

# MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE BROTAÇÕES DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA<sup>1</sup>

PAULO HENRIQUE PEREIRA PEIXOTO<sup>2</sup> e MOACIR PASQUAL<sup>3</sup>

**RESUMO** - Segmentos nodais retirados das porções apical, mediana e basal de plântulas mantidas *in vitro*, do porta-enxerto de videira 1103, receberam inoculação em meio "C<sub>2</sub>D" adicionado de 6-benzilamino purina-BAP (0,0; 5,0 x 10<sup>-4</sup>; 10,0 x 10<sup>-4</sup> e 20,0 x 10<sup>-4</sup> g.l<sup>-1</sup>) e ácido naftaleno acético-ANA (0,0; 1,0 x 10<sup>-4</sup>; 10,0 x 10<sup>-4</sup> e 100,0 x 10<sup>-4</sup> g.l<sup>-1</sup>). O experimento foi conduzido sob fotoperíodo de 16/8 horas, termoperíodo de 26/20°C e luminosidade de 35 U.E.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. As avaliações realizadas aos 45 dias da instalação do experimento demonstraram que BAP a 5,0 x 10<sup>-4</sup> e 10,0 x 10<sup>-4</sup> g.l<sup>-1</sup> proporcionaram as maiores taxas de multiplicação e crescimento; a adição de ANA reduziu a multiplicação e o crescimento dos segmentos nodais; os explantes oriundos da porção apical produziram maior número de brotações que o obtido das porções mediana e basal.

Termos para indexação: cultura de tecidos, micropropagação.

## *IN VITRO* SHOOT MULTIPLICATION OF GRAPEVINE ROOTSTOCK

**ABSTRACT** - Nodal segments excised from *in vitro* plantlets of '1103' grapevine rootstock were inoculated on "C<sub>2</sub>D" media supplemented with 6-benzylamino purine (0.0, 5.0 x 10<sup>-4</sup>, 10.0 x 10<sup>-4</sup> and 20.0 x 10<sup>-4</sup> g.l<sup>-1</sup>) and naphthalene acetic acid (0.0, 1.0 x 10<sup>-4</sup>, 10.0 x 10<sup>-4</sup> and 100.0 x 10<sup>-4</sup> g.l<sup>-1</sup>) at all possible combinations. The experiments were realized under 16/8-hours photoperiod, 26/20°C thermoperiod and 35 u.E.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> light and were evaluated 45 days after inoculation. The best multiplication and growth was registered with 5.0 x 10<sup>-4</sup> and 10.0 x 10<sup>-4</sup> g.l<sup>-1</sup> BAP. The addition of naphthalene acetic acid reduced the multiplication and growth of nodal segments. The explants from the apical part produced greater number of shoots than those of the middle and basal parts.

Index terms: tissue culture, micropropagation.

## INTRODUÇÃO

A cultura da videira (*Vitis* spp. L.), pela sua extensa área plantada no Brasil e pelo seu potencial de utilização como matéria-prima para as indústrias de vinhos, sucos, geléias, passas, vinagres, e para consumo *in natura*, constitui uma importante fruteira de clima temperado, ocupando o terceiro lugar quanto ao valor de produção.

Dentre os problemas fitossanitários da videi-

ra, a ocorrência de doenças causadas por vírus ou outros agentes paravíricos é um dos mais graves, pois uma vez instalados, os vírus não são mais eliminados através de métodos de controle fitossanitários convencionais (Schuck et al. 1988).

A recuperação da produtividade e eliminação das principais doenças viróticas da videira podem ser obtidas com a utilização da cultura de tecidos, associada, ou não, à termoterapia (Schuck et al. 1988).

Diferentes meios de cultura, tais como os de Murashige & Skoog (1962), Chee et al. (1984) e suas modificações, são amplamente utilizados na propagação *in vitro* da videira. Quando segmentos nodais são utilizados no estabelecimento *in vitro* das brotações, o suprimento exógeno de citocininas é essencial para a brotação apical (Pool & Powell 1975).

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 26 de setembro de 1991.

Extraído da Dissertação de Mestrado apresentada pelo primeiro autor, do Dep. de Agric., ESAL.

<sup>2</sup> Eng. - Agr., M.Sc., Inst. de Ciências Biológicas, Univ. do Amazonas, CEP 69000 Manaus, AM.

<sup>3</sup> Eng. - Agr., Dr., Prof. - Adj., ESAL, Dep. de Agric., Caixa Postal 37, CEP 37200 Lavras, MG. Bolsista do CNPq.

A 6-benzilamino purina (BAP) tem sido a citocinina mais utilizada no cultivo *in vitro* dos segmentos nodais, em concentrações que variam entre 0,5 e 2,0 mg.l<sup>-1</sup>. Concentrações muito altas deste regulador prejudicam a extensão e a qualidade das brotações (Jona & Webb 1978). A adição de auxinas ao meio de cultura não é recomendada, pois segundo Novak & Juvova (1983), estes reguladores provocam a formação indesejável de raízes e calos, além de reduzirem o número de brotações produzidas por explante (Gray & Fisher 1986).

A posição do explante na planta matriz pode influenciar o comportamento *in vitro* dos segmentos nodais. Geralmente, as gemas axilares das plantas encontram-se inibidas pelo desenvolvimento do meristema apical. A dominância apical, segundo Hillman (1984), é controlada através do balanço na síntese e translocação interna de fitormônios, principalmente pelo transplante basípeto do AIA. Segundo Barlass & Skene (1983), a dominância apical é regulada pela distribuição de citocininas nas plantas, podendo ser suprimida pelo fornecimento exógeno destes reguladores.

Utilizando segmentos nodais, Chee & Poll (1989) não verificaram nenhum efeito de remoção dos ápices ou de folhas na primeira geração de brotações *in vitro* da videira. Estes autores sugerem que a brotação das gemas axilares é controlada através do balanço hormonal adequado do meio de cultura, e influenciada pelas condições ambientais de cultivo.

Objetivou-se, com o presente trabalho, verificar o efeito da posição de retirada dos explantes associados a várias combinações de reguladores de crescimento, na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de videira.

## MATERIAL E MÉTODOS

O meio de cultura utilizado foi o de Murashige & Skoog (1962), "MS", modificado por Chee et al. (1984) - "C<sub>2</sub>D" -, adicionando-se 10 ml por tubo de ensaio (2,5 x 15 cm), utilizando-se tampas de plástico e "vitafilm" para a vedação. O pH foi ajustado para 5,7, antes da autoclavagem.

Os explantes consistiram de segmentos nodais, com

aproximadamente 2 cm de comprimento, retirados de plântulas intactas (com parte aérea e raízes) oriundas de ápices caulinares do porta-enxerto de videira 1103 Paulsen (1103 P), mantidas *in vitro* durante mais ou menos um ano e meio "C<sub>2</sub>D" adicionado de 0,04 mg.l<sup>-1</sup> de ácido naftaleno acético (ANA). Os explantes foram coletados 30 dias após o último transplante, dividindo-se a parte aérea das plântulas em três porções (apical, mediana e basal), excisando-se também as folhas do explante.

Inoculou-se um segmento nodal, contendo uma única gema, em cada tubo de ensaio. Estas porções, juntamente com as concentrações de BAP de 0,0; 5,0 x 10<sup>-4</sup>; 10,0 x 10<sup>-4</sup> e 20,0 x 10<sup>-4</sup> g.l<sup>-1</sup> e ANA a 0,0; 1,0 x 10<sup>-4</sup>; 10,0 x 10<sup>-4</sup> e 100,0 x 10<sup>-4</sup> g.l<sup>-1</sup>, adicionadas ao meio "C<sub>2</sub>D", formaram um fatorial 3 x 4 x 4, num total de 48 tratamentos. Foram utilizadas três repetições por tratamento, sendo o delineamento estatístico o inteiramente casualizado. Para a análise estatística, os dados foram transformados para  $\sqrt{x} + 0,5$ .

O experimento foi conduzido em sala de crescimento com fotoperíodo de 16/8 horas, termoperíodo de 26/20°C e luminosidade de 35 u.E.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Avaliaram-se 45 dias após a instalação do experimento, o número médio de brotações e número médio de brotações superiores a 1,5 cm, obtidos por segmento nodal.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação ao número médio de brotações por explante, observaram-se efeitos significativos para ANA (A), BAP (B), porção do explante (P) e para as interações de A x B e B x P (Tabela 1.).

Para a interação A x B, nas dosagens de BAP a 0,0 e 20,0 x 10<sup>-4</sup> g.l<sup>-1</sup>, não se verificaram diferenças significativas quanto ao número médio de brotações, em relação às dosagens de ANA (Tabela 2). Para as doses de BAP a 5,0 x 10<sup>-4</sup> e 10,0 x 10<sup>-4</sup> g.l<sup>-1</sup>, verifica-se, nesta Tabela, que o aumento da concentração de ANA reduziu o número de brotações produzidas. Um maior número de brotações por explante foi obtido com BAP a 10,0 x 10<sup>-4</sup> g.l<sup>-1</sup>, na ausência de ANA. Os balanços hormonais de BAP a 5,0 x 10<sup>-4</sup> e 10,0 x 10<sup>-4</sup> g.l<sup>-1</sup>, combinados com ANA a 0,0 e 10,0 x 10<sup>-4</sup> g.l<sup>-1</sup>, proporcionaram as maiores taxas de multiplicação por explante.

**TABELA 1.** Análises de variância referentes a número médio de brotações, número médio de brotações superiores a 1,5 cm, e altura média de brotações do porta-enxerto de videira 1103 P, obtidos *in vitro*, em diferentes concentrações de ANA e BAP e nas três porções dos explantes.

Causas de variação	GL	Quadrados médios		
		Nº médio brotações	Nº médio de brotações superiores a 1,5 cm	Altura média de brotações
ANA (A)	3	0,34585**	0,02967	0,00250
BAP (B)	3	4,21972**	0,85348**	0,56554**
A x B	9	0,17191*	0,08944	0,01144
Porção (P)	2	1,28781**	0,62506**	0,33440**
A x P	6	0,08250	0,05015	0,02433
B x P	6	0,28728**	0,10981*	0,06928**
A x B x P	18	0,04743	0,03398	0,01796
Resíduo	96	0,08341	0,04942	0,01095
CV%		17,02	23,35	35,78
X.		2,034	0,476	0,959

\* Significativo ao nível de 5%

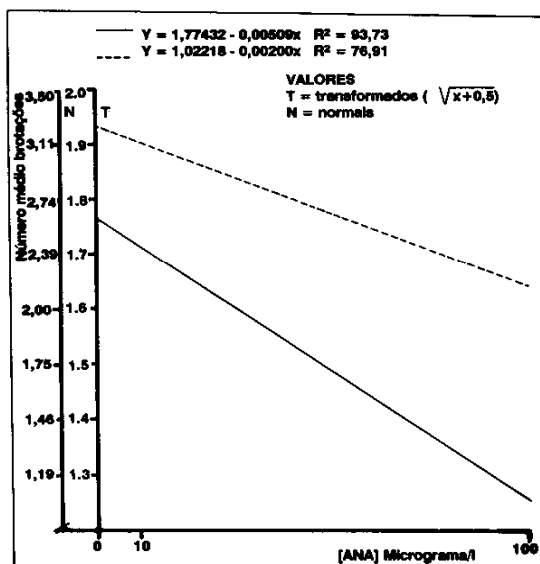
\*\* Significativo ao nível de 1%

**TABELA 2.** Número médio de brotações por explante do porta-enxerto de videira 1103 P, obtido *in vitro*, em diferentes concentrações de ANA e BAP.

ANA (10 <sup>-4</sup> g.l <sup>-1</sup> )	BAP (10 <sup>-4</sup> g.l <sup>-1</sup> )			
	0,0	5,0	10,0	20,0
0,0	0,677 Ba	2,570 Aa	3,609 Aa	2,693 Aa
1,0	0,692 Ba	2,934 Aa	3,027 Aab	2,524 Aa
10,0	0,880 Ba	2,242 Aa	2,823 Aab	2,805 Aa
100,0	0,571 Ba	1,115 Bb	2,190 Ab	2,904 Aa

As médias seguidas das mesmas letras (maiúscula para BAP e minúscula para ANA) não diferem entre si pelo Teste de Tukey 5%.

As equações de regressão relativas a BAP a 5,0 x 10<sup>-4</sup> e 10,0 x 10<sup>-4</sup> g.l<sup>-1</sup> em doses crescentes de ANA encontram-se na Fig. 1. Observa-se que em ambas dosagens de BAP, o aumento da concentração de ANA causou uma redução li-



**FIG. 1.** Equações de regressão para o número médio de brotações por explante do porta-enxerto de videira 1103 P, nas concentrações de 5,0 x 10<sup>-4</sup> e 10,0 x 10<sup>-4</sup> g.l<sup>-1</sup> de BAP, em relação às doses de ANA, 45 dias após a inoculação.

near no número de brotações produzidas por explante. Verifica-se, ainda, nesta figura, que um maior número de brotações foi obtido na ausência do ANA.

Estes resultados concordam com os obtidos por Novak & Juvova (1983), que verificaram efeitos prejudiciais da adição do ANA em meio de cultura para a regeneração de segmentos nodais de videira. Provavelmente, a adição do ANA ao meio provocou o desbalanceamento da relação endógena de auxinas e citocininas dos explantes, reduzindo o número de brotações produzidas. Quanto ao BAP, os resultados obtidos coincidem com os observados por Chee et al. (1984) e Gray & Fisher (1986), que alcançaram altas taxas de multiplicação de brotações em concentrações similares às melhores, observadas neste ensaio. O efeito benéfico do BAP na multiplicação das brotações, pode ser relacionado com a influência deste regulador de crescimento na divisão celular e na liberação das gemas axilares inibidas pela dominância apical.

Quanto à interação B x P, efeitos significativos foram observados nas três porções de explantes. As equações de regressão referentes a esta interação encontram-se na Fig. 2.

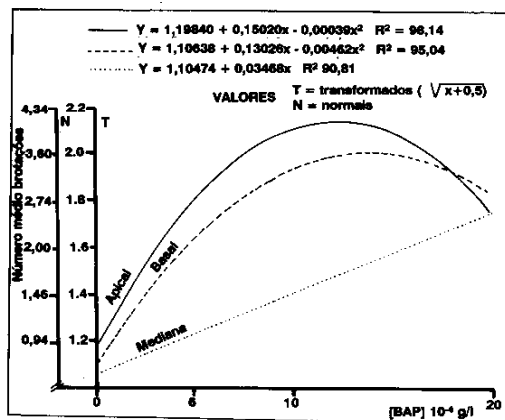


FIG. 2. Equações de regressão relativas ao número médio de brotações por explante do porta-enxerto de videira 1103 P, nas porções apical, mediana e basal, em relação às doses de BAP, 45 dias após a inoculação.

Observa-se, nesta Fig. 2, que nas porções apical e basal, o aumento da dosagem de BAP induziu uma resposta quadrática no número médio de brotações por explante, com máxima multiplicação na concentração de  $13,0 \times 10^{-4} \text{ g.l}^{-1}$ . Concentrações superiores reduziram a multiplicação das brotações. Quanto à posição mediana, o incremento das doses de BAP aumentou linearmente o número de brotações produzidas. Os resultados conferem com os obtidos por Jona & Webb (1978), que observaram efeitos positivos do BAP na multiplicação das brotações, em concentrações equilibradas. Estes autores observaram que concentrações excessivas de BAP podem alterar o balanço hormonal e reduzir a multiplicação dos explantes.

Diferenças significativas foram observadas em relação às três porções de explantes. Verifica-se, na Tabela 3, que explantes oriundos das porções apical e basal produziram maior número de brotações, em comparação com o número de explantes da porção mediana.

TABELA 3. Número médio de brotações por explante do porta-enxerto de videira 1103 P, oriundo de diferentes porções de plântulas, 45 dias após a inoculação.

Porção do explante	Número médio de brotações/explante
Apical	2,483 A
Mediana	1,488 B
Basal	2,289 A

As médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

Estes resultados diferem dos obtidos por Chee & Pool (1989), que não verificaram a influência da remoção dos ápices de plântulas de videira no desenvolvimento *in vitro* das brotações. O comportamento superior das porções apical e basal está relacionado com o balanço hormonal. A porção apical é o local de síntese de fitormônios e outros compostos. A basal, pela localização privilegiada, próxima ao meio de cultura, provavelmente encontrava-se com um balanço hormonal adequado e alto vigor.

Quanto ao número médio de brotações superiores a 1,5 cm, efeitos significativos foram observados para BAP (B), porção do explante (P) e para a interação B x P (Tabela 1).

As equações de regressão para esta característica, em relação à interação B x P, encontram-se na Fig. 3. Verifica-se que para as porções apical e mediana o aumento da concentração de BAP reduziu linearmente o número de brotações superiores a 1,5 cm por explante. Quanto à porção basal, o aumento da dosagem de BAP incrementou a produção de brotações superiores a 1,5 cm até a concentração máxima de  $3,1 \times 10^{-4} \text{ g.l}^{-1}$ , a partir da qual, dosagens mais altas reduziram o crescimento das brotações. Observa-se, ainda, nesta figura, que nas porções apical e mediana, um maior número de brotações superiores a 1,5 cm foi obtido na ausência de BAP. Estes resultados equivalem aos obtidos por Jona & Webb (1978) e Chee & Poll

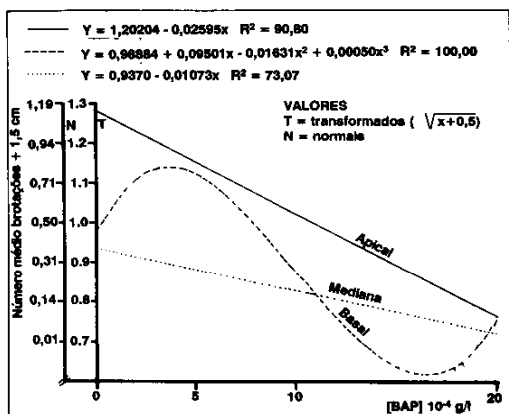


FIG. 3. Equações de regressão relativas ao número médio de brotações superiores a 1,5 cm por explante do porta-enxerto de videira 1103 P, oriundo das porções apical, mediana e basal, em relação às doses de BAP, 45 dias após a inoculação.

(1989), que observaram a redução do crescimento das brotações em concentrações muito altas de BAP.

Os valores médios para esta característica, em relação à porção do explante, podem ser observados na Tabela 4. Diferenças significativas foram verificadas entre as três porções do explante. Na porção apical, um maior número de

TABELA 4. Número médio de brotações superiores a 1,5 cm por explante do porta-enxerto de videira 1103 P, oriundo de diferentes porções de plântulas, 45 dias após a inoculação.

Porção do explante	Número médio de brotações superiores a 1,5 cm
Apical	0,634 A
Mediana	0,200 C
Basal	0,410 B

As médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

brotações superiores a 1,5 cm foi produzido, seguido pelas porções basal e mediana. Estes resultados coincidem com os obtidos para o número médio de brotações por explante, discutido anteriormente.

O comportamento superior da porção apical em relação às demais, nas características avaliadas neste ensaio, permite supor a existência de uma inibição do crescimento das gemas axilares pelo desenvolvimento apical. Este efeito é conhecido por dominância apical ou inibição correlativa (Hillman 1984). Por ser o local de síntese do AIA, fitormônio responsável pela inibição correlativa, as brotações apicais utilizadas neste ensaio apresentavam, provavelmente, uma alta atividade metabólica, com balanço hormonal favorável aos processos morfogênicos. Estes fatores influenciaram, certamente, a superioridade desta porção, em comparação com as demais porções.

Quanto ao papel do BAP na liberação das gemas inibidas pela dominância apical, o efeito positivo verificado com relação às três porções de explantes coincide com os efeitos observados por Barlass & Skene (1983). O BAP altera o balanço hormonal endógeno, tornando a relação auxina/citocinina favorável ao desenvolvimento das gemas axilares inibidas.

## CONCLUSÕES

1. As concentrações de BAP a  $5,0 \times 10^{-4}$  e  $10,0 \times 10^{-4} \text{ g.l}^{-1}$  proporcionaram as maiores taxas de multiplicação e crescimento dos segmentos nodais.

2. A adição de ANA reduziu a multiplicação e o crescimento dos segmentos nodais.

3. Explantes oriundos da porção apical produziram um número de brotações maior que o obtido das porções mediana e basal.

## REFERÊNCIAS

- BARLASS, M.; SKENE, K.G.M. *In vitro* adventitious bud formation from the grapevine shoot apex. *Proceedings, Australian Plant Breeding Conference, Melbourne*, v.7, p.310-311, 1983.

- CHEE, R.; POLL, R.M. Morphogenic responses to propagule trimming, spectral irradiance, and photoperiod of grapevine shoots recultured *in vitro*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.114, n.2, p.350-354, 1989.
- CHEE, R.; POLL, R.M.; BUCHER, D. A method for large scale *in vitro* propagation of *Vitis*. **New Yorks Food and Life Science Bulletin**, New York, v.190, p.1-9, 1984.
- GRAY, D.J.; FISHER, L.C. *In vitro* shoot propagation of grape species, hybrids and cultivars. In: ANNUAL MEETING OF THE FLORIDA STATE HORTICULTURAE SOCIETY, 98., 1985 Tampa. **Proceedings...** Gainesville: Florida State Horticultural Society, 1986. p.172-174.
- HILLMAN, J.R. Apical dominance. In: WILKINS, M.B. **Advanced plant physiology**. London: Pitman, 1984. Cap. 6. p.127-148.
- JONA, R.; WEBB, J. Callus and axillary-bud culture of *Vitis vinifera* 'Sylvaner Riesling'. **Scientia Horticulturae**. Amsterdam, v.9, p.55-60, 1978.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- NOVAK, F.J.; JUVOVA, Z. Clonal propagation of grapevine through *in vitro* axillary bud culture. **Scientia Horticulturae**. Amsterdam, v.18, n.3, p.231-240, Jan. 1983.
- POOL, R.M. & POWELL, L.E. The influence of cytokinins on *in vitro* shoot development of 'Concord' grape. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. Alexandria, v.100, n.2, p.200-202, Mar. 1975.
- SCHUCK, E.; SILVA, A.L.; CRESTANI, D.A. Seleção e controle sanitário da videira em Santa Catarina para virose e anomalias similares. Florianópolis: EMPASC, 1988, 23p. (Boletim Técnico, 42).