

MICROPROPAGAÇÃO DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA '420-A'¹

PRYSCILLA MENARIN DZAZIO², LUIZ ANTONIO BIASI³, FLÁVIO ZANETTE⁴

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para a micropropagação do porta-enxerto de videira 420-A. O estabelecimento das culturas foi realizado com segmento nodal, cuja fonte dos explantes foram brotações de estacas lenhosas armazenadas sob refrigeração. No cultivo inicial, foram testados: o efeito de 6-benzilaminopurina e cinetina nas concentrações de 0; 1; 5 e 10 μM , diferentes meios de cultura (MS, NN e WPM) e diluições do meio básico (MS, MS/2, MS/4 e MS/8). Na fase de alongamento e multiplicação, os meios de cultura testados foram MS, MS/2, NN e WPM. No enraizamento, foram testados: o meio de cultura MS/2 sem e com carvão ativado (1gL^{-1}). Na aclimatização, foram testados vermiculita, Plantmax® e casca de arroz carbonizada como substrato. A cinetina não apresentou efeito sobre a brotação e o crescimento dos segmentos nodais. Já o BAP promoveu um aumento no número de brotos por explante. O aumento na concentração de BAP reduziu o número de folhas emitidas por explante e aumentou os sintomas de vitrificação, sendo os melhores resultados obtidos com 1 μM de BAP. No cultivo inicial, o meio de cultura MS, com a concentração normal de sais, permitiu o maior crescimento das brotações. As diluições do meio MS em 1/4 e 1/8 mostraram-se prejudiciais ao desenvolvimento do porta-enxerto '420-A', afetando o crescimento das brotações após o primeiro subcultivo. Durante a multiplicação o meio MS/2 foi o que proporcionou melhores resultados. O enraizamento ocorreu naturalmente durante a multiplicação, sendo desnecessário o uso de carvão ativado no meio de cultura. A aclimatização foi realizada com sucesso em câmara de nebulização, com substrato vermiculita (95,8%) e Plantmax® (87%). Conclui-se que o porta-enxerto '420-A' pode ser micropropagado pelo cultivo inicial de segmentos nodais em meio de cultura MS + 1 μM de BAP, alongamento das brotações e multiplicação pelo seccionamento das mesmas em meio MS/2 e aclimatização em substrato vermiculita ou Plantmax®.

Termos para indexação: videira, porta-enxerto, cultura de tecidos, micropropagação.

MICROPROPAGATION OF '420-A' GRAPEVINE ROOTSTOCK

ABSTRACT - The objective of this work was to establish a protocol for the rootstock of 420-A micropropagation. The establishment of the cultures was accomplished with nodal segments, whose source of explants was the budding of woody stakes stored under refrigeration. In the initial cultivation were tested: the effect of 6-benzilaminopurine and kinetin with 0, 1, 5 and 10 μM concentrations, different culture medium (MS, NN and WPM) and dilutions of the basic medium (MS, MS/2, MS/4 and MS/8). In the elongation and multiplication steps were tested the following culture medium: MS, MS/2, NN and WPM. In the rooting were tested: the MS/2 culture medium with or without activated coal (1gL^{-1}). In the acclimatization were tested the substrate vermiculite, Plantmax® and carbonized rice hulls. The kinetin didn't present effect on the budding and the growth of the nodal segments. BAP already promoted an increase in the number of sprouts per explant. The increase in the concentration of BAP reduced the number of leaves emitted by explant and increased the vitrification symptoms, being the best results obtained with 1 μM of BAP. In the initial cultivation the MS medium culture with the normal concentration of salts allowed the largest growth of the buddings. The dilutions of the MS medium in 1/4 and 1/8 showed very harmful to the development of the rootstock '420-A', being quite harmed the growth of the shoots after the first subcultivation. During the multiplication the medium MS/2 showed more appropriate. The roots happened naturally during the multiplication, being unnecessary the use of activated coal in the culture medium. The acclimatization was accomplished with success in a misty camera, being obtained high survival rates in vermiculite (95,8%) and Plantmax® (87%). It is concluded that the rootstock '420-A' can be micropropagated by initial cultivation of nodal segments in a culture medium of MS+1 μM of BAP, multiplication by sectioning the shoots in MS/2 medium and acclimatization in vermiculite substratum or Plantmax®.

Index terms: vine, rootstock, tissue culture, micropropagation.

INTRODUÇÃO

A videira apresenta grande valor econômico e social para o desenvolvimento do nosso País. A atividade concentra-se na produção de uvas de mesa e matéria-prima na elaboração de vinhos e outros derivados.

O método de propagação mais empregado no Brasil consiste no plantio de porta-enxertos no local definitivo do futuro vinhedo para posterior enxertia no campo das variedades de interesse (Souza, 1996). A formação do vinhedo por este método leva, no mínimo, dois anos e, apesar de apresentar baixo custo, favorece a disseminação de várias doenças (Regina et al., 1998). As técnicas de micropropagação são uma importante alternativa visando à formação mais rápida do vinhedo e à obtenção em larga escala de material vegetativo de boa qualidade fitossanitária.

A micropropagação de videiras consiste basicamente no processo de enraizamento de brotações axilares ou adventícias multiplicadas *in vitro*, para a regeneração de plantas inteiras. Este processo possibilita a rápida multiplicação de plantas, a obtenção de plantas-matrizes livres de vírus, a propagação de híbridos e a preservação de

germoplasmas de interesse (Krul & Mowbray, 1984). Os explantes normalmente utilizados são segmentos nodais (Gribaldo & Fronda, 1991), ápices meristemáticos (Yu & Meredith, 1986) e meristemas (Passos et al., 1985). Os segmentos nodais constituem-se de microestacas com apenas 1 gema lateral mais uma pequena porção dos tecidos adjacentes do caule e pecíolo, variando de 8 a 25 mm de comprimento (Griboudo & Fronda, 1991; Martinez & Tizio, 1989; Mullins et al., 1979).

Os ápices meristemáticos são retirados da extremidade apical das brotações com cerca de 2 a 4 primórdios foliares e 0,5 a 1,5 mm de comprimento (Botti et al., 1993; Chée & Pool, 1982; Goussard, 1981).

Os meristemas também são retirados da extremidade das brotações, mas possuem um tamanho menor do que os ápices, atingindo no máximo 0,5 mm de comprimento (Troncoso et al., 1988; Novák & Juvová, 1983). Meristemas menores do que 0,3 mm dificilmente regeneram novas plantas (Koruza & Jelaska, 1993).

Pela cultura de meristemas, em conjunto com a termoterapia, é possível a obtenção de clones livres de vírus, que dificilmente são eliminados apenas com o tratamento térmico (Barlass et al., 1982; Koruza & Jelaska, 1993).

A utilização dos ápices e dos meristemas também permite o

1 (Trabalho 155/2001). Recebido: 02/10/2001. Aceito para publicação: 08/07/2002.

Extraído da dissertação de Mestrado do primeiro autor.

2 Professora. CEDETEG. Rua Simeão Camargo Varella de Sá, 03.85.040-080. Guarapuava-PR

3 Professor Adjunto. Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo. Setor de Ciências Agrárias. UFPR. Caixa Postal 19061.80001-970. Curitiba-PR. Bolsista em Produtividade do CNPq.

4 Professor Titular. Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo. Setor de Ciências Agrárias. UFPR. Caixa Postal 19061. 80001-970. Curitiba-PR

estabelecimento de culturas com baixíssimo índice de contaminação e possibilita a eliminação de outros patógenos, como viróides, organismos semelhantes a micoplasmas e bactérias (Barlass, 1987).

A micropropagação também é uma alternativa viável para a multiplicação de videiras muscadíneas, que apresentam grande interesse para o melhoramento de plantas, mas cuja propagação através de estacas lenhosas é muito difícil (Gray & Benton, 1990; Gray & Benton, 1991; Gray & Fisher, 1985; Lee & Wetzstein, 1990; Thies & Graves Junior, 1992; Wetzstein & Myers, 1994).

O potencial de multiplicação *in vitro* é elevado, sendo estimado por Botti et al. (1993) a obtenção anual de 2808990 brotações da cultivar Thompson Seedless, 26494 brotações da cultivar Ribier e 1213 da cultivar Black Seedless em meio MS com 2 mgL⁻¹ de BAP, a partir de um explante. Harris & Stevenson (1982) estabeleceram um protocolo capaz de produzir 12000 brotações em 4 meses, a partir de apenas um ápice meristemático. Na cultura de ápices fragmentados, Barlass & Skene (1978) estimaram a produção de aproximadamente 8000 plantas em 4 meses.

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

Este trabalho foi realizado para estabelecer um protocolo de micropropagação para o porta-enxerto de videira '420-A'.

MATERIALE MÉTODOS

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

Material vegetal:

O porta-enxerto '420-A' é um híbrido originado do cruzamento entre as espécies *Vitis berlandieri* e *Vitis riparia* (Pommer et al., 1997). Para o fornecimento contínuo e uniforme de explantes, foi utilizada a metodologia adaptada por Biasi et al. (1998a). As estacas lenhosas foram coletadas em julho de 1999, das plantas matrizes do viveiro de mudas frutíferas da Fazenda Experimental do Canguiri da UFPR, localizada em Pinhais-PR.

Depois foram tratadas com captan (2gL⁻¹), enroladas em jornal úmido, acondicionadas dentro de sacos plásticos e armazenadas em temperatura fria (4 a 6°C). Quando havia necessidade de explantes, as estacas foram retiradas do refrigerador, cortadas em segmentos com 2 ou 3 gemas e colocadas para brotar em frascos contendo cerca de 100 mL de água, na sala climatizada para as culturas *in vitro*. As brotações das estacas foram utilizadas como fonte de explantes.

Todos os experimentos foram mantidos dentro de uma sala climatizada, com fotoperíodo de 16 horas fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia, e temperatura de 25±1°C.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, com 10 mL de meio de cultura. Em todos os experimentos *in vitro* o delineamento utilizado foi de blocos ao acaso com 4 repetições e 10 frascos por parcela. Em cada frasco foi colocado apenas um explante. A avaliação dos experimentos foi realizada após 30 dias da sua instalação.

Estabelecimento da cultura *in vitro*:

A assepsia das brotações das estacas, com cerca de 5 nós sem as folhas, que foram cortadas pelos pecíolos, foi realizada pelo tratamento das brotações com benomyl (2 gL⁻¹), seguida pela imersão em solução de hipoclorito de sódio (2,5%) mais Tween 20 (0,1%), por 20 minutos e 4 lavagens em água esterilizada. O ápice das brotações foi desprezado, e o restante foi dividido em segmentos nodais com cerca de 1 cm de comprimento cada, possuindo uma gema axilar.

Foram testados o efeito de concentrações de BAP e cinetina: 0,

1, 5 e 10 µM, em meio de cultura MS com a metade da concentração de sais solidificado com 6,5 gL⁻¹ de ágar. Também foram testadas as seguintes diluições do meio de cultura MS: MS, MS/2, MS/4 e MS/8 e os seguintes meios de cultura: MS, MS/2, NN e WPM, sendo utilizado 1 µM de BAP em todos os meios de cultura.

Alongamento e multiplicação:

Os tratamentos foram os seguintes meios de cultura: MS, MS/2, NN e WPM. Os explantes consistiram em segmentos nodais com 1 folha e gema axilar, com aproximadamente 10 mm de comprimento, retirados de plantas crescidas *in vitro*, provenientes do primeiro subcultivo em meio de cultura isento de reguladores de crescimento.

Enraizamento:

Os tratamentos foram: meio de cultura MS/2 com e sem 1 gL⁻¹ de carvão ativado. Os explantes consistiram em segmentos nodais com 1 folha, com aproximadamente 10 mm de comprimento, retirados de plantas crescidas *in vitro*, provenientes do primeiro subcultivo em meio de cultura isento de reguladores de crescimento.

Aclimatização:

O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso com 3 repetições e 10 plantas por parcela. A aclimatização foi realizada em câmara de nebulização com intervalo de rega de 30 minutos. Os tratamentos foram os seguintes: vermiculita, Plantmax® e casca de arroz carbonizada. As plantas enraizadas foram acondicionadas em tubetes plásticos e a avaliação da sobrevivência foi realizada após 30 dias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estabelecimento da cultura *in vitro*:

A análise de variância para o efeito de BAP, não apresentou significância sobre a porcentagem de gemas axilares brotadas, o comprimento das brotações principais, a porcentagem de segmentos nodais oxidados e a porcentagem de explantes perdidos por oxidação e contaminação. Porém, adição de BAP no meio de cultura afetou o número de brotos por explante e o número de folhas presentes na brotação principal.

A maior quantidade de brotos por explante foi encontrada nos meios com presença de BAP (Tabela 1). A multiplicidade de brotos é característica deste regulador, que induz a formação de grandes números de brotos e alta taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação (Martinelli, 1985). Fanizza et al. (1988), encontraram brotos múltiplos no cultivo de meristemas apicais de cultivares de *Vitis vinifera*, especialmente em altas concentrações de BAP (2 mgL⁻¹). Brotos múltiplos de gemas axilares também foram observados no trabalho realizado por Novák & Juvová (1982).

TABELA 1 - Efeito de concentrações de BAP na porcentagem de gemas axilares brotadas, no comprimento das brotações, no número de brotos por explante e no número de folhas da brotação principal das gemas axilares em segmentos nodais do porta-enxerto '420-A', após 30 dias.

BAP (mM)	Brotação (%)	Comprimento das brotações (cm)	Nº brotos/explante	Nº folhas da brotação principal
0	47,50 ²	0,76 ²	0,78b ¹	1,42ab ²
1	63,88	1,12	1,3ab	2,11 ^a
5	90,95	0,87	1,76a	0,72b
10	66,40	0,66	1,75a	0,16b
C.V.(%)	45,59	32,96	25,65	52,03

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente, pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

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

Encontrou-se maior número de folhas nos tratamentos com ausência de BAP e na concentração de 1 μM (Tabela 1). Concentrações mais altas diminuíram a quantidade de folhas, afetando seu desenvolvimento e a qualidade das brotações, que apresentaram sintomas de vitrificação. A vitrificação é um problema comum no cultivo de videiras, notadamente, em altas concentrações de BAP (Harris & Pool, 1985; Gray & Benton, 1991).

Chée & Pool (1985), trabalhando com o híbrido 'Remaily Seedless', definiram ótimas concentrações para a multiplicação do broto (5 μM), para produção de brotos maiores (2,5 μM) e para a máxima expansão dos internos (1 μM), concluindo que o efeito do BAP, em concentrações mais baixas, foi mais eficiente na qualidade e crescimento do explante. Para Biasi et al. (1998a), o aumento da concentração de BAP induziu o crescimento das gemas axilares dos segmentos nodais do porta-enxerto 'Jales' até a concentração de 11,5 μM , quando passou a reduzir seu crescimento.

Portanto, concordando com Biasi et al. (1998a) e Lee & Wetzstein (1990), concentrações de BAP devem ser adequadas para cada cultivar, otimizando o processo para a obtenção de brotações de boa qualidade e com mínimo de vitrificação, mesmo que a taxa de crescimento seja menor. Pois, fases subsequentes dependem do bom estado fisiológico das brotações.

Para o efeito da cinetina, a análise de variância não apresentou significância para todas as variáveis analisadas. Apesar do efeito da cinetina no desenvolvimento das gemas axilares não ser significativo, observa-se que para o comprimento das brotações principais e número de folhas, a concentração de 1 μM foi superior (Tabela 2). Gray & Benton (1991) observaram a ineficiência da cinetina na micropropagação de cultivares de videira, onde os meios com e sem a presença do regulador de crescimento apresentaram o mesmo efeito.

TABELA 2 - Efeito de concentrações de cinetina na porcentagem de gemas axilares brotadas, no comprimento das brotações e no número de folhas da brotação principal das gemas axilares em segmentos nodais do porta-enxerto '420-A', após 30 dias.

Cinetina (μM)	Brotação (%)	Comprimento das brotações (cm)	Nº folhas/brotação Principal
0	33,63 ¹	0,96 ¹	0,91 ¹
1	26,88	1,70	2,42
5	23,81	1,11	1,12
10	33,33	0,94	0,83
C.V.(%)	37,85	41,83	64,10

¹Médias não diferem significativamente, pelo teste F, em nível de 5% de probabilidade.

O baixo efeito da cinetina na indução do crescimento e desenvolvimento de gemas axilares também pode ser observado no trabalho com *Vitis rotundifolia* (Sudarsono & Goldy, 1991), e no trabalho realizado por Skene & Barlass (1980) com ápices fragmentados. Já, Novák & Juvová (1982), observaram que a cinetina afetou o crescimento e desenvolvimento de meristemas de gemas axilares em todas as concentrações testadas.

As diferentes diluições do meio de cultura MS testadas apresentaram resultados significativos para o comprimento da brotação principal, para número de folhas do explante, para a porcentagem de explantes com calo e para a porcentagem de explantes perdidos por contaminação e oxidação. A porcentagem de gemas axilares brotadas e o número de brotos por explante, não foram afetados pelas diferentes diluições do meio MS.

O maior comprimento da brotação principal da gema axilar foi de 24 mm obtido no meio de cultura MS com a concentração normal de sais (Tabela 3). Vários são os trabalhos que indicam o meio MS normal no estabelecimento inicial da cultura (Lewandowski, 1991; Yu & Meredith, 1986; Goussard, 1982; Goussard, 1981; Novák & Juvová, 1982; Lu &

Wetzstein, 1990; Gray & Benton, 1990).

Apesar da superioridade do MS normal, observado neste parâmetro analisado, existe a tendência dos efeitos do MS normal e MS/2 se igualarem à medida que são realizados os subcultivos. Já, o MS/4 apresentou uma redução no crescimento das brotações no primeiro subcultivo realizado após os 30 dias no meio de indução com presença de BAP.

Para a variável número de folhas, os meios MS normal, MS/2 e MS/4 apresentaram os maiores números de folhas (Tabela 3).

TABELA 3 - Efeito de diferentes diluições do meio de cultura MS na porcentagem de gemas axilares brotadas, no comprimento das brotações, no número de brotos por explante, na porcentagem de explantes perdidos por oxidação e contaminação e no número de folhas da brotação principal das gemas axilares em segmentos nodais do porta-enxerto '420-A', após 30 dias.

MS	Brotação (%)	Comprimento das brotações (cm)	Nº brotos/explante	Nº folhas da brotação principal	Explantes perdidos (%)
MS	63,48 ²	2,44a ¹	1,25 ²	3,62a ¹	52,5b ¹
MS/2	85,35	1,79b	1,29	3,13 ^a	42,5b
MS/4	96,43	1,26c	1,18	2,88 ^a	47,5b
MS/8	82,14	0,66d	1,25	0,45b	80,0a
C.V.(%)	20,83	13,52	24,95	24,31	17,02

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente, pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

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

O MS normal também foi superior no desenvolvimento de meristemas apicais da cultivar 'Blanc Du Bois' (Gray & Klein, 1989). Estes autores sugerem o emprego do meio MS normal para a produção comercial, tanto pelo seu uso comum como pela sua composição ser encontrada em mix. Os resultados deste trabalho coincidem também com os encontrados por Barlass & Skene (1980b), onde o meio MS com concentração normal de sais foi superior à concentração reduzida (MS/2), no crescimento inicial de folhas originadas de ápices fragmentados de cultivares de *Vitis vinifera*, e na subsequente capacidade destas folhas em produzir gemas adventícias.

Os explantes do MS/8 foram os mais afetados pela concentração reduzida dos sais, apresentando menor crescimento e menor número de folhas. Nesse tratamento, 80% dos segmentos nodais foram perdidos por contaminação e oxidação, provavelmente pela concentração reduzida de sais.

O efeito dos tipos de meios de cultura sobre o crescimento inicial das gemas axilares não foi significativo para todas as variáveis analisadas, exceto para o número de folhas do explante.

O meio WPM foi o que apresentou menor número de folhas por explante (Tabela 4). Apesar de não apresentar diferença significativa para comprimento da brotação principal foi o que apresentou menores valores (Tabela 4). O meio WPM apresentou brotos raquíticos no trabalho de Gray & Benton (1991). Coincidindo também com os resultados obtidos com meristemas apicais, onde o meio WPM apresentou menor número de brotos, sintomas de vitrificação e sofreram abscisão foliar (Gray & Benton, 1990).

Maiores números de folhas foram obtidos nos meios MS com concentração normal de sais, MS/2 e NN. Observa-se que, apesar de não diferir significativamente dos demais tratamentos, o meio MS normal apresenta maiores valores para comprimento da brotação principal e porcentagem de gemas axilares brotadas. Estes resultados apresentam a tendência de o MS normal ser superior aos demais meios.

O MS normal foi considerado superior aos demais tratamentos testados (MS/2, C₂D, WPM) no trabalho de Gray & Benton (1990), onde atingiu a média de 3,3 brotos por ápice em 6 semanas.

Já, para as cultivares 'Ribier', Thompson Seedless, e Black Seedless foram estabelecidas na fase inicial: MS ¾ e fase de proliferação e alongação: MS normal.

Concentrações reduzidas do meio MS também foram superiores no trabalho de Brian et al. (1998b), onde os meios MS/2 e NN apresentaram melhores resultados para o porta-enxerto 'Jales' e não diferiram entre si em todas as variáveis analisadas.

TABELA 4 - Efeito de diferentes meios de cultura na porcentagem de gemas axilares brotadas, no comprimento das brotações, no número de brotos por explante e no número de folhas da brotação principal de segmentos nodais do porta-enxerto '420-A', após 30 dias.

MS	Brotação (%)	Comprimento das brotações (cm)	Nº brotos/explante	Nº folhas da brotação principal
MS	40,26 ²	2,07 ²	1,00 ²	3,30a ¹
MS/2	31,10	1,47	1,25	2,41ab
NN	35,71	1,63	1,05	2,35 ⁵ b
WPM	38,54	1,07	1,00	1,16b
C.V.(%)	45,45	30,92	22,89	34,19

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente, pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

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

Alongamento e multiplicação:

A análise de variância apresentou significância para todas as variáveis analisadas, com exceção para a porcentagem de explantes perdidos por contaminação ou oxidação.

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

Os meios MS/2, WPM e NN não diferiram significativamente entre si, em todas as variáveis analisadas (Tabela 5). Resultados semelhantes foram obtidos com o porta-enxerto 'Jales', comparando os meios NN e MS/2, que se apresentaram superiores aos demais e não diferiram entre si (Biasi et al., 1998b).

O MS, com concentração normal de sais, apresentou resultados inferiores para comprimento da brotação principal, número de folhas do explante e porcentagem de gemas axilares brotadas, indicando que, para esta fase, menores concentrações de sais são requeridas (Tabela 5).

Concentrações reduzidas do meio MS foram utilizadas em vários trabalhos (Biasi et al., 1998b; Botti et al., 1993; Ciccotti, 1982; Fanizza et al., 1984; Harris & Stevenson, 1982), principalmente na fase de enraizamento das brotações (Botti et al., 1993; Ciccotti, 1982; Harris & Stevenson, 1982).

TABELA 5 - Efeito de diferentes meios de cultura no alongamento e na multiplicação das brotações de segmentos nodais do porta-enxerto '420-A', após 30 dias.

MS	Brotação (%)	Comprimento das brotações (cm)	Enraizamento (%)	Nº folhas da brotação principal
MS	69,51b ¹	1,05b ¹	50,00b ¹	1,36b ¹
MS/2	97,50a	1,76a	97,50 ^a	2,34ab
NN	87,22ab	1,68a	84,44 ^a	2,65a
WPM	92,22a	1,86a	89,44 ^a	2,31ab
C.V.(%)	9,33	13,52	12,01	21,39

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente, pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

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

Brotos de videira produzidos *in vitro* são facilmente induzidos à produzir raízes tanto pelo uso do meio contendo auxina como sem o regulador de crescimento (Gray & Fisher, 1985).

Os maiores números de folhas por explante foram obtidos nos meios MS/2, NN e WPM, atingindo as médias 2,3; 2,65; 2,31 folhas por brotação, respectivamente, o que representa, em termos de taxa de multiplicação, considerando a presença da gema axilar em cada folha, aproximadamente 3 novos brotos a cada 30 dias (Tabela 5). Biasi et al. (1998b) obtiveram 3,9 folhas por brotação do porta-enxerto 'Jales' no meio MS/2, em 33 dias.

Enraizamento:

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

A porcentagem média de enraizamento para os tratamentos MS/2 e MS/2 mais carvão ativado foi considerada alta, com 80% dos segmentos nodais apresentando raízes (Tabela 6). Biasi et al. (1998b), também trabalhando com segmentos nodais, obtiveram para porta-enxerto 'Jales' taxas de enraizamento próximas de 100%, no meio MS/2 sem auxina. Para a cultivar 'Carbenet Sauvignon', o melhor enraizamento foi obtido quando se utilizou o meio White sem regulador de crescimento (Barlass & Skene, 1980b).

Já, para algumas cultivares, a presença de auxina no meio é importante para o bom enraizamento, como no trabalho de Gray & Klein (1981), que obtiveram 94% de enraizamento da cultivar 'Orlando Seedless', utilizando o meio C₂D com 0,4 µM ANA.

Gray & Benton (1991) obtiveram 55% de enraizamento dos brotos de cultivares de *V. rotundifolia*, cultivadas em meio MS sem presença de auxina e 77% com auxina.

A rizogênese é fortemente dependente do genótipo da videira (Roubelakis-Angelakis & Zivanovitch, 1991) e enraiza facilmente pelo uso de meio de cultura sem regulador de crescimento ou com auxina (Gray & Fisher, 1985).

O maior número de raízes foi encontrado no meio MS/2 (1,97 raízes/explante), enquanto o meio MS com presença de carvão emitiu 1,6 raiz/explante (Tabela 6). Estes resultados foram bem próximos dos obtidos por Peixoto & Pasqual (1996), onde 1,42 e 1,35 raiz foram emitidas por explante do porta-enxerto R99, nos tratamentos com 0,22µM e 0,44µM de ANA, respectivamente. Já o porta-enxerto 'Jales', em meio MS/2, emitiu 2,8 raízes/explante (Biasi et al., 1998b).

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

TABELA 6 - Efeito do carvão ativado no enraizamento das brotações do porta-enxerto '420-A', após 30 dias.

Meio MS/2	Brotação (%)	Comprimento das brotações (cm)	Enraizamento (%)	Nº raízes por explante	Nº folhas por brotação
Sem carvão ativado	82,50 ¹	1,9 ¹	87,50 ¹	1,97 ²	2,12 ¹
Com carvão ativado	50,30	1,77	72,50	1,6	2,10
C.V.(%)	33,13	15,51	18,40	4,98	10,72

¹Médias não diferem significativamente, pelo teste F, em nível de 5% de probabilidade.

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

Aclimatização:

A análise de variância apresentou diferença significativa nos tratamentos para a porcentagem de sobrevivência das brotações.

Os substratos vermiculita e Plantmax® não apresentaram diferenças significativas entre si, obtendo-se 95,83% e 87,50% de sobrevivência, respectivamente (Tabela 7).

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

Blazina et al. (1991) obtiveram 90% de sobrevivência utilizando como substrato uma mistura de vermiculita, solo e mix comercial. Bons resultados também foram obtidos por Compton & Gray (1994), utilizando uma parte de mistura comercial e uma de vermiculita.

Pode-se constatar a facilidade de adaptação da videira através de altos índices de sobrevivência obtidos por vários autores (Koruza & Jelaska, 1993; Ricciardi & Silvestroni, 1988; Ravindra & Pious Thomas, 1995; Lewandowski, 1991; Biasi et al., 1998b).

TABELA 7 - Efeito de diferentes substratos sobre a sobrevivência de brotações aclimatizadas em casa de vegetação do porta-enxerto '420-A'.

Substrato	Sobrevivência (%)
Vermiculita	95,83 ^{a1}
Plantmax®	87,50ab
Casca de arroz carbonizada	45,83b
C.V.(%)	21,82

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o porta-enxerto de videira '420-A' pode ser micropropagado pelo seguinte protocolo: cultivo inicial de segmentos nodais, obtidos a partir de brotações de estacas lenhosas, em meio de cultura MS + 1 µM de BAP, alongamento das brotações e multiplicação pelo seccionamento das mesmas em meio de cultura MS/2 isento de reguladores de crescimento e aclimatização em câmara de nebulização com substrato vermiculita ou Plantmax®.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARLASS, M. Elimination of stem pitting and corky bark diseases from grapevine by fragmented shoot apex culture. **Annals of Applied Biology**, London, v. 110, p. 653-656, 1987.
- BARLASS, M.; SKENE, K.G.M. *In vitro* propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices. **Vitis**, v. 17, p. 335-340, 1978.
- BARLASS, M.; SKENE, K.G.M. Studies on the fragmented shoot apex of grapevine. II. Factors affecting growth and differentiation *in vitro*. **Journal of Experimental Botany**, Oxofort, v. 31, n. 121, p. 489-495, 1980.
- BARLASS, M.; SKENE, K.G.M.; WOODHAM, R.C.; KRAKE, L.R. Regeneration of virus-free grapevines using *in vitro* apical culture. **Annals of Applied Biology**, London, v. 101, p. 291-295, 1982.
- BIASI, L.A.; PASSOS, I.R.S.; POMMER, C.V. Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de videira através de ápices meristemáticos e segmentos nodais. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, n. 2, p. 196-202, 1998a.
- BIASI, L.A.; PASSOS, I.R.S.; POMMER, C.V. Micropropagação do porta-enxerto de videira Jales. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 10, p. 1587-1594, 1998b.
- BLAZINA, I.; KOROSK-KORUZA, Z.; RAVNIKAR, M.; ZOLNIR, M.; GOGALA, N. Regeneration and micropropagation of the grapevine (*Vitis vinifera* L. 'Zelen') from shoot tip meristems. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 300, p. 123-126, 1991.

- BOTTI, C.; GARAY, L.; REGINATO, G. The influence of culture dates, genotype and size and type of shoot apices on *in vitro* shoot proliferation of *Vitis vinifera* cvs Thompson Seedless, Ribier and Black Seedless. **Vitis**, Siebeldingen, v. 32, n.2, p. 125-126, 1993.
- CHÉE, R.; POOL, R.M. The effects of growth substances and photoperiod on the development of shoot apices of *Vitis* cultured *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 17-27, 1982.
- CHÉE, R.; POOL, R.M. *In vitro* propagation of *Vitis*: the effects of organic substances on shoot multiplication. **Vitis**, Siebeldingen, v. 24, p. 106-118, 1985.
- CICCOTTI, A.M. Micropropagazione di *Vitis vinifera* L. cvs. Moscato d' Amburgo e Pinot Bianco. **Esperienze e Ricerche**, v. 11, p. 73-81, 1982.
- COMPTON, M.E.; GRAY, D.J. Micropropagation of 'Southern Home' hybrid grape. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Wruter Haven, v. 107, p. 308-310, 1994.
- FANIZZA, G.; RICCIARDI, L.; SILVESTRONI, O.; BOSCIA, D. The influence of high temperatures and benzyladenine on root induction during *in vitro* shoot tip culture in *Vitis vinifera* L. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 227, p. 479-481, 1988.
- FANIZZA, G.; TANZARELLA, O.A.; CARROZZO, G. Influence of *Vitis* source on *in vitro* shoot apex culture. **Annals of Applied Biology**, London, v. 104, p. 577-578, 1984.
- GOUSSARD, P.G. Effects of cytokinins on elongation, proliferation and total mass of shoots derived from shoot apices of grapevine cultured *in vitro*. **Vitis**, Siebeldingen, v. 20, n. 3, p. 228-234, 1981.
- GOUSSARD, P.G. Morphological responses of shoot apices of grapevine cultured *in vitro*. Effects of cytokinins in routine subculturing. **Vitis**, Siebeldingen, n. 21, n. 4, p. 293-298, 1982.
- GRAY, D.J.; BENTON, C.M. Micropropagation and plant establishment of muscadine grape. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, Hruter Haven, v. 103, p. 300-302, 1990.
- GRAY, D.J.; BENTON, C.M. *In vitro* micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (*Vitis rotundifolia*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 27, n. 1, p. 7-14, 1991.
- GRAY, D.J.; FISHER, L.C. *In vitro* shoot propagation of grape species, hybrids and cultivars. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Wruter Haven, v. 98, p. 172-174, 1985.
- GRAY, D.J.; KLEIN, C.M. *In vitro* micropropagation and plant establishment of 'Blanc du Bois' grape. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Hruter Haven, v. 102, p. 221-223, 1989.
- GRIBAUDO, I.; FRONDA, A. Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v. 26, n. 8, p. 1083, 1991.
- HARRIS, R.E.; STEVENSON, J.H. *In vitro* propagation of *Vitis*. **Vitis**, Siebeldingen, v. 21, n. 1, p. 22-32, 1982.
- KORUZA, B.; JELASKA, S. Influence of meristem culture and virus elimination on phenotypical modifications of grapevine (*Vitis vinifera* L., cv. Refosk). **Vitis**, Siebeldingen, v. 32, n. 1, p. 59-60, 1993.
- KRUL, W.R.; MOWBRAY, G.H. Grapes. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. **Handbook of plant cell culture**, Mac Millan Publishing, 1984. v. 6, p. 396-434
- LEE, N.; WETZSTEIN, Y. *In vitro* propagation of muscadine grape by axillary shoot proliferation. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 115, n. 2, p. 324-329, 1990.
- LEWANDOWSKI, V.T. Rooting and acclimatization of micropropagated *Vitis labrusca* 'Delaware'. **HortScience**, Alexandria, v. 26, n. 5, p. 586-589, 1991.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings International Plant Propagator's Society**, v. 30, p. 421-427, 1986.
- MARTINELLI, L.; SCIENZA, A.; GIANAZZA, E.; VILA, P.L. Somatic embryogenesis from leaves and petioles of grapevine. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 289, p. 243-244, 1991.
- MARTINEZ, E.A.; TIZIO, R. Grapevine micropropagation through shoot

- tips and minicuttings from in vitro cultured one-node cuttings. **HortScience**, Alexandria, v. 24, n. 3, p. 513, 1989.
- MULLINS, M.G.; NAIR, Y.; SAMPET, P. Rejuvenation *in vitro*: induction of juvenile characters in an adult clone of *Vitis vinifera* L. **Annals of Botany**, London, v. 44, p. 623-627, 1979.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-479, 1962.
- NOVAK, F.J.; JUVOVÁ, Z. Clonal propagation of grapevine through in vitro axillary bud culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 18, n. 3, p. 231-240, 1983.
- NITSCH, J.P.; NITSCH, C. Haploid plants from pollen grains. **Science**, Washington, v. 163, p. 85-87, 1969.
- PASSOS, I.R. da S.; SONDAHL, M.R.; RIBEIRO, I.J.A.; TERRA, M.M.; PIRES, E.J.P. Cultura *in vitro* de meristemas de videira. I. Concentrações do hormônio 6-BA em meio primário. **Bragantia**, Campinas, v. 44, n. 1, p. 473-479, 1985.
- PEIXOTO, P.H.P.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N.N.J.; ALVARENGA, A.A. de. Enraizamento e multiplicação "in vitro" de porta-enxertos de videira (*Vitis* spp L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 16, n. 1, p. 178-184, 1994.
- REGINA, M.A.; SOUZA, C.R.; SILVA, T.G.; PEREIRA, A.F. A propagação da videira. **Informe Agropecuário**, v. 19, n. 194, p. 20-27, 1998.
- ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A.; ZIVANOVITC, S.B. A new culture medium for *in vitro* rhizogenesis of grapevine (*Vitis* spp.) genotypes. **HortScience**, Alexandria, v. 26, n. 12, p. 1551-1553, 1991.
- SKENE, K.G.M.; BARLASS, M. Micropropagation of grapevine. **International Plant Propagators' Society Combined Proceedings**, v. 30, p. 564-570, 1980.
- SUDARSONO; GOLDY, R.G. Growth regulator and axillary bud position effects on *in vitro* establishment of *Vitis rotundifolia*. **HortScience**, Alexandria, v. 26, n. 3, p. 304-307, 1991.
- THIES, K.L.; GRAVES JUNIOR, C.H. Meristem micropropagation protocols for *Vitis rotundifolia* Michx. **HortScience**, Alexandria, v. 27, n. 5, p. 447-449, 1992.
- TRONCOSO, A.; CANTOS, M.; LIÑÁN, J.; PRIETO, J.; SARMIENTO, R. The use of "in vitro" culture and tubular container system to propagate selected grapevine plants for sherry wine production. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 227, p. 358-362, 1988.
- YU, D.; MEREDITH, C.P. The influence of explant origin on tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 111, n. 6, p. 972-975, 1986.