maiores que aqueles das inflorescências dos segmentos crescidos em água destilada. O autor aplicou, também, as soluções de citocininas diretamente na superfície das inflorescências, mas neste caso, houve apenas um leve estímulo no seu crescimento. Uma outra citocinina, SD8₃₃₉, teve um melhor efeito quando aplicada às inflorescências, causando um rápido alongamento do ráquis, mas não afetou o crescimento das inflorescências, quando aplicada às bases de segmentos dormentes, sugerindo que esta citocinina só pode ser transportada a curtas distâncias.

Em seu trabalho, MULLINS (1967) testou soluções de ácido indolilacético, ácido naftalenacético e ácido 2,4-diclorofenoxiacético, aplicados isoladamente em inflorescências ou em combinação com o ácido giberélico. Esses tratamentos falharam em estimular o crescimento do ráquis ou evitar o atrofiamento das inflorescências. MULLINS (1967) sugeriu finalmente, a partir dos resultados de seus experimentos, que as citocininas produzidas em raízes estão envolvidas no controle do crescimento da inflorescência em videira.

Em trabalho posterior, MULLINS (1968) descreve investigações adicionais sobre o crescimento da inflorescência em segmentos de videira, e relata alguns efeitos da aplicação da citocinina e desfolhação. As inflorescências são retidas, se folhas em expansão forem removidas da base

do caule logo após a abertura da gema, e este efeito tem sido usado para produzir plantas que frutifiquem para propósitos experimentais (MULLINS, 1966). A excisão de folhas parece remover o requerimento de citocinina exógena para o crescimento da inflorescência, em brotação de segmentos de videira em alongamento, sendo que a remoção de folhas após a abertura da gema parece compensar a falta do sistema radicular no plantio.

Depois de vários anos utilizando esse método, MULLINS & RAJASEKARAN (1981) relataram o aprimoramento do método original desenvolvido por MULLINS (1966). Em resumo, os segmentos são enraizados num recipiente aquecido (26°C nas bases dos segmentos), numa sala fria (4°C). As gemas, desta forma, permanecem dormentes. Após quatro semanas, os segmentos enraizados são transferidos para a casa de vegetação ou salas de crescimento (27°C de dia e 22°C à noite, 16 horas de fotoperíodo e irradiância 60W.m^{-2} ($\cong 276 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)). Na brotação, as folhas basais e adjacentes às inflorescências são removidas tão logo que acessíveis, e o ápice do ramo é excisado. Esses tratamentos promovem o crescimento da inflorescência. Permite-se o crescimento de um ramo lateral a partir de uma gema axilar de um dos nós desfolhados sobre o eixo principal. Quando quatro a seis folhas foram produzidas, retira-se o ápice do caule e as gemas do ramo lateral. O desenvolvimento da panícula à maturidade é sustentado pela folhagem do ramo lateral. O início da pigmentação da baga ocorre aproximadamente 12 semanas após a

brotação e o fruto maduro é produzido em 16 ou 18 semanas. As bagas maduras das plantas testes têm aproximadamente a metade do tamanho normal, mas as sementes, embora em menor número, são férteis (MULLINS & RAJASEKARAN, 1981).

MULLINS & RAJASEKARAN (1981) testaram quatro regimes de temperatura e os dados obtidos mostraram que houve diferenças mínimas no crescimento de inflorescências e frutificação entre as plantas crescidas a $24^{\circ}/19^{\circ}$, $27^{\circ}/22^{\circ}$ e $30^{\circ}/25^{\circ}\text{C}$. O maior número de bagas ocorreu em plantas crescidas a $27^{\circ}/22^{\circ}\text{C}$. Os autores verificaram, também, que nem todos os cultivares respondem bem a esta metodologia. Esta técnica é mais confiável em alguns cultivares que em outros e, sendo assim, MULLINS & RAJASEKARAN (1981) separaram essas variedades em três grupos: a) fáceis: 50% de segmentos produzem panículas; b) intermediárias: 30-50% dos segmentos produzem panículas; c) difíceis, 30% dos segmentos produzem panículas. Isto se aplica em segmentos a partir de estacas que foram estocadas a frio por menos de 10 meses. No segundo ano de estocagem a taxa de sucesso é dividida pela metade, e as inflorescências de segmentos que foram estocados por três anos, raramente são retidas.

De acordo com MULLINS & RAJASEKARAN (1981) as inflorescências de segmentos de videira são retidas quando tratadas com citocinina exógena, mas este método de produzir plantas que frutificam introduz fatores equívocos nos experimentos referentes a compostos endógenos ou reguladores vegetais sintéticos. Já no modelo original e em suas

modificações subseqüentes, a manipulação de condições de crescimento e poda é usada para promover o desenvolvimento de inflorescências.

É provável que o tratamento de pré-enraizamento aumente o suprimento de citocinina endógena à gemá em expansão e a remoção das folhas expandidas e de ápices faça com que a citocinina seja desviada para o crescimento da inflorescência. Juntos, esses tratamentos permitem a produção de panículas em segmentos de caule de videira (MULLINS & RAJASEKARAN, 1981).

MULLINS & RAJASEKARAN (1981) declararam ainda, que segmentos que frutificam são muito úteis na pesquisa com viticultura, mas eles são plantas artificiais, nas quais são efetuadas alterações nas interrelações de tempo e espaço do crescimento vegetativo e frutífero. De acordo com isso, muito cuidado é necessário na interpretação de experimentos com plantas testes, especialmente na extrapolação de resultados para a situação de vinhedo.

A técnica de MULLINS (1966) e suas modificações têm sido utilizadas com fontes de ápices meristemáticos, óvulos não fertilizados e anteras para experimentos com cultura *in vitro*, tendo como vantagem a obtenção de grande quantidade de material vegetal (KRUL & WORLEY, 1977; MULLINS *et alii*, 1979; RAJASEKARAN E MULLINS, 1979; GOUSSARD, 1982; RAJASEKARAN & MULLINS, 1983 a e b; LEBRUN *et alii*, 1985; MAURO *et alii*, 1986, para citar alguns autores).

STAMP & MEREDITH (1988) utilizaram caules lenhosos de videira coletados em vinhedos e conservados a 5°C sob condições de escuridão e umidade por no mínimo 2 meses. Quando o material floral ou vegetativo foi requerido, segmentos de caule de 4-5 nós foram plantados na areia, em casa de vegetação, com temperatura de 24°-28°C, sob luz natural. Dentro de 2 a 4 semanas, as gemas de nós superiores desenvolveram-se para produzir brotações vigorosas, que proveram tanto pontas vegetativas terminais, quanto axilares. Para a promoção do desenvolvimento da flor, tecidos vegetativos foram removidos como no trabalho de MULLINS (1966).

Sabe-se que a videira sob condições de campo, se não sofrer a aplicação de alguma substância promotora no ramo ou nas gemas (ou em ambos), logo após a poda, apresenta, aproximadamente depois de um mês, uma brotação falha, desuniforme e pouco vigorosa. Isto porque o inverno no Estado de São Paulo é pouco intenso e o processo de quebra de dormência de gemas é acionado na natureza pela baixa temperatura (Lavee, 1974, citado por SHULMAN *et alii*, 1983). Portanto, em cultivos comerciais de videira aplicam-se, logo após a poda, substâncias como a calciocianamida ou a cianamida hidrogenada, que antecipam a brotação e a uniformizam.

A cianamida hidrogenada (H_2CN_2) é o primeiro produto da decomposição do fertilizante calciocianamida ($CaCN_2$) e por isso foi amplamente estudada com relação à sua decomposição no solo e nas plantas, onde é também uma fonte

de nitrogênio para elaborar aminoácidos e proteínas, o que foi demonstrado com radioisótopos marcados (BONNAIRE & RIEDER, 1985).

A calciocianamida ou cianamida cálcica (CaCN_2) é um adubo orgânico nitrogenado artificial. Apresenta 20% de N total e 40 a 42% de CaO e libera gás acetileno, quando em solução. É um material alcalino.

A cianamida hidrogenada possui 66% de N. Apresenta-se comercialmente na forma aquosa estabilizada, contendo 49% de ingrediente ativo (H_2CN_2).

Como a CaCN_2 sofre hidrólise para H_2CN_2 solúvel, SHULMAN *et alii* (1983) sugeriram que a cianamida (H_2CN_2) ou algum produto ligado à hidrólise deva ser o ingrediente ativo na quebra da dormência de gemas de videira.

A cianamida é metabolizada na planta dentro de poucas horas após ser absorvida (WUNSCH & AMBERGER, 1989).

A cianamida hidrogenada marcada com ^{14}C foi rapidamente metabolizada em brotações jovens de *Vitis vinifera*, quando aplicada como um pulso (2-2,5h) através da extremidade basal. Dentro de 20 horas, depois do início do experimento, aproximadamente um terço da atividade total foi encontrada como $^{14}\text{CO}_2$, sugerindo que uma quantidade significativa de cianamida foi transformada em uréia e subsequente-mente hidrolizada pela urease. Verificou-se uma significativa liberação de $^{14}\text{CO}_2$ uma hora após a aplicação da cianamida (GOLDBACH *et alii*, 1988). De acordo com esses autores, parte

da decomposição de H_2CN_2 no material vegetal aparenta ser de natureza puramente química.

De acordo com Amberger¹ as plantas podem absorver facilmente a cianamida hidrogenada se esta for colocada em solução nutritiva. A absorção pelas raízes e pela parte aérea das plantas é igualmente possível. Ela se move livremente no sistema vascular da planta em ambas as direções.

A cianamida hidrogenada é rapidamente metabolizada na planta fazendo uso de seu conteúdo de nitrogênio para síntese de aminoácidos, especialmente arginina (VILSMEIER & AMBERGER, 1988).

Segundo Amberger¹ a cianamida hidrogenada provou ser um inibidor específico da catalase, enquanto que a atividade da peroxidase foi levemente aumentada.

PEREIRA *et alii* (1979) estudaram a ação da calciocianamida e da giberelina na antecipação da maturação dos frutos do cultivar de videira Niagara Rosada. A calcio-cianamida foi testada na forma de solução a 10 e 20%, tendo a aplicação sido realizada 3 dias antes da poda de inverno. A giberelina, na concentração de 100ppm, foi aplicada quando as brotações, com aproximadamente 25cm, apresentavam inflorescências com 3 a 4cm de comprimento. A análise estatística dos dados relativos ao número total de brotações aos 30 e 50 dias após a poda e, do número de brotações com comprimento

¹ AMBERGER, A. Dept. of Plant Nutrition. Technical University of Munich. Federal Republic of Germany. (Comunicação pessoal, 1986).

superior a 15cm, aos 50 dias após a poda, antes, pois, da aplicação da giberelina, evidenciou a ação da calciocianamida na antecipação da brotação de videiras, bem como permitiu a verificação da maior efetividade da solução a 20%. Por outro lado, a análise estatística dos dados referentes aos índices de maturação, determinados aos 147 dias após a poda de inverno, mostrou que a associação da aplicação de calciocianamida a 20% com a giberelina a 100ppm, antecipou significativamente o período de maturação dos frutos.

De acordo com KISHINO *et alii* (1978) os cultivares menos exigentes em horas de frio apresentam resposta mais imediata aos efeitos da solução de calciocianamida.

TERRA *et alii* (1982) estudaram os efeitos da calciocianamida e de sua mistura com uréia e adubo foliar na brotação de gemas, concentração de açúcares totais no suco e produção de frutos de videira 'Niagara Rosada'. Realizaram os seguintes tratamentos: testemunha; adubo foliar (20-10-10) 100g.l⁻¹; calciocianamida 200g.l⁻¹; calciocianamida 200g.l⁻¹ + uréia 45g.l⁻¹; calciocianamida 200g.l⁻¹ + uréia 100g.l⁻¹ e calciocianamida 200g.l⁻¹ + adubo foliar (20-10-10) 100g.l⁻¹. A aplicação da calda foi efetuada na forma de pincelamento do ramo todo imediatamente após a poda. Verificaram que todos os tratamentos que receberam calciocianamida anteciparam em cerca de 10 dias o início da brotação. Com relação à concentração de açúcares totais, os tratamentos com calciocianamida complementados com uréia ou adubo foliar mostraram-se superiores à testemunha. Observou-

-se que os tratamentos com calciocianamida não afetaram significativamente a produção, havendo porém tendência dos mesmos apresentarem valores menores em relação à testemunha. Também os efeitos da calciocianamida, nas características estudadas não foram afetados significativamente pela adição de uréia ou adubo foliar.

PIRES *et alii* (1985) estudaram o efeito da calciocianamida e da cianamida hidrogenada (Alzodef) na quebra de dormência das gemas da videira 'Niagara Rosada'. Aplicaram, duas horas depois da poda, calciocianamida 20% através de pincelamento na região apical do ramo, calciocianamida 20% pincelada sobre o corte da poda; pulverizaram Alzodef 2% e 5% sobre a região apical do ramo, além do controle. Os autores verificaram que: a) Alzodef 2% promoveu maior precocidade na emergência das gemas de videira 'Niagara Rosada'; b) o pincelamento do ramo ou do corte da poda com calciocianamida 20% e a pulverização com Alzodef 2% e 5% promoveram quebra de dormência das gemas e; c) os produtos químicos aplicados não afetaram significativamente o número de panículas nem o peso das panículas na colheita.

TERRA *et alii* (1987) estudaram os efeitos de doses e modos de aplicação da calciocianamida, na brotação e na produção do cultivar de videira Niagara Rosada. Utilizaram as doses de 0, 70, 140 e 210 gramas de calciocianamida por litro, aplicadas através de pincelamento no ramo todo ou só no corte do bacelo recém podado. Os autores verificaram

que todos os tratamentos com calciocianamida anteciparam a brotação e o período de colheita em relação à testemunha. De modo geral, os tratamentos com calciocianamida proporcionaram aumentos na porcentagem de gemas brotadas quando comparados com o controle. Mas, com relação à produção por planta e ao peso médio do cacho, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com calciocianamida e a testemunha."

PIRES *et alii* (1990) estudaram os efeitos de agentes químicos na indução da brotação, desenvolvimento dos brotos e na produção de videira 'Niagara Rosada'. Avaliaram em condições de campo, os efeitos da calciocianamida (CaCN_2), da cianamida hidrogenada (H_2CN_2) e do ethephon [ácido (2-cloroetil) fosfônico] sendo que os tratamentos foram: testemunha; calciocianamida nas doses de 200 e 400g.l⁻¹ aplicadas em pincelamento nos cortes dos bacelos recém podados; cianamida hidrogenada 1,0; 2,5 e 5,0% do i. a. em pulverização na vara imediatamente após a poda, ethephon na dose de 8.000ppm em pulverização da planta toda 10 dias antes da poda. Os autores verificaram, que os tratamentos que receberam calciocianamida e cianamida hidrogenada, independentemente das doses aplicadas, interromperam a dormência da totalidade das gemas latentes, anteciparam a brotação e o desenvolvimento dos brotos, os quais tiveram o estágio de desenvolvimento vegetativo correspondente à 5ª folha expandida, antecipado em cerca de 21 dias. Esses tratamentos aumentaram significativamente o número de panículas e a produ-

ção. Observaram, também, que o período de colheita foi significativamente antecipado, havendo um efeito positivo com o aumento da dose de calciotcianamida e de cianamida hidrogenada, neste último até a dose de 2,5%. Quanto ao ethephon, este teve um efeito parcial na quebra de dormência das gemas latentes, retardou a brotação e o desenvolvimento dos ramos e não afetou o período de colheita e a produção.

LIN & WANG (1985) estudaram o efeito da cianamida hidrogenada na brotação de segmentos de videira isolados, com uma única gema. O cultivar utilizado foi Kyoho em estado vegetativo e não dormente. No primeiro experimento os autores utilizaram videiras de um ano de idade provenientes de plântulas regeneradas de cultura de tecidos. Os cortes e tratamentos foram conduzidos em 9 de novembro de 1983. No segundo experimento outra porção de segmentos de videiras de 10 anos de idade foi obtida de vinhedos. Os tratamentos químicos foram conduzidos no mesmo dia. Os segmentos vegetativos foram trazidos do vinhedo para o laboratório dentro de uma hora e cortados em seções de 8cm de comprimento com um único nó e uma única folha deixada atada em cada segmento. As extremidades basais dos segmentos foram embebidas em solução de cianamida 1% e 2,5% contendo agente molhante, por 15 minutos. Um segmento de 0,5cm foi cortado do final basal do segmento e a superfície cortada fresca foi polvilhada com um pó misturado contendo NAA (0,1%) e IBA (0,3%).

Os segmentos tratados foram colocados num material esponjoso úmido, que foi constantemente embebido em

água, numa bandeja plástica durante o experimento. Para o controle, os procedimentos manuais foram os mesmos dos tratamentos químicos exceto, obviamente, que o pré-tratamento com cianamida foi omitido. Os segmentos foram mantidos numa câmara de crescimento escura a $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Os autores utilizaram segmentos de videira em vegetação, com folhas, os quais requerem menor resfriamento do que videiras dormentes (LIN & WANG, 1985).

LIN & WANG (1985) relatam que em trabalho anterior utilizaram segmentos dormentes de videira, cortados em secção de 50cm para avaliação do tratamento de cianamida na brotação da gema. Nesse trabalho não obtiveram sucesso pois a porcentagem de brotamento da gema foi de apenas 2,3%, depois de 21 dias. Os autores atribuem isso ao problema de translocação dos compostos aplicados e da não uniformidade de maturidade da gema dentro de um segmento de gemas múltiplas. Já neste trabalho, de acordo com LIN & WANG (1985), a utilização de segmentos vegetativos de uma única gema provida de folha reduziu os problemas associados com a translocação química do sítio de aplicação ao sítio de ação. Os resultados demonstram que o tratamento de segmentos de ambos os experimentos com 1% de cianamida produziu porcentagem de brotação mais alta do que a de segmentos não tratados. O tratamento de segmentos com 2,5% de cianamida não aumentou a taxa e o grau de brotação da gema. As gemas dos segmentos do tratamento com cianamida começaram a brotar 10 dias após o tratamento.

Vários foram os trabalhos publicados sobre a utilização de diferentes substâncias, visando à quebra de dormência de fruteiras lenhosas de clima temperado.

OFFER & GOUSSARD (1980) trataram as partes basais, apicais, bem como segmentos inteiros de videira com água quente a uma temperatura de 50°C por 30 min. Quando aplicado em segmentos inteiros ou em partes basais, o tratamento com água quente atrasou a iniciação da raiz. Já o tratamento das partes apicais dos segmentos, resultaram em um efeito favorável no tempo de brotação, iniciação da raiz e número médio e massa das raízes.

As giberelinas constituem um grupo de hormônios para o qual há evidência do possível envolvimento no período de dormência. O quadro que parece ter emergido gradualmente é que temperaturas de resfriamento são importantes condicionantes do estado da giberelina de sementes e gemas, embora os detalhes precisos estão longe de serem claros e podem variar com as espécies (POWELL, 1988).

ALBUQUERQUE (1979) estudou os efeitos do ácido giberélico na brotação da videira (*Vitis vinifera* L.), cultivar Trebbiano, sob condições de campo. Utilizou as concentrações de 0, 100, 200 e 300ppm de GA₃. Realizou o pincelamento das gemas uma única vez, no início da fase de brotação e verificou que o GA₃ não retardou a brotação da videira, quando aplicado próximo ao início da mesma e, pelo contrário, provocou uma brotação maior e mais uniforme de gemas.

De acordo com POWELL (1988) as citocininas podem desempenhar também um papel na quebra de dormência do tipo denominado "repouso", baseando-se no fato de que aplicações exógenas dessas substâncias podem estimular o crescimento da gema e que a sua ocorrência endógena pode se correlacionar bem com estes mesmos eventos. POWELL (1988) afirma ainda que a efetividade das aplicações exógenas de citocininas na estimulação de gemas dormentes é incerta. Segundo o autor, há numerosos relatos de que essas substâncias, quando aplicadas a gemas axilares, que não estão crescendo, em ramos intactos, estimulam essas gemas a crescerem. Entretanto, o tipo de dormência que caracterizou essas gemas, e sua intensidade no momento do tratamento é raramente estabelecido. Parece que, em alguns casos, o que estimulou a crescer foram gemas axilares que anteriormente sofriam os efeitos da dominância apical.

YOUNG & WERNER (1986) estudaram os efeitos da 6-BA aplicada a ramos dormentes de árvores jovens de macieira e pessegueiro depois de aplicar todas as combinações de resfriamento de broto e raiz durante o repouso. Após forçamento em casa de vegetação, a brotação, peso seco do ramo novo e crescimento de raízes novas foram maiores em macieiras com ramos e raízes resfriados. Já para o pessegueiro, apenas o resfriamento do ramo foi suficiente para a resposta máxima, e a 6-BA não teve nenhum efeito significativo. Em macieira, a 6-BA aplicada substituiu o tratamento de resfriamento da raiz em árvores que possuíam apenas os ramos

resfriados, resultando em brotação igual àquela que tiveram tanto os ramos quanto as raízes resfriadas. YOUNG & WERNER (1986) sugeriram que a máxima brotação em macieiras jovens é dependente do resfriamento da raiz, o que implicaria em algum sinal químico movimentando-se da raiz para o ramo, e que este sinal pode ser a citocinina. Ainda segundo esses autores, uma vez que é necessário o resfriamento do ramo para a máxima brotação e para resposta à citocinina aplicada, é provável que haja uma mudança no nível do inibidor e/ou sensibilidade do tecido durante o resfriamento. Por outro lado, o fato de que o peso seco do broto novo em macieira é estimulado primeiramente pelo resfriamento do ramo e não pelo resfriamento da raiz ou tratamento com citocinina, indica que o crescimento imediatamente após a brotação pode ser controlado separadamente da brotação propriamente dita.

De acordo com POWELL (1988) não há informações convincentes de que as auxinas exerçam algum papel importante na regulação de dormência em gemas.

2.1.2. Cultura de ápices meristemáticos de caule

Tecidos crescidos *in vitro* não estão sujeitos a flutuações ambientais e podem se constituir em fonte ideal de material para regeneração *in vitro*. Além do mais, por já estarem em condições assépticas evita-se a etapa da esterilização, onde o explante vai ficar menos sujeito a estresse e a danos.

Em dois trabalhos de cultura *in vitro* de videira visando à obtenção de embriogênese somática, explantes obtidos de plântulas crescidas a partir de ápices meristemáticos de caule, foram utilizados (FAVRE, 1977 e STAMP & MEREDITH, 1988), sendo que somente os últimos autores observaram embrióides.

No trabalho de STAMP & MEREDITH (1988), seções nodais foram removidas de caules esterilizados de *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon e gemas axilares foram dissecadas para prover explantes de pontas de caule de 0,5 - 1,0mm de diâmetro, consistindo de um meristema e 2-3 primórdios foliares. Ápices de caule foram inoculados sobre o meio MS, suplementado com 20g.l^{-1} de sacarose, 2,0ppm de 6-BA e 500ppm de caseína hidrolisada, e solidificado com $7,0\text{g.l}^{-1}$ de agar Difco Bacto. O meio foi ajustado a pH 5,7 e distribuído em placas de Petri plásticas de 9cm de diâmetro com 20ml de solução do meio em cada uma delas. As placas de Petri foram seladas com Parafilme M. Os autores utilizaram também GA_3 e IAA, mas não se referiram em que etapa do desenvolvimento da plântula e a que concentrações.

Os explantes de ápices de caule foram incubados a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ com um fotoperíodo de 16 horas ($40\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e, após 6 semanas, mais da metade (43 de 70) desenvolveram-se em plantas com raízes adventícias e caules múltiplos com mais de 3cm de comprimento. Folhas inteiras com 1,5-5,0mm de comprimento, crescendo adjacentes a gemas vegetativas terminais, foram utilizadas. Dos cinco experimentos conduzidos

com folhas de cultura de ápice de caule de 'Cabernet Sauvignon', apenas um produziu embriões (STAMP & MEREDITH, 1988).

2.2. Metodologia da cultura de óvulos não fertilizados

O primeiro relato sobre a obtenção de embriogênese somática em videira foi apresentado em 1976 por MULLINS & SRINIVASAN. Antes de ter sido alcançado o sucesso por esses autores muitas foram as tentativas para obter embriões por outros autores desde Morel (1944) citado por MULLINS & SRINIVASAN (1976) e inclusive por Mullins (1971), citado por RAJASEKARAN & MULLINS (1979).

MULLINS & SRINIVASAN (1976) supuseram que por ser a videira propagada por séculos através de garfagem, ou seja, propagação vegetativa, clones como Cabernet Sauvignon são velhos, apresentando por isso falta de competência regenerativa *in vitro*. A necessidade de um tecido juvenil, que não fosse de plântulas originadas de sementes por causa da segregação genética, levou-os a considerar o caso de certas espécies apomíticas onde o nucelo da planta adulta possui juvenilidade críptica e competência regenerativa (MULLINS & SRINIVASAN, 1976). Sabendo que o óvulo da videira possui um nucelo maciço e que este tecido é capaz de uma intensa divisão celular *in vivo* (NITSCH, 1965) e que Coombe (1974), citado por MULLINS & SRINIVASAN (1976), mostrou que auxinas sintéticas aplicadas às inflorescências de videira antes da antese causam um marcante aumento no tamanho dos óvulos,

MULLINS & SRINIVASAN (1976) decidiram investigar a possibilidade de formação de embriões em óvulos não fertilizados, isolados de 'Cabernet Sauvignon'. As inflorescências foram coletadas 5-15 dias antes da antese, de videiras 'Cabernet Sauvignon' propagadas por segmentos armazenados a frio (4°C) pelo método de MULLINS (1966). Elas foram esterilizadas e seus óvulos não fertilizados foram removidos sob condições assépticas numa cabine de fluxo laminar asséptico com a ajuda de uma lupa estereoscópica (MULLINS & SRINIVASAN, 1976). Os autores não conseguiram obter plântulas quando utilizaram meio de cultura com agar para o crescimento dos óvulos, mas sim quando utilizaram frascos de 100ml contendo 25ml de meio líquido (MULLINS & SRINIVASAN, 1976). Os frascos foram mantidos num incubador giratório (80-90 osc. min⁻¹) a uma temperatura de 27°C. O fotoperíodo foi de 16h provido por lâmpadas fluorescentes gro-lux (2,5W.m⁻² $\cong$ 11,5 μ E.m⁻².s⁻¹). Para a produção de plântulas os embriões foram transferidos para meio semi-sólido com os mesmos regimes de luz e temperatura. MULLINS & SRINIVASAN (1976) testaram quatro meios nutritivos basais, quais sejam: BN (NITSCH, 1951), MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), White (WHITE, 1943) e HDWM (HAWKER *et alii*, 1973). Os meios basais foram suplementados com auxinas, citocininas e vários aditivos orgânicos (leite de coco e caseína hidrolisada) e os tratamentos foram aplicados de forma isolada ou em combinações fatorais.

MULLINS & SRINIVASAN (1976) verificaram que os experimentos envolvendo seqüências de tratamentos, bem como aplicações únicas, mostraram que o crescimento de explantes de óvulos variaram com o meio basal, substâncias de crescimento exógenas e aditivos orgânicos tal qual caseína hidrolisada. Ocorreram dois tipos principais de desenvolvimento nos óvulos cultivados: (1) crescimento dos integumentos e produção de crescimentos verrugosos para o exterior; e (2) proliferação do nucelo e protusão do calo através da micrópila. O crescimento dos integumentos ocorreu em vários tratamentos mas foi mais pronunciado com caseína hidrolisada (0,1%) no meio HDWN. No período de duas semanas de inoculação houve um crescimento no volume dos óvulos de quatro vezes devido principalmente à expansão e à divisão de células do integumento externo, que tornou-se clorofiloso acumulando amidos e materiais fenólicos. Os crescimentos verrugosos para o exterior foram induzidos pela transferência de óvulos para meio contendo citocininas (cinetina, benziladenina (BA) ou zeatina 5-50 μ M). Esses crescimentos para o exterior tiveram uma vida curta e não produziram estruturas diferenciadas. Os crescimentos para o exterior de uma língua de tecidos de calos a partir da micrópila foram observados pela primeira vez quando os óvulos de videira foram cultivados no meio HDWM, com leite de coco (10-15%), caseína hidrolisada (1g.l⁻¹) e ácido 4-clorofenilacético (15 μ M). Estudos histológicos indicaram que estes calos se originaram da calota nucelar, isto é, de um grupo de células

las, como as meristemáticas, no final micropilar do nucelo, perto dos lábios do integumento interno. Em secções de todos os óvulos cultivados que foram estudados encontrou-se que houve degeneração do saco embrionário. A partir desses materiais ocorreram diferenciações anômalas como nódulos meristemáticos e elementos vasculares, mas nunca foram observados brotações, raízes ou embriões somáticos (MULLINS & SRINIVASAN, 1976). Finalmente, óvulos não fertilizados isolados cresceram em meio BN, com 6-BA e a auxina ácido β -naftoxiacético (NOA). Com o meio BN contendo $1g.l^{-1}$ de caseína hidrolisada e 6-BA (5-10 μ M), os óvulos de videira tornaram-se verdes e o calo nucelar cresceu a partir da micrópila; mas os óvulos cresceram muito pouco com NOA isoladamente. Quando 6-BA (5-10 μ M) e NOA (5-25 μ M) foram aplicados juntos verificou-se um crescimento muito vigoroso dos integumentos e a formação de crescimentos para o exterior, verdes, compactos e nodulares, mas houve pouca produção de calos a partir da micrópila. MULLINS & SRINIVASAN (1976) ponderaram, a partir dessas observações, que a 6-BA foi necessária para o crescimento ótimo do calo nucelar e que o desenvolvimento organizado ocorreu com uma combinação de 6-BA e NOA. Dessa maneira, os autores efetuaram uma série de experimentos fatoriais nos quais os óvulos cresceram inicialmente com 6-BA e foram então transferidos a vários intervalos para diferentes concentrações de 6-BA + NOA. Essa conduta deu resultados positivos e embriões somáticos (embrióides) foram formados com uma sequência relativamente simples de tratamentos. Os

óvulos cresceram primeiro em meio BN com $5\mu\text{M}$ de 6-BA e foram transferidos depois de 3 semanas para meio BN mais $5\mu\text{M}$ de 6-BA e mais $5\mu\text{M}$ de NOA, ficando duas semanas nesse meio quando foram transferidos para um meio similar, mas com uma concentração reduzida de 6-BA (i.é. $2,5\mu\text{M}$). Durante as seguintes 3-4 semanas, protuberâncias brancas começaram a aparecer sobre o calo produzido a partir da micrópila. Depois descobriram que essas protuberâncias eram massas proembriogênicas que deram origem aos embrióides (MULLINS & SRINIVASAN, 1976). Esses autores encontraram ainda que a produção de plântulas a partir dos embrióides foi difícil. O crescimento de raízes primárias e adventícias ocorreu no mesmo meio utilizado para a indução de embrióides, mas para a formação da parte aérea necessitou-se transferir os embrióides para meio semi-sólido contendo $5\mu\text{M}$ de 2-isopentiladenina (2-iP) e $1\mu\text{M}$ de ácido giberélico, e dali para o meio basal de WHITE (MULLINS & SRINIVASAN, 1976). Esses autores relatam ainda que as brotações produzidas observadas até então exibiram a morfologia característica de plântulas de videira originadas de sementes, isto é, filotaxia espiral e ausência de gavinhas. MULLINS & SRINIVASAN (1976) afirmaram em seu trabalho que tentaram obter embrióides ou mesmo gemas adventícias a partir de tecidos vegetativos de videira, mas não obtiveram sucesso e o nucelo foi o único tecido que mostrou competência regenerativa embora eles não possuissem informações disponíveis que explicassem em nível bioquímico a responsividade do nucelo a substâncias de crescimento

exógenas. MULLINS & SRINIVASAN (1976) utilizaram NOA para a cultura de óvulos seguindo sugestão de Norreel (1973), citado por MULLINS & SRINIVASAN (1976), que encontrou ser esta auxina altamente efetiva para a cultura de cenouras silvestres. Por outro lado a benziladenina é uma inibidora de embriogênese em cultura de cenouras (Halperin, 1970 citado por MULLINS & SRINIVASAN, 1976), mas é um constituinte essencial para a formação de plântulas em videira. MULLINS & SRINIVASAN (1976) afirmam que o estabelecimento das plântulas a partir de embriões somáticos foi inesperadamente difícil e houve requerimento tanto de giberelina quanto de citocinina. A necessidade de giberelina para o crescimento de embrióides isolados imaturos foi relatada previamente por SKENE (1969). MULLINS & SRINIVASAN (1976) efetuaram testes com diversas citocininas para a indução do crescimento da parte aérea e havia indícios da especificidade da 2-iP.

Em trabalho publicado em 1980, SRINIVASAN & MULLINS efetuaram um refinamento do seu método de cultura de óvulos publicado anteriormente (MULLINS & SRINIVASAN, 1976). Além de 'Cabernet Sauvignon' estudaram também 'Grenache' e um híbrido masculino (*V. vinifera* x *V. rupestris*) denominado 'Gloryvine'. Para obtenção de óvulos desse cultivar masculino, suas gavinhas foram transformadas em inflorescências utilizando-se uma citocinina sintética (SRINIVASAN & MULLINS, 1979). As flores foram coletadas 10 dias antes da antese e os demais procedimentos de esterilização, distribui-

ção nos frascos e condições de luz e temperatura de incubação foram idênticos ao descrito previamente (MULLINS & SRINIVASAN, 1976). O meio de cultura básico utilizado foi o de Nitsch *et alii* (1968) citado por SRINIVASAN & MULLINS (1980).

O meio de indução constou do seguinte: óvulos excisados de 'Cabernet Sauvignon', 'Grenache' e 'Gloryvine' cresceram em meio de Nitsch suplementado com $5\mu\text{M}$ de 2,4-D ou $5\mu\text{M}$ de NOA, mais 1 ou $5\mu\text{M}$ de 6-BA. No meio contendo $5\mu\text{M}$ de 2,4-D e $1\mu\text{M}$ de 6-BA, os óvulos tornaram-se verdes e um calo compacto, friável e creme-esbranquiçado extravasou através da micrópila. Com $5\mu\text{M}$ de NOA e $5\mu\text{M}$ de 6-BA os óvulos aumentaram em tamanho, tornaram-se verde-escuros e então produziram um calo branco coberto de pilosidade a partir da micrópila. Os explantes de óvulos que cresceram com $5\mu\text{M}$ de 6-BA apenas, tornaram-se verdes, mas não produziram calos (SRINIVASAN & MULLINS, 1980). Depois de duas semanas no meio de indução, os explantes de óvulos foram transferidos para meio basal contendo NOA ($10\mu\text{M}$) e 6-BA ($1\mu\text{M}$) para crescimento adicional do calo. Os calos que cresceram inicialmente com 2,4-D ($5\mu\text{M}$) e 6-BA ($1\mu\text{M}$) entraram num período de rápido crescimento em 7-10 dias seguidos da transferência e começaram a se quebrar em agregados celulares. Depois de duas semanas adicionais, esses agregados celulares começaram a se desenvolver em embrióides globulares. Os calos que foram iniciados em meio contendo NOA ($5\mu\text{M}$) e 6-BA ($5\mu\text{M}$) e explantes de óvulos que cresceram em $5\mu\text{M}$ de 6-BA apenas não se quebraram em fragmentos quando transferidos para meio de

crescimento (NOA-10 μ M e 6-BA 1 μ M), mas permaneceram como aglomerados. Estes calos subseqüentemente produziram embriões globulares branco-mármore nas suas superfícies (SRINIVASAN & MULLINS, 1980). No caso do calo que foi induzido em meio contendo 6-BA, ou NOA mais 6-BA, os embriões formaram-se tanto sobre, quanto abaixo da superfície do calo e permaneceram ligados ao calo parental até depois da iniciação da raiz. A transferência de explantes de óvulos diretamente do meio de indução (contendo 2,4-D ou NOA, mais 6-BA) para meio basal, sem passagem através do meio de crescimento de calo, levou a uma produção muito baixa de embriões. A produção de embriões a partir de óvulos tratados com 2,4-D mais 6-BA foi muito maior do que de óvulos tratados com NOA mais 6-BA ou 6-BA isoladamente. A produção de embriões de 'Cabernet Sauvignon' e 'Gloryvine' foi aumentada várias vezes pela formação de embriões secundários e terciários a partir da região do hipocótilo e do suspensor de embriões primários. Em 'Grenache' vários embriões desenvolveram-se de cada aglomerado num padrão radial. Os embriões produzidos a partir de óvulos que foram induzidos por 2,4-D mais 6-BA foram menores do que aqueles formados em calos tratados com NOA mais 6-BA ou 6-BA isoladamente, mas também foram os que mais proliferaram. A maioria dos embriões possuíam 1 a 3 cotilédones. Os embriões de 'Cabernet Sauvignon' possuíam cotilédones proeminentes, com margens onduladas. Os embriões de 'Grenache' possuíam hipocótilos alongados, os embri-

óides de 'Gloryvine' foram na maioria das vezes dicotiledôneos e pareceram normais em desenvolvimento. A cultura prolongada de calos (11 semanas) derivada de óvulos de 'Cabernet Sauvignon' em meio com NOA (5 μ M) e 6-BA (5 μ M) levou à formação de vários agregados celulares branco-cremosos. Entretanto, nenhum desses agregados se desenvolveu em embrióides, mas ocorreu um rápido desenvolvimento de raízes flutuando livres quando foram subcultivados em meio basal (SRINIVASAN & MULLINS, 1980).

BESSIS (1985) tentou utilizar a técnica descrita acima para os cultivares Pinot, Chardonnay e Gamay encontrando as seguintes dificuldades: a) a formação do calo nucelar foi muito aleatória, muitas vezes não atingindo o ponto de início da proliferação, ou foi um outro tecido do óvulo ou do tegumento que forneceu o calo; b) a proliferação do calo nucelar foi muito limitada, calo este cuja cor era negra quando embriogênico; c) quando a embriogênese se iniciava, ela se fazia de uma maneira bastante aleatória sobre alguns calos sem que se dominasse a sua iniciação; d) a embriogênese às vezes era muito intensa (muitas centenas de embriões por placa de Petri, e às vezes não produzia mais do que alguns; e) para uma utilização prática do procedimento é necessário que os embrióides se transformem em plântulas. Entretanto, a organização dos meristemas caulinar e radicular, e em seguida seu funcionamento foram aleatórios. Em certos casos o autor obteve os embrióides com os dois meristemas perfeitamente funcionais, mas muito

comumente um ou outro ou mesmo os dois não entraram em atividade apesar das muitas tentativas efetuadas pelo autor.

RAJASEKARAN & MULLINS (1985) utilizaram a cultura de nucelo de óvulos visando à embriogênese somática em um estudo sobre os efeitos da fertilização e do gametocida toluidina azul sobre o crescimento do tubo polínico *in vivo* e sobre os efeitos deste gametocida sobre a germinação do pólen, crescimento do tubo polínico e crescimento dos óvulos *in vitro*. Os objetivos de seu trabalho foram dois: a) determinar os efeitos da fertilização sobre a competência regenerativa do nucelo e; b) investigar a possibilidade de induzir a partenogênese haplóide *in vitro*. Os óvulos utilizados neste caso foram coletados dois dias após a antese. O comportamento *in vitro* de óvulos a partir de flores tratadas com toluidina azul e flores normalmente fertilizadas (controle) foi similar. Os óvulos cultivados em meio basal tornaram-se pretos e morreram dentro de 4 dias da inoculação, mas óvulos crescidos em meio NN contendo $1\mu\text{M}$ de 6-BA, $5\mu\text{M}$ de 2,4-D e 0,1% de caseína hidrolisada produziram um calo branco-esverdeado a partir da micrópila depois de 2-3 semanas. Este calo desintegrou-se subsequente para produzir uma suspensão de agregados celulares e células únicas. Após uma transferência para meio basal, isto é, omitindo 6-BA e 2,4-D, as culturas derivadas de flores tratadas e controle deram origem a grande quantidade de embriões somáticos. A competência regenerativa do calo ovular não foi afetada pela fertilização ou pelo tratamento

com toluidina azul e embriões somáticos foram produzidos com a mesma frequência pelos óvulos de flores tratadas ou não. Os autores fizeram amostragem dos óvulos para observação em microscópio durante o período de cultura e foi confirmado que os calos a partir dos quais os embrióides se originaram surgiram de divisões da calota nucelar, um tecido localizado perto da micrópila. Houve uma óbvia degeneração do saco embrionário em todos os óvulos que foram investigados.

GRAY & MORTENSEN (1987) obtiveram a iniciação e manutenção de embriogênese somática a longo prazo a partir de anteras e ovários de *Vitis longii* cv. Microsperma, uma videira feminina. Os autores testaram, em meio de MS mais $5\mu\text{M}$ de 2,4-D e mais $1\mu\text{M}$ de 6-BA os explantes: anteras, óvulos e ovários intactos. Estes autores trataram as flores a frio por 72 horas, aproximadamente 10 dias antes da antese: depois esterilizaram e dissecaram as flores inoculando os explantes em meio de placa já com o meio de cultura. A temperatura (22°C) foi mais baixa do que a normalmente utilizada pelos demais autores ($25-27^{\circ}\text{C}$). Os autores obtiveram embrióides apenas de 2,5% das anteras cultivadas e de 10% dos ovários cultivados. Nenhum embrióide foi obtido a partir do nucelo de óvulo e os autores não comentam qual o tecido da antera ou do ovário que deu origem aos calos embriogênicos. De acordo com GRAY & MORTENSEN (1987) várias anormalidades de desenvolvimento foram observadas nos embrióides. A anormalidade mais comum foi a presença de mais de dois cotilédones ou um "colar" de material cotiledonar fundido. A

embriogênese secundária direta ocorreu comumente a partir tanto da parte inferior do hipocótilo, da parte superior da radícula, como de tecidos da junção entre a radícula e o hipocótilo.

2.3. Metodologia da cultura de anteras

A primeira tentativa para obtenção de embriões e plantas a partir de cultura de antera de *Vitis* foi feita por Mullins (1971) (citado por RAJASEKARAN & MULLINS, 1979), a qual foi sem sucesso. Posteriormente, GRESSHOFF & DOY (1974) conseguiram derivar uma linha de células haplóides a partir de cultura de antera de *Vitis vinifera*, mas não conseguiram obter embriões ou plântulas desenvolvidas. Para a obtenção de linhas de células haplóides houve estádios da meiose mais favoráveis quais sejam o de tétrade e de pólen uninucleado. Os autores relatam ainda que fizeram muitas tentativas para diferenciar os calos haplóides em raízes, caules, plantas inteiras ou pseudo-frutos, tentativas essas sem sucesso, embora tenha havido formação de xilema e esverdeamento (GRESSHOFF & DOY, 1974). Os reguladores vegetais utilizados foram: meio 1 (10 μ M de NAA; 11 μ M de IAA e 7 μ M de cinetina), meio 2 (0,5 μ M de NAA; 0 μ M de IAA e 1,4 μ M de cinetina) e meio 3 (0,25 μ M de NAA; 0 μ M de IAA e 0,37 μ M de cinetina). Os autores incubaram as anteras por 24h na luz (fluorescente e incandescente) a 27°C. Depois as luzes foram apagadas e a incubação continuou no escuro (GRESSHOFF & DOY, 1974).

HIRABAYASHI *et alii* (1976) relataram a indução de diferenciação de brotações e raízes a partir de calos derivados de anteras de *Vitis thunbergii*. De acordo com a descrição dos autores a diferenciação foi obtida por organogênese e não embriogênese. As anteras foram inoculadas em meio MS ou NN acrescido de $10\mu\text{M}$ de NAA mais $1\mu\text{M}$ de 6-BA. Os tubos de ensaio contendo as anteras foram mantidos no escuro durante todo o período da cultura. Durante um mês todos foram mantidos a 28°C num incubador. Posteriormente uma parte foi trazida para uma sala onde a temperatura não foi controlada, variando de $0-30^{\circ}\text{C}$ durante o período de 6 meses. Somente após este período é que se observou a diferenciação em parte aérea e raiz, a qual foi observada apenas no meio de NN, para anteras no estágio de tétrade (15%) e uninucleado (1,4%) no material deixado em sala sem controle de temperatura.

Em geral, o objetivo de quem trabalha com cultura de antera é a obtenção de haplóides para a análise genética e o melhoramento da videira. Mas quando se obteve uma plântula pela primeira vez, proveniente de um embrióide, esta não era haplóide. Isto ocorreu no trabalho de RAJASEKARAN & MULLINS (1979). Os autores utilizaram dois cultivares de videira, um híbrido ornamental 'Gloryvine' (*Vitis vinifera* x *Vitis rupestris*) e um cultivar comercial muito importante 'Cabernet Sauvignon' (*Vitis vinifera* L.). Uma novidade em sua metodologia é que os autores utilizaram meio líquido sob agitação. As anteras de ambos os cultivares

foram retiradas no estágio de microsporos uninucleados e cultivadas em meio NN contendo (2,4-D $5\mu\text{M}$; ou NOA $5\mu\text{M}$ ou NAA $5\mu\text{M}$) e citocininas (BA $1\mu\text{M}$ ou PBA $5\mu\text{M}$). Em todos os tratamentos as anteras de 'Cabernet Sauvignon' ficaram pretas dentro de 4 a 5 dias e não exibiram nenhum desenvolvimento adicional. As anteras de 'Gloryvine' não cresceram em meio com NAA. Quando desenvolvidas em meio com 2,4-D, ou NOA, as anteras de 'Gloryvine' retiveram a sua coloração amarela e começaram a inchar após 1 semana de cultura. Após 10-20 dias as anteras se romperam e expeliram um calo branco amarelado. A produção de calo foi maior com NOA do que com 2,4-D e as duas auxinas deram calos com características diferentes. Os calos foram formados por anteras quando cultivados tanto na luz quanto no escuro, mas apareceram 10 dias antes em anteras crescidas no escuro do que na luz. Os calos obtidos a partir de anteras cultivadas com citocinina (BA ou PBA, ambas à concentração de $5\mu\text{M}$) e 2,4-D ou com essas citocininas e NOA, não puderam ser subcultivados em meio contendo as citocininas na concentração original, pois senão eles se tornavam vermelhos e paravam de crescer. Para um crescimento contínuo foi necessário reduzir a concentração de 6-BA e PAB para $1\mu\text{M}$. Aproximadamente duas semanas após a primeira subcultura o crescimento do calo cessou e ele começou a quebrar e a formar agregados. Os calos e os agregados foram então transferidos para meio basal ou meio suplementado com citocininas (BA, PBA, 2iP), auxina (NOA) e giberelina (GA_3)

individualmente ou em combinação, a fim de induzir o desenvolvimento organizado. Nesse estágio, os calos que haviam crescido no escuro, foram passados para a luz. Calos e agregados crescidos em meio basal ou em meio contendo GA_3 produziram grande número de embriões. Dentro de 10 dias mais de 2.500 embriões foram encontrados em culturas que foram tratadas inicialmente com $BAC1\mu M$ e $2,4-D5\mu M$ e que cresceram inicialmente no escuro. Quando NOA foi utilizado como auxina, a formação do embrião foi ausente ou ocorreu em baixa frequência. Nos embriões desenvolvidos a partir da cultura de anteras foram observados os padrões característicos de desenvolvimento dos embriões zigóticos: os estádios globular, coração e torpedo e os embriões maduros exibiram um suspensor bem pronunciado. Houve também produção de embriões secundários e terciários a partir dos embriões formados. A partir de estudos citológicos dos calos encontraram-se duas populações de células mitóticas, aquelas com número de cromossomos consistido de 19, o número haplóide, e aquelas com número de cromossomos consistido de 38 (RAJASEKARAN & MULLINS, 1979). Esses autores observaram que a produção de calos por antera foi mais rápida e abundante quando as culturas foram incubadas inicialmente no escuro. Aproveitando-se dessa observação e com a finalidade de verificar o efeito do resfriamento ($4^{\circ}C$ por 72h) fizeram um experimento no qual anteras resfriadas e não resfriadas, ambas com pólen no estágio uninucleado foram incubados no escuro e na luz ($2,5W.m^{-2} \cong 11,5\mu E.m^{-2}.s^{-1}$). Verificaram que

o melhor tratamento foi com anteras resfriadas cultivadas no escuro (meio de NN acrescido de 2,4-D ($5\mu\text{M}$) e BA ($1\mu\text{M}$) (RAJASEKARAN & MULLINS, 1979). Observaram ainda que quando os embriões maduros foram transferidos para meio básico com agar o desenvolvimento deles era muito demorado e muitos embriões falharam em produzir plântulas normais. Os cotilédones tornaram-se verdes e alongados, mas as brotações falharam em se desenvolver e as plântulas tiveram uma aparência fasciculada. Tentativas para produzir plântulas normais utilizando meios basais diferentes (WHITE, 1943; MURASHIGE & SKOOG, 1962), foram infrutíferas.

Lembrando que, normalmente as sementes de videira têm necessidade de um resfriamento (estratificação) para germinar, RAJASEKARAN & MULLINS (1979) fizeram outros experimentos testando o resfriamento (4°C) de embriões maduros por vários períodos (0 a 8 semanas) e também GA_3 ($1\mu\text{M}$), que é conhecido por substituir o resfriamento para superar a dormência de sementes em muitas espécies. Os resultados desses experimentos mostraram claramente que embrióides derivados de anteras exibem dormência fisiológica e que é requerido um resfriamento (4°C) por no mínimo 2 semanas para induzir uma germinação normal. Para se ter uma idéia em embrióides não resfriados houve apenas 2% de produção de plântulas normais e em duas semanas de resfriamento obteve-se 83% de plântulas normais. Embrióides tratados com GA_3 ($1\mu\text{M}$) produziram 47% de plântulas normais. Os autores ainda verificaram que em qualquer estágio do desenvolvimento do

embrióide (globular, coração, torpedo e maduro) o resfriamento foi igualmente efetivo em induzir o desenvolvimento normal de plântulas. Segundo RAJASEKARAN & MULLINS (1979) o sucesso dos experimentos depende mais da escolha do material experimental do que de variações discretas na composição do meio de cultura. A identificação do tecido regenerativamente competente foi de importância primária (RAJASEKARAN & MULLINS, 1979). Ainda nesse trabalho, esses autores afirmaram que o fato de não terem conseguido plântulas haplóides, embora houvessem nos calos células haplóides, seja talvez devido ao fato de a videira possuir muitos genes deletérios que se manifestaram em homozigose. Finalmente ZOU & LI (1982) descreveram a primeira e única indução de sucesso de plantas haplóides a partir de cultura de anteras de um cultivar de *V. vinifera*.

O trabalho seguinte sobre obtenção de embriões e plântulas a partir de calos derivados de anteras foi o de HIRABAYASHI & AKIHAMA (1982). Estes autores estudaram 28 clones e cultivares de videira incluindo 8 porta-enxertos. Flores em estádios diversos de desenvolvimento foram esterilizadas (não sofreram pré-resfriamento). As anteras foram colocadas assepticamente em tubos de ensaio contendo 5ml de meio. Utilizaram como meio basal o de Nitsch (1972) citado por HIRABAYASHI & AKIHAMA (1982), suplementado com várias concentrações de NAA ou 2,4-D e 6-BA. Os tubos de ensaio foram incubados no escuro a 25-30°C. Quando os embriões se desenvolveram a partir dos calos derivados de anteras, os

tubos foram colocados sob um regime de 16 horas de luz (2.500lux). A contagem dos cromossomos foi realizada em células de raízes coradas com acetocarmim.

HIRABAYASHI & AKIHAMA (1982) observaram a formação de embriões em plântulas do cultivar de *Vitis vinifera* Koshusanjaku após 2 a 4 meses de cultura. Os embriões foram produzidos em meio suplementado com várias combinações de NAA (0,1 a 10 μ M) e BA (1 a 10 μ M) ou 2,4-D (1 a 10 μ M) e BA (1 a 10 μ M). Entre os meios testados as combinações de NAA (5 μ M ou 1 μ M) ou 2,4-D (1 μ M) e BA (10 μ M) foram as mais favoráveis para a formação de embriões de calos derivados de anteras. Os autores observaram que a frequência de formação de calos foi maior em meio contendo NAA, mas que a frequência de formação de embriões foi maior em meio contendo 2,4-D. As massas de células embriogênicas formadas puderam ser mantidas em meio contendo 2,4-D (10 μ M) e BA (1 μ M) sem perder a sua capacidade de produzir embriões. Os embriões assim formados foram transferidos para meio basal contendo as vitaminas de MS para induzir desenvolvimento adicional. Entretanto, HIRABAYASHI & AKIHAMA (1982) observaram que nesse meio basal, apenas poucos embriões desenvolveram-se em plântulas normais. Algumas vezes os autores obtiveram plantas normais diretamente de anteras cultivadas em meio suplementado com NAA (0,1 μ M) e BA (1 μ M ou 10 μ M). Os embriões foram então cultivados por uma a duas semanas em baixa sacarose, 2% do meio de MS suplementado com NAA (0,1 μ M) e BA (1 ou 5 μ M) para induzir desenvolvimento adicio-

nal. Os embriões que se desenvolveram, foram transferidos para meio basal ou meio suplementado com NAA ($0,1\mu\text{M}$) para obter plântulas normais. Os autores relataram ainda que não estudaram os efeitos do resfriamento e nem do tratamento com GA_3 na promoção do crescimento de plântulas a partir de embriões maduros (HIRABAYASHI & AKIHAMA, 1982). Esses autores obtiveram ainda embriões a partir de cultura de anteras das seguintes videiras: a) cultivares de *V. vinifera*: Koshusanjaku, Neo Muscat, Kaiji, Askéri, Riesling, Black Hamburg, Muscat Hamburg; b) *V. spp*: Delaware, D x K 151; c) híbridos entre: *V. thunbergii* x dois cultivares; *V. thunbergii* x Muscat Bailey A, Muscat Bailey A x *V. thunbergii*, Delaware x *V. thunbergii*; d) espécies silvestres: *V. thunbergii*. Relataram finalmente, que todas as plantas examinadas eram no entanto diplóides.

RAJASEKARAN & MULLINS (1983a) publicaram um trabalho mais completo sobre a cultura de anteras de 'Glory-vine' (*V. vinifera* x *Vitis rupestris* Scheele) onde através de estudos citológicos, genéticos e eletroforéticos tentaram determinar a origem das plântulas derivadas de anteras. O meio de cultura utilizado em todos os experimentos foi o NN contendo $5\mu\text{M}$ de 2,4-D e $1\mu\text{M}$ de 6-BA e nele foram inoculados, separadamente anteras, internódios e microsporos isolados. Inicialmente as culturas foram mantidas no escuro (26°C) por 10 dias e depois transferidas para a luz (26°C , irradiância de $4,5\text{W.m}^{-2} \cong 20,7\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Segundo RAJASEKARAN & MULLINS (1983a) houve uma forte evidência de que o calo pro-

duzido por anteras cultivadas originou-se das células somáticas da antera. O padrão da produção de calos em anteras cultivadas foi de dois tipos. No primeiro, as células foram produzidas a partir do conetivo que junta as duas tecas, e houve um crescimento prolífico de calos a partir da cicatriz do filamento. No segundo tipo, o calo surgiu de células do conetivo situado entre os dois lóculos. Em algumas anteras o calo emergiu como uma língua de tecido que pareceu vir de dentro do lóculo. O rompimento das paredes das anteras para liberar calos e grãos de pólen foi também observado. Quando cultivados separadamente, os filamentos isolados falharam em produzir calos e embriões (RAJASEKARAN & MULLINS, 1983a). Determinações citofluorimétricas do conteúdo de DNA nuclear de calos recém-formados (de anteras cultivadas por 10 dias) revelaram uma predominância de células $2n$ (64%). Entretanto, uma pequena proporção de células (mais ou menos 1,5%) teve núcleo $1n$. Trinta por cento do núcleo mostrou um nível $4n$ e poucas células foram observadas com um conteúdo de DNA superior a $4n$. A variação no conteúdo de DNA de células de calos de antera foi comparada àquela de células de calos derivada de cultura de internódios. O número de células com nível de DNA nuclear $2n$ foi maior em calos de internódios (73%) do que em calos de anteras. Vinte e sete por cento dos núcleos mostraram um nível $4n$ de DNA. Nenhum núcleo haplóide foi encontrado em células provenientes de internódios. Houve uma considerável variação entre plantas derivadas de anteras na morfologia das folhas. A progênie de plantas derivadas de

cultura de anteras auto-polinizadas exibiu segregação para característica de folhas indicando heterozigose e origem somática. Padrões de isoenzimas para indofenol oxidase, leucina amino peptidase e catecol oxidase em plantas derivadas de anteras e no genótipo original a partir do qual as culturas foram estabelecidas foram indistinguíveis (RAJASEKARAN & MULLINS, 1983a). Outra observação importante desse trabalho é que houve alta mortalidade de plântulas originadas de cultura de anteras (71%) sendo que algumas mostraram albinismo e albinismo deletério. Apenas 120 foram transferidas para o campo com sucesso. 'Gloryvine' é uma videira masculina, como consequência da falta do desenvolvimento do gineceu, entretanto, duas das plantas regeneradas produziram flores perfeitas e frutos em duas estações consecutivas. As outras plantas permaneceram masculinas. RAJASEKARAN & MULLINS (1983a) fizeram uma excelente discussão dos resultados de seus experimentos concluindo finalmente que nenhuma planta derivada de antera, obtida em seus experimentos era haplóides ou um homozigoto diplóide surgido da duplicação de um núcleo haplóide.

Em um trabalho subsequente (RAJASEKARAN & MULLINS, 1983b) foi estudada a influência do genótipo e da expressão do sexo em anteras de videiras cultivadas *in vitro*. Esses autores não mencionam o trabalho de HIRABAYASHI & AKIHAMA (1982) mais ou menos no mesmo sentido, e apesar destes últimos autores haverem testado diversos cultivares de *Vitis vinifera*, híbridos e espécies, nenhum deles foi

comum ao trabalho de RAJASEKARAN & MULLINS (1983b). Estes autores trabalharam com as seguintes videiras: a) espécies de *Vitis*: *Vitis longii**, *V. rupestris* du Lot*, *V. rupestris* cv. *Metallica cape**, *V. cinerea*; b) híbridos interespecíficos: J.S. 23-416*, M.G.60-44*, Gloryvine I*, Gloryvine II*, Hillar Noir*, Villard Blanc*, Campbells Early, Lady Patrícia; c) híbridos intraespecíficos: Sumoll x Cabernet Sauvignon; d) cultivares de *V. vinifera*: Grenache*, Shiraz, Cabernet Sauvignon, Traminer, Jones Muscat; e) *Vitacea* australiana nativa: *Cissus* sp*, *Cissus opaca*, *Ampelocissus gardeneri*. As videiras marcadas com asteriscos foram as que deram embriões com o protocolo utilizado por RAJASEKARAN & MULLINS (1983b). Anteras contendo micrósporos uninucleados foram isoladas de flores primeiramente resfriadas (4°C, 72h) e colocadas em frascos Erlenmeyer de 100ml com 25ml de meio de cultura, 25 anteras por frasco. O meio de cultura utilizado foi idêntico ao do trabalho anterior (RAJASEKARAN & MULLINS, 1983a) ou seja, NN suplementado com 5µM de 2,4-D e 1µM de 6-BA. As culturas foram agitadas num incubador giratório e incubadas a uma temperatura de 26 ± 1°C. As anteras isoladas cresceram no escuro por 10 a 20 dias. Em vários genótipos as anteras produziram um calo composto, branco-amarelado a partir da parede da antera e da cicatriz do filamento, mas em outros genótipos as anteras deixaram de crescer *in vitro* e tornaram-se pretas após 5-7 dias de cultura. Mais tarde, os calos produzidos de anteras responsivas desintegraram-se para formar agregados e células iniciais.

Essas suspensões foram transferidas subseqüentemente para meio basal sem auxina ou citocinina. Neste estágio as culturas foram transferidas para a luz ($2,5-3,0 \text{ W.m}^{-2} \cong 11,5$ a $13,8 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) de irradiância, 16h). Durante os seguintes 10-20 dias, grande quantidade de embriões branco-mármore desenvolveu-se a partir dos agregados de células. O curso do crescimento e diferenciação de embriões somáticos foi similar ao dos embriões zigóticos com exceção de que os embriões somáticos sempre possuíam mais do que dois cotilédones. A formação de embriões secundários a partir da região do hipocótilo foi observada em todos os genótipos responsivos (RAJASEKARAN & MULLINS, 1983b). Houve maior tendência das videiras masculinas darem embriões, mas quando flores de cultivares masculinos foram feminizadas pela utilização de citocininas, as anteras de flores hermafroditas falharam de crescer *in vitro*. Apenas quatro entre treze cultivares hermafroditas produziram embriões somáticos a partir de calos derivados de anteras. Entre os cultivares masculinos, 6 entre 7 produziram embriões. O cultivar 'Grenache' foi exceção duas vezes, pois foi o único cultivar de *Vitis vinifera* (entre 5) que produziu embriões, sendo um cultivar hermafrodita (RAJASEKARAN & MULLINS, 1983b). É importante lembrar ainda, que todas videiras utilizadas deram calos, em maior ou menor quantidade, sendo que a porcentagem de obtenção de calos por antera cultivada variou de 2% a 72%.

De acordo com BOUQUET & DANGLLOT (1985), a Estação de Viticultura de Montpellier (INRA) incluiu nos seus programas de pesquisa, a médio prazo, o melhoramento genético de porta-enxertos de videira pela cultura *in vitro* com três objetivos: resistência à salinidade, resistência às toxicidades iônicas em solos ácidos e resistência à clorose calcária. Esses autores utilizaram cultura de anteras dos porta-enxertos *Vitis rupestris* cv. du Lot e os híbridos de *V. rupestris* (3309 Couderc, 110 Richter e 140 Ruggeri), e observaram que as anteras colocadas em cultura em um estágio de desenvolvimento avançado apresentam um total de calogênese muito superior àquele observado sobre anteras colocadas em cultura em um estado mais precoce (meiose). Por outro lado, o total de embriogênese não é melhorado. Observaram também que um pré-tratamento de inflorescência pelo frio, antes de colocar as anteras em cultura não melhora a produção de calos e de embriões somáticos. BOUQUET & DANGLLOT (1985) utilizaram em meio primário o meio MS na metade das concentrações (o que se aproxima de NN no que diz respeito às concentrações salinas) acrescido de 2,4-D e 6-BA; não esclarecem, entretanto, se fizeram uma incubação prévia no escuro como recomendam RAJASEKARAN & MULLINS (1983a e b). Conseguiram um aumento significativo na porcentagem de anteras embriogênicas transferindo os calos para meio com baixa concentração de auxina. Encontraram também um efeito significativo do pH e da concentração em micro-nutrientes do meio de cultura sobre o total de embriogênese.

Testaram concentrações crescentes de NaCl em meio de cultura e observaram que a calogênese e a embriogênese são fortemente inibidas. Por repicagens sucessivas de calos sobre os meios com concentrações crescentes de sal, foi possível selecionar-se uma cultura celular de *V. rupestris* resistente a uma concentração de 15g.l^{-1} de NaCl. Entretanto, a néo-formação de embriões somáticos a partir desta fonte celular não foi possível. De acordo com os autores essa técnica apresenta dois pontos principais de estrangulamento: o primeiro é a perda relativamente rápida e irreversível das potencialidades embriogênicas dos calos obtidos através de anteras em vias de repicagem sucessivas; o segundo é o desenvolvimento muitas vezes fraco e anormal dos embriões somáticos obtidos. Apesar disso, os autores conseguiram 150 plantas pertencentes a quatro variedades de porta-enxertos, regeneradas a partir de embriões somáticos as quais estavam multiplicando antes de levarem para o campo para fazerem um estudo mais aprofundado sobre a variabilidade somaclonal susceptível de ser obtido por esta técnica de cultura *in vitro* (BOUQUET & DANGLOT, 1985).

Um trabalho muito interessante foi efetuado por MAURO *et alii* (1986). Estes autores partiram dos métodos de Bouquet *et alii* (1982) citados por MAURO *et alii* (1986) para a cultura de antera e indução de embriões somáticos. O material vegetal utilizado foram 3 clones de Cabernet Sauvignon. As inflorescências foram resfriadas por 72 horas a 4°C e após isto as flores foram esterilizadas. Pela

primeira vez foi utilizado um parâmetro externo mais prático, qual seja, o comprimento da antera. Também os autores utilizaram meios sequenciais para iniciação, desenvolvimento do calo e proliferação do calo embriogênico. Anteras com 0,2 a 1,0mm de comprimento foram excisadas de flores e cultivadas durante 28 dias em placas de petri de 5cm contendo a metade das concentrações do meio MS solidificado com 0,7% de agar (e isto difere dos trabalhos de RAJASEKARAN & MULLINS, 1979, 1983a e 1983b que utilizaram sempre meio líquido pois observaram em trabalhos preliminares que o meio com agar, ou seja, meio sólido não era satisfatório para o cultivo de anteras de videira) e suplementado com sacarose 2%, 2,4-D ($4,5\mu\text{M}$) e 6-BA ($1\mu\text{M}$). Este foi o procedimento para iniciação dos calos o qual foi feito no escuro. A seguir as anteras foram transferidas para meio suplementado com NAA ($0,5\mu\text{M}$), BA ($1\mu\text{M}$) e caseína hidrolisada (250ppm) e cultivadas durante um mês. Os vários compostos de nitrogênio examinados foram adicionados antes da autoclavagem destes dois meios. Houve um terceiro meio para a proliferação do calo embriogênico para o qual os calos foram subcultivados a cada mês, meio este sem caseína hidrolisada e suplementado com $0,5\mu\text{M}$ de NAA e $1\mu\text{M}$ de 6-BA. Os embrióides foram transferidos individualmente para tubos de ensaio contendo 6-BA ($0,4\mu\text{M}$) a fim de se desenvolver em plântulas. Todas as culturas foram mantidas a 24°C sob um regime de 16 horas de iluminação ($100\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). A porcentagem de anteras que produziram calos foi determinada

no fim da primeira subcultura sobre o meio embriogênico. A porcentagem de calos que produziram embrióides foi determinada após três subculturas sobre o meio embriogênico (MAURO *et alii*, 1986). No que diz respeito à produção de calo houve um efeito marcante do comprimento da antera para os três clones estudados. Assim, os comprimentos de 0,3 a 0,7mm foram os que deram a maior frequência de produção de calos e também foram os mais eficientes para produzir embrióides (MAURO *et alii*, 1986). Comparando-se os três clones vêm-se diferenças em sua capacidade de iniciarem calos e embrióides. O clone nº 1565 foi significativamente o menos efetivo especialmente em produzir calo e estes tiveram baixa capacidade embriogênica. Os outros dois clones, nº 15 e nº 337 foram mais eficientes em ambos, produção de calos e embrióides, embora a porcentagem de calo embriogênico foi muito baixa, uma vez que nunca ultrapassou 1,8%. Uma alta porcentagem de produção de embrióides ocasional foi observada (76,2%) exibindo alta capacidade embriogênica de um determinado calo (MAURO *et alii*, 1986). Partindo dos resultados desses primeiros experimentos MAURO *et alii*, (1986) utilizaram anteras com comprimento de 0,5mm nos experimentos subseqüentes, tamanho este identificado facilmente pela mudança de coloração da parede da antera de verde para amarelo. Visando a aumentar as porcentagens de produção de calos e de embrióides, MAURO *et alii*, (1986) efetuaram experimentos testando caseína hidrolisada, aminoácidos (glutamina e fenilalamina) e adenina em meio da

cultura. O efeito da caseína hidrolisada na iniciação do calo não foi apreciável; com ou sem caseína hidrolisada as porcentagens de calos foram similares. Entretanto, o aspecto do calo foi grandemente diferente, e sem caseína hidrolisada nenhum dos calos uniformemente marrons, foram capazes de induzir embrióides (MAURO *et alii*, 1986). Os autores estudaram também o efeito da associação entre glutamina, fenilalanina e adenina (controle, Phe + Ade, glu + Ade; glu + Phe + Ade). Os três meios testados aumentaram significativamente e numa forma similar as porcentagens de calos obtidos a partir de anteras. Quando transferidos ao meio de regeneração, todos os calos tratados mostraram um aumento na capacidade para induzir embrióides. O meio mais efetivo foi aquele suplementado com os três compostos orgânicos (4,8% de calo embriogênico) e a porcentagem mais baixa foi observada na ausência de glutamina. Entretanto, a maior porcentagem de embrióides foi obtida na associação de glutamina e adenina. Os autores observaram que, quando uma grande porcentagem de embrióides foi diferenciada (81,8%) apenas alguns deles desenvolveram-se em plântulas normais (19,4%). Uma correlação inversa foi observada por esses autores entre a produção de embrióides e o subsequente desenvolvimento do embrióide, como se estes dois fenômenos fossem antagônicos. MAURO *et alii*, (1986) tentaram por isso algumas estratégias para aumentar a porcentagem de regeneração de plantas. Estes autores sabiam que RAJASEKARAN & MULLINS (1979) já haviam tentado melhorar a germinação de

embriões somáticos utilizando meios basais diferentes e não obtiveram sucesso. Por outro lado, sabiam que três a cinco semanas de resfriamento e também tratamentos com giberelina provaram ser efetivos (CRAJASEKARAN & MULLINS, 1979, TAKENO *et alii* 1983; MAURO *et alii*, 1986). Entretanto, em seu trabalho, MAURO *et alii* (1986), um período de três semanas de resfriamento utilizando embrióides em vários estádios de embriogênese não aumentou significativamente a porcentagem de regeneração.

THEVENOT (1982) demonstrou em seu trabalho com macieira (*Malus sylvestris* Mill, W. cv. Golden Delicious) a existência de correlações fisiológicas entre o eixo e o cotilédone. A autora verificou que a germinação e a dormência são fenômenos que têm lugar no eixo embrionário, mas que são controlados pelos cotilédones. Em seus resultados experimentais, em relação à remoção dos cotilédones, quanto maiores foram as partes dos cotilédones excisados, maior foi o número de embriões aptos a germinar, embora uma quase total excisão dos dois cotilédones permitiram apenas 52% de germinação. Em outro experimento, embriões intactos e eixos isolados foram colocados em placas de Petri a várias temperaturas entre 5 e 30°C. As porcentagens de germinação após 30 ou 60 dias mostraram claramente que os embriões intactos bem como os eixos isolados germinaram melhor à temperatura próxima de 10°C do que a 20 ou 25°C. Além do mais, eixos isolados germinaram geralmente melhor do que embriões intactos; estes achados

sustentam a idéia de que os cotilédones inibem em parte a germinação de embriões intactos. Entretanto, mesmo a temperaturas favoráveis, eixos isolados são inaptos para germinar completa e rapidamente. Isto indica uma dormência do eixo embrionário propriamente dito (THEVENOT, 1982).

Para melhorar o desenvolvimento dos embrióides obtidos a partir de cultura de anteras, em seu trabalho MAURO *et alii* (1986) resolveram testar a hipótese de THEVENOT (1982). Por essa razão realizaram dois tratamentos sobre os embrióides do clone nº 15 obtidos em grande quantidade, quais sejam o resfriamento e a remoção dos cotilédones, verificando que o tratamento mais efetivo foi a remoção dos cotilédones associada com três semanas de resfriamento. No final deste trabalho os autores obtiveram 100 somaclones os quais foram transferidos para casa de vegetação (MAURO *et alii*, 1986).

CERSOSIMO (1986) cultivou anteras de 36 cultivares de uvas de vinho, mesa, porta-enxertos e híbridos produtores diretos nos estádios uninucleados e de tétrade em quatro meios de cultura diferentes. A formação de calos foi observada em culturas de 13 cultivares; em dois deles (o cultivar Grenache Noir e o híbrido Dalmasso IX-I), foram observados calos haplóides. Não se observou, porém, embriogênese. Cultivares importantes como Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc e Sultanina, não produziram calos em nenhum dos quatro meios de cultura. Quanto aos meios de cultura utilizados, denominados pelo autor de C_1 , C_2 , C_3 , e C_4 , a

maior frequência de calo foi observada no C_4 , a seguir C_3 , C_2 e por último C_1 . O meio C_1 , baseado na solução salina de MS possuía a maior concentração iônica total, mas possuía menos vitaminas e não possuía IAA; a concentração de sacarose foi de $30g.l^{-1}$, enquanto as demais possuíam $20g.l^{-1}$. O meio C_2 possuía a menor concentração iônica total mas a concentração de vitaminas foi maior que a do C_1 . Os meios C_3 e C_4 baseados no meio de NN possuíam concentração iônica total intermediária. Diferiram dos meios anteriores também por possuírem dois tipos de vitaminas a mais (biotina e ácido fólico), três aminoácidos (prolina, glicina e serina) e 0,1ppm de IAA. O meio C_3 diferiu do C_4 apenas na concentração de 2,4-D (C_3 com 2,2ppm e C_4 com 1,1ppm). Todos os meios possuíam 0,23ppm de 6-BA e os meios C_1 e C_2 possuíam também 2,2ppm de 2,4-D (CERSOSIMO, 1986).

NIIMI (1988) cultivou anteras de videira 'Muscat Bailey' e 'Kiyoho'. A porcentagem de formação de calos em anteras de 0,6-0,8mm de comprimento foi de 75% e 40% respectivamente; por outro lado houve um decréscimo em anteras maiores ou menores. Sob ambas as condições de escuro e de luz, o tratamento por resfriamento das anteras por 24, 48 ou 72 h aumentou a formação do calo de acordo com o tempo de resfriamento. O efeito do resfriamento foi mais marcante no escuro. A adição de NAA ($>0,02ppm$) e BA ($>0,01ppm$) do meio foi requerida para a formação do calo.

STAMP & MEREDITH (1988) também utilizaram anteras como explantes a fim de obter embriogênese somática.

As anteras utilizadas foram translúcidas a verde pálidas com 0,5-1,0mm de comprimento. Elas foram isoladas de flores não abertas de casa de vegetação e de vinhedos. Os autores utilizaram tanto meio sólido quanto meio líquido. Para culturas em meio sólido, as anteras em cachos de uma flor (5 anteras) compreenderam um explante e cada 5 desses explantes ou 5 folhas foram inoculadas em placa de Petri de 9cm contendo 20ml de meio. Para cultura líquida 7 folhas ou anteras de 7 flores foram colocadas em pedaços de papel de filtro de 10x5mm, umedecidos com meio estéril e colocados em 10ml de meio contido em frascos cônicos de 125ml que foram agitados a 30rpm. A incubação foi feita no escuro a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. O meio utilizado foi baseado no MS revisado com sais na concentração total (MS) ou na metade ($1/2$ MS) e foi testado também NN com $5,57\text{g.l}^{-1}$ de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. O meio sólido foi geleificado com $7,0\text{g.l}^{-1}$ de agar Difco Bacto e todo o meio foi suplementado por 20g.l^{-1} de sacarose. Os meios foram suplementados com BAP, 2,4-D ou NOA, sozinhos ou em combinações. Os autores, entretanto, não testaram todas as combinações de reguladores de crescimento com todos os meios basais, nem com todos os genótipos.

Depois de 25-35 dias quando o calo embriogênico foi freqüentemente observado, as anteras cultivadas em meio líquido foram transferidas para a superfície de um meio sólido da mesma formulação e incubadas a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ com um fotoperíodo de 16 horas ($40\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). As anteras cultivadas em meio sólido foram mudadas para as mesmas condições de

luz de cultura nesse momento sem transferência para meio fresco (STAMP & MEREDITH, 1988). Os genótipos estudados foram: a) *Vitis vinifera*: 'Cabernet Sauvignon', 'Cardinal', 'Grenache', 'Sauvignon Blanc', 'Thompson Seedless' e 'White Riesling'; b) *Vitis rupestris*: 'St George' (syn. 'du Lot'; PI 100692); c) *V. vinifera* x *V. rupestris*: 'Ganzinon² 1'; d) *V. longii*. Anteras inoculadas dentro de meio sólido ou dentro de meio líquido sem o suplemento de reguladores de crescimento não se desenvolveram. Após 10 dias de incubação em meio líquido suplementado com reguladores de crescimento, as anteras usualmente tornaram-se marrom luminoso. Elas raramente iniciaram um calo friável enquanto na fase líquida do procedimento da cultura, mas freqüentemente o fizeram quando transferidas para meio sólido ou quando cultivadas inicialmente sobre meio sólido. Algumas anteras iniciaram calos embriogênicos brancos desorganizados no ponto do destacamento do filamento e, após mais ou menos 40 dias de incubação total, pedaços de tecido embriogênico de até 3mm de diâmetro haviam se desenvolvido. O tecido embriogênico foi composto de calos embriogênicos desorganizados, unidades embriogênicas globulares e iniciais de embrião somático. Neste estágio de desenvolvimento as culturas foram transferidas para superfície do meio sólido da mesma formulação e em consequência ocorreu crescimento e maturação dos embriões somáticos e algumas anteras não desenvolvidas iniciaram calos embriogênicos. Após 3 meses de incubação, desenvolveram-se embriões somáticos de anteras de todos os genótipos

testados exceto *Vitis longii*. Elas ou não se desenvolveram ou produziram calos friáveis e raízes adventícias sobre meio contendo reguladores de crescimento. STAMP & MEREDITH (1988) relataram que os embriões se desenvolveram em ambos os casos de anteras de campo e de casa de vegetação e a resposta embriogênica foi aparentemente influenciada pela fonte de antera, meio e procedimento de cultura (sólido ou líquido-sólido). Por exemplo, entre aqueles cultivares nos quais as anteras de casa de vegetação foram cultivadas por ambos os procedimentos ('Cabernet Sauvignon', 'Cardinal', 'White Riesling', 'St. Georges' e 'Ganzin nº 1', os melhores resultados foram obtidos com o procedimento líquido-sólido para 'Ganzin nº 1', enquanto o procedimento sólido produziu os melhores resultados com os outros quatro cultivares. Por outro lado, quando anteras provenientes de vinhedos foram cultivadas por ambos os procedimentos, os melhores resultados foram obtidos com os procedimentos líquido-sólido em todos os casos. No caso de 'White Riesling', no qual ambos os procedimentos foram testados com ambas as fontes de anteras, o procedimento sólido produziu ótimos resultados com anteras de casa de vegetação, enquanto o procedimento líquido-sólido produziu resultados ótimos com anteras desenvolvidas em vinhedos. Em todos os genótipos, exceto dois: 'Cardinal' e 'Sauvignon Blanc', mais que um meio sustentou a embriogênese somática e em alguns, por exemplo 'Thompson Seedless' e 'St. George', vários meios foram efetivos. Também, meios diferentes sustentaram embriogênese

somática ótima em diferentes genótipos, embora certos meios específicos foram efetivos com muitos genótipos. As concentrações 1,0ppm de NOA e 0,2ppm de 6-BA foram ótimas para nove genótipos mesmo variando a fonte do explante (casa de vegetação ou vinhedo) e o método de cultura (sólido ou líquido-sólido). A embriogênese ocorreu apenas em tecidos parentais e nunca em calos friáveis, os quais foram claramente não morfogeneticamente competentes sob as condições teste (STAMP & MEREDITH, 1988). A proliferação do tecido embriogênico ocorreu quando pedaços de 2 a 5mm de diâmetro foram removidos das culturas parentais e incubados sob um fotoperíodo de 16 horas ($40\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sobre meio fresco sólido da mesma formulação, de forma que ele promoveu a embriogênese somática de novo. STAMP & MEREDITH (1988) afirmam ainda que o meio sólido NN suplementado com 1,5ppm de NOA e 0,4ppm de BAP foi efetivo na estimulação da proliferação dos tecidos embriogênicos de todas as fontes.

CAO *et alii* (1989) realizaram um trabalho sobre cultura de anteras onde estas foram colhidas de plantas originadas de cultura de anteras, isto para verificar se a frequência de regeneração de plântulas poderia ser aumentada desta maneira, como ocorre em cultura de cereais. Estes autores confirmaram que a frequência de regeneração de plântulas neste caso é maior do que de anteras colhidas de plantas estoque.

BOUQUET *et alii* (1989), considerando a possibilidade de obter variação somaclonal induzida pela cultura de tecido, estudaram a habilidade embriogênica de tecidos somáticos de anteras de oito cultivares apirenos: Sultanina, Perlette, Delight, Beauty Seedless, Canner Seedless, Sultana Moscata (75 Pirovano), 45 Bruni e 116 Bruni. A indução do calo e a produção de embrião somático para plantinhas dependeram consideravelmente da variedade utilizada. Desse ponto de vista, as que deram melhores resultados foram: 'Sultanina', 'Canner Seedless', '75 Pirovano' e '116 Bruni'. No total 952 plântulas foram obtidas de 3.213 embrióides. A influência do estágio de desenvolvimento da antera sobre os diferentes parâmetros da produção de embrióides foi estudada sobre a variedade 116 Bruni, e mostrou que alguns desses parâmetros são processos antagônicos: a promoção de um resulta geralmente na depressão do outro. A variação somaclonal dentro dos embriões somáticos de 116 Bruni foi observada com a ocorrência de plântulas subletais apresentando deficiência de clorofila (BOUQUET *et alii*, 1989).

Devido aos problemas de dormência encontrados em embrióides desenvolvidos *in vitro* RAJASEKARAN *et alii* (1982) efetuaram um trabalho para tentar verificar as possíveis causas do fenômeno. Sabe-se que sementes de videira recém-colhidas têm uma profunda dormência e requerem uma estratificação a baixa temperatura (4-5°C) por até 3 meses para induzir a germinação. Embriões somáticos de *Vitis* também exibem dormência e têm um requerimento de resfriamento

para germinação (duas a oito semanas a 4°C) (RAJASEKARAN & MULLINS, 1979). Sementes dormentes de muitas espécies, incluindo videiras, contêm altas concentrações de ácido abscísico (ABA). O nível desse hormônio é reduzido pelo resfriamento (estratificação) e o ABA exógeno é um inibidor da germinação e de sementes não dormentes (Chen & Varner, 1973; Milborrow, 1974; Taylorsan & Hendricks, 1977; Walton, 1980 citados por RAJASEKARAN *et alii*, 1982). Nesse trabalho, os autores mediram o ABA com alta precisão em sementes e embriões somáticos de videira (RAJASEKARAN *et alii*, 1982). Esses autores efetuaram medições do conteúdo de ABA livre de calos e de embriões somáticos originados de cultura de anteras de videira em estádios diferentes de desenvolvimento (globular, coração, torpedo e maduro). O conteúdo total de ABA dos embrióides aumentou rapidamente do estágio globular para o maduro e alcançou um máximo (0,22ng) a 60 dias. A taxa de aumento do ABA livre foi quase constante do estágio globular para o torpedo (aproximadamente 15,0pg.d⁻¹), mas declinou do estágio de torpedo até a maturidade (aproximadamente 3,3pg.d⁻¹). O nível global de ABA em tecidos de embriões somáticos, expresso como ng por mg de peso seco, decresceu do estágio globular para o estágio maduro (RAJASEKARAN *et alii*, 1982). Embrióides maduros foram resfriados (4°C) no escuro, por uma, duas, quatro ou oito semanas, quando então foi medido o ABA. Em experimentos paralelos as determinações do ABA foram feitas em embriões somáticos mantidos no escuro a 26°C. O resfriamento levou a uma rápida

redução no conteúdo de ABA e melhorou a germinação. Após 28 dias de resfriamento o ABA total por embrião caiu a um nível similar àquele do estágio globular (0,03ng) e o nível de ABA em base de peso seco caiu a um valor muito baixo, aproximadamente $0,03\text{ng.mg}^{-1}$. O meio de cultura, no qual os embriões somáticos foram estocados durante o resfriamento foram analisados para ABA, mas apenas traços foram detectados. O conteúdo de ABA livre de embriões somáticos maduros que foram mantidos a 26°C , não mudou durante os primeiros 30 dias de estoque, mas declinou a um nível relativamente baixo (0,075ng) após oito semanas. A germinação desses embriões não resfriados (3%) foi muito pobre quando comparada com a germinação de embriões resfriados (100%). RAJASEKARAN *et alii* (1982) efetuaram experimentos adicionais onde um tratamento de resfriamento a 4°C por quatro semanas foi aplicado a embriões em diferentes estádios de desenvolvimento, e os embriões nos estádios globular, coração, torpedo ou maduro resfriados, foram então transferidos para agar (meio NN) para observar a germinação. Encontrou-se que o resfriamento foi efetivo em promover a germinação quando aplicado a todos os estádios de embriogenia. A germinação dos embriões nos estádios globular, coração e torpedo foi precoce, mas todos estes embriões deram origem a uma alta proporção de plântulas normais. Como no caso dos embriões maduros, o efeito do resfriamento sobre a germinação de embriões globulares esteve associada a uma redução marcante na quantidade de ABA endógeno, com base no peso seco.

Embriões globulares não resfriados contiveram $0,76\text{ng.mg}^{-1}$ de ABA, mas quando resfriados a 4°C por quatro semanas a concentração de ABA declinou para $0,12\text{ng.mg}^{-1}$. Os efeitos do resfriamento sobre o ABA e a germinação em sementes de 'Gloryvine' foram similares àqueles de embriões somáticos. A estratificação por oito semanas a 4°C levou a uma redução de 10 vezes no conteúdo de ABA, quando comparado com sementes não resfriadas, e para a germinação, 80%. As sementes não resfriadas não germinaram dentro de 30 dias da semeadura. RAJASEKARAN *et alii* (1982) verificaram também os efeitos do ABA exógeno sobre a germinação de embriões somáticos. Embriões somáticos maduros de 'Gloryvine' foram ou resfriados a 4°C ou mantidos a 25°C por quatro semanas. Esses embriões, resfriados ou não, foram então transferidos para o meio NN contendo ABA ($0-10\mu\text{M}$). A germinação foi registrada após 45 dias. Nenhum dos embriões não resfriados germinou durante o período de teste. Com os embriões resfriados houve 90% de germinação na ausência de ABA, mas houve uma inibição marcante da germinação na presença de ABA. A concentração de ABA para 50% da inibição da germinação de embriões foi de $3,5\mu\text{M}$.

O aumento no ABA é um processo componente na diferenciação dos embriões. Estudos com embriões somáticos de *Vitis* mostraram que: a) o embrião é um sítio de síntese de ABA (MILBORROW & ROBINSON, 1973) e b) a importação de ABA de outras partes da videira (se ocorre) não é importante na aquisição de dormência de embriões de videira (RAJASEKARAN

et alii, 1982). Em sementes e embriões somáticos de 'Gloryvine' está claro que a dormência está associada com um alto conteúdo de ABA endógeno e, que o resfriamento, um tratamento que quebra a dormência e promove a germinação conduz a uma rápida redução no conteúdo de ABA livre. Esta relação entre o resfriamento e os níveis endógenos de ABA foi encontrada na germinação de embriões maduros e na germinação precoce de embriões globulares tratados a frio. Além do mais o ABA exógeno inibiu a germinação de embriões resfriados (RAJASEKARAN *et alii*, 1982). Esses autores propuseram que a redução no ABA em embriões somáticos, que ocorreu em resposta ao resfriamento, tenha sido consequência do metabolismo *in situ* (SONDHEIMER *et alii*, 1974; BARTHE & BULARD, 1978), e a possibilidade de que os tratamentos de baixa temperatura promovam a germinação facilitando a liberação do ABA livre do embrião pode ser descartada, porque o meio de cultura no qual os embriões de 'Gloryvine' foram mantidos durante o resfriamento continha apenas traços de ABA (RAJASEKARAN *et alii*, 1982).

TAKENO *et alii* (1983) estudaram substâncias endógenas semelhantes à giberelina em embriões somáticos de videira (*Vitis vinifera* x *Vitis rupestris* Scheele) em relação à embriogênese e ao requerimento de resfriamento para o desenvolvimento subsequente de embriões maduros. Os embriões foram derivados de cultura de anteras. A partir de seus resultados concluíram que os GAs têm importante papel

na regulação do desenvolvimento e germinação de embriões somáticos (TAKENO *et alii*, 1983).

A videira é altamente susceptível a danos causados por alta concentração salina. Há uma considerável variação genética para tolerância salina no gênero *Vitis*, mas o melhoramento de porta-enxertos por métodos convencionais é um processo a longo prazo (LEBRUN *et alii*, 1985). Entretanto, na tentativa de selecionar *in vitro* plantas de videiras de porta-enxerto *Vitis rupestris* Scheele cv. *Rupestris* St. George, LEBRUN *et alii* (1985) não obtiveram sucesso. Linhas de células e embriões somáticos (derivados de cultura de anteras) que cresceram em meio líquido sob agitação, contendo até 150mM de NaCl, foram isoladas. A exposição de embrióides a NaCl (50-100mM) promoveu o crescimento de embriões somáticos secundários, mas inibiu o desenvolvimento de plântulas. Dentro dos embriões somáticos, o tecido do cotilédone e o do hipocótilo foram mais tolerantes que o tecido das raízes. O alongamento da radícula a partir de embrióides na presença de NaCl (50mM) esteve associado com necrose e morte do tecido da raiz, mas os hipocótilos e os cotilédones permaneceram viáveis e continuaram a produzir calos e embriões somáticos secundários. Por isso os autores questionaram a utilidade da cultura de células na seleção de tolerância a sal (LEBRUN *et alii*, 1985).

2.4. Metodologia da cultura de folhas, pecíolos e caules

O primeiro trabalho sobre embriogênese somática obtida a partir de tecidos de partes vegetativas da videira *in vitro*, foi efetuado por KRUL & WORLEY (1977). FAVRE (1977) relatou a obtenção de organogênese a partir de calos de tecidos de folhas de videira. A organogênese, ou seja, a formação de parte aérea ou de raízes adventícias, não é o ideal em termos de regeneração para fins de melhoramento genético. Para este fim, geralmente busca-se a formação de estruturas dipolares semelhantes a embriões, ou seja, embrióides os quais podem ser individualizados dando origem a plantas inteiras a partir de uma ou poucas células.

KRUL & WORLEY (1977) utilizaram em seus experimentos quatro cultivares de videira: Cabernet Sauvignon e Chardonnay (*Vitis vinifera* L.), Seyval e Ravat 6 (híbridos interespecíficos de *Vitis* de origem complexa). Segmentos desses materiais foram estocados em condições de baixas temperaturas em turfa e Sphagnum úmidos até serem plantados no solo em vasos, em casa de vegetação. Os ramos brotados foram colhidos quando apresentavam mais ou menos 15cm de comprimento. Os explantes utilizados foram internódios de ramos primários, pecíolos de folhas, panículas de flores com os pendúnculos presos e nervuras principais de folhas. Este material foi esterilizado e as áreas danificadas pelo hipoclorito de sódio foram removidas. Estes explantes foram colocados em meio de MS modificado, segundo os autores, pela reti-

rada de caseína hidrolisada e adição de $4,5\mu\text{M}$ de 2,4-D e $0,44\mu\text{M}$ de 6-BA e pelo aumento de sacarose de 20 para 30g.l^{-1} . Os recipientes foram colocados em sala escura a 27°C .

De acordo com KRUL & WORLEY (1977) houve formação de calos em todos os explantes, mas houve maior proliferação em panículas de flores excisadas do que sobre folha, caule e segmentos de pecíolos. As culturas de calos começaram a ficar marrons depois de 2 subculturas a 30 dias de intervalo. Então os calos foram transferidos para o mesmo meio MS, mas com $10,74\mu\text{M}$ de NAA, ao invés de 2,4-D. Os calos de tecidos de 'Ravat 6' e 'Cabernet Sauvignon' não sobreviveram, mas aqueles de 'Seyval' e 'Chardonnay' sim. Depois de 80 dias da iniciação da cultura notaram-se pequenas protrusões brancas semelhantes a embrióides em calos de 'Seyval'. Estes calos com embrióides foram transferidos para meio MS sem reguladores vegetais e sem vitaminas com 20g.l^{-1} de sacarose, e foram incubados na luz (luz branca mais luz incandescente, dando um total de aproximadamente 6.000 lux, num fotoperíodo de 16 horas). A temperatura variou entre 25 e 30°C . Quando os embrióides atingiram um comprimento de 25-30mm eles foram transferidos para tubos de ensaio (25x150mm) contendo meio de cultura, sem reguladores vegetais e sem vitaminas e, com baixo teor de sacarose (os autores não especificam quanto). As plântulas com 50-100mm de altura foram transferidas para potes, tendo como substrato

mistura comercial, sendo cobertas com bequer e adaptadas gradativamente à atmosfera exterior (KRUL & WORLEY, 1977).

KRUL & WORLEY (1977) efetuaram também um estudo histológico dos embrióides desenvolvidos em cultura e dos tecidos adjacentes. De acordo com esses autores, os embrióides adventícios de uva parecem surgir de células únicas, via divisões repetidas. As células embriogênicas, quando contrastadas com células parecidas com meristemáticas do centro de crescimento circular são facilmente identificadas pelos seus núcleos e nucléolos proeminentes, possuindo parede celular e conteúdos citoplasmáticos manchados mais densamente. Todos os embrióides em desenvolvimento observados estavam em áreas adjacentes a células necróticas e os embrióides secundários e terciários estavam freqüentemente associados com áreas necróticas da planta mãe. KRUL & WORLEY (1977) relataram que obtiveram plântulas a partir de embrióides com certa facilidade; seus embrióides não necessitaram de tratamentos a frio e nem de reguladores vegetais para se desenvolverem em plântulas e por isso, consideraram que poderiam ser úteis em estudos comparativos de mecanismos de dormência. Este estudo foi efetuado por RAJASEKARAN *et alii* (1982), os quais demonstraram existir uma certa correlação entre os teores de ácido abscísico e a dormência em embriões e embrióides.

Segundo KRUL & WORLEY (1977) alguns embrióides primários desenvolveram embrióides adventícios na zona de transição do caule e da raiz. Alguns dos embrióides secundários desenvolveram embrióides terciários nas zonas de tran-

sição. Os embrióides estavam sendo produzidos a partir da cultura original, 6 meses após o primeiro embrióide ter sido notado, embora nenhum dos calos originais, tenham permanecido. Assim, bem mais de 50 videiras e várias centenas de embrióides primários, secundários e terciários foram obtidos de um simples aglomerado de calos com um volume de aproximadamente 1cm^3 .

KRUL & WORLEY (1977) afirmaram desconhecer a origem do tecido que produziu os calos embriogênicos em seus experimentos. Todas as folhas isoladas ou inflorescências possuíam resíduos de pecíolo ou pedúnculo. Na época da redação de seu trabalho, KRUL & WORLEY (1977) observaram a formação de embrióides em calos originados de tecidos de caule mantidos em cultura líquida e, estes embrióides não haviam formado embrióides secundários, até então.

Alguns embrióides possuíam folhas primárias malformadas, presumivelmente a partir do tratamento inicial de 2,4-D em cultura. Entretanto, foram formadas folhas normais em crescimento subsequente (KRUL & WORLEY, 1977).

HIRABAYASHI (1985) estudou as condições de indução de embriogênese somática em vinte e seis genótipos de videira a partir de discos de folhas. Folhas maduras, logo após estarem totalmente expandidas, foram esterilizadas e posteriormente perfuradas com um perfurador de cortiça, formando discos de folhas de 6mm de diâmetro, evitando os tecidos da nervura central e das margens. Todos os explantes foram colocados com o lado abaxial para cima sobre o meio e

cultivados em frascos Erlenmayer de 100ml contendo 25ml de meio. O meio basal constou do meio NN modificado, constando dos sais de NN, 100g.l^{-1} de mio-inositol, 2ppm de glicina, 0,5ppm de ácido nicotínico, 0,5ppm de piridoxina HCl, 0,1ppm de tiamina HCl, 20g.l^{-1} de sacarose e 8g.l^{-1} de agar-Difco-Bacto.

O meio basal foi suplementado com várias concentrações de 2,4-D e 6-BA. A cultura foi mantida a 27° sob condições de escuro. Quando os embriões se desenvolveram de discos de folhas cultivados, as culturas foram colocadas sob um regime de luz de 16 horas de fotoperíodo, com 3.000 lux. Inicialmente HIRABAYASHI (1985) testou discos foliares de *V. vinifera* cv. Koshusanjaku em vinte e quatro meios de cultura, os quais diferiam entre si quanto às concentrações de 2,4-D (0; 0,1; 1; 5; 10 e $50\text{ }\mu\text{M}$) combinadas com concentrações de 6-BA (0; 1; 5 e $10\text{ }\mu\text{M}$). Depois de 7 a 10 dias de cultura os tecidos dos calos tornaram-se visíveis a partir da área periférica dos explantes. De acordo com o autor, a proliferação de calos em discos de folhas cultivados sobre meio contendo altas concentrações de 6-BA (5 e $10\text{ }\mu\text{M}$) combinado com 2,4-D, foi muito baixa e nenhum calo se formou em meio sem 2,4-D. A combinação de $0,1\text{ }\mu\text{M}$ de 2,4-D com $1\text{ }\mu\text{M}$ de 6-BA foi a mais favorável para a formação de calos depois de 6 semanas de cultura. Altas concentrações de 2,4-D ($50\text{ }\mu\text{M}$) reduziram a formação de calos de discos de folhas. Depois de 4-6 semanas de cultura, os calos derivados de discos de folhas tornaram-se marrons. Depois de 3-4 meses de cultura,

a formação de embrião somático foi observada sobre meio contendo 2,4-D (5, 10 e 50 μ M) combinados com 10 μ M de 6-BA e, 2,4-D (1, 5 e 10 μ M) combinados com 5 μ M de 6-BA. Os embriões somáticos formaram-se sobre o calo marrom. Em experimentos preliminares não se observou nenhuma formação de embrião somático sobre meio contendo NAA (1 μ M), IAA (10 μ M) com 6-BA (0, 1 e 10 μ M). Para induzir a formação adicional de embriões a partir de discos de folha de videira 'Koshusanjaku', discos de folhas cultivados em meio contendo 2,4-D (1, 5 e 10 μ M) combinados com 6-BA (0, 1, 5 e 10 μ M) por seis semanas, foram transferidos para meio basal e para meio da mesma formulação da cultura primária. Os calos transferidos para meio basal não contendo nem auxina nem citocinina tornaram-se imediatamente marrons. Depois de 6-12 semanas de cultura sobre meio basal, os embriões foram produzidos a partir de calos derivados de discos de folhas cultivados inicialmente em meio contendo 2,4-D (1, 5 e 10 μ M) combinado com 6-BA (5 e 10 μ M). O meio com 2,4-D (10 μ M) combinado com 6-BA (10 μ M) foi o mais favorável para a formação de embrião somático em cultura primária. Quando os calos foram subcultivados sobre o meio contendo a mesma formulação da cultura primária, os embriões e calos embriogênicos foram formados a partir de calos marrons sobre meio contendo 2,4-D (1, 5 e 10 μ M) combinados com 6-BA (5 e 10 μ M) depois de 12 a 20 semanas de cultura secundária. De acordo com HIRABAYASHI (1985) parecem ser necessárias altas concentrações de 6-BA (5 e 10 μ M) combinados com 2,4-D

(1-10 μ M) para a indução de embriogênese somática a partir de discos de folhas cultivados do cultivar Koshusanjaku. O 2,4-D, isoladamente, ou com baixa concentração de 6-BA (1 μ M), não pode induzir embriões somáticos a partir dos discos de folhas cultivados. O autor relata que em seu experimento os embriões foram formados sobre calos marrons depois de cultura prolongada. Calos embriogênicos amarelados, nodulares e de crescimento lento, transferidos para meio basal, desenvolveram-se num grande número de embriões depois de 1-2 meses de cultura. Entretanto, o desenvolvimento de embriões somáticos foi assincrônico. O enraizamento precoce e a formação de calos a partir de embriões somáticos foram freqüentemente observados. Segundo HIRABAYASHI (1985) menos do que 5% de embriões maduros cultivados em meio basal puderam desenvolver-se em plântulas normais. Tratamentos de resfriamento (1 mês a 5°C) e GA₃ (1 μ M) não puderam aumentar o número de plântulas normais formadas a partir de embriões maduros neste experimento. Para estudar os efeitos do genótipo na formação de embriões somáticos, a partir de discos de folhas cultivadas, HIRABAYASHI (1985) utilizou 26 genótipos, os quais foram cultivados em dois meios (um contendo 10 μ M de 2,4-D combinado com 10 μ M de 6-BA e outro contendo 5 μ M de 2,4-D combinado com 5 μ M de 6-BA), onde permaneceram por 6 semanas, sendo daí transferidos para meio basal. Apenas 6 genótipos produziram embriões somáticos de discos de folhas cultivados: os cultivares de *V. vinifera* Koshusanjaku, Neo

Muscat e Kaiji; 3306 Couderc (*V. riparia* x *V. rupestris*); *V. longii* (feminina) e *V. aestivalis* (masculina). Dentro dos genótipos examinados, observaram-se marcantes diferenças sobre a formação de calos e embriões a partir de discos de folhas cultivados.

Tendo em vista a obtenção de embriogênese somática em pecíolos e limbos foliares de oito genótipos de videira REISCH *et alii* (1985) estudaram o crescimento de cultura de calos na presença de concentrações variáveis de auxinas. As auxinas testadas foram o picloram (ácido 4 - amino - 3,5,6 - tricloropicolínico) e o IAA conjugado com três aminoácidos: alanina, fenilalanina e aspartato. Os genótipos utilizados foram *Vitis labrusca* 'Alba', 'Cabernet Sauvignon' (*Vitis vinifera*) e os híbridos interespecíficos: 'Gloryvine'; 'Horizon'; 'Seyval'; 'Remaily Seedless'; 'Vanessa' e 'Vignolis'. Os explantes foram derivados de cultura de ápices de caule em rápida multiplicação e de segmentos dormentes forçados a brotar em laboratório. Os meios utilizados foram tanto líquidos como sólidos.

De acordo com REISCH *et alii* (1985) todos os três conjugados de IAA sustentaram o crescimento da cultura de calos. Quando utilizado numa combinação com $1,0\mu\text{M}$ de 6-BA, IAA-Ala sustentou um bom crescimento de calo a $10\mu\text{M}$, mas ocorreu um excessivo enraizamento a $100\mu\text{M}$. O conjugado IAA-Asp foi inefetivo a 1 e $10\mu\text{M}$, mas produziu um calo prolífico e crescimento de raiz a $100\mu\text{M}$. O conjugado IAA-Phe sustentou um lento crescimento de calos a 1 e $10\mu\text{M}$ de

concentração. A 100 μ M houve uma excelente produção de calos amarelo-bronzeado, com algum bronzeamento aparente na borda dos calos. A concentração ótima de IAA-Phe para o crescimento do calo parece estar entre 10 e 100 μ M. Quando subcultivados em meio com alta concentração de citocinina, continuou um excelente crescimento de calo a partir do calo originalmente produzido, tanto a 100 μ M de IAA-Asp quanto a 100 μ M de IAA-Phe. Não foi observada a formação de parte aérea em nenhum caso. Quanto à utilização de picloram, embora este tenha mostrado ser uma excelente fonte de auxina, sendo altamente efetiva, mesmo a baixas concentrações, nenhuma regeneração foi observada a partir de cultura de calos produzidos em meio contendo esse regulador vegetal.

Adicionalmente, REISCH *et alii* (1985) utilizaram pecíolos para iniciar culturas de calos de acordo com os procedimentos de sucesso de RAJASEKARAN & MULLINS (1981). Dentre os genótipos testados, um caso de embriogênese foi observado para a videira 'Horizon'. Neste caso, um frasco contendo calo derivado de pecíolo numa cultura líquida sob agitação produziu embrióides a aproximadamente 3,5 meses a partir da iniciação da cultura. A presença de embrióides foi confirmada tanto por exame macroscópico como por secções de material fixado. O exame de secções anatômicas confirma a presença de estruturas simétricas bilaterais com anatomia semelhante a embrião. Tentativas de repetir a produção de embrióides não tiveram sucesso (REISCH *et alii*, 1985).

RAJASEKARAN & MULLINS (1981), diferentemente de REISCH *et alii* (1985), não obtiveram embriões em seu trabalho, mas sim a formação ou de parte aérea ou de raízes.

Segundo RAJASEKARAN & MULLINS (1981), o sucesso na obtenção de órgãos adventícios em explantes de *Vitis* é dependente não somente do conteúdo de auxina e citocinina do meio de cultura, mas também do estado de maturidade da planta-mãe e do genótipo.

A dificuldade que alguns autores como KRUL & WORLEY (1977), e REISCH *et alii* (1985) encontraram em repetir o sucesso na obtenção de embriões seguindo a mesma metodologia de seus experimentos anteriores, sugerem que além desses fatores considerados por RAJASEKARAN & MULLINS (1981) existem outros ainda desconhecidos e, portanto, fora do controle dos pesquisadores.

MARCHENCO *et alii* (1988) relataram a obtenção de embriões e plantas inteiras a partir de cultura de explantes de internódios de videira 'Padarok Magaracha' em meio MS com 2,4-D e 6-BA, transferindo os calos obtidos para o mesmo meio basal com NAA e 6-BA. Os autores obtiveram heterogeneidade na morfologia e no número de cromossomos das plantas regeneradas e sugeriram que o procedimento de dois estádios, utilizado, é uma fonte potencial de variação somaclonal e pode ser utilizado no melhoramento.

STAMP & MEREDITH (1988) obtiveram embriogênese somática a partir de folhas de videira em 3 de 7 genótipos

testados. Os cultivares utilizados foram: a) os de *Vitis vinifera*: Cabernet Sauvignon, Grenache e Sultanina; b) os de *V. rupestris*: St. George e PI 100692; c) o híbrido de *V. vinifera* x *V. rupestris*: Ganzin nº 1 e d) um cultivar de *V. longii*. Os explantes foram de folhas inteiras de 1,5-5,0mm de comprimento, que cresciam adjacentes a gemas vegetativas terminais. As folhas foram coletadas de plantas de casa de vegetação, sendo que para 'Cabernet Sauvignon', também foram utilizadas folhas de plântulas originadas de ápices de caule cultivados *in vitro*. Meios de culturas líquidos e sólidos foram testados para 'Cabernet Sauvignon', 'Grenache' e 'St. George', sendo que para os demais cultivares foram testados apenas meios de cultura sólidos. Para 'Cabernet Sauvignon', 'Grenache', 'Sultanina', 'Ganzin nº1' e *Vitis longii*, testaram o meio NN; para 'St. George' foram testados os meios NN e 0,5 x MS; finalmente para o cultivar PI 100692 testaram-se os meios 1 x MS e 0,5 x MS. Quanto aos reguladores vegetais e concentrações utilizadas, STAMP & MEREDITH (1988), procederam da seguinte forma: NOA e 6-BA foram testados em todas as combinações das concentrações de 0 e 1ppm de NOA com 0; 0,2 e 1ppm de 6-BA para os cultivares Cabernet Sauvignon, Grenache, Sultanina e *V. longii*; para os cultivares St. George e Ganzin nº 1 testaram 0; 1,0 ; 1,5 e 2,0ppm de NOA combinados com 0; 0,2; 0,4 e 1,0ppm de 6-BA, bem como 0; 0,1 e 1,0ppm de 2,4-D combinados com 0; 0,2 e 1,0ppm de 6-BA; finalmente para 'PI 100692' testaram a combinação 0; 0,2 e 2,0ppm de NOA combinados com 0; 0,2 e

2,0ppm de 6-BA. Para as culturas de meio sólido, cinco folhas foram inoculadas em placas de Petri de 9cm contendo 20ml de meio. Para cultura líquida, sete folhas foram colocadas em pedaços de papel de filtro de 10x5mm umedecido com meio esterilizado e colocados em frascos cônicos de 125 ml contendo 10ml de meio de cultura, sendo agitado a 80 rpm. Os frascos e as placas de Petri foram selados com Parafilme M. Os explantes de folhas foram incubados com um fotoperíodo de 16 horas ($40\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Explantes de folhas cultivados em meio líquido foram raramente transferidos para meio sólido e, quando foram cultivados inicialmente em meio sólido, não foram transferidos de meio. O meio de cultura utilizado foi baseado no de MS revisado com sais na concentração total (MS) ou na metade (0,5xMS) ou meio NN com $5,57\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. O meio sólido foi geleificado com $7,0\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ de agar Difco-Bacto e todos os meios foram suplementados com $20\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ de sacarose, sendo estes meios suplementados com BAP, 2,4-D ou NOA, conforme descrito acima. Segundo STAMP & MEREDITH (1988) as folhas inoculadas em meio sólido expandiram-se após 1-2 dias; enquanto reguladores vegetais estiveram presentes foram observados calos amarelos luminosos a marrom, friáveis e desorganizados, após aproximadamente 10 dias. Explantes em meio sem suplementos de reguladores vegetais não iniciaram calos friáveis ou raízes adventícias, e todas as folhas cultivadas em meio líquido falharam em iniciar uma resposta embriogênica. Algumas culturas em meios sólidos de folhas iniciaram um calo branco

translúcido embriogênico após 30-40 dias de incubação. Os calos embriogênicos pareceram formar-se diretamente a partir do explante ao invés de calos friáveis, e preferencialmente daqueles tecidos imersos no meio. Pequenas porções da nervura média e do tecido da lâmina adjacente à nervura média, perderam a sua coloração verde translúcida e tornaram-se brancas. Em incubação continuada estes tecidos deram origem a calos embriogênicos. Em uma primeira observação os calos embriogênicos não mostraram nenhuma organização ou diferenciação, mas após incubação adicional, unidades globulares de tecidos de calo branco cremoso foram discerníveis sobre a superfície do calo, e depois desenvolveram-se em embriões somáticos em forma de coração e torpedo. Essas estruturas globulares não apenas se desenvolveram em embriões somáticos individuais, mas, como um resultado de um processo de produção de gema, também iniciaram estruturas globulares adicionais. Dessa maneira, um estado de proliferação de tecido embriogênico foi observado persistir sobre estruturas parentais por mais de 10 semanas.

STAMP & MEREDITH (1988) observaram, também, que os embriões somáticos não se desenvolveram sincronizadamente. Estes embrióides foram facilmente soltos ou separados por agitação em meio líquido e pareceu que eles não estavam atados uns aos outros ou aos explantes paternos. Foi observado, também, que os embriões somáticos maduros possuíam eixos de raiz e de caule, um hipocótilo e comumente dois cotilédones, sendo que algumas vezes alguns embrióides

apresentaram cotilédones fundidos. Os cultivares que apresentaram embriogênese somática a partir de explantes de folhas foram: Cabernet Sauvignon, St. George e PI 200692. No caso de 'Cabernet Sauvignon' obteve-se embriogênese tanto de folhas provenientes de casa de vegetação (8%) (1,0ppm de NOA com 0,2ppm de 6-BA), quanto de folhas provenientes de cultura *in vitro* de ápices de caule (14%) (1,0ppm de NOA com 1,0ppm de 6-BA), no meio básico testado que foi o de NN, sólido. Apenas um experimento foi conduzido com folhas de plantas crescidas em casa de vegetação. Cinco foram conduzidos com folhas de cultura de ápice de caule, com apenas um produzindo embrióides. Os cultivares 'St. George' e PI 200692 produziram embriogênese a partir de folhas provenientes de casa de vegetação. Para o 'St. George' o melhor resultado ocorreu no meio NN com 1,0 ppm de NOA e 1,0ppm de 6-BA. De acordo com STAMP & MEREDITH (1988) embriões somáticos deste cultivar foram obtidos repetidamente com ambos os meios 0,5xMS e NN e NOA, BAP ou 2,4-D, isoladamente, ou em combinações de qualquer auxina com BAP, resultados que os autores não mostraram. Já folhas de *V. rupestris* PI 200692 produziram embriões somáticos nos 2 experimentos realizados, mas apenas em baixa frequência (11%) e apenas quando cultivadas em meio MS suplementado com 1,0ppm de NOA.

Por causa da formação do embrião somático, observada mais freqüentemente no lado inferior de folhas emergidas em meio sólido, dois experimentos foram empreen-

didos nos quais a resposta morfogênética de folhas de *V. rupestris*, inoculadas tanto sobre como abaixo da superfície do meio sólido foi comparada. Os resultados indicaram que a inoculação de explantes de folha abaixo da superfície do meio favoreceram a embriogênese somática (STAMP & MEREDITH, 1988). Os autores consideraram que o tamanho do explante de folha por eles utilizados, o menor e o mais imaturo que eles puderam isolar sem dano foi o fator de sucesso em seu trabalho. Os autores relatam que em experimentos preliminares utilizaram folhas maiores, as quais não sofreram embriogênese somática, e folhas menores não se desenvolveram.

MATSUTA & HIRABAYASHI (1989) estudaram o efeito da composição do meio basal e do tratamento com citocinina na embriogênese somática de tecido de folha de videira 'Koshusanjaku' cultivado *in vitro*, e da indução e manutenção de calos embriogênicos. Nesse trabalho os autores verificaram que a utilização de meio livre de vitamina, inositol e glicina foi um pré-requisito para a indução de um calo embriogênico. Quando cachos de embriões somáticos foram cultivados sobre um meio contendo vitaminas, inositol e glicina formou-se apenas um calo úmido, friável, destituído de habilidade embriogênica e nenhum calo embriogênico foi produzido. Os autores encontraram, também, que as citocininas sintéticas TAG (N-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)-N'-feniluréia) e a KT-30 (N-(Cloro-4-piridil) - N'-feniluréia) foram efetivas para induzir a embriogênese somática a partir do tecido de folha de videira 'Koshusanjaku'.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de cultura *in vitro* da Seção de Genética e da Seção de Viticultura do Instituto Agronômico de Campinas, SP.

A câmara fria utilizada pertence à Seção de Hortalças Diversas, onde a umidade relativa foi mantida a 75% e a temperatura, 2-4°C.

O material vegetal foi coletado em grande parte em vinhedos particulares, localizados em Jundiaí, SP. Em menor quantidade coletou-se material em casa de vegetação localizada no Centro Experimental de Campinas e na Estação Experimental de Jundiaí, SP.

As operações em condições assépticas sempre foram efetuadas em capela de fluxo laminar asséptico marca Veco, modelo HLFS-12 e HLFS-09. Os meios de cultura e água bidestilada utilizados nos experimentos foram esterilizados em autoclave à temperatura de 120°C, com pressão de 1 atm., pelo período de 20 minutos.

No presente trabalho utilizaram-se dois meios de cultura básicos, citados na literatura: o meio de MURASHIGE & SKOOG (1962) (MS) e o meio H de NITSCH & NITSCH (1969). A composição de ambos os meios é fornecida no apên-

dice deste trabalho. Dentro dos experimentos, quando houve variações de algum dos componentes destes meios ou das concentrações utilizadas, fizeram-se as devidas anotações.

3.1. Genealogia dos cultivares utilizados

Devido às diferentes respostas dos cultivares aos meios de cultura utilizados, o que ocorre freqüentemente, tendo em vista diferenças na composição genotípica, dá-se a seguir a genealogia dos cultivares utilizados nos experimentos:

3.1.1. 'Itália', sinônimo 'Pirovano 65' (*Vitis vinifera* L.)

'Bicane'	}	'Itália'
x		
'Moscatel de Hamburgo'		

3.1.2. 'Niagara Rosada' (*Vitis vinifera* L. x *Vitis labrusca* L.)

3.1.3. 'Paulistinha', sinônimo 'Iracema' (IAC 457-11)

'Niagara'	}	'Paulistinha' (IAC 457-11)
x		
'Sultanina' (<i>Vitis vinifera</i> L.)		

3.1.4. 'Maria' (IAC 514-6)

'Highland'	}	IAC 8-2	}	'Maria' (IAC 514-6)		
x						
'Golden Queen'	}					
	}	Jumbo				
'Itália'						
x						
'Sultanina'	}					

3.1.5. 'A Dona' (IAC 871-13)

	'Highland'	}	IAC 8-5	}	'A Dona' IAC 871-13		
	x						
	'Golden Queen'	}					
'Bicane'		}	x				
	x						
	'Pirovano 57'						
	x						
'Poeta Matabon'		}	'Pirovano 215'				
	'Moscatel de Alexandria'	}					
	'Moscatel de Hamburgo'	}	IAC 339-21				
	x						
	<i>Vitis cinerea</i>	}					
		}	x				
	'Niagara Rosada'	}	IAC 544-14				
	x						
	Jumbo	}	IAC 287-2				

3.2. Fontes de material experimental

3.2.1. Estacas com forçamento de brotação

Antes de se utilizar estacas com forçamento de brotação como fonte de material experimental, efetuaram-se alguns experimentos para verificar se algum dos substratos testados poderia superar a água em termos de rapidez e uniformidade de brotação.

Os materiais vegetais utilizados nestes experimentos, 'Maria' e 'Iracema', foram coletados na Chácara Extra-Vitis na época da poda (agosto/setembro de 1988). As estacas lignificadas, dormentes, foram cortadas com mais ou menos 6 gemas, tratadas com o fungicida Captan (2%), guardadas dentro de sacos de polietileno transparentes, que foram amarrados com barbantes e colocados na câmara fria.

Para a avaliação do estágio de desenvolvimento das gemas brotadas, utilizou-se, em todos os experimentos uma escala de notas, segundo PEDRO JR. *et alii* (1989), Tabela 1.

3.2.1.1. Experimento nº 1

O material vegetal utilizado foi o híbrido apireno 'Iracema'. Após seis dias em câmara fria, as estacas foram retiradas, cortadas em segmentos com três gemas, sendo que a última foi inutilizada, e distribuídas nos tratamentos.

Tabela 1 - Escala de notas para os diferentes estádios do desenvolvimento vegetativo da videira 'Niagara Rosada' (Segundo PEDRO JR. *et alii*, 1989).

NOTA	CARACTERÍSTICA
1	gema dormente
2	gema algodão
3	ponto verde
4	saída da folha
5	uma folha aberta (folha separada)
6	até 3 folhas abertas (cacho visível)
7	até 4 folhas abertas (cacho visível)
8	mais de 4 folhas abertas (cacho separado)
9	pré-florescimento (botões florais separados)
10	florescimento
11	pós-florescimento (formação do fruto)
12	chumbinho
13	grão-de-café
14	meia baga
15	verde
16	"de vez" (amadurecendo)
17	madura (colheita)

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições, sendo que cada parcela constou de 10 frascos com uma estaca cada. Para a comparação das médias dos tratamentos com a testemunha, no caso a água, utilizou-se o teste de Dunnett bilateral, ao nível de 5% de probabilidade.

A sala de cultura ficou com temperatura variando entre 25 e 30°C, ocorrendo as mais baixas durante a noite; o fotoperíodo foi de 24 horas e a luz foi provida por lâmpadas fluorescentes gro-lux, com intensidade luminosa que variou de 13,5 a 49,1 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ao nível da brotação.

Os tratamentos utilizados, constaram de doses de 2 substâncias em soluções aquosas (Tabela 2), nas quais as bases das estacas foram mergulhadas. A cianamida hidrogenada foi fornecida através do produto Dormex da SKW Trostberg, da Alemanha, o qual possui 49% do ingrediente ativo (CH_2CN_2) .

O experimento durou um mês e nesse período foram efetuadas cinco avaliações. As soluções foram trocadas duas vezes, uma e três semanas após a instalação do experimento.

Tabela 2 - Substratos em solução aquosa utilizados no experimento nº 1 de estacas com forçamento de brotação.

NÚMERO	TRATAMENTO	CONCENTRAÇÃO
1	água bidestilada (controle)	-
2	cianamida hidrogenada	245,0ppm
3	cianamida hidrogenada	367,5ppm
4	cianamida hidrogenada	490,0ppm
5	6-benzilaminopurina	10 μM
6	6-benzilaminopurina	15 μM
7	6-benzilaminopurina	20 μM
8	6-benzilaminopurina	25 μM

3.2.1.2. Experimento nº 2

O material vegetal utilizado foi o híbrido apireno 'Maria'. Após 34 dias em câmara fria, as estacas foram retiradas, cortadas em segmentos com três gemas, sendo a última inutilizada e as extremidades basais submetidas aos

tratamentos (Tabela 3). O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com cinco repetições, sendo que cada parcela constou de 10 frascos com uma estaca cada. Ao nível de bloco fêz-se uniformização das estacas, quanto ao comprimento do internódio e espessura. Para a comparação dos tratamentos com a testemunha, no caso a água, utilizou-se o teste de Dunnett bilateral, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 3 - Substratos em solução aquosa utilizados no experimento nº 2 de estacas com forçamento de brotação.

NÚMERO	TRATAMENTO	CONCENTRAÇÃO
		---- ppm ---
1	água bidestilada (controle)	-
2	ácido naftalenacético	200,0
3	ácido giberélico	20,0
4	cianamida hidrogenada	9,8
5	calcicocianamida	200,0
6	6-benzilaminopurina	100,0

Utilizou-se um regime de luz direta cuja intensidade variou de 13,5 a $49,1 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, provida por lâmpada gro-lux e temperatura de 28-30°C. Após 48 horas as bases das estacas foram lavadas em água corrente e as soluções foram substituídas por água, a qual foi renovada semanalmente. Foi medido o pH das soluções utilizadas, o qual é mostrado na Tabela 4.

O ácido giberélico foi fornecido através do produto KGA, o Gibrel da Merck Sharp Dohme, o qual possui 2% de GA_3 .

Tabela 4 - pH das soluções utilizadas no experimento nº 2 de estacas com forçamento de brotação.

SOLUÇÃO	pH
água bidestilada	7,0
ácido giberélico	6,8
cianamida hidrogenada	6,8
ácido naftalenacético	9,6
6-benzilaminopurina	8,5
calcio cianamida	10,3

Durante os quinze dias de duração do experimento foram feitas duas avaliações, uma após 10 dias e outra após 15 dias, onde se anotou a quantidade de gemas que brotaram (superior e inferior), o estágio de seu desenvolvimento e a presença de raízes.

3.2.1.3. Experimento nº 3

Após 85 dias, estacas do cultivar Maria foram retiradas da câmara fria e cortadas em segmentos com três gemas, sendo que a última foi inutilizada. As extreminades basais foram submetidas aos tratamentos com substratos em solução aquosa (Tabela 5).

O pH de todas as soluções foi acertado para 6,0, que foi o encontrado para a água bidestilada. Utilizou-se um regime de luz direta cuja intensidade variou de 13,5 a $49,1 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, providos por lâmpadas gro-lux e a temperatura variou de 28-30°C. Após 48 horas as bases das estacas foram lavadas em água corrente e as soluções foram substituídas por água, a qual foi renovada semanalmente.

Tabela 5 - Substratos em solução aquosa utilizados no experimento nº 3 de estacas com forçamento de brotação.

NÚMERO	TRATAMENTO	CONCENTRAÇÃO
		---- ppm ---
1	água bidestilada	-
2	6-benzilaminopurina	20
3	calcicocianamida	20
4	ácido naftalenacético	20

Uma avaliação foi realizada 9 dias após a instalação do experimento, onde anotaram-se o número de gemas brotadas e o seu respectivo estágio de desenvolvimento. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com cinco repetições. Os dois primeiros blocos constituíram-se de estacas finas (área transversal $29,4\text{mm}^2$ em média) e os outros três constituíram-se de estacas mais grossas (área transversal $59,5\text{mm}^2$ em média).

Após efetuar-se a análise de variância, foram realizados os testes de Dunnett e Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para a comparação das médias.

3.2.1.4. Experimento nº 4

Utilizaram-se estacas do cultivar Maria. Após 132 dias, as estacas foram retiradas da câmara fria, sendo selecionadas aquelas com diâmetro de aproximadamente 8mm, internódios uniformes, cortando-as com 3 gemas num comprimento aproximado de 21cm. A última gema foi inutilizada.

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com cinco repetições, sendo que cada parcela constou de 20 frascos. Os tratamentos foram aplicados por 48 horas (Tabela 6). Após isto, as bases das estacas foram lavadas e colocadas em água de torneira. O pH da água era de 6,6 e as soluções de 6-BA foram acertadas para esse pH.

Fez-se uma avaliação dez dias após a instalação do experimento, onde anotou-se o número de gemas brotadas, o estágio de desenvolvimento destas gemas e o número de inflorescências encontradas.

As estacas foram deixadas no fotoperíodo de 24 horas, sob lâmpadas gro-lux, com uma intensidade luminosa que variou de 13,5 a $49,1 \mu E.m^{-2}.s^{-1}$ ao nível das gemas. A temperatura variou entre 25 a 30°C.

Realizou-se a análise de variância do experimento.

Tabela 3 - Substratos em solução aquosa utilizados no experimento nº 4 de estacas com forçamento de brotação.

NÚMERO	TRATAMENTO	CONCENTRAÇÃO
		---- ppm ---
1	água de torneira	-
2	6-benzilaminopurina	10
3	6-benzilaminopurina	20

3.2.2. Plântulas originadas de ápices meristemáticos cultivados *in vitro*

Para os experimentos de cultura de plântulas, visando à obtenção de embriões somáticos (item 3.5), foram utilizadas plântulas originadas de cultura de ápices meristemáticos do cultivar Maria. Estes foram coletados em laboratório, de estacas forçadas a brotar, dissecados em câmara asséptica, deixados com 2-3 primórdios foliares e inoculados em meio de pré-incubação (MP) e deixados por 3-7 dias na penumbra. Estes ápices meristemáticos foram inoculados em meio primário, que constou dos meios de MS ou NN acrescidos de 0, 2, 4, 6 e 8 μ M de 6-BA. Foram transferidos, sendo multiplicados e passados para outros meios de MS e de NN, em que se variou a concentração de reguladores vegetais (6-BA e 2iP), sendo que as plântulas foram utilizadas com 4 a 10 meses de permanência *in vitro*.

Antes de serem utilizadas, fez-se uma classificação dessas plântulas de acordo com o seu aspecto externo. Utilizaram-se cinco classes, sendo que a classe número 1 é a de plantas normais, bem desenvolvidas, enraizadas, correspondendo à nota máxima. À classe número 2 pertencem plantas em ótimo estado, também enraizadas, um pouco menos desenvolvidas que as da classe 1, mas cuja altura já alcança o nível do parafilme. A classe 3 é composta de plantas um pouco menos desenvolvidas que as duas anteriores, mas têm ainda um bom aspecto. As de classes 4 e 5 são de aspecto

ruim, ou seja, pouco desenvolvidas, apresentando partes oxidadas e/ou vitrificadas, sendo que as classificadas na classe 5 são as piores.

3.3. Cultura de óvulos não fertilizados

3.3.1. Grupo de experimentos nº 1

Utilizaram-se inflorescências dos seguintes cultivares apirenos de videira: A Dona, Iracema e Maria, coletadas em casa de vegetação no Centro Experimental de Campinas, SP.

As inflorescências foram colhidas antes da antese, lavadas com água de torneira, esterilizadas com uma solução comercial de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 20% durante 20 minutos sob agitação. Após isto foram efetuadas três lavagens com água esterilizada, sob agitação durante 10 minutos cada, sempre sob capela de fluxo laminar asséptico.

As flores foram dissecadas com pedaços de lâminas de barbear, montados em varetas e esterilizados com álcool. Os óvulos foram retirados com agulhas também montadas em varetas e esterilizadas em álcool, e foram inoculados em meio de pré-incubação (MP).

A Tabela 7 mostra o número de óvulos inoculados por ensaio, em meio de placa.

Tabela 7 - Número de óvulos inoculados por ensaio, em meio de placa, no Grupo de Experimentos nº 1.

ENSAIO	CULTIVAR	ÓVULOS INOCULADOS EM MP
A	A Dona	100
B	Iracema	236
C	Iracema	135
D	Maria	160
E	Maria	164
F	Maria	190
G	Maria	131
TOTAL		1.116

Fez-se a primeira avaliação dois dias após inoculação em meio de pré-incubação para evitar que as contaminações que porventura houvessem, espalhassem-se pela placa, como ocorreu no ensaio A onde, excepcionalmente, fez-se a avaliação 5 dias após. A inoculação dos óvulos viáveis em meio primário foi feita no mesmo dia da avaliação.

O meio primário foi o de NN, acrescido de cisteína ($500\mu\text{M}$), caseína hidrolisada (2g.l^{-1}) e agar (8g.l^{-1}). Testaram-se quatro concentrações de 2,4-D com uma concentração de 6-BA (Tabela 8).

Tabela 8 - Concentrações de 2,4-D e de 6-BA utilizadas no Grupo de Experimentos nº 1 de óvulos não fertilizados.

TRATAMENTO	6-BA	2,4-D
	----- μM -----	
1	1,0	0,1
2	1,0	1,0
3	1,0	2,0
4	1,0	2,5

Os óvulos, uma vez inoculados em meio primário, foram avaliados semanalmente, para descartar os contaminados e verificar o aparecimento de calos.

A incubação foi feita na luz a uma intensidade luminosa que variou de 27,8 a 41,8 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16h e temperatura entre 25 e 28°C.

3.3.2. Grupo de experimentos nº 2

O material vegetal utilizado constou de inflorescências dos seguintes cultivares de videira: Niagara Rosada, Itália, A Dona e Maria, de onde os óvulos foram excisados, coletadas em casa de vegetação no Centro Experimental de Campinas, SP.

As inflorescências foram colhidas entre 7 e 15 dias antes da antese, esterilizadas em uma solução comercial de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 20% durante 20 minutos, sob agitação. A seguir foram efetuadas 3 lavagens com água esterilizada, sob agitação, durante 10 minutos cada, sempre sob capela de fluxo laminar asséptico.

As flores foram dissecadas sob lupa estereoscópica com pedaços de lâmina de barbear montados em varetas, as quais já haviam sido previamente esterilizadas com álcool. Os óvulos foram retirados com agulhas também montadas em varetas da mesma forma esterilizadas, e foram inoculados em meio de pré-incubação (MP). Após a retirada dos inviáveis (1ª avaliação) inoculou-se em meio primário. O número de

óvulos inoculados dos respectivos cultivares é dado na Tabela 9.

Tabela 9 - Número de óvulos inoculados por ensaio, no Grupo de Experimentos nº 2.

ENSAIO	CULTIVAR	Nº DE ÓVULOS INOCULADOS EM MP
A	Niagara Rosada	80
B	Niagara Rosada	140
C	Niagara Rosada	80
D	Itália	236
E	A Dona	200
F	A Dona	150
G	Maria	200
H	Maria	200
I	Maria	300
TOTAL		1.586

O meio primário utilizado foi o NN acrescido de cisteína 500µM. Para os ensaios de A e D utilizou-se meio solidificado com 7,0g.l⁻¹ de agar, sendo inoculados quatro óvulos por frasco e mantidos no escuro.

Para os ensaios de E a I utilizou-se meio líquido, sendo utilizados 50 óvulos para 50ml de meio, colocados em Erlenmeyer de 350ml, embrulhados em papel alumínio e deixados sob agitação, em agitador rotativo elétrico. A temperatura de incubação variou de 25 a 28°C.

Dentro do teste dos meios sólidos e líquidos estudaram-se em meio primário os tratamentos constantes da Tabela 10.

Tabela 10 - Concentrações de reguladores vegetais utilizadas em meio primário no Grupo de Experimentos nº 2 de cultura de óvulos não fertilizados.

TRATAMENTO	6-BA	2,4-D	NOA
	----- μM -----		
1	1	5	0
2	2	10	0
3	1	0	5
4	5	0	5

A segunda avaliação foi efetuada na ocasião da transferência para meio secundário. O meio secundário foi idêntico ao primário, com exceção dos tratamentos (Tabela 11). Também foram efetuados meios sólidos e líquidos para os respectivos tratamentos.

Tabela 11 - Concentrações de reguladores vegetais utilizadas em meio secundário no Grupo de Experimentos nº 2 de cultura de óvulos não fertilizados.

TRATAMENTO	6-BA	2,4-D	NOA
	----- μM -----		
1	1	5	8,25
2	1	10	0

Foram efetuadas avaliações e seleções frequentes para eliminação dos contaminados, sendo a última avaliação para encerrar o experimento.

3.3.3. Experimento nº 3

O material vegetal constou de inflorescências do cultivar Itália coletadas em vinhedo particular em Jundiaí, SP. As inflorescências foram coletadas em três estádios diferentes de maturação e dessa forma obtiveram-se os tratamentos: A (cacho de flores mais maduras - 1 dia antes da antese), B (maturação intermediária - 5 dias antes da antese e C (menos madura - 7 dias antes da antese).

Fez-se a esterilização superficial das flores com 20% de uma solução comercial de hipoclorito de sódio (NaOCl) por 20 minutos, após o que lavaram-se-as 3 vezes com água destilada.

As flores foram dissecadas sob lupa estereoscópica em capela de fluxo laminar asséptico e os óvulos inoculados em meio de placa (MP) e após 3 a 7 dias foram inoculados em meio primário, que constou do meio de NN sem biotina acrescido de $6g.l^{-1}$ de agar mais 6-BA em concentrações variadas e com ausência ou presença de cisteína ($500\mu M$) (Tabela 12).

Foram inoculados 10 óvulos por frasco utilizando-se quatro frascos por tratamento, dando um total de 960 óvulos inoculados.

Os frascos foram inoculados no escuro por 5 dias e posteriormente, após a 1ª avaliação, colocados sob luz.

Tabela 12 - Tratamentos utilizados em meio primário para o experimento nº 3 de cultura de óvulos não fertilizados.

TRATAMENTO	6-BA	CISTEÍNA	ÉPOCA DE COLETA
	-- μM --		
1	5,0	-	ABC
2	10,0	-	ABC
3	15,0	-	ABC
4	20,0	-	ABC
5	5,0	+	ABC
6	10,0	+	ABC
7	15,0	+	ABC
8	20,0	+	ABC

A temperatura da sala de incubação esteve sempre ao redor de $25-28^{\circ}\text{C}$, no fotoperíodo de 16 horas. A intensidade luminosa provida por lâmpadas gro-lux variou de 12,1 a $23,8\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Foram efetuadas 3 avaliações, uma aos 5 dias, uma aos 10 dias e outra aos 15 dias.

Após quinze dias, os óvulos viáveis foram transferidos para meio secundário, o qual constou do meio NN, mais cisteína ($500\mu\text{M}$), caseína hidrolisada ($2\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$), sacarose ($20\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$) e agar ($7\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$). Os reguladores vegetais utilizados foram 6-BA ($1,0\mu\text{M}$) e NOA ($10\mu\text{M}$).

Um mês após a transferência para meio secundário fez-se a última avaliação e encerrou-se o experimento.

3.3.4. Experimento nº 4

O material vegetal utilizado constou de inflorescências do cultivar apireno A Dona colhidas 4 a 6 dias

antes da antese, em casa de vegetação localizada no Centro Experimental de Campinas, pertencente ao Instituto Agronômico, Campinas, São Paulo.

As flores foram esterilizadas superficialmente com 20% de uma solução comercial de hipoclorito de sódio (NaOCl) por 20 minutos, e depois lavadas três vezes com água destilada.

As flores foram dissecadas em capela de fluxo laminar asséptico e os óvulos inoculados diretamente em meio primário para evitar a contaminação, pois neste experimento utilizaram-se apenas meios líquidos, a fim de diminuir a oxidação verificada no experimento anterior. Os frascos foram incubados no escuro por 10 dias, após o que foram transferidos para luz, onde a intensidade luminosa variou de 12,1 a $23,8 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ providos por lâmpadas gro-lux, o fotoperíodo foi de 16 horas e a temperatura esteve entre 25 e 28°C . Os tratamentos utilizados constam da Tabela 13. O meio de cultura básico foi o de NN acrescido de cisteína ($500 \mu\text{M}$). Foram utilizados 3 frascos por tratamento, cuja distribuição de óvulos consta da Tabela 14.

Após dez dias em meio primário, no escuro, os explantes foram transferidos para meio secundário, sendo que a metade dentro de cada tratamento foi passada para luz e a outra metade permaneceu no escuro, onde foram deixados por 15 dias.

Tabela 13 - Tratamentos utilizados em meio primário para o experimento nº 4 de cultura de óvulos não fertilizados.

TRATAMENTOS	SACAROSE	2,4-D	NOA	6-BA
	-- g.l ⁻¹ --	----- µM -----		
1	10	5	5	0
2	10	5	0	1
3	10	5	0	0,45
4	10	10	0	2,0
5	10	0	10	1,0
6	5	5	5	0
7	5	5	0	1
8	5	5	0	0,45
9	5	10	0	2,0
10	5	0	10	1

Tabela 14 - Distribuição dos óvulos por frasco e por tratamento no experimento nº 4 de cultura de óvulos não fertilizados.

TRATAMENTOS	FRASCO 1	FRASCO 2	FRASCO 3	TOTAL
1	9	12	12	33
2	10	12	12	34
3	11	12	12	35
4	10	11	12	33
5	12	10	12	34
6	11	12	12	35
7	12	12	12	36
8	12	11	12	35
9	11	11	10	32
10	12	10	12	34
TOTAL				341

O meio secundário constou do meio de NN com os seguintes tratamentos:

1. Sacarose 10g.l⁻¹ + 10µM de NOA + 1µM de 6-BA

2. Sacarose 5g.l⁻¹ + 10µM de NOA + 1µM de 6-BA

Após 15 dias todos foram transferidos para novo meio de indução com a solução básica de NN acrescida de:

1. Sacarose 10g.l^{-1} + $30\mu\text{M}$ de 2,4-D + $6,0\mu\text{M}$ de 6-BA

2. Sacarose 5g.l^{-1} + $30\mu\text{M}$ de 2,4-D + $6,0\mu\text{M}$ de 6-BA

Depois de permanecerem 10 dias nesse meio voltaram para o meio secundário.

3.4. Cultura de Anteras

3.4.1. Grupo de Experimentos nº 1

Anteras do cultivar Maria foram coletadas de flores provenientes de estacas forçadas a brotar em laboratório, tendo água como substrato. As estacas estavam há 3 meses em câmara fria.

As flores após serem coletadas foram deixadas em geladeira por 3 dias, e depois dissecadas sob lupa estereoscópica; as anteras foram retiradas e inoculadas em meio de cultura primário. Estabeleceu-se neste ensaio um determinado estágio do desenvolvimento da flor, em que o cálice cobria mais da metade da flor. Foram instalados 4 ensaios, sendo que em apenas um (Ensaio A) esterilizaram-se as flores (Tabela 15).

O meio de cultura primário utilizado foi o de NN acrescido de 7g.l^{-1} de agar (com exceção do tratamento 8) e $500\mu\text{M}$ de cisteína. Foram inoculadas aproximadamente 20 anteras por frasco (frascos redondos de 100ml), com 30ml de meio. Os tratamentos utilizados são dados na Tabela 16.

Tabela 15 - Particularidades dos ensaios do Grupo de Experimentos nº 1 de cultura de anteras.

ENSAIO	ESTERILIZAÇÃO	TRATAMENTOS UTILIZADOS
A	sim	1 ao 30
B	não	1 ao 30
C	não	1 ao 30
D	não	1 ao 30

Tabela 16 - Concentrações de NOA e 6-BA (ppm) utilizadas em meio primário no Grupo de Experimentos nº 1 de cultura de anteras.

Nº DE TRATAMENTO	NOA	6-BA
	--- ppm ---	--- ppm ---
1	0	0
2	0	0,2
3	0	0,4
4	0	0,6
5	0	0,8
6	0	1,0
7	0,5	0
8	0,5	0,2
9	0,5	0,4
10	0,5	0,6
11	0,5	0,8
12	0,5	1,0
13	1,0	0
14	1,0	0,2
15	1,0	0,4
16	1,0	0,6
17	1,0	0,8
18	1,0	1,0
19	1,5	0
20	1,5	0,2
21	1,5	0,4
22	1,5	0,6
23	1,5	0,8
24	1,5	1,0
25	2,0	0
26	2,0	0,2
27	2,0	0,4
28	2,0	0,6
29	2,0	0,8
30	2,0	1,0

Após a inoculação em meio primário o material foi incubado no escuro sob temperatura que variou de 25 a 28°C.

Fez-se uma avaliação para retirar os contaminados dentro do período de incubação no escuro e anotaram-se os tratamentos que deram calos dentro de cada ensaio.

Após um período que variou de 20 a 28 dias, dependendo do ensaio, fez-se nova avaliação e o material que apresentou calo foi passado para luz sem se fazer a transferência para meio fresco, o que se fez dentro de dois dias. Esses calos foram passados para o mesmo meio em que foram induzidos e, quando num frasco havia mais de um calo, testaram-se os meios de tratamentos que deram mais calos, quais sejam: 9, 12 e 14.

Sem ainda algum sinal de embriogênese, passaram-se todos os calos para meio NN sem hormônios após 27-28 dias.

3.4.2. Grupo de experimentos nº 2

Inflorescências de videira do cultivar Maria foram colhidas de estacas forçadas a brotar em laboratório, após ficar em câmara fria aproximadamente 7 meses. As inflorescências foram colocadas em geladeira durante 7 dias, quando então extraíram-se as anteras e colocaram-se-as em meio de placa com carvão (MP).

O meio primário utilizado para todos os ensaios constou do meio NN com $7g.l^{-1}$ de agar. Os tratamentos são dados na Tabela 17.

Fizeram-se 8 ensaios cujas particularidades constam da Tabela 18.

As anteras, num total de 2.450, foram distribuídas nos tratamentos de acordo com a Tabela 19.

Os frascos foram colocados em caixas altas, cobertas com papel alumínio.

Após 32 dias da inoculação das anteras dos ensaios A e B em meio primário e 26 dias após a instalação do último ensaio (H) fêz-se a primeira avaliação. Os frascos com explantes que deram calos foram passados para a luz, permanecendo no mesmo meio por ainda dez dias, findos os quais foram transferidos para meio NN com 1,5ppm de NOA e 0,4ppm de 6-BA.

Os frascos que não deram calos permaneceram incubados no escuro. Fêz-se uma segunda avaliação, um mês após a primeira, para verificar o possível aparecimento de novos calos. E, quando ocorreu, passou-se para o meio já referido.

Após três meses fez-se a última avaliação, para verificar a formação de novos calos no escuro e se houve formação de embriões no material incubado na luz.

A sala de incubação forneceu o fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de $25-28^{\circ}C$ e a intensidade luminosa variou de $12,1$ a $23,8\mu E.m^{-2}.s^{-1}$.

Tabela 17 - Tratamentos aplicados em meio primário no Grupo de Experimentos nº 2 de cultura de anteras.

TRATAMENTO	NOA	6-BA	PROLINA
	----- ppm -----		(50 ppm)
1	0,5	0,2	+
2	0,5	0,4	+
3	0,5	0,6	+
4	0,5	0,8	+
5	0,5	1,0	+
6	0,5	0,2	-
7	0,5	0,4	-
8	0,5	0,6	-
9	0,5	0,8	-
10	0,5	1,0	-
11	1,0	0,2	+
12	1,0	0,4	+
13	1,0	0,6	+
14	1,0	0,8	+
15	1,0	1,0	+
16	1,0	0,2	-
17	1,0	0,4	-
18	1,0	0,6	-
19	1,0	0,8	-
20	1,0	1,0	-

Tabela 18 - Particularidades dos ensaios do Grupo de Experimentos nº 2 de cultura de anteras.

ENSAIO	ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO DA ANTERA	PLACA DE PETRI EM GELADEIRA
A	verdes	não
B	amarelas	não
C	verdes	sim
D	amarelas	sim
E	amarelas	sim
F	verdes	não
G	verdes	não
H	amarelas	não

Tabela 19 - Distribuição das anteras nos tratamentos, dentro de cada ensaio no Grupo de Experimentos nº 2.

ENSAIO	TRATAMENTOS	Nº DE ANTERAS POR FRASCO	TOTAL
A	1 a 20	10	200
B	1 a 20	10	200
B	1 a 10	5	50
C	1 a 20	10	200
C	1 a 10	5	50
D	1 a 20	10	200
E	1 a 20	10	200
E	1 a 20	10	200
F	1 a 20	10	200
F	15 a 20	10	60
F	6 a 10	20	100
F	1 a 5	20	100
F	17, 18, 19 e 20	20	80
G	1 a 20	10	200
G	3 e 5	20	40
H	1 a 19	10	190
H	7, 9, 10 e 14	20	80
H	2, 6, 8, 11 e 14	20	100
TOTAL			2.450

3.5. Cultura de Plântulas

3.5.1. Experimento nº 1

Utilizou-se material vegetativo originário de cultura de ápice meristemático de caule do cultivar Maria. Plântulas que, *in vitro*, encontravam-se superbrotadas ou estagnadas e, portanto, com dificuldades para se desenvolver, foram cortadas de forma a separar as brotações e, colocadas *in vitro*, no meio de incubação, como se estivessem sendo plantadas, sem raízes. Nesse experimento, todos os

explantes utilizados pertenciam à classe 5. O meio primário, no qual os ápices meristemáticos que deram origem às plântulas assim classificadas, se desenvolveram inicialmente é dado na Tabela 20. Os explantes desenvolvidos em concentração zero de 6-BA não chegaram a dar folhas, nem tampouco a se ramificar.

Tabela 20 - Número de plântulas da classe 5 provenientes de cultura de ápices meristemáticos de caule do cultivar Maria, utilizados no Experimento nº 1 de cultura de plântulas, e sua distribuição quando em meio primário.

MEIO DE CULTURA	CONCENTRAÇÕES DE 6-BA (μ M)					TOTAL
	0	2	4	6	8	
	----- n° -----					
NN	4	1	2	3	0	10
MS	8	2	2	3	5	20
TOTAL	12	3	4	6	5	30

Depois desse meio primário, onde permaneceram por 3 meses, com passagem mensal para meios frescos, esse material passou para meio com 6-BA e 2iP em diversas concentrações, resultando de qualquer forma em plântulas estagnadas, oxidadas e vitrificadas, sem condições de se desenvolverem.

Como esse material utilizado como explante, originou-se de cultura *in vitro*, não houve necessidade de proceder-se à esterilização. O meio de incubação utilizado

foi o de NN acrescido de 1,5ppm de NOA e 0,4ppm de 6-BA. Onze frascos foram inoculados na luz e quatro no escuro. A temperatura da sala de cultura foi controlada a um máximo de 28°C, mas alguns dias frios ocorreram nos quais temperaturas mais baixas não puderam ser evitadas.

O fotoperíodo foi de 16 horas, provido por lâmpadas gro-lux, onde a intensidade luminosa variou de 12,1 a 23,8 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, ao nível do meio de cultura e 12,8 a 37,1 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ao nível da plântula. O material permaneceu incubado nesse meio durante dois meses, quando em alguns tratamentos observou-se o aparecimento dos primeiros embriões em estádios iniciais de desenvolvimento. Esses embriões foram sendo transplantados de meio para se desenvolverem e, quando já eram plântulas foram transferidos para frascos com terra + vermiculita, esterilizados, tampados com parafilme. O parafilme foi sendo furado aos poucos e as folhinhas expostas ao ambiente externo a fim de se adaptarem ao novo ambiente. Enquanto permaneceram nesses frascos, foram irrigadas, em dias alternados com 0,25 x MS, utilizando-se apenas a solução salina. Plântulas adaptadas foram sendo transplantadas para sacos plásticos de 34cm de altura e 14cm de diâmetro com terra esterilizada.

3.5.2. Experimento nº 2

Neste experimento utilizou-se o mesmo tipo de explante do experimento anterior, isto é, material estagna-

do, superbrotado ou vitrificado originário de cultura *in vitro* de ápices meristemáticos de caule de videira 'Maria', pertencentes às classes 4 e 5.

Da mesma forma que no experimento anterior, as plântulas foram cortadas de forma a separar as brotações e, colocadas *in vitro*, no meio primário, como se estivessem sendo plantadas, sem raízes. O meio primário (NN acrescido de NOA, 6-BA e prolina) e o número de repetições em cada tratamento (luz e escuro) são dados na Tabela 21. Cento e sete explantes foram incubados no escuro e trinta e oito na luz. As condições de luz e temperatura foram idênticas às do experimento anterior.

Esses materiais permaneceram incubados no mesmo meio primário em condições respectivas de luz e escuro por três meses e meio aproximadamente, quando então foram passados para meio fresco e todos foram expostos à luz. Este meio secundário constou do meio de NN acrescido de 1,5ppm de NOA e 0,4ppm de 6-BA. Permaneceram neste meio por aproximadamente três meses, findos os quais foram passados para meio fresco da mesma formulação anterior.

Durante todo o período efetuaram-se várias avaliações onde anotou-se a presença de explantes, com calos, oxidados e com indícios de embrióides.

Tabela 21 - Tratamentos e composições do meio primário para o experimento nº 2 de cultura de plântulas, bem como o número de repetições utilizadas em cada tratamento.

TRATAMENTO	PROLINA	6-BA	NOA	NÚMERO DE REPETIÇÕES	
				ESCURO	LUZ
	-- 50ppm --	--- ppm ---			
1	+	0,2	0,5	5	2
2	+	0,4	0,5	5	1
3	+	0,6	0,5	5	1
4	+	0,8	0,5	5	2
5	+	1,0	0,5	4	2
6	-	0,2	0,5	4	1
7	-	0,4	0,5	5	1
8	-	0,6	0,5	5	1
9	-	0,8	0,5	5	1
10	-	1,0	0,5	5	1
11	+	0,2	1,0	4	1
12	+	0,4	1,0	6	2
13	+	0,6	1,0	7	2
14	+	0,8	1,0	6	3
15	+	1,0	1,0	5	3
16	-	0,2	1,0	6	2
17	-	0,4	1,0	7	3
18	-	0,6	1,0	6	3
19	-	0,8	1,0	6	3
20	-	1,0	1,0	6	3
TOTAL				107	38

4. RESULTADOS

4.1. Estacas com forçamento de brotação

4.1.1. Experimento nº 1

Na primeira avaliação efetuada nove dias após a instalação do experimento obteve-se no máximo 5% de brotações. Por isso, não se efetuou a análise estatística para comparação dos tratamentos.

Já na segunda avaliação, efetuada 15 dias após a instalação do experimento, os tratamentos com 6-BA e 245ppm de cianamida hidrogenada não diferiram da testemunha (água) em número de gemas brotadas. Entretanto, os tratamentos com cianamida hidrogenada nas doses de 367,5 e 490ppm foram estatisticamente inferiores à testemunha, com base no teste de Dunnett aplicado (Tabela 22).

Quanto ao número de brotações mais desenvolvidas (nota maior ou igual a 6), a testemunha não diferiu estatisticamente dos tratamentos com 6-BA, mas foi superior aos tratamentos com cianamida hidrogenada (Tabela 23).

Tabela 22 - Número de gemas brotadas em diferentes épocas, a partir da instalação do experimento nº 1 de estacas com forçamento de brotação.

TRATAMENTO	15 dias	19 dias	26 dias	30 dias
Água (Testemunha)	2,04 a	2,34 a	2,79 a	2,85 a
6-benzilaminopurina 10 μ M	1,99 a	2,45 a	2,75 a	2,76 a
6-benzilaminopurina 15 μ M	1,83 a	2,50 a	2,67 a	2,73 a
6-benzilaminopurina 20 μ M	2,11 a	2,46 a	2,74 a	2,82 a
6-benzilaminopurina 25 μ M	2,06 a	2,31 a	2,74 a	2,82 a
Cianamida hidrogenada 245ppm	1,54 a	1,89 a	2,03 b	2,03 b
Cianamida hidrogenada 367,5ppm	0,17 b	0,45 b	0,72 b	0,79 b
Cianamida hidrogenada 490ppm	0,35 b	0,35 b	0,62 b	0,62 b
F(Tratamento)	27,76*	41,01*	27,35*	26,29*
C. V. (%)	19,95	15,47	16,76	16,95

*: significativo ao nível de 5% de probabilidade.

OBS.: Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Dunnett, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 23 - Número de brotações com nota maior ou igual a 6, em diferentes épocas, a partir da instalação do experimento nº 1 de estacas com forçamento de brotação.

TRATAMENTO	15 dias	19 dias	26 dias	30 dias
Água (Testemunha)	1,54 a	1,96 a	2,40 a	2,78 a
6-benzilaminopurina 10 μ M	1,42 a	1,89 a	2,34 a	2,75 a
6-benzilaminopurina 15 μ M	1,20 a	1,97 a	2,39 a	2,65 a
6-benzilaminopurina 20 μ M	1,13 a	2,04 a	2,37 a	2,70 a
6-benzilaminopurina 25 μ M	1,30 a	1,94 a	2,46 a	2,71 a
Cianamida hidrogenada 245ppm	0,35 b	0,62 a	0,75 b	1,00 b
Cianamida hidrogenada 367,5ppm	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,45 b
Cianamida hidrogenada 490ppm	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,17 b
F(Tratamento)	7,22*	48,75*	64,65*	45,79*
C. V. (%)	55,27	20,41	17,74	17,86

*: significativo ao nível de 5% de probabilidade.

OBS.: Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Dunnett, ao nível de 5% de probabilidade.

Efetuuou-se a 3ª avaliação aos 19 dias e verificou-se novamente que a 6-BA em todas as concentrações e a cianamida hidrogenada a 245ppm não diferiram significativamente da testemunha através do teste de Dunnett aplicado. Mas, nas doses de 367,5 e 490ppm a cianamida hidrogenada foi inferior à testemunha (Tabela 22).

No total de brotações com nota maior ou igual a 6 verificou-se, através do teste de Dunnett, que a testemunha não diferiu dos tratamentos com 6-BA em qualquer uma das concentrações, mas foi superior aos tratamentos com cianamida hidrogenada (Tabela 23).

A quarta avaliação foi efetuada aos 26 dias, verificando-se que os tratamentos com 6-BA não diferiram da testemunha e os tratamentos com cianamida hidrogenada foram inferiores a ela, quanto ao número total de gemas brotadas, e ao total de brotações com nota maior ou igual a 6, de acordo com o teste de Dunnett (Tabelas 22 e 23).

Finalmente, na quinta avaliação, efetuada 30 dias após a instalação do experimento, embora tenha-se verificado um aumento na magnitude das médias, manteve-se o mesmo resultado estatístico da avaliação anterior (Tabelas 22 e 23).

4.1.2. Experimento nº 2

Nota-se, através da Tabela 24, que na primeira avaliação, efetuada após dez dias da aplicação dos tratamen-

tos, houve um efeito desfavorável do ácido naftalenacético e do ácido giberélico em relação à testemunha, para o número total de gemas brotadas. Os demais tratamentos, entretanto, não diferiram estatisticamente da testemunha.

Tabela 24 - Número de gemas brotadas aos 10 e 15 dias, após a instalação do experimento nº 2 de estacas com forçamento de brotação.

TRATAMENTO	10 dias	15 dias
Água (Testemunha)	2,34 a	2,72 a
6-benzilaminopurina 100µM	2,25 a	2,47 a
Calciocianamida 200ppm	2,21 a	2,60 a
Cianamida hidrogenada 9,8ppm	2,15 a	2,68 a
Ácido naftalenacético 200ppm	0,86 b	0,86 b
Ácido giberélico 20ppm	0,58 b	0,99 b
F(Tratamento)	18,32*	23,46*
C. V. (%)	23,92	19,77

*: significativo ao nível de 5% de probabilidade.

OBS.: Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Dunnett, ao nível de 5% de probabilidade.

Quanto ao total de brotações com nota maior ou igual a 6, não se verificou diferença significativa entre os tratamentos. Provavelmente a falta de significância seja devida à grande variabilidade dentro dos tratamentos.

Já na segunda avaliação, efetuada após 15 dias da aplicação dos tratamentos, os efeitos das substâncias GA₃ e NAA foram desfavoráveis em relação à testemunha, tanto com relação ao número total de gemas brotadas, quanto ao total de brotações com nota maior ou igual a 6. Da mesma forma, os

demais tratamentos não diferiram da testemunha, quando aplicado o teste de Dunnett (Tabela 24 e 25).

Tabela 25 - Número de brotações com nota maior ou igual a 6, 15 dias após a instalação do experimento nº 2 de estacas com forçamento de brotação.

TRATAMENTO	MÉDIA
Água (testemunha)	2,13 a
6-benzilaminopurina 100ppm	1,85 a
calcicocianamida 200ppm	2,15 a
cianamida hidrogenada 9,8ppm	2,04 a
ácido naftalenacético 200ppm	0,46 b
ácido giberélico 20ppm	0,28 b
F(Tratamento)	22,62 *
C. V. (%)	27,64

*: significativo ao nível de 5% de probabilidade.

OBS.: Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Dunnett, ao nível de 5% de probabilidade.

A presença de raízes foi notada apenas na segunda avaliação. No tratamento com cianamida hidrogenada houve 0,2% de presença de raízes e no tratamento com NAA 4,8%. Nos demais tratamentos não ocorreu enraizamento. A Figura 1 mostra estacas do tratamento com NAA apresentando raízes ou apenas o engrossamento da extremidade basal do caule, 15 dias após a aplicação do tratamento.

Figura 1 Estacas do cultivar Maria, 15 dias após o tratamento de suas bases com 200ppm de NAA por 48h, no experimento nº 2.

4.1.3. Experimento nº 3

Em avaliação única efetuada aos 9 dias após a aplicação dos tratamentos, verificou-se que apesar de se ter diminuído a concentração de algumas substâncias em relação aos tratamentos do experimento anterior, novamente o ácido naftalenacético mostrou-se desfavorável em relação à testemunha, e os demais tratamentos dela não diferiram, no que concerne ao número total de gemas brotadas (Tabela 26).

No que diz respeito ao total de brotações com nota maior ou igual a 6 não se verificou diferença significativa entre os tratamentos em relação à testemunha (Tabela 27).

Tabela 26 - Número de gemas brotadas 9 dias após a instalação do experimento nº 3 de estacas com forçamento de brotação.

TRATAMENTO	MÉDIA
Água (testemunha)	14,0 a
6-benzilaminopurina 20ppm	14,6 a
calcicocianamida 20ppm	12,8 a
ácido naftalenacético 20ppm	7,6 b
F(Tratamento)	16,63*
C. V. (%)	14,28

*: significativo ao nível de 5% de probabilidade.

OBS.: Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Dunnett, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 27 - Número de brotações com nota maior ou igual a 6, 9 dias após a instalação do experimento nº 3 de estacas com forçamento de brotação.

TRATAMENTO	MÉDIA
Água (testemunha)	6,8 a
6-benzilaminopurina 20ppm	7,8 a
calcicocianamida 20ppm	7,6 a
ácido naftalenacético 20ppm	4,6 a
F(Tratamento)	3,45*
C. V. (%)	26,31

*: significativo ao nível de 5% de probabilidade.

OBS.: Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Dunnett, ao nível de 5% de probabilidade.

Observou-se efeito significativo de blocos quando se analisou o total de gemas brotadas. Como nos blocos 1 e 2 as estacas utilizadas foram de diâmetro menor que os dos demais blocos efetuou-se a comparação entre as médias de blocos, com o teste de Tukey ao nível de 5%. A Tabela 28 mostra o resultado dessa análise.

Concluiu-se que, de fato, o diâmetro da estaca foi responsável pela variação de blocos, com menor número de gemas brotadas, em magnitude, nos blocos com estacas mais finas.

Também, para o total de brotação com nota maior ou igual a 6 verificou-se efeito de blocos, com o teste de Tukey ao nível de 5% (Tabela 29).

Tabela 28 - Efeito de blocos para o número de gemas brotadas no experimento nº 3 de estacas com forçamento de brotação.

BLOCOS	MÉDIA
1	11,75 ab
2	8,25 b
3	13,50 a
4	14,00 a
5	13,75 a
F(Blocos)	7,56*
C. V. (%)	14,28

*: significativo ao nível de 5% de probabilidade.

OBS.: Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 29 - Efeito de blocos para o número de gemas com nota maior ou igual a 6 no experimento nº 3 de estacas com forçamento de brotação.

BLOCOS	MÉDIA
1	5,25 bc
2	3,25 c
3	6,50 abc
4	10,00 a
5	8,50 ab
F(Blocos)	9,06*
C. V. (%)	26,31

*: significativo ao nível de 5% de probabilidade.

OBS.: Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

O efeito de blocos com estacas mais finas neste caso não foi tão marcante, havendo uma sobreposição. Mas pelo menos um bloco com estacas mais grossas diferiu estatisticamente de um com estacas mais finas.

4.1.4. Experimento nº 4

No quarto experimento onde concentrações mais baixas de 6-BA foram testadas, procurou-se verificar também a influência desta citocinina no aumento do número de inflorescências, uma vez que segundo SRINIVASAN & MULLINS (1978) a citocinina pode transformar gavinhas em inflorescências.

Novamente não se verificaram diferenças significativas no número de gemas brotadas (Tabela 30) ou tampouco no número de brotações com nota maior ou igual a 6, dez dias após a instalação do experimento (Tabela 31).

Outrossim, com as doses utilizadas, não se verificou aumento no número de inflorescências produzidas em relação à testemunha (Tabela 32).

Tabela 30 - Número de gemas brotadas dez dias após a instalação do experimento nº 4 de estacas com forçamento de brotação.

TRATAMENTO	MÉDIA
Água (testemunha)	31,6
6-benzilaminopurina 10ppm	33,4
6-benzilaminopurina 20ppm	27,2
F(Tratamento)	4,35 ^{ns}
C. V. (%)	11,13

ns: não significativo.

Tabela 31 - Número de brotações com nota maior ou igual a 6, dez dias após a instalação do experimento nº 4 de estacas com forçamento de brotação.

TRATAMENTO	MÉDIA
Água (testemunha)	21,2
6-benzilaminopurina 10ppm	22,0
6-benzilaminopurina 20ppm	22,0
F(Tratamento)	9,23 ^{ns}
C. V. (%)	9,92

ns: não significativo.

Tabela 32 - Número de inflorescências, 10 dias após a instalação do experimento nº 4 de estacas com forçamento de brotação.

TRATAMENTO	MÉDIA
Água (testemunha)	21,8
6-benzilaminopurina 10ppm	27,4
6-benzilaminopurina 20ppm	28,0
F(Tratamento)	3,28 ^{ns}
C. V. (%)	16,40

ns: não significativo.

4.2. Cultura de óvulos não fertilizados

4.2.1. Grupo de Experimentos nº 1

Através da Tabela 33 nota-se o quanto é importante inocular-se uma grande quantidade de óvulos, porque as perdas por oxidação e por contaminação, por maiores que sejam os cuidados, podem ser grandes. Também não se devem deixar os óvulos por muito tempo em meio de placa para se evitar a contaminação de explantes sadios pela propagação de fungos ou bactérias provenientes de explantes contaminados. Percebe-se, também, que as perdas iniciais por oxidação são baixas, o que indica que o método de esterilização do material não está sendo estressante para o explante.

Tabela 33 - Primeira avaliação do Grupo de Experimentos nº 1, referente ao número e porcentagem de óvulos contaminados, oxidados e sadios.

ENSAIO	CULTIVAR	ÓVULOS					
		CONTAMINADOS		OXIDADOS		SADIOS	
		nº	%	nº	%	nº	%
A	A Dona	100	100	0	-	0	-
B	Iracema	0	-	60	25,4	176	74,6
C	Iracema	38	28,2	5	3,7	92	68,1
D	Maria	0	-	0	-	160	100
E	Maria	0	-	0	-	164	100
F	Maria	8	4,2	38	20,0	144	75,8
G	Maria	0	-	0	-	131	100
TOTAL		146	13,1	103	9,2	867	77,7

No ensaio A a perda total por contaminação foi devida à grande concentração de óvulos na placa, o que propiciou que se espalhasse rapidamente a contaminação por fungo de explante para explante, durante os cinco dias que permaneceram incubados. Nos ensaios subseqüentes cuidou-se para que isto não ocorresse, não somente diminuindo-se a concentração de óvulos por placa, como também deixando-os incubados no máximo dois dias para que a contaminação de alguns não atingisse os demais sadios. A prática da incubação é importante por dois motivos: primeiro porque se isola grande quantidade de explante, aproveitando-se o máximo possível o tempo e o material disponível, evitando-se trabalhar com muitos frascos ao mesmo tempo, o que também favorece a contaminação; em segundo lugar algum explante que escapou à es-

terilização ou que sofreu algum estresse, oxidando-se, pode ser eliminado antes de se instalar o experimento.

O material, que foi incubado na luz, foi avaliado semanalmente, sendo que os contaminados iam sendo eliminados.

Houve perda total de 21% dos explantes, considerando-se todos os ensaios, por contaminação. Quatro meses após a instalação dos ensaios, nenhum calo havia se formado e todos os demais explantes de óvulos haviam se oxidado.

Em experimentos preliminares, em que se utilizaram bagas na fase de chumbinho dos cultivares apirenos A Dona, Geni e Maria, foram obtidos calos quando se utilizou $0,5\mu\text{M}$ de NAA e $1,0\mu\text{M}$ de 6-BA em meio com anti-oxidante. Por outro lado, quando se utilizou meio sem anti-oxidante com $5,0\mu\text{M}$ de 2,4-D e $1,0\mu\text{M}$ de 6-BA todos os explantes oxidaram-se e nenhum calo foi obtido.

Neste grupo de experimentos, por isso, utilizaram-se concentrações mais baixas de reguladores vegetais do que aquelas indicadas por MULLINS & SRINIVASAN (1976) acrescentando ao meio de cultura de NN a cisteína como anti-oxidante. Entretanto, não se obteve a formação de calos em nenhum dos cultivares. Por esse motivo, no segundo grupo de experimentos, resolveu-se utilizar uma concentração mais alta de reguladores vegetais, principalmente da auxina, 2,4-D, e testar também uma outra auxina, o ácido naftoxiacético (NOA), tido como muito eficiente para embriogênese somática

em cenouras e em videira (MULLINS & SRINIVASAN, 1976). Utilizou-se também meio líquido na tentativa de evitar a desidratação e oxidação dos óvulos, além de manter a cisteína.

4.2.2. Grupo de Experimentos nº 2

A Tabela 34 mostra os resultados do segundo grupo de experimentos que teve várias particularidades além daquelas indicadas em Material e Métodos. Os ensaios variaram quanto ao cultivar, data de instalação e outras, que serão descritas a seguir.

Inicialmente nos ensaios de A a D utilizou-se meio de cultura sólido, mas, devido à grande oxidação que se verificou nestes ensaios, passou-se a testar o meio líquido. Este procedimento apresenta dois problemas: o primeiro em relação à facilidade de propagação da contaminação e o segundo quanto à necessidade de agitação para se oxigenar o meio, o que fica na dependência de se dispor de agitadores.

Para os ensaios de E a I utilizaram-se as recomendações de MULLINS & SRINIVASAN (1976) e SRINIVASAN & MULLINS (1980), onde a densidade de cultura foi de 1 óvulo por ml de meio de cultura. Para a cultura de células, a densidade de cultura é importante. Nos ensaios E, G e H utilizou-se um frasco por tratamento. No ensaio F testaram-se apenas os tratamentos 1, 2 e 3 e no ensaio I, os tratamentos 3 e 4 foram repetidos duas vezes, graças à disponibilidade de material.

Tabela 34 - Grupo de Experimentos nº 2 de cultura de óvulos: Tempo de permanência em meio de placa (MP) e em meio primário (M1º). Perdas com oxidação e contaminação em meio primário e em meio secundário (M2º).

ENSAIO	PERMAN. EM MP	PERMAN. EM M1º	PERDAS M1º		PERDAS M2º	
			OXIDAÇÃO	CONTAMINAÇÃO	OXIDAÇÃO	CONTAMINAÇÃO
(dias) (dias)			----- % -----		----- % -----	
A	1	14	0,0	10,0	85,0	5,0
B	3	11	0,0	5,7	88,6	5,7
C	2	8	0,0	20,0	75,0	5,0
D	1	-	72,9	27,1	-	-
E	1	21	25,0	25,0	50,0	0
F	1	21	40,0	0,0	60,0	0
G	0	21	0,0	0,0	100,0	0
H	0	20	0,0	75,0	25,0	0
I	1	20	0,0	0,0	100,0	0

Nos óvulos inoculados em meio sólido, a perda por oxidação, cujo início já ocorria em meio primário, foi total. Em experimento posterior, verificou-se que apesar da parte externa permanecer verde, interiormente o óvulo já estava oco e seco; quando da transferência para o meio secundário os óvulos acabaram de oxidar, sendo que muitas vezes a parte em contato com o meio permanecia verde. Estes permaneceram 2,5 meses em meio secundário e não se notou diferença entre tratamentos.

Já em meio líquido, os óvulos que não se oxidaram em meio primário, permaneceram estagnados em meio secundário, sendo que as avaliações foram realizadas no período de 3 a 5 semanas de permanência nesse meio.

Notou-se no meio primário um aumento no tamanho dos óvulos particularmente no tratamento 3, para os ensaios E, F, G e I; verificou-se também um pequeno aumento de tamanho nos tratamentos 4 (Ensaio E e G) e 1 (Ensaio I). Entretanto, quando passados para meio secundário o crescimento cessou. Em nenhum tratamento ocorreu formação de calo.

4.2.3. Experimento nº 3

Na 1ª avaliação, aos cinco dias após inoculação prévia no escuro, não houve para nenhum tratamento sinais de oxidação, contaminação ou aumento de tamanho.

Aos dez dias ainda não se notaram diferenças marcantes entre os tratamentos. Apenas nos tratamentos onde

não se utilizou cisteína, alguns óvulos já mostravam sinais de oxidação.

Aos quinze dias verificou-se que alguns óvulos desenvolvidos racharam, mostrando massas celulares querendo emergir. A Tabela 35 mostra que houve um desenvolvimento maior nos óvulos cultivados em meio com cisteína, cujos tratamentos são os de 05 a 08. Não se notaram, entretanto, diferenças entre as concentrações de 6-BA, nos diversos tratamentos, bem como entre as diferentes épocas de coletas dos materiais A, B ou C.

Os óvulos não desenvolvidos estavam oxidados e foram eliminados.

Tabela 35 - Avaliação aos 15 dias de incubação em meio primário do experimento nº 3 de cultura de óvulos. Porcentagem de óvulos que se desenvolveram e racharam; média de quatro frascos.

TRATAMENTOS	ÓVULOS QUE SE DESENVOLVERAM E RACHARAM		
	A	B	C
	----- % -----		
01	12,5	10,0	22,5
02	12,5	12,5	17,5
03	5,0	12,5	5,0
04	7,5	22,5	10,0
05	62,5	90,0	97,5
06	100,0	100,0	85,0
07	85,0	100,0	95,0
08	100,0	67,5	87,5

O material transferido para meio secundário permaneceu neste meio durante um mês. Após este período fez-

se a última avaliação na qual não se verificou formação de calos em nenhum tratamento. Nesta ocasião fizeram-se cortes transversais nos óvulos e verificou-se que grande parte deles, embora verdes por fora estavam ocós por dentro. A Tabela 36 mostra esses resultados.

Tabela 36 - Avaliação dos óvulos em meio secundário no experimento nº 3 após um mês. Óvulos observados (oxidados + verdes) e % de óvulos ocós.

TRATAMENTOS	ÓVULOS OBSERVADOS (OXIDADOS + VERDES)			OCÓS		
	A	B	C	A	B	C
				----- % -----		
01	6	4	9	0,0	50,0	55,6
02	5	10	3	60,0	30,0	33,3
03	2	2	3	100,0	100,0	33,3
04	3	7	4	33,3	42,9	75,0
05	25	10	10	48,0	30,0	0,0
06	39	20	9	41,0	35,0	22,2
07	34	5	10	35,3	40,0	10,0
08	40	10	10	42,5	60,0	0,0

4.2.4. Experimento nº 4

Neste experimento, mesmo usando meio líquido com cisteína e aumentando-se o tempo de incubação no escuro, ainda não se verificou a formação de calos.

Em meio primário apenas 1 frasco do tratamento 7 foi perdido por contaminação.

Não se notou diferença entre tratamentos quanto à oxidação através dos meios de cultura. Enquanto o mate-

rial permaneceu verde, transferiu-se de meio, aumentando inclusive a quantidade de auxinas para favorecer a formação de calos. Entretanto nenhum calo se formou em nenhum tratamento, e os óvulos acabaram oxidando-se.

Este experimento foi baseado nos procedimentos de SRINIVASAN & MULLINS (1980) onde os autores conseguiram alta frequência de embriogênese somática; entretanto, mais uma vez o material mostrou-se recalcitrante na resposta aos reguladores vegetais para formar calos.

4.3. Cultura de Anteras

4.3.1. Grupo de Experimentos nº 1

Nos experimentos com cultura de anteras um avanço foi obtido, em relação à cultura de óvulos, ou seja, logo no primeiro grupo de experimentos já foi obtida a formação de calos. A porcentagem de formação de calos, mostrada através da Tabela 37 foi, entretanto, baixa. As perdas por contaminação prejudicaram em parte os resultados, principalmente nos tratamentos 6, 11 e 17, onde 50 a 75% dos frascos foram perdidos por contaminação (Tabela 37).

Tabela 37 - Porcentagem de anteras que deram calos e de frascos perdidos por contaminação no Grupo de Experimentos nº 1.

TRATAMENTO	ANTERAS QUE DERAM CALOS				TOTAL	FRASCOS PERDIDOS POR CONTAMINAÇÃO TOTAL
	A	B	C	D		
	----- % -----					
1	-	0	0	0	0	25
2	25	-	15	0	10,0	25
3	5	0	2	0	3,8	0
4	15	5	10	10	10,0	0
5	0	0	10	0	2,5	0
6	-	-	25	-	6,3	75
7	-	-	0	0	0	25
8	15	0	0	0	3,8	0
9	55	-	10	0	16,3	25
10	-	0	10	15	6,3	25
11	-	-	15	5	5,0	50
12	35	0	5	0	10,0	0
13	0	0	0	0	0	0
14	30	0	5	35	17,5	0
15	-	0	0	0	0	25
16	5	0	0	0	1,3	0
17	-	-	0	0	0	50
18	0	0	0	0	0	0
19	0	-	0	0	0	25
20	10	0	0	0	2,5	0
21	0	0	-	0	0	25
22	0	0	0	0	0	0
23	-	0	0	0	0	25
24	0	0	-	0	0	25
25	0	-	0	0	0	25
26	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0
29	5	0	0	0	1,3	0
30	0	0	0	0	0	0

Pode-se observar, entretanto, que em nenhum tratamento onde a concentração de citocinina (6-BA) foi zero (tratamentos; 1, 7, 13, 19 e 25) houve formação de calos e a maior porcentagem deles encontrou-se nos tratamentos onde a

concentração de NOA foi 0, 0,5 e 1,0ppm (tratamentos de 1 a 18).

Quando os calos foram transferidos para meios frescos de mesma formulação ou dos tratamentos 9, 12 e 14 tornaram-se verdes e endurecidos. Após transferências para meios de cultura sem reguladores vegetais, oxidaram-se. Alguns calos foram mantidos por até 9 meses em cultura sob luminosidade, mas não houve formação de embrióides em nenhum caso.

4.3.2. Grupo de Experimentos nº 2

Verifica-se, através da Tabela 38, que os tratamentos com prolina deram resultados muito insatisfatórios, uma vez que houve ocorrência de calos, em baixa porcentagem, apenas no tratamento 5 (1ª avaliação) e no tratamento 11 (2ª avaliação).

Notam-se diferenças visíveis, na 1ª avaliação, na resposta de determinados ensaios aos tratamentos, como no caso dos ensaios A e G onde, em apenas um tratamento de cada um deles, ocorreu produção de calos pelas anteras. Entretanto, não se pode afirmar que essas diferenças estejam ligadas ao estágio de desenvolvimento das anteras (verdes ou amarelas) e à incubação da placa com anteras em geladeira. Nos ensaios A e G, as anteras verdes, não foram incubadas em geladeira, mas o mesmo procedimento foi efetuado no ensaio F, cujas anteras produziram uma quantidade de calos visi-

velmente maior. Similarmente no ensaio D (anteras amarelas, cujas placas foram incubadas em geladeira) os resultados diferiram dos do ensaio E, cujas anteras sofreram o mesmo procedimento. Por outro lado, não se pode afirmar que as perdas por contaminação tenham mascarado os resultados, uma vez que apenas no ensaio E, em um frasco dos tratamentos 7 e 18 e no ensaio F, em um frasco dos tratamentos 1, 6, 8, 9 e 11, não se pode confirmar a presença ou ausência de calo, porque a contaminação tomou conta destes frascos inteiramente.

Na 2ª avaliação, efetuada 75 dias após a instalação do ensaio A, verificou-se a formação de mais alguns calos (Tabela 38).

As perdas por contaminação foram altas, mas não chegaram a prejudicar os resultados.

A terceira e última avaliação foi efetuada 118 dias após a instalação do ensaio A e 84 dias após a instalação do ensaio H. Não se verificou a formação de novos calos nos frascos com os explantes originais, os quais permaneceram no escuro. Os frascos que foram passados para a luz, sendo após dez dias levados para meio NN com 1,5ppm de NOA e 0,4ppm de 6-BA, mantidos na luz, tiveram seus calos oxidados e não produziram embriões.

Tabela 38 - Resultados da 1ª avaliação e da 1ª mais a 2ª avaliaçõesno Grupo de Experimentos nº 2 de cultura de anteras. Porcentagem de anteras que produziram calos e de anteras perdidas por contaminação.

TRATAMENTOS	1ª AVALIAÇÃO										1ª E 2ª AVALIAÇÕES	
	ENSaios										CALOS FORMADOS TOTAL	ANTERAS PERDIDAS POR CONTAMINAÇÃO TOTAL
	A	P	C	D	E	F	G	H	TOTAL	%		
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	59,3	
2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	35,7	
3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	14,3	
4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	59,3	
5	0,0	6,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,7	50,0	
6	0,0	6,7	0,0	0,0	10,0	3,3	0,0	16,7	6,4	9,3	35,7	
7	0,0	40,0	20,0	0,0	5,0	13,3	0,0	10,0	12,1	17,1	35,7	
8	0,0	33,3	20,0	10,0	20,0	10,0	10,0	30,0	18,7	25,0	33,3	
9	0,0	33,3	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	14,0	9,4	12,5	43,8	
10	0,0	26,7	33,3	0,0	10,0	23,3	0,0	26,7	18,6	24,3	21,4	
11	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	27,3	
12	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	22,2	
13	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	11,1	
14	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	23,1	
15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	30,0	
16	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	15,0	0,0	0,0	4,0	5,0	40,0	
17	0,0	20,0	10,0	0,0	0,0	5,0	0,0	20,0	5,8	9,2	16,7	
18	0,0	10,0	10,0	20,0	0,0	5,0	0,0	30,0	7,5	11,7	50,0	
19	0,0	20,0	20,0	10,0	15,0	15,0	0,0	10,0	12,5	19,2	25,0	
20	0,0	20,0	0,0	0,0	10,0	15,0	0,0	-	9,1	13,6	45,5	

4.4. Cultura de Plântulas

4.4.1. Experimento nº 1

Na primeira avaliação, efetuada 53 dias após a instalação do experimento, não havia se formado embrióide em nenhum explante. Ocorreu a formação de calos nos 4 frascos incubados no escuro e em 2 deles formaram-se raízes.

Quanto aos frascos incubados na luz, ocorreu formação de calos nos onze e em apenas dois formaram-se raízes. Por não se haver notado ainda a formação de embrióides manteve-se a incubação, efetuando-se observações diárias.

Após dois meses de incubação, em meio primário no escuro, observou-se em um dos frascos a presença de embrióides nos estádios de globular a torpedo (Figura 2) desenvolvendo-se tanto isolados (Figura 2a), quanto em aglomerados (Figura 2b). Nota-se, nesta figura, que o calo é claro e pouco abundante; observam-se partes do explante sem calo e de cor branco-leitosa (Figura 2c). O aglomerado de embrióides que se encontra à frente do explante desenvolveu-se na parte posterior inferior do explante, muito próximo ao meio de cultura, o que foi observado também por STAMP & MEREDITH (1988) quando verificaram que a formação de embrião somático ocorria freqüentemente no lado inferior de folhas imersas em meio sólido. Nota-se também a formação de uma raiz (Figura 2d). O frasco que continha esses embrióides foi então transferido para a luz.

Figura 2 - Explante do cultivar de videira Maria, inoculado em meio de cultura primário, no experimento nº 1 de cultura de plântulas, mostrando após dois meses de incubação, a formação de embriões: a) dois embriões desenvolvendo-se separadamente; b) aglomerado de embriões; c) parte do explante de cor branco leitosa; d) formação de raiz.

Figura 3 - Fotografia tirada 7 dias após a da Figura 2, mostrando o desenvolvimento dos embriões: (a) e (b) são os embriões mais desenvolvidos mostrados na Figura 2a, e (c) um embrião menos desenvolvido.

A Figura 3 mostra, após 7 dias, o desenvolvimento dos embriões mostrados na Figura 2a (Figura 3a e 3b), e de um outro embrião menos desenvolvido (Figura 3c). Esses embriões foram transferidos para meio de MS, acrescido de $2\mu\text{M}$ de 6-BA. O embrião que mostra os cotilédones verdes (Figura 3a), fotografado em 24.05.89, apresenta-se, em 04.08.89, como uma plântula, já bem desenvolvida, como se nota na Figura 4. Nesse intervalo de tempo, essa plântula passou por dois meios de cultura, o já citado acima, para onde foi transferida em 24.05.89 e depois, o meio com $0,5 \times \text{MS}$, sem reguladores vegetais, para o qual foi transferido em 13.07.89. Percebe-se, portanto, que ambos os meios foram propícios para o desenvolvimento da plântula, sendo que esta plântula produziu também embriões secundários, geralmente a partir da base da mesma, ou seja, no limite entre o hipocótilo e a radícula, ou o caule e a raiz.

Em 04.08.89, as plântulas que estavam em meio $0,5 \times \text{MS}$ sem reguladores vegetais foram avaliadas. Essas plântulas foram provenientes do explante original, cujos embriões foram distribuídos em 51 frascos. Alguns frascos possuíam mais de uma plântula (difícil de se distinguir quantas, dentro do frasco, por se encontrarem entrelaçadas), cuja origem pode ser tanto do número inicial de embriões inoculados (pois, de acordo com o estágio de desenvolvimento, foram inoculados mais de um por frasco, às vezes em aglomerados), como provenientes dos embriões secundários

produzidos a partir de embriões ou plântulas em vários estádios de desenvolvimento.

Considerou-se, assim, como 65 o número de plântulas distinguíveis e efetuou-se uma avaliação geral. Dos 51 frascos avaliados, 13,7% apresentaram plântulas com folhas cotiledonares visíveis; 15,7% apresentaram plântulas anormais, sem raízes e, 64,7% apresentaram plântulas com embriões secundários visíveis. Das 65 plântulas contadas nestes frascos, 33,8% eram normais 66,2% anormais.

A Figura 5 mostra uma plântula normal, desenvolvida a partir de embriões de origem somática, de videira cultivar Maria.

Já a Figura 6 mostra uma plântula anormal, proveniente de embriões do mesmo explante (Figura 6a), mais um embrião também desenvolvido anormalmente (Figura 6b) e vários outros embriões secundários aglomerados, em estádios iniciais de desenvolvimento (Figura 6c).

Ambas as plântulas das Figura 5 e 6 foram provenientes do mesmo frasco, como mostra a Figura 7.

Este fato ocorreu porque muitas vezes os embriões não puderam ser bem individualizados, indo para o meio de desenvolvimento como aglomerados de 3 ou 4 embriões. Os embriões mostrados na Figura 6c, porém, tratam-se de embriões secundários, originados fora do meio de indução, qual seja, o meio NN com 1,5ppm de NOA e 0,4ppm de 6-BA.

Figura 4 - Plântula em frasco com terra mais vermiculita, aclimatando-se; desenvolvida a partir do embrião de mostrado na Figura 3a.

Figura 5 - Plântula originada de embrião do Experimento nº 1, mostrando aparência normal.

Figura 6 - Plântula originada de embrião do Experimento nº 1, mostrando aparência anormal (a); embrião desenvolvido anormalmente (b); grupo de embriões secundários aglomerados (c).

Figura 7 - Plântulas desenvolvidas em um frasco de cultura, mostradas individualmente nas Figuras 5 e 6.

Para a germinação e desenvolvimento de embriões e plântulas testaram-se ainda os reguladores vegetais, no meio de MS, 6-BA (0, 2, 4 e 5 μ M) e 2 μ M de 6-BA + GA₃ (0, 0,5 e 1,0 μ M), sendo que os meios com GA₃ foram desfavoráveis. Dentre as concentrações de 6-BA não se conseguiu discernir a mais apropriada, parecendo indicar que a melhor concentração pode variar de acordo com o estágio de desenvolvimento do embrião ou com seus complexos fatores endógenos, ainda desconhecidos.

Por multiplicação, 1055 frascos foram manipulados, dando-se assim, uma idéia dos embriões que se conseguiu individualizar, ou seja, no mínimo 1055, uma vez que cada frasco possuía um ou mais embriões. Esses embriões originaram-se diretamente ou não, dos dois explantes dos dois frascos iniciais do experimento, os quais foram incubados no escuro.

Numa avaliação final desses embriões, pelo menos 38% desenvolveram-se em plantas normais e 17,4% encontram-se já adaptados em casa de vegetação, plantadas em sacos plásticos com terra (Figura 8). Por outro lado, 2,4% dos embriões foram separados em estágios iniciais para utilização em outros experimentos e 37,0% dos embriões desenvolveram-se anormalmente *in vitro*, dando origem a plântulas amorfas, oxidadas e vitrificadas.

Figura 8 Plantas provenientes de cultura *in vitro* de plântulas do cultivar Maria, através da embriogênese somática, desenvolvendo-se em casa de vegetação.

4.4.2. Experimento nº 2

Na primeira avaliação, efetuada um mês após a instalação do experimento, não ocorreu o aparecimento de embrióides em nenhum explante, em nenhum dos tratamentos (Tabela 39). O parâmetro "branqueamento" foi incluído na avaliação, pois no experimento anterior notou-se uma certa relação entre o "branqueamento" do tecido e o posterior aparecimento de embrióides no local. Também STAMP & MEREDITH (1988) relataram que pequenas porções da nervura média e do tecido da lâmina adjacente à nervura das folhas que haviam incubado, em meio de indução, perderam a sua coloração verde translúcida e tornaram-se brancos e, após incubação continuada, esses tecidos deram origem a calos embriogênicos. Esse "branqueamento" não se trata apenas de perda de clorofila, quando o tecido torna-se amarelado tendendo para o branco translúcido, mas sim, o tecido torna-se branco leitoso como pode ser observado na Figura 2. Tanto que nos trabalhos de STAMP & MEREDITH (1988) esse branqueamento do tecido ocorreu em condições de incubação na luz.

Entretanto, observações preliminares mostram que nem sempre esse tecido torna-se embriogênico (talvez por causa do seqüenciamento de meios), e nem sempre o tecido embriogênico passa por essa fase de branco leitoso. Observações detalhadas a esse respeito necessitam ainda serem efetuadas.

Tabela 39 - Porcentagem de frascos com explantes apresentando calo, oxidação e branqueamento, ocorrendo isoladamente ou em conjunto, com incubação na luz (L) e no escuro (E), na primeira avaliação do experimento nº 2 de cultura de plântulas. Porcentagem de frascos com os explantes normais e de frascos com contaminação.

TRATAMENTO	NORMAL			CALO			OXIDAÇÃO			BRANQUEAMENTO			CALO + OXID. BRANQ.			OXID. + CALO + OXID. BRANQ. + BRANQ.			CONTAMINAÇÃO		
	L	E	-	L	E	-	L	E	-	L	E	-	L	E	-	L	E	-	L	E	-
	%																				
1	50	-	-	-	-	-	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-	40	-	-	-	100	20	-	-	-
3	-	-	100	-	-	-	20	-	20	-	-	-	-	-	-	-	20	-	20	-	-
4	-	-	-	-	-	50	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-
5	-	-	50	-	-	-	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	25	-	-	-	-	-	-	-	50	100	-	-	-
7	20	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	20	100	-	-	-	-	40	-	-	-	-	-	-	20	-	-
9	-	-	-	-	-	20	100	-	-	-	-	40	-	-	-	-	40	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	20	100	-	-	-	-	20	-	-	-	-	20	-	40	-	-
11	-	-	-	-	-	100	50	-	-	-	-	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	50	66,7	-	-	-	-	33,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	50	42,9	-	14,3	-	-	14,3	-	-	-	-	14,3	50	-	-	-
14	-	-	-	-	-	33,3	66,7	-	-	-	66,7	16,7	-	-	-	-	16,7	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	33,3	-	-	-	-	66,7	20,0	-	-	-	-	90	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	100	33,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16,7	-	16,7	-	-
17	-	-	33,3	-	-	33,3	28,6	-	-	-	33,3	14,3	-	-	-	-	28,6	-	14,3	-	-
18	-	-	33,3	16,7	33,3	-	-	-	-	-	33,3	-	-	16,7	-	-	50,1	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	16,7	33,3	-	-	-	56,7	-	-	50,1	-	-	16,7	-	-	-	-
20	-	-	33,3	16,7	-	-	-	-	-	-	33,3	16,7	-	33,4	-	-	-	-	33,4	33,3	-

Não ocorreu, nesta primeira avaliação, nenhum caso de branqueamento de tecido na luz; por outro lado, como se verá a seguir, só em um caso houve formação de embrióides no explantes incubados inicialmente na luz, contra seis casos, no escuro. A formação de calos e a oxidação do tecido são fatos também que, como o branqueamento, podem ou não estar ligados à formação do tecido embriogênico. Isto porque os calos podem ser de vários tipos, devido tanto ao tecido do qual ele se originou, quanto à sua interação com o meio de cultura e as condições de incubação, podendo portanto ser embriogênico ou não. STAMP & MEREDITH (1988) relataram que no caso da cultura de folhas de videira, os calos embriogênicos pareceram se formar diretamente a partir do explante ao invés do calo friável, e preferencialmente daqueles tecidos imersos no meio.

Neste trabalho, houve formação de tecidos embriogênicos sobre explantes oxidados, o que pode ser verificado na Figura 9. A Figura 9a mostra um explante com uma parte oxidada e outra parte, sem calo, de onde os embrióides parecem surgir diretamente do explante. Já a Figura 9b mostra um grupo de embrióides originados talvez do calo de cor creme que se apresenta na parte posterior.

Assim, na primeira avaliação, não se conseguiu encontrar nenhum indício de que o explante pudesse vir a produzir um tecido embriogênico.

Figura 9 - Embrióides do experimento nº 2 desenvolvendo-se em meio de indução; a) embrióides desenvolvendo-se diretamente do explante; b) grupo de embrióides originados provavelmente do calo de cor creme, que se apresenta na parte posterior.

Como já foi relatado, os explantes permaneceram no mesmo meio e nas mesmas condições de incubação ainda por dois meses e meio, quando então foram novamente avaliados sem que se notasse a presença de embrióides. Foram então transferidos para meio NN com 1,5ppm de NOA e 0,4ppm de 6-BA (de acordo com STAMP & MEREDITH, 1988) e todos foram incubados na luz.

Dois meses depois surgiram os primeiros embrióides para os tratamentos incubados inicialmente no escuro: 11 (0,2ppm de 6-BA e 1,0ppm de NOA) e 15 (1,0ppm de 6-BA e 1,0ppm de NOA). Outros embrióides foram surgindo ao longo dos meses, em outros tratamentos, como é mostrado na Tabela 40.

As Figuras 10 e 11 mostram estádios seqüenciais do desenvolvimento dos embriões, do estágio globular até uma plântula. A Figura 10a mostra um embrião em estágio globular, a 10b mostra um embrião em estágio de coração um pouco adiantado e a 10c e d, embriões ainda atados ao calo de origem, em estágio de torpedo. A Figura 11 mostra estádios mais adiantados em que os cotilédones já vão se tornando verdes, devido à formação de clorofila, chegando à formação de uma plântula.

Os embriões em diversos estádios de desenvolvimento (globular, coração e torpedo) foram sendo transferidos para meio MS com 1; 4 ou 5 μ M de 6-BA. Porém em nenhum desses meios de cultura apresentaram desenvolvimento normal, chegando alguns a estagnar e morrer.

Alguns embriões sobreviventes com seus explantes originais (Figura 12), ou não (Figura 13), foram passados para o meio NN com 1,5ppm de NOA, e 0,4ppm de 6-BA, acrescido porém de $1g.l^{-1}$ de caseína hidrolisada.

A Figura 12 mostra a proliferação desses embriões em meio com caseína hidrolisada, 2 meses após a incubação. Notam-se nessa figura embriões em diversos estádios de desenvolvimento.

A Figura 13 mostra um embrião com desenvolvimento anormal, que, ao ser passado para o meio fresco com caseína hidrolisada, passou a produzir embriões secundários.

Tabela 40 - Tratamentos do meio primário que produziram embriões, a partir de dois meses de incubação em meio secundário no experimento nº 2 de cultura de plântulas.

Nº DO TRAT.	INCUBAÇÃO INICIAL LUZ/ESCURO	REGULADORES VEGETAIS		PROLINA	NÚMERO DO FRASCO	DATA EM QUE OS EMBRIÕES DES FORAM OBSERVADOS
		6-BA	NOA			
---ppm---						
11	E	0,2	1,0	+	45	19.09.89
15	E	1,0	1,0	+	17	19.09.89
14	L	0,8	1,0	+	50	25.09.89
17	E	0,4	1,0	-	24	10.10.89
20	E	1,0	1,0	-	36	10.10.89
14	E	0,8	1,0	+	8	01.12.89
18	E	0,6	1,0	-	1	01.12.89

Figura 10 Estádios sequenciais de desenvolvimento dos embriões: a) globular; b) coração, já adiantado; c) e d) torpedo.

Figura 11 Embriões germinando, em estádios progressivos até uma plântula.

Figura 12 - Proliferação de embriões em meio NN com 1,5ppm de NOA, 0,4ppm de 6-BA e $1g.l^{-1}$ de caseína hidrolisada, 2 meses após a incubação.

Figura 13 - Embriões com desenvolvimento anormal, que ao ser incubado em meio idêntico ao citado na Figura 12, passou a produzir embriões secundários.

5. DISCUSSÃO

5.1. Estacas com forçamento de brotação

Os experimentos sobre estacas com forçamento de brotação foram baseados nos protocolos de GOUSSARD (1981). Com esse protocolo o autor conseguiu brotação e rápido alongamento em 5-8 dias. Isto significa que com estacas conservadas a frio ($2-3^{\circ}\text{C}$) e forçadas a brotar em altas temperatura ($28-30^{\circ}\text{C}$), sob iluminação constante, a quebra de dormência foi alcançada. O autor entretanto, não relata o tempo mínimo de permanência das estacas em câmara fria e nem a porcentagem de gemas brotadas dentro dos 5-8 dias citados. No primeiro experimento aqui relatado, as estacas dormentes do cultivar Iracema permaneceram em câmara fria apenas seis dias e quando efetuou-se a primeira avaliação, nove dias após a instalação do experimento, verificou-se baixa porcentagem de brotação o que significa que, o tempo de permanência em câmara fria pode ter sido insuficiente e que a 6-BA e a cianamida hidrogenada, nas concentrações utilizadas, não foram eficazes na quebra de dormência das gemas. Comparando-se o total de gemas brotadas no substrato água 15 dias após a instalação do experimento, com o

total de gemas brotadas 30 dias após, para o mesmo substrato (Tabela 22), verifica-se que ocorreu um aumento no total de gemas brotadas, o que significa que as gemas estavam viáveis e apenas não havia ocorrido a quebra de dormência.

Por outro lado WEAVER (1963) encontrou que aplicações exógenas de 6-BA a concentrações de 1000ppm aceleraram o fim do repouso da videira.

Para o total de gemas brotadas com nota maior ou igual a 6, onde se busca averiguar a rapidez e homogeneidade no alongamento dos ramos, para se poder utilizá-los como fonte de explante para a cultura *in vitro*, verificou-se através das avaliações efetuadas no experimento nº 1 (Tabelas 23), que para o substrato água, o comportamento no alongamento das brotações foi análogo ao total de gemas brotadas, isto é, aumentou com a passagem do tempo. Deve-se portanto procurar uma solução para a quebra da dormência, como foi alcançado por GOUSSARD (1981).

Nos 3 experimentos subseqüentes com o cultivar Maria, o tempo de permanência das estacas em câmara fria foi maior (34-134 dias) e este período já pode ter sido suficiente para a quebra da dormência, não revelando assim, o efeito de substâncias promotoras.

Embora não se possa comparar estatisticamente os três experimentos, verificou-se um aumento no total de gemas brotadas para o substrato água, a medida que se aumentou o tempo de permanência das estacas em câmara fria (Tabelas 24, 26 e 30). Entretanto deve-se lembrar que, no

último experimento (nº 4), utilizaram-se estacas com uma área transversal mais adequada, após as conclusões do experimento nº 3. Provavelmente por esses dois motivos citados, quanto a homogeneidade no alongamento das brotações, no experimento nº4 alcançou-se um bom resultado, quando aproximadamente 67,1% das gemas brotadas, já haviam alcançado o estágio de desenvolvimento 6, 10 dias após a instalação do experimento.

5.1.1. Efeitos da 6-benzilaminopurina

No decorrer das avaliações efetuadas, com relação ao número de gemas brotadas, não se verificou diferença significativa entre a testemunha e os tratamentos com 6-BA, nas concentrações utilizadas. Estes resultados compararam-se com os de MULLINS (1967) que, utilizando estacas dormentes de videira armazenadas a frio, e concentrações a partir de 10 ppm de 6-BA, não verificou diferenças aparentes na taxa de brotação quando comparada com a testemunha.

De acordo com SRINAVASAN & MULLINS (1981) a formação do eixo da inflorescência e flores na videira envolve três estádios bem definidos: a formação dos primórdios não comprometidos ("anlagen"), a formação do eixo da inflorescência e a formação de flores. O último estágio ocorre logo antes ou durante a brotação da gema. Os primórdios não comprometidos desenvolvem-se em inflorescências, gavinhas ou caule dependendo dos fatores ambientais e hormonais. SRINI-

VASAN & MULLINS (1978) já haviam verificado que citocininas aplicadas sobre gavinhas *in vitro*, podem transformá-las em inflorescências. Entretanto, no experimento nº 4, aqui relatado, não se verificou efeito positivo da 6-benzilamino-purina no aumento no número de inflorescências da videira 'Maria', considerando-se o método de aplicação e as concentrações utilizadas (Tabela 31).

5.1.2. Efeitos da calciocianamida e da cianamida hidrogenada

No primeiro experimento utilizaram-se concentrações de cianamida hidrogenada vinte vezes inferiores às recomendadas para pulverização no campo. Entretanto, como a absorção deste produto é fácil e o metabolismo é rápido, da forma como foram aplicadas, as concentrações utilizadas neste experimento foram excessivas. Por outro lado, nas avaliações aos 15 e 26 dias, o tratamento com a cianamida hidrogenada, na concentração mais baixa, não diferiu estatisticamente da testemunha, no que diz respeito ao número total de gemas brotadas. Isto pode significar que mesmo em concentrações mais baixas, a cianamida hidrogenada não superaria a testemunha no número total de gemas brotadas.

No segundo experimento, utilizando-se concentrações mais baixas de cianamida hidrogenada, estes tratamentos não diferiram estatisticamente da testemunha. Porém, deve-se lembrar que houve um tratamento a frio *a priori*. LIN

8. WANG (1985) conseguiram uma alta porcentagem de brotação tratando segmentos de estacas de videiras não dormentes, com apenas uma gema, utilizando 10.000ppm de cianamida hidrogenada. As bases das estacas permaneceram expostas à cianamida hidrogenada por apenas 15 minutos. Existe de fato um efeito da cianamida hidrogenada na quebra de dormência de gemas de videira, o que já foi comprovado por trabalhos de campo, com gemas de plantas dormentes (PIRES *et alii*, 1985; TERRA *et alii*, 1987).

Se a cianamida hidrogenada não superou a testemunha em termos de número de gemas brotadas, o mesmo é esperado para a calciocianamida, já que a primeira é o produto da decomposição da segunda.

Até o momento não se sabe qual das reações da cianamida hidrogenada tem a propriedade de quebra de dormência (GOLDBACH *et alii*, 1988). VILSMEIER & AMBERGER (1988) marcaram o nitrogênio e GOLDBACH *et alii* (1988) o carbono, para seguir os passos metabólicos da cianamida hidrogenada, mas não conseguiram chegar a uma conclusão sobre o seu modo de ação ao nível bioquímico.

Entre os produtos do metabolismo da cianamida encontram-se a uréia e a guaniluréia (GOLDBACH *et alii*, 1988). De acordo com KRIKORIAN *et alii* (1988), derivados de feniluréia como o N-fenil-N'-4 piridiluréia, têm atividades citocinínicas e são às vezes mais ativos do que a zeatina. Assim, há uma possibilidade de os produtos do metabolismo da

cianamida hidrogenada formarem compostos a partir da uréia com atividade citocininica, agindo na quebra de dormência.

5.1.3. Efeito do ácido giberélico (GA_3)

Nos experimentos aqui relatados, o tratamento com GA_3 20ppm, aplicado através de imersão da base das estacas, foi muito inferior à testemunha, quanto ao número de gemas brotadas, discordando dos resultados de ALBUQUERQUE (1979), onde o GA_3 , em concentrações mais elevadas, aplicado através de pincelamento próximo ao início da brotação da videira, proporcionou uma brotação maior e mais uniforme.

5.1.4. Efeito do ácido naftalenacético

O NAA não possui, provavelmente, nenhum efeito positivo na quebra de dormência de gemas em repouso (POWELL, 1988), sendo, porém, responsável pelo enraizamento das estacas. Assim, a citocinina produzida em pontas de raízes, é transportada predominantemente através do xilema, podendo exercer algum efeito no processo de quebra de dormência.

No segundo experimento, no qual se utilizou uma concentração elevada de NAA, observou-se uma grande produção de raízes. As poucas brotações que ocorreram foram geralmente em segmentos que não enraizaram ou que enraizaram muito pouco, mostrando, um certo antagonismo entre os processos (Figura 1).

O enraizamento seria importante, no caso de se desejar manter a inflorescência da videira e o desenvolvimento do fruto (MULLINS, 1967).

5.1.5. Efeito da extensão da área transversal das estacas

Notou-se, claramente, nos experimentos com estacas do cultivar Maria, que a extensão da área do corte transversal das mesmas é um fator muito importante na taxa de brotação. Isto foi determinado mais especificamente no experimento número 3 (Tabelas 28 e 29). A extensão da área transversal da estaca de videira expressa o seu estado de maturidade, podendo estar relacionada ao balanço hormonal e à reserva de nutrientes e carboidratos. Esses fatores contribuíram para a maior taxa de brotação em estacas com área média de $59,5\text{mm}^2$ em detrimento das com área de $29,4\text{mm}^2$.

5.2. Metodologia da cultura de óvulos não fertilizados

A revisão de literatura efetuada, mostra que a obtenção de embrióides a partir do tecido nucelar de óvulos de videira, embora tenha sido a primeira a ser relatada, não é a metodologia mais prática para a obtenção de embrióides. Mullins (1971) citado por RAJASEKARAN & MULLINS (1979) e mesmo MULLINS & SRINIVASAN (1976) relatam que tentaram obter embriogênese somática utilizando outros explantes de videi-

ra, sem obter nenhum resultado positivo. Várias informações a respeito do nucelo da videira e de outras espécies como a manga, levaram esses autores a concentrar esforços na obtenção do calo nucelar da videira, cuja chance de ser embriogênico era bastante grande. Esta tarefa, entretanto, não deve ter sido fácil, pois além de serem os óvulos de videira explantes que se oxidam e dessecam com facilidade (o que é favorecido pelo fluxo de ar laminar asséptico da capela dentro da qual os óvulos são isolados), estes explantes são inoculados em meio de cultura e, por isso, vários outros tecidos do óvulo, como os integumentos internos e externos, podem dar origem a calos, como de fato ocorreu. Apesar das dificuldades, MULLINS & SRINIVASAN (1976) desenvolveram e dominaram esta metodologia inclusive com alta frequência de obtenção de embrióides (SRINIVASAN & MULLINS, 1980). Além desses autores, apenas BESSIS (1985) conseguiu obter alguns embrióides, mas em baixa frequência e sem o controle da metodologia.

A tentativa de obtenção de calos e embrióides a partir do tecido nucelar de óvulos não fertilizados, neste trabalho, seguiu os procedimentos de MULLINS & SRINIVASAN (1976) e de SRINIVASAN & MULLINS, 1980.

Embora possa-se atribuir à utilização de meio de cultura sólido, na maior parte dos experimentos, como a causa do insucesso, devido a dessecação interna dos óvulos, em alguns experimentos utilizou-se meio líquido acrescido de outros cuidados como a utilização de anti-oxidante (cisteí-

na) e incubação prévia no escuro e mesmo assim não se obteve calo.

Utilizou-se a caseína hidrolisada em meio primário apenas no primeiro experimento, porque, de acordo com MULLINS & SRINIVASAN (1976), ela poderia favorecer o desenvolvimento dos integumentos, em detrimento do tecido nucelar. Entretanto, RAJASEKARAN & MULLINS (1985) utilizaram 1 g.l^{-1} de caseína hidrolisada em meio primário de NN com $5\mu\text{M}$ de 2,4-D e $1\mu\text{M}$ de 6-BA para a cultura de tecido nucelar de óvulos de videira e obtiveram resultados positivos.

O procedimento de incubar os óvulos em placa, aparentemente não os inviabilizou para o prosseguimento dos experimentos; o meio possuía carvão ativado, um anti-oxidante, que funciona muito bem no caso de cultura de ápices meristemáticos de videira; entretanto, pode ter ocorrido um início de dessecação interno do óvulo devido a problemas de translocação de água, o que não foi verificado na ocasião, uma vez que externamente os óvulos não apresentavam sinais de oxidação. Entretanto, no experimento nº4 os óvulos foram inoculados diretamente em meio líquido e embora tivesse ocorrido um pequeno aumento no tamanho dos óvulos, não houve a emersão de calo nucelar pela micrópila, ou formação de calo proveniente de algum outro tecido.

O segundo grupo de experimentos foi o que mais se aproximou em procedimentos aos relatados por SRINIVASAN & MULLINS, (1980), por isso pode-se considerar que a pré-incubação em meio de placa sólido tenha prejudicado em

algo. Entretanto, intriga o fato de não haver ocorrido formação de calos, nem a partir dos integumentos.

No terceiro experimento estudou-se também o efeito de épocas diferentes de maturação do óvulo, colhendo inflorescências em estádios diferentes, anteriores à antese para verificar se havia algum efeito do estágio de desenvolvimento do óvulo, pois de acordo com MULLINS & SRINIVASAN (1976) o óvulo jovem da videira possui nucelo maciço. Entretanto este pode não ser preservado à medida que o óvulo amadurece, podendo perder inclusive a sua capacidade de divisão celular; utilizou-se como regulador vegetal em meio primário apenas a 6-BA, de acordo com MULLINS & SRINIVASAN (1976).

No quarto experimento, mesmo aumentando a amplitude de reguladores vegetais testados, utilizando-se todas as medidas possíveis para evitar a oxidação, não se obteve ainda a formação de calos a partir de nenhum tecido do óvulo.

Embora não se possa concluir desses experimentos que seja impossível para os cultivares estudados, obter-se calos a partir do tecido nucelar, pode-se depreender pelo trabalho executado, e pela bibliografia revisada, que se trata de uma metodologia difícil e que exige muitos cuidados e, portanto, havendo um outro explante que produza embriões com maior facilidade, a cultura de óvulos deve ser evitada.

5.3. Metodologia da Cultura de Anteras

A obtenção de embriogênese somática em espécies de *Vitis* tem sido resultado de um processo de tentativas.

RAJASEKARAN & MULLINS (1979), os pioneiros na obtenção de embrióides a partir de anteras de videira, trabalharam com dois cultivares: um híbrido masculino denominado 'Gloryvine' e um cultivar muito importante de videira, Cabernet Sauvignon. Embora houvessem testado várias concentrações de reguladores vegetais, e utilizado um protocolo semelhante ao repetido muitas vezes depois por outros autores, não conseguiram obter embrióides a partir de 'Cabernet Sauvignon'. Esses autores propuseram que, em videira, a capacidade para produzir plântulas a partir de anteras é um caráter determinado geneticamente e a masculinidade, distintamente do hermafroditismo poderia ser um fator predisponente. Em 1983, os mesmos autores efetuaram um novo estudo com 21 genótipos de videira, incluindo novamente 'Cabernet Sauvignon' (RAJASEKARAN & MULLINS, 1983b). Desses 21 genótipos, apenas 11 produziram embrióides, mas todos produziram calos numa porcentagem que variou de 2 a 72%. Novamente não conseguiram sucesso na obtenção de embrióides de 'Cabernet Sauvignon'. Esses resultados foram obtidos, muito provavelmente, porque fixaram um único protocolo para todos os cultivares.

Por outro lado MAURO *et alii* (1986) estudaram 3 clones de 'Cabernet Sauvignon' e entre outros procedimentos que diferiram do protocolo dos autores supra citados, incluíram caseína hidrolisada em meio de cultura secundário, o que consideraram indispensável para a obtenção de embrióides a partir desse cultivar, tido como recalcitrante por RAJASEKARAN & MULLINS (1979, 1983b).

RAJASEKARAN & MULLINS (1979) consideraram o meio de cultura sólido como impróprio para o desenvolvimento de anteras de videira, mas MAURO *et alii* (1986) obtiveram sucesso utilizando meio de cultura sólido para anteras, inclusive com o mesmo cultivar utilizado pelos primeiros autores.

A quase totalidade dos autores admite a necessidade de se incubar no escuro as anteras, uma vez inoculadas em meio primário, para qualquer cultivar. Entretanto o pré-resfriamento das anteras ou inflorescências, os reguladores vegetais e suas concentrações, o tamanho exato da antera (que traduz em última análise o seu estágio de maturidade e do futuro grão de pólen desenvolvendo-se no seu interior), o meio de cultura líquido, sólido ou líquido/sólido como o utilizado com sucesso por STAMP & MEREDITH (1988), o seqüenciamento de meios e aditivos orgânicos, como a caseína hidrolisada e os aminoácidos, ou seja, a definição de um protocolo, depende de estudos para cada cultivar de videira ou até clones de um mesmo cultivar, como pode ser observado no trabalho de MAURO *et alii* (1986).

STAMP & MEREDITH (1988) encontraram diferenças nas respostas à embriogênese somática em material proveniente de campo ou de casa de vegetação, bem como diferenças na composição do meio de cultura e do estado líquido ou sólido, havendo uma certa interação entre eles.

O fato parece bem claro. Cada explante de antera apresenta um estado fisiológico individual, que se expressa a grosso modo como o seu "balanço hormonal". Esse "balanço hormonal" que o explante apresenta é resultado do seu genótipo em interação com o meio ambiente, que vem desde o local em que a inflorescência se desenvolveu (alta ou baixa intensidade luminosa, por exemplo), o estágio atual do seu desenvolvimento, sendo que quando for isolado vai interagir com a composição do meio de cultura que se utiliza, e todos os demais processos como: condições ambientais de incubação, seqüenciamento de meios, enfim, todo um procedimento de cultura.

Para se saber antecipadamente o procedimento de cultura ideal para o explante que se tem em mãos, tem-se que considerar o que foi dito por KRUL (1985): "O sucesso contínuo na produção de embrião somático virá às custas da compreensão das interações complexas entre substâncias de crescimento e padrões da expressão genética relacionada à regulação da divisão, expansão e diferenciação celular", e isto ainda levará algum tempo.

Nos experimentos executados neste trabalho utilizaram-se apenas anteras de inflorescências do cultivar

Maria provenientes de estacas conservadas em câmara fria. Embora a chance de sucesso estivesse limitada pela utilização de um cultivar apenas, procurou-se testar vários meios e procedimentos de cultura, e como já foi demonstrado pela literatura consultada, não foram esgotadas todas as possibilidades de ainda se poder obter embriões a partir da cultura de anteras desse cultivar.

Uma possibilidade de teste, partindo-se dos meios que já mostraram ser adequados para o desenvolvimento de calos, seria a utilização de caseína hidrolisada em meio secundário, pois a importância do seqüenciamento de meios de cultura já foi demonstrada por vários autores, entre eles MAURO *et alii* (1986), e a importância de novos testes de meios e procedimentos está bem demonstrada através do exemplo com o cultivar Cabernet Sauvignon.

5.4. Metodologia da cultura de plântulas, folhas, pecíolos e caule

A utilização de explantes vegetativos para a indução de embriogênese somática *in vitro* é sempre mais interessante devido à maior facilidade de obtenção e manuseio, evitando-se os melindres dos explantes florais, como óvulos e anteras.

Outra vantagem do explante vegetativo, utilizado neste trabalho é que ele já é proveniente da cultura *in vitro*, apresentando por isso dois pontos positivos: o

primeiro é que se pode mais facilmente obter um explante fisiologicamente homogêneo devido ao controle que se faz dos ambientes interno e externo; e o segundo é que eles não necessitam passar por um processo de descontaminação pois provêm de cultura asséptica, como foi bem lembrado por STAMP & MEREDITH (1988).

O explante vegetativo, utilizado neste trabalho, foi porém diferente dos utilizados pelos demais autores já referidos. Pela primeira vez, utilizou-se uma plântula inteira, embora sem raiz, sendo colocada no meio de cultura sólido como se estivesse sendo plantada. Já se tinha observado em experimentos preliminares que folhas de videira cultivadas isoladamente não davam bons resultados. Quando provenientes de material não cultivado *in vitro*, a porcentagem de contaminação chegou a 99%. Se provenientes de material cultivado *in vitro*, verificou-se a ocorrência de oxidação e o enraizamento a partir da base de corte dos pecíolos. Como anteras e óvulos já haviam sido testados e como STAMP & MEREDITH (1988) verificaram que folhas submersas em meio sólido haviam sido mais apropriadas para a produção de tecidos embriogênicos, resolveu-se verificar se as plântulas colocadas em meio de indução como se estivessem sendo "plantadas", evitando que tecidos do corte produzissem calos, poderiam gerar também tecidos embriogênicos. Esse procedimento talvez tenha evitado que outros tecidos, sem competência embriogênica, tivessem produzido calos em detrimento de tecidos competentes como é o caso da epiderme (KRUL, 1985).

Como STAMP & MEREDITH (1988) obtiveram grande proliferação de tecidos embriogênicos em meio NN suplementado com 1,5ppm de NOA e 0,4ppm de 6-BA, resolveu-se testar esse meio de cultura, como ponto de partida. No primeiro experimento em que se utilizou em meio primário o meio supra-referido e incubou-se por dois meses no escuro, os embrióides foram obtidos logo em meio primário, em 2 dos 4 frascos incubados, sendo que os outros dois frascos sofreram contaminação por fungos e portanto não puderam ser avaliados.

Este é um protocolo muito desejado, pois os embrióides são obtidos rapidamente sem a necessidade de seqüenciamento de meios de cultura, como descrito por vários outros autores (MULLINS & SRINIVASAN, 1976; KRUL & WORLEY, 1977 e MAURO *et alii*, 1986). No segundo experimento, entretanto, houve necessidade de seqüenciamento de meios porque o meio primário não foi adequado, provavelmente por causa da baixa concentração de NOA utilizada, em relação ao experimento anterior. Mas, tendo em vista o meio de cultura utilizado no primeiro experimento, vale lembrar que, no segundo experimento esse mesmo meio acrescido de 1g.l^{-1} de caseína hidrolisada proporcionou uma grande proliferação de embrióides (Figura 12).

O experimento nº 2 de cultura de plântulas foi iniciado antes do aparecimento de embrióides no experimento nº 1 e por isso não teve, na época de sua instalação nenhuma ligação de continuidade com o primeiro experimento. No-

tou-se, portanto, que concentrações mais baixas de NOA, 0,5 e 1,0ppm, foram desfavoráveis para a resposta inicial dos explantes, os quais, uma vez transferidos para meio de cultura com 1,5ppm de NOA apresentaram embrióides em alguns tratamentos e unicamente naqueles em que a incubação inicial havia sido efetuada em meio com 1,0ppm de NOA. Nesta ocasião, eles foram incubados na luz; não se sabe se essa foi a causa da baixa frequência de obtenção de embrióides (5,6% e 2,6% para as incubações iniciais no escuro e na luz, respectivamente), ou se o tempo demasiado de permanência em outros meios prejudicou a expressão da embriogênese. De qualquer forma, ficou claro que as concentrações de 6-BA utilizadas neste experimento não foram tão importantes quanto as de NOA (Tabela 21). E, certamente reafirmou-se o protocolo do primeiro experimento como o mais adequado.

Outros fatores, além do meio de cultura e os procedimentos de incubação podem ter estado envolvidos na resposta dos explantes à embriogênese somática. As plântulas utilizadas como explantes foram originadas de cultura *in vitro*, e se por um lado tem-se a hipótese de MULLINS & SRINIVASAN (1976), do tecido juvenil, por outro lado essas plântulas passaram por diversos meios de cultura, demonstrando um desenvolvimento vegetativo inadequado, como resposta ao protocolo utilizado, mas, quando em meio de indução para embriogênese somática, responderam positivamente.

Outros experimentos ainda serão necessários para se tentar isolar esses fatores e se ter uma idéia de

quais deles foram mais propícios para induzir um tecido, provavelmente a epiderme, a se transformar em um tecido embriogênico.

Uma vez obtidos os embrióides, independentemente do explante original utilizado, ou seja, anteras, óvulos, plântulas, etc., o próximo passo é fazê-los germinar para a obtenção de uma plântula, a qual deve ser posteriormente aclimatada, para ser levada ao campo. De acordo com KRUL (1985), a indução de embrióides e a germinação são processos antagônicos e a promoção de um geralmente resulta na depressão do outro.

A proliferação dos embrióides é geralmente muito grande. Uma vez que o tecido se torna embriogênico e começa a produzir embrióides, estes dão origem a embrióides secundários e terciários, tanto no meio de indução, como no meio de germinação, em embrióides e plântulas (KRUL & WORLEY, 1977; RAJASEKARAN & MULLINS, 1979 ; SRINIVASAN & MULLINS, 1980; RAJASEKARAN & MULLINS, 1983b; GRAY & MORTENSEN, 1987 e STAMP & MEREDITH, 1988). Nos experimentos deste trabalho verificou-se também que embrióides já germinados e plântulas, além dos embrióides em estádios iniciais de desenvolvimento, continuaram a produzir embrióides como está evidenciado na Figuras 2c, 6b, 12 e 13. No primeiro experimento, mais de 1055 embrióides foram obtidos a partir de dois explantes, ou seja, duas plântulas.

Entretanto, a germinação dos embrióides não ocorre com facilidade e foi objeto de vários estudos espe-

cíficos (RAJASEKARAN *et alii*, 1982 e TAKENO *et alii*, 1983).

Muitos autores relataram que conseguiram um aumento na germinação de seus embriões utilizando gibberelina e citocinina (MULLINS & SRINIVASAN, 1976); resfriamento a 4°C por no mínimo duas semanas (RAJASEKARAN & MULLINS, 1979); seqüenciamento de meios com NAA, 6-BA e baixa concentração de sacarose (HIRABAYASHI & AKIHAMA, 1982), remoção de cotilédones associada com três semanas de resfriamento (MAURO *et alii*, 1986); meio de MS contendo 1 µM de 6-BA (GRAY & MORTENSEN, 1987).

Já STAMP & MEREDITH (1988), para cultura de folhas, apresentaram um meio de cultura básico (NN ou MS) combinados com concentrações diferentes de vários reguladores vegetais, incluindo BAP, GA₃, IAA e NOA, para cada genótipo estudado; sendo que entre esses genótipos a porcentagem de embriões que produziram plântulas, variou de 17 a 42%.

No primeiro experimento deste trabalho, através de um seqüenciamento de meios, 75% dos 1055 embriões chegaram a germinar, sendo que 37% geraram plântulas amorfas, apresentando oxidação e atrofiamento, como mostrado na Figura 6a. Entretanto não se pode responsabilizar apenas o meio de cultura ou as condições de incubação por esse fenótipo apresentado, pois no mesmo frasco (Figura 7) desenvolveram-se tanto uma plântula perfeitamente normal (Figura 5), como uma plântula anormal (Figura 6a) e portanto o

estádio de desenvolvimento do embriãoide e sua interação com o meio de cultura principalmente com os reguladores vegetais devem ser melhor estudados.

6. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Neste trabalho propôs-se um protocolo para a obtenção de embriogênese somática *in vitro*, após o teste de vários tipos de explantes, meios e procedimentos de cultura, utilizando-se vários genótipos de videira.

Para a fonte de explante teve-se o cuidado de estudar a obtenção de material vegetal que fosse abundante e homogêneo, permitindo sua utilização durante o ano todo, após um certo período de armazenamento em câmara fria, que foi verificado ser importante. Nestes estudos verificou-se também que a imersão da base de estacas de videira 'Iracema' em solução de 6-BA (10, 15, 20 e 25 μ M) e de cianamida hidrogenada (245, 367,5 e 490ppm) não foi eficiente para quebrar a dormência de gemas de estacas com forçamento de brotação em laboratório e que, neste caso, as altas concentrações de cianamida hidrogenada utilizadas, foram prejudiciais. Para o cultivar 'Maria', as substâncias 6-BA, calcicocianamida e cianamida hidrogenada, aplicadas em soluções às bases das estacas, a várias concentrações, também não superaram a testemunha, nem quanto ao número de gemas brotadas, nem quanto ao número de gemas com nota maior ou igual a 6. O GA₃ (20ppm) e o NAA (20 e 200ppm) foram prejudiciais

à brotação das estacas. Por outro lado, a extensão da área transversal das estacas de videira influenciou a sua brotação, sendo que as de área transversal mais extensa, entre as duas utilizadas, aumentaram significativamente o número de gemas brotadas. Concluiu-se assim, destes experimentos, que para uma brotação rápida e homogênea de estacas de videira 'Maria', em laboratório, é importante utilizar-se estacas estocadas a frio, sendo que a extensão da área transversal das estacas desse cultivar deve ser em média $59,5\text{mm}^2$, utilizando-se como substrato apenas água.

As estacas com forçamento de brotação fornecem material vegetativo (folhas, caules e ápices meristemáticos de caule) e reprodutivo (óvulos não fertilizados e anteras), muito úteis para os trabalhos de cultura *in vitro*. Esta metodologia foi utilizada, neste trabalho, para a cultura de ápices merismáticos de caule e como fonte de explantes de anteras. Verificou-se no Grupo de Experimentos nº 1 de cultura de anteras que não houve necessidade de se efetuar a descontaminação superficial das flores, antes de se isolar as anteras, para inoculá-las *in vitro*.

Nos experimentos com culturas de óvulos não fertilizados verificou-se que nenhum meio ou procedimento de cultura testado propiciou o desenvolvimento de calos em nenhum tecido do óvulo, o que parece indicar que os procedimentos de cultura utilizados não foram adequados aos genótipos estudados.

Nos experimentos com culturas de anteras verificou-se que a 6-BA, independentemente da concentração utilizada foi um regulador vegetal essencial para a produção de calos. No que diz respeito à auxina NOA, as concentrações de zero, 0,5 e 1,0ppm foram mais adequadas para a produção de calo do que concentrações mais elevadas de 1,5 e 2,0ppm utilizadas. O aminoácido prolina mostrou-se desfavorável para a obtenção de calos e nenhum procedimento, como incubação de anteras em placa de petri na geladeira ou estádios de maturidade da antera (verde ou amarela) mostraram afetar a obtenção de calos.

Embora RAJASEKARAN & MULLINS (1983b) tenham afirmado que a habilidade das anteras para formar calos e embriões varia com o genótipo, considera-se que antes disso, a capacidade de um determinado genótipo manifestar a sua habilidade embriogênica, dentro do explante utilizado, seja ele antera ou outro qualquer, depende de todo o procedimento de cultura utilizado e este sim, varia muito com o genótipo e com o estado fisiológico do explante; e é por isso que foram descritos na literatura tantos diferentes procedimentos de cultura.

Neste trabalho, a embriogênese somática foi obtida com um tipo de explante ainda não descrito na literatura, e, embora se tivesse baseado no protocolo de STAMP & MEREDITH (1988), o protocolo aqui descrito distingue-se dos desses autores em alguns aspectos.

Neste trabalho, embriões somáticos foram obtidos, no primeiro experimento, quando plântulas desprovidas de raízes de videira 'Maria', provenientes de cultura de ápices merismáticos de caule *in vitro*, foram inoculadas em meio de cultura sólido (como se estivessem sendo plantadas); o meio de cultura constou do meio básico de NN, acrescido de 1,5ppm de NOA e 0,4ppm de 6-BA, após incubação no escuro por dois meses.

No segundo experimento de cultura de plântulas, utilizaram-se concentrações mais baixas de NOA em meio primário e embriões só foram obtidos quando os explantes foram transferidos para o meio que continha 1,5ppm de NOA e 0,4ppm de 6-BA, o que confirmou o protocolo do experimento nº 1. Entretanto, no experimento nº 2 verificou-se que transferindo-se os embriões para o meio de indução acrescido de 1g.l^{-1} de caseína hidrolisada, conseguiu-se uma grande proliferação de embriões.

O protocolo deste trabalho assemelha-se ao de STAMP & MEREDITH (1988) quanto ao meio de cultura utilizado, qual seja NN acrescido de 1,5ppm de NOA e 0,4ppm de 6-BA, embora os autores tivessem utilizado este meio como secundário, em um seqüenciamento de meios; difere do desses autores porque eles utilizaram folhas ao invés de plântulas e incubaram na luz ao invés de no escuro.

Este trabalho pode vir a ser importante, uma vez que se descreve aqui, pela primeira vez no Brasil, um protocolo para embriogênese somática em videira, uma cultura

em expansão. O protocolo aqui descrito e a bibliografia relatada e discutida com os procedimentos experimentais de outros explantes, podem servir de ponto de partida para muitos outros trabalhos, com 'Maria' ou com outros cultivares de videira.

Finalmente, o protocolo aqui descrito permite a obtenção de embrióides do cultivar Maria, com alta frequência, para uso imediato em Programa de Melhoramento Genético, pois trata-se de um cultivar muito importante, no qual se pretende introduzir resistência a doenças fúngicas, principalmente ao oídio, ao qual é muito susceptível.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ALBUQUERQUE, J.A.S. Influência do ácido giberélico na brotação da videira (*Vitis vinifera* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5., Pelotas, 1979. **Anais.** Sociedade Brasileira de Fruticultura, Pelotas, RS, 1: 73-80, 1979.
- BARTHE, Ph. & BULLARD, C. Bound and free abscisic acid levels in dormant and after-ripened embryos of *Pyrus malus* L. cv. Golden delicious. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, 90: 201-208, 1978.
- BESSIS, R. Callogénese et régénération chez le Pinot, le Chardonnay et le Gamay. In: COLLOQUE AMÉLIORATION DE LA VIGNE ET CULTURE IN VITRO, Paris, 1985. **Résumés des Communications.** Mœt Hennessy, Paris, France, 1985. p.19-20.
- BONNAIRE, A. & RIEDER, G. Cianamida hidrogenada un nuevo regulador de crecimiento para uva de mesa. **Aconex**, Chile, 9: 21-22, 1985.
- BOUQUET, A.; BENCHETRIT, G.; DANGLOT, Y. Production of somatic embryos and plantlets in seedless grapevines varieties (*Vitis vinifera*) by anther culture. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON GRAPE BREEDING, 5., St. Martin/Pfalz, 1989, **Abstracts.** Siebildengen, Bundesrepublik Deutschland, 1989. p.94.

- BOUQUET, A. & DANGLLOT, Y. Amélioration genetique des porte-greffes de vigne par culture *in vitro*. In: COLLOQUE AMÉLIORATION DE LA VIGNE ET CULTURE IN VITRO, Paris, 1985. *Resumés des Communications*. Mœt Hennessy, Paris, France, 1985. p.23-24.
- CAO, Z.Y.; LI, W.; GUO, C.Y.; QI, Y.S. The regeneration of plantlets from culture anthers picked from anther culture derived plants in grape *in vitro*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON GRAPPE BREEDING, 5., St. Martin/Pfalz, 1989. *Abstracts*. Siebeldingen, Bundesrepublik Deutschland. 1989. p.104.
- CERSOSIMO, A. Coltura *in vitro* di antere in *Vitis* sp. (primo contributo). *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, Cognigliano, 39(12): 520-531, dez. 1986.
- FAVRE, J.M. Premiers résultats concernant l'obtention *in vitro* de néoformations caulinaires chez la Vigne. *Annales de L'Amerioration des Plantes*, Paris, 27: 151-169, 1977.
- GOLDBACH, H.; THALER, Ch.; WUNSCH, A.; AMBERGER, A. Decomposition of ^{14}C -labelled Cyanamide in *Vitis vinifera* cuttings. *Journal of Plant Physiology*, Stuttgart, 133: 299-303, 1988.
- GOUSSARD, P.G. Effects of cytokinins on elongation, proliferation and total mass of shoots derived from shoot apices of grapevine cultured *in vitro*. *Vitis*, Geilweilerhof, 20(3): 288-234, out. 1981.
- GOUSSARD, P.G. Morphological responses of shoot apices of grapevine cultured *in vitro*. Effects of cytokinins in routine subculturing. *Vitis*, Geilweilerhof, 21(4): 293-298, dez. 1982.

GRAY, D.J. & MORTENSEN, J.A. Initiation and maintenance of long-term somatic embryogenesis from anthers and ovaries of *Vitis longii* 'Microsperma'. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, Netherlands, 9: 73-80. 1987.

GRESSHOFF, P.M. & DOY, C.H. Derivation of a haploid cell line from *Vitis vinifera* and the importance of the stage of meiotic development of anthers for haploid culture of this and other Genera. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, Stuttgart, 73: 132-141, 1974.

HAWKER, J.S.; DOWNTON, W.J.S.; WISKICH, D.; MULLINS, M.G. Callus and cell culture from grape berries. *HortScience*, Alexandria, 8(5): 398-399, out. 1973.

HIRABAYASHI, T.; KOZAKI, I.; AKIHAMA, T. *In vitro* differentiation of shoots from anther callus in *Vitis*. *HortScience*, Alexandria, 11(5): 511-512, out. 1976.

HIRABAYASHI, T. Somatic embryogenesis from leaf tissues of grape. In: COLLOQUE AMÉLIORATION DE LA VIGNE ET CULTURE IN VITRO, Paris, 1985. *Annales*. Möet Hennessy, Paris, France, 1985. p.75-82.

HIRABAYASHI, T. & AKIHAMA, T. *In vitro* embryogenesis and plant regeneration from the anther-derived callus of *Vitis*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, Yamanakako, 1982, *Proceedings*. Yamanakako, Japan, 1982. p.547-548.

KISHINO, A.Y.; NASCIMENTO, E.C. do; TUSNETA, M; CARVALHO, S.L.C. de; MASHIMA, M. Considerações sobre o uso da calciocinamida visando estimular a brotação de videira. *Informe da Pesquisa*, Londrina, Fundação Instituto Agrônômico do Paraná, ano II nº 7, 1978, 7pp.

- KRIKORIAN, A.D.; KELLY, K.; SMITH, D.L. Hormones in tissue culture and micro-propagation. In: DAVIES, P.J., **Plant hormones and their role in plant growth and development**. 2ª edição. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1988. cap. E-18, p.593-613.
- KRUL, W.R. Somatic embryo induction, expression and development. A general model. In: COLLOQUE AMÉLIORATION DE LA VIGNE ET CULTURE IN VITRO, Paris, 1985. **Annales. Mœt. Hennessy**, Paris, France, 1985. p.101-120.
- KRUL, W.R. & WORLEY, J.F. Formation of adventitious embryos in callus cultures of 'Seyval', a French hybrid grape. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Virginia, 102(3): 360-363, mai. 1977.
- LEBRUN, L.; RAJASEKARAN, K.; MULLINS, M.G. Selection in vitro for NaCl-tolerance in *Vitis rupestris* Scheele. **Annals of Botany**, London, 56, 733-739, 1985.
- LIN, C.H. & WANG, T.Y. Enhancement of bud sprouting in grape single bud cuttings by cyanamide. **American Journal of Enology and Viticulture**, Lodi, 36(1): 15-17, 1985.
- MARCHENKO, A.O.; GOLDRIGA, P.Y.; KLIMENKO, V.P.; PIVEN', N.M. Somatic embryogenesis in tissue culture of grapevine. **Fisiologiya i Biokhimiya Kul'turnykh Rastenii, Vsesoyuznyi**, 19: 408-411, 1987. Apud **Vitis, Viticulture and Enology Abstracts**, Geilweilerhof, 27(1): 4, mar. 1988. Resumo.
- MATSUTA, N. & HIRABAYASHI, T. Embryogenic cell lines from somatic embryos of grape (*Vitis vinifera* L.). **Plant Cell Reports**, Berlin, 7: 684-687, 1989.

- MAURO, M.CI.; NEF, C.; FALLOT, J. Stimulation of somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon.. *Plant Cell Reports*, Berlin, 5: 377-380, 1986.
- MILBORROW, B.V. & ROBINSON, D.R. Factors affecting the biosynthesis of abscisic acid. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 24(80) 537-548, jun. 1973.
- MULLINS, M.G. Test plants for investigations of the physiology of fruiting in *Vitis vinifera* L. *Nature*, London, 209:419-420, jan. 1966.
- MULLINS, M.G. Morphogenetic effects of roots and of some synthetic cytokinins in *Vitis vinifera* L. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 18(55): 206-214, mai. 1967.
- MULLINS, M.G. Regulation of inflorescence growth in cuttings of the grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 19(60): 532-543, ago. 1968.
- MULLINS, M.G.; NAIR, Y.; SAMPET, P. Rejuvenation *in vitro*; Induction of juvenile characters in an adult clone of *Vitis vinifera* L. *Annals of Botany*, London, 44: 623-627, 1979.
- MULLINS, M.G. & RAJASEKARAN, K. Fruiting cuttings: revised method for producing test plants of grapevine cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*, Davis, 32(1): 35-40, 1981.
- MULLINS, M.G. & SRINIVASAN, C. Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (cv. Cabernet-Sauvignon) by apomixis *in vitro*. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 27: 1022-1030, out.1976.

- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 15: 473-497, 1962.
- NIIMI, Y. Effect of light and chilling on callus formation from anther culture in *Vitis*. *Bulletin of the Hiroshima Agricultural College*, Saijyo-cho, 8: 337-340, 1987. Apud *Vitis, Viticulture and Enology Abstracts*, Geilweilerhof, 27(3): 76, 1988. Resumo.
- NITSCH, J.P. Growth and development *in vitro* of excised ovaries. *American Journal of Botany*, Baltimore, 38: 566-577, 1951.
- NITSCH, J.P. Physiology of flower and fruit development. *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Berlin, 15(1): 1537-1647, 1965.
- NITSCH J.P. & NITSCH, C. Haploid plants from pollen grains. *Science*, Washington, 163: 85-87, 1969.
- OFFER, C.J. & GOUSSARD, P.G. Effect of hot water treatments on bud-burst and rooting of grapevine cuttings. *Vitis*, Geilweilerhof, 19(1): 1-3, mar. 1980.
- PEDRO JR., M.J.; RIBEIRO, I.J.A.; POMMER, C.V.; MARTINS, F.P. Caracterização de estádios fenológicos da videira 'Niagara Rosada'. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 10., Fortaleza, 1989. Programa e Resumos. Sociedade Brasileira de Fruticultura, Fortaleza, CE, 1989. p.60.
- PEREIRA, F.M.; SIMÃO, S.; MARTINS, F.P.; LOWLER, P.; IGUE, T. Ação da calciocinamida e da giberelina na antecipação da maturação dos frutos da cultivar de videira Niagara Rosada. *Científica*, 7(3): 441-445, 1979.

- PIRES, E.J.P.; CASTRO, P.R.C.; DEMETRIO, C.G.B. Ação da calciocianamida e alzódef na época de brotação e produtividade da videira 'Niagara Rosada'. *Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz"*, Piracicaba, 52: 469-479, 1985.
- PIRES, E.J.P.; FAHL, J.I.; TERRA, M.M.; PASSOS, I.R.S.; CARELLI, M.L.C., MARTINS, F.P. Effects d'agents chimiques dans l'induction du débourrement, du développement des pousses et de la production de la variété 'Niagara Rosada' (*Vitis labrusca* L. x *Vitis vinifera* L.). *Bulletin de l'O.I.V. Office International de La Vigne et du Vin*. Paris, 63(709-710): 243-251, março/abril, 1990.
- PIRES, E.J.P.; PASSOS, I.R.S. TERRA, M.M.; MARTINS, F.P. A expansão da viticultura no Brasil. *O Agrônomo*, Campinas, 38(2): 139-144, 1986.
- POWELL, E.L. The hormonal control of bud and seed dormancy in woody plants. In: DAVIES, P.J., ed. *Plant hormones and their role in plant growth and development*. 2ª edição. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1988. cap. E-15, p.539-552.
- RAJASEKARAN, K. & MULLINS, M.G. Embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 30: 399-407, jun. 1979.
- RAJASEKARAN, K. & MULLINS, M.G. Organogenesis in internode explants of grapevines. *Vitis*, Geilweilerhof 20: 218-227, out, 1981.
- RAJASEKARAN, K. & MULLINS, M.G. The origin of embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*, Davis, 34(2): 108-113, 1983a.

- RAJASEKARAN, K. & MULLINS, M.G. Influence of genotype and sex-expression on formation of plantlets by cultured anthers of grapevine *Agronomie*, Paris, 3(3):233-238, 1983b.
- RAJASEKARAN, K. & MULLINS, M.G. Somatic embryo formation by cultured ovules of Cabernet Sauvignon grape. Effects of fertilization and of the male gameticide toluidine blue. *Vitis*, Geilweilernos, 24(3): 151-157, 1985.
- RAJASEKARAN, K.; VINE, J.; MULLINS, M.G. Dormancy in somatic embryos and seeds of *Vitis*: Changes in endogenous abscisic acid during embryogeny and germination. *Planta*, Berlin, 154: 139-144, 1982.
- REISCH, B.I.; ALDWINCKLE, H.A.; ROBERTS, M.H. & KIN, S.K. I. Embryogenesis from petiole culture of 'Horizon' grapes. II. *In vitro* grape shoot tip mutagenesis. In: COLLOQUE AMÉLIORATION DE LA VIGNE ET CULTURE *in vitro*, Paris, 1985. *Annales*. Mœt Hennessy, Paris, France. 1985 p.161-170.
- SHULMAN, Y.; NIR, G.; FANBERSTEIN, L.; LAVEE, S. The effect of cyanamide on the release from dormancy of grapevine buds. *Scientia Horticulturæ*, Amsterdam, 19:97-104, 1983.
- SKENE, K.G.M. Stimulation of germination of immature bean embryos by gibberellic acid. *Planta*, Berlin, 87:188-192, 1969.
- SONDHEIMER, E.; GALSTON, E.C.; TINELLI, E.; WALTON, D.C. The metabolism of hormones during seed germination and dormancy. IV. The metabolism of (S)-2-¹⁴C- Absciscic acid in ash seed. *Plant Physiology*, Lancaster, 54:803-808, 1974.

- SRINIVASAN, C. & MULLINS, M.G. Control of flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.). Formation of inflorescences *in vitro* by isolated tendrils. *Plant Physiology*, Lancaster, 61:127-130, 1978.
- SRINIVASAN, C. & MULLINS, M.G. Flowering in *Vitis*: Conversion of tendrils into inflorescences and bunches of grapes. *Planta*, Berlin, 145:187-192, 1979.
- SRINIVASAN, C. & MULLINS, M.G. High-frequency somatic embryo production from unfertilized ovules of grapes. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, 13:254-252, 1980.
- SRINIVASAN, C. & MULLINS, M.G. Physiology of flowering in the grapevine - A REVIEW. *American Journal of Enology and Viticulture*, Davis, 32(1): 47-63, 1981.
- STAMP, J.A. & MEREDITH, C.P. Somatic embryogenesis from leaves and anthers of grapevine. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, 35:235-250, 1988.
- TAKENO, K.; KOSHIOKA, M.; PHARIS, R.P.; RAJASEKARAN, K.; MULLINS, M.G. Endogenous gibberellin-like substances in somatic embryos of grape (*Vitis vinifera* x *Vitis rupestris*) in relation to embryogenesis and the chilling requirement for subsequent development of mature embryos. *Plant Physiology*, Lancaster, 73:803-808, 1983.
- TERRA, M.M.; FAHL, J.I.; PIRES, E.J.P.; PASSOS, I.R.S.; MARTINS, F.P.; CARELLI, M.L.C. Efeitos de doses e modos de aplicação de calciocianamida na brotação e na produção de videira 'Niagara Rosada' (*Vitis labrusca* L. x *V. vinifera* L.) In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE ENOLOGIA E VITICULTURA, 2.; JORNADA LATINO-AMERICANA DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 2.; SIMPÓSIO ANUAL DE VITIVINICULTURA, 2., Garibaldi/Bento Gonçalves, 1987. *Anais*. Garibaldi/Bento Gonçalves, RS p. 287-289, 1987.

- TERRA, M.M.; FAHL, J.I.; RIBEIRO, I.J.A.; MARTINS, F.P.; SCARANARI, H.J. Efeitos da calciocianamida sobre a videira 'Niagara Rosada' (*Vitis labrusca* L. x *V. vinifera* L.) In: CONGRESS OF AMERICAN SOCIETY FOR HORTICULTURAL SCIENCE, 29., Campinas, 1982, *Proceedings of the Tropical Region*. Campinas, SP. 25: 473-475, 1982.
- TERRA, M.M.; POMMER, C.V.; PIRES, E.J.P. Considerações para elaboração de um plano nacional para a vitivinicultura. *O Agrônomo*, Campinas, 41(2): 122-131, mai./ago., 1989.
- THEVENOT, C. Correlation between axis and cotyledons in apple-embryo dormancy. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, Stuttgart 106(1): 15-26, 1982.
- VILSMEIER, K. & AMBERGER, A. Uptake and metabolism of ¹⁵N labelled cyanamide by cuttings of grapevine. *Vitis*, Geilweilerhof, 27(4) 223-228, dez. 1988.
- WEAVER, R.J. Use of kinin in breaking rest in buds of *Vitis vinifera*. *Nature*, Londres, 198: 207-208, abr., 1963.
- WHITE, P.R. A Handbook of Plant Tissue Culture. The Jaques Cattell Press, Lancaster, Pennsylvania, 1943. 177p.
- WUNSCH, A. & AMBERGER, A. Uptake and stability of dicyandiamide in grapevines. *Vitis*, Geilweilerhof, 28(2): 81-84, jun. 1989.
- YOUNG, E. & WERNER, D.J. 6-BA applied after shoot and/or root chilling and its effect on growth resumption in apple and peach. *HortScience*, Alexandria, 21(2): 280-281, abr. 1986.

ZOU, C.J. & LI, P.F. Induction of plantlets from grape (*Vitis vinifera* L.) pollen. *Acta Botanica Sinica*, Shandog, 23(1): 79-81, 1981. Apud *Plant Breeding Abstracts*, Cambridge, 52(7): 552, jul. 1982. Resumo.

A P E N D I C E

I. MEIO BÁSICO DE MURASHIGE & SKOOG (1962)

a) Solução salina:

Macronutrientes	ppm
NH_4NO_3	1.650
KNO_3	1.900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170

Micronutrientes	ppm
Na_2EDTA	37,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
H_3BO_3	6,2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10,6
KI	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025

b) Suplementos orgânicos utilizados

Nome	Concentração (μM)
Inositol	550
Cisteína	500
Tiamina	30
Piridoxina	10
Ácido nicotínico	15
Sacarose	30g.l^{-1}
Agar	9g.l^{-1}
pH	5,6-5,8

II. MEIO BÁSICO DE NITSCH & NITSCH (1969)

a) Solução salina:

Macronutrientes	ppm
NH_4NO_3	720
KNO_3	950
CaCl_2	166
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	185
KH_2PO_4	68

Micronutrientes	ppm
Na_2EDTA	37,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
H_3BO_3	10
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	25
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025

b) Suplementos orgânicos utilizados

Nome	Concentração (ppm)
Glicina	2
Acido nicotínico	5
Piridoxina HCl	0,5
Tiamina HCl	0,5
Acido Fólico	0,5
Biotina	0,05
Mio-inositol	100
Sacarose	20g. l^{-1}
Agar	8g. l^{-1}
pH	5,5

III. MEIO DE PRÉ-INCUBAÇÃO OU MEIO DE PLACA

0,5 x MS (Macronutrientes e Fe EDTA)

0,5 x NN (Micronutrientes)

1 x NN (Vitaminas)

Inositol 550 μ M

Cisteína 500 μ M

Sacarose 20g.l⁻¹

Carvão ativo 4g.l⁻¹

Agar 7g.l⁻¹

pH 5,5