



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**

BRUNA THAIS GONÇALVES NUNES

**OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE OBTENÇÃO E
CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE
HÍBRIDOS DE UVAS DE MESA NO VALE DO SÃO
FRANCISCO**

Feira de Santana - BA

2018

BRUNA THAIS GONÇALVES NUNES

**OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE OBTENÇÃO E
CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE
HÍBRIDOS DE UVAS DE MESA NO VALE DO SÃO
FRANCISCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito para obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Nataniel Franklin de Melo

Co-orientadora: Dra. Patrícia Coelho de Souza Leão

Feira de Santana - BA

2018

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

N923

Nunes, Bruna Thais Gonçalves

Otimização do protocolo de obtenção e cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de híbridos de uvas de mesa no Vale do São Francisco / Bruna Thais Gonçalves Nunes.– 2018.

xii, 42 f. : il.

Orientador: Nataniel Franklin de Melo.

Coorientadora: Patrícia Coelho de Souza Leão.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2018.

1. *Vitis* sp. 2. Videira – melhoramento genético. 3. Resgate de embrião – cultivo *in vitro*. 4. Uvas de mesa – Vale do São Francisco. 5. Reguladores de crescimento. I. Melo, Nataniel Franklin de, orient. II. Leão, Patrícia Coelho de Souza, coorient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

CDU: 634.84:631.52

BANCA EXAMINADORA


Profa. Dra. Rita Mercia Estigarribia Borges Faustino
(EMBRAPA Semiárido)


Profa. Dra. Alane Lima Brito
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)


Prof. Dr. Nataniel Franklin de Melo
(EMBRAPA Semiárido)
Orientador e Presidente da Banca

A Fabiane e Maria Fernanda

Minhas flores,

Minhas saudades,

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por todos os desafios e conquistas me dados até aqui, pois ele tem um propósito em nossas vidas e minha fé é o que me motiva a seguir sempre em frente.

Ao meu orientador Dr^o Nataniel Franklin de Melo, por toda ajuda e confiança na realização do trabalho. A minha co-orientadora Dr^a Patrícia Coelho de Souza Leão, por todo apoio e oportunidade a mim dados, desde a graduação. Ao pesquisador da Embrapa Semiárido Dr^o Geraldo Milanez, por todo auxílio na realização das análises estatísticas.

Ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais (PPG-RGV) da Universidade Estadual de Feira de Santana, pela oportunidade de ingressar no curso e participar de minha formação acadêmica. Aos professores do curso, por todo conhecimento compartilhado.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado, fundamental para minha manutenção e realização deste trabalho.

Aos colegas mestrandos e doutorandos do RGV, em especial Bárbara Ramos, por todo apoio dado em nos recepcionar em Feira de Santana. À Larissa e Evelyn, por todo companheirismo e amizade durante a estadia fora de nossas casas.

A Embrapa Semiárido, por toda estrutura na realização do trabalho. As estagiárias e bolsistas de Melhoramento genético de videira: Emille Mayara, Kacya Lowrana, Edimara Ribeiro e Michele Lira por toda ajuda na execução do experimento, principalmente quando eu não podia estar presente.

Aos funcionários do Laboratório de Biotecnologia: Ângela Katiussia, Francisco Manoel e seu Elenício, obrigada por todo auxílio. Aos amigos estagiários e bolsistas: Rúbia Layane, Jéssica Oliveira, Angélica, Pedro Dias, Rafael, Bruno, Jhones, Simone e em especial a Carla Maria, por toda ajuda e amizade que conquistamos nesse período!

Aos funcionários dos Campos Experimentais por toda atenção na execução do experimento, em especial à Fábio Moura, Rodrigo, Hélio Rocha, Chicão e Seu Paixão.

A minha família, que sempre torceu para que meus objetivos fossem alcançados. Aos meus pais, Fábio e Deia, por todo amor, incentivo, apoio e dedicação, obrigada por sempre respeitarem as minhas escolhas, sem vocês eu nada seria.

Ao meu noivo Josimar, por toda paciência e compreensão nos momentos de ausência e apoio durante o curso.

À Daynara Aparecida que está presente nessa caminhada desde o início do meu ingresso na Embrapa, obrigada por todos os momentos de descontração e pela amizade. A Raíssa, Inez, Dayara (minha coach), Ana Lúcia, Henrique, João Paulo, Michele, Jéssica, Monique e a todos que de alguma forma, contribuíram para a minha formação e realização deste trabalho, obrigada!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xi
RESUMO GERAL	xii
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS.....	6
CAPÍTULO 1: Resgate de embriões em cachos provenientes de cruzamentos de videira apirênicas tratados com diferentes reguladores de crescimento	
Resumo	12
Abstract	13
Introdução	14
Material e Métodos	15
Resultados e Discussão	18
Conclusões	20
Referências	21
CAPÍTULO 2: Diferentes épocas de inoculação e resgate de embriões na obtenção de populações híbridas de videira	
Resumo	25
Abstract	26
Introdução	27
Material e Métodos	28
Resultados e Discussão	30
Conclusões	32
Referências	33
CONSIDERAÇÕES FINAIS	35

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 1: Resgate de embriões em cachos provenientes de cruzamentos de videira apirênicas tratados com diferentes reguladores de crescimento

Tabela 1. Reguladores de crescimento e doses utilizadas em pulverizações de cachos de videira da Embrapa Semiárido, Petrolina-PE, 2018 17

Tabela 2. Efeito de aplicações de reguladores de crescimento em cachos resultantes do cruzamento de videiras e a obtenção *in vitro* de embriões zigóticos..... 19

CAPÍTULO 2: Diferentes épocas de inoculação e resgate de embriões na obtenção de populações híbridas de videira

Tabela 1. Características e maturação dos genótipos de videira utilizados nos cruzamentos realizados no Campo Experimental de Bebedouro da Embrapa Semiárido, Petrolina-PE, 2018 28

Tabela 2. Números de óvulos produzidos, inoculados, embriões resgatados e embriões germinados em dois cruzamentos de videira, com inoculação dos óvulos às seis, sete e oito semanas após a polinização. Campo Experimental de Bebedouro da Embrapa Semiárido, Petrolina-PE, 2018 31

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Representação da flor de videira. (A) Flor hermafrodita; (B) Flor feminina; (C) Flor masculina)	1
--	---

Capítulo 2. Avaliação de diferentes épocas de inoculação e resgate de embriões na obtenção de populações híbridas de videira

Figura 1. Etapas da inoculação de óvulos de videira. (A) Coleta de cacho; (B) Desinfestação de bagas; (C) Extração de óvulos; (D) Óvulo inoculado em meio de cultura	29
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ANA	Ácido naftaleno acético
BA	Benziladenina
BAP	Benzilaminopurina
EUA	Estados Unidos da América
GA3	Ácido giberélico
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
pH	Potencial hidrogeniônico
PVP	Polivinilpirrolidona
WPM	Wood Plant Medium

RESUMO GERAL

A expansão da videira pelo mundo demonstrou a suscetibilidade das variedades de *Vitis vinifera* à várias doenças, principalmente àquelas causadas pelos fungos e bactérias, levando a necessidade de implementação de programas de melhoramento genético para desenvolvimento de novas cultivares resistentes às doenças e adaptadas as mais diferentes regiões. A técnica de resgate de embriões tem possibilitado a seleção de genótipos mais promissores, pois permite o cruzamento entre variedades apirênicas. Entretanto, a percentagem de plantas obtidas a partir das sementes-traço resultantes de cruzamentos entre genitores apirenos ainda é muito baixa. Em contrapartida, o uso de reguladores de crescimento antes da floração de cachos tem proporcionado um resultado bastante satisfatório no aumento da população de videira obtida através de resgate de embriões, além da época ideal para coleta e resgate de embriões de cada genótipo. Dessa forma, objetivou-se nesse trabalho verificar a influência da aplicação de ANA, AG3, BAP e a combinação de ANA + BAP e BAP + AG3, antes e após a emasculação de cachos de videira na obtenção de populações híbridas, bem como a relação entre o tempo de inoculação de óvulos e a época de resgate de embriões realizados na região do Vale do São Francisco. Os cruzamentos foram realizados no Campo Experimental de Bebedouro e levados para o Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido, Petrolina-PE, onde foram contabilizados os números de bagas, número de óvulos inoculados e embriões resgatados e germinados. De maneira geral, os cruzamentos de videira que receberam a aplicação de GA3 e ANA aumentaram significativamente a quantidade de plantas híbridas obtidas. Para a época de coleta e resgate foi observado uma maior quantidade de óvulos inoculados e germinados quando coletados às oito semanas após a polinização. Entretanto, o tempo de cultivo não influenciou nos resultados obtidos, podendo serem resgatados aos 45 e 60 dias após a inoculação dos óvulos.

Palavras-chave: *Vitis* sp., reguladores de crescimento, uva sem semente, resgate de embrião, melhoramento genético de videira.

ABSTRACT

Vine expansion around the world has shown its lack of resistance to various diseases, especially those caused by fungi and bacteria, which has led to the creation of genetic improvement programs that aim to create new cultivars resistant to diseases and adapted to the most different regions. Genetic improvement and biotechnology have made it possible to select more promising genotypes, in which case the embryo culture in the vine allows the crossing between apirenic varieties, because in these the immature embryo aborts at the beginning of development, not allowing seed formation. However, the percentage of plants obtained from seed-traits resulting from crosses between apirenic parents is still very low. In contrast, the use of growth regulators prior to flowering of bunches has provided a rather satisfactory result in the increase of the vine population obtained through embryo rescue. The objective of this work was to verify the influence of the application of NAA, GA3, BAP and the combination of NAA + BAP and BAP + GA3, before and after the emasculation of grape bunches in obtaining hybrid populations and the relation between the time of ovules inoculation and the time of embryo rescue. The crosses were carried out without Bebedouro Experimental field to the Biotechnology Laboratory of Embrapa Semiarido, Petrolina-PE, where they were counted in the numbers of berries, number of inoculated ovules and embryos rescued and germinated. In general, grape crosses receiving an application of GA3 and NAA significantly increased the amount of hybrid plants obtained. For a time of collection and rescue, a larger number of inoculated and germinated ovules were observed when collected at eight weeks after pollination. However, the culture time did not influence our results, being able to be rescued at 45 and 60 days after inoculation of the ovules.

Keywords: *Vitis* sp., Growth regulators, Seedless grapes, embryo rescue, genetic grape breeding.

INTRODUÇÃO GERAL

Taxonomicamente o gênero *Vitis* pertence à família Vitaceae e engloba aproximadamente 1.126 espécies que estão amplamente distribuídas nas regiões subtropicais e temperadas. Dentre estas, destacam-se *Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L. que abrangem a maioria das variedades cultivadas e produtoras de uvas, sendo elas de origem europeia e americana, respectivamente. O gênero *Vitis* é o único que possui frutos comestíveis e é considerado o de maior importância econômica. É caracterizado por apresentar plantas trepadeiras, perenes, podendo ser monoicas ou dioicas, as inflorescências são opostas às folhas, e as flores são hermafroditas perfeitas, masculinas ou femininas (Figura 1). As que possuem flores de sexo separados geralmente são infrutíferas e bastante utilizadas como porta-enxerto (LEÃO; BORGES, 2009; SOUSA, 1996).

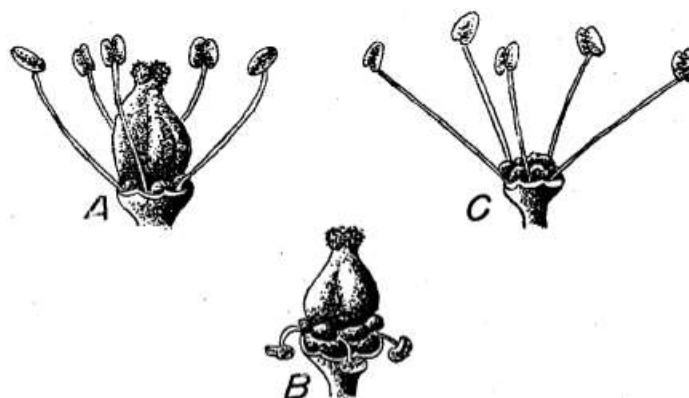


Figura 1. Representação da flor de videira. (A) Flor hermafrodita; (B) Flor feminina; (C) Flor masculina. Fonte: SANTOS-NETO, 1955.

O cultivo da videira está presente desde idades muito distantes. Vasos sagrados encontrados em escavações na Turquia, na antiga cidade comercial de Kannish, mostraram que a viticultura era praticada desde a idade do bronze, há cerca de 3.500 anos A.C. No Brasil, a videira foi introduzida em 1532, por Martim Afonso de Souza, na capitania de São Vicente, à priori eram uvas finas (*Vitis vinifera* L.), trazidas de Portugal e da Espanha (LEÃO; POSSIDIO, 2000). Estes primeiros cultivos apresentaram problemas de adaptação no país e logo em seguida houve a expansão do ouro e da cana de açúcar, o que fez com que a viticultura ficasse praticamente esquecida por mais de 200 anos. Foi só então a partir de 1888,

com a abolição da escravidão e imigração italiana que houve o ressurgimento da cultura, com a introdução da cultivar americana Isabel (*Vitis labrusca* L.), que obteve sucesso por ser mais rústica e adaptada às condições edafoclimáticas locais. A partir daí a cultura começou a se disseminar pelo país, inclusive na região Nordeste (SOUZA, 1996).

A expansão das videiras pelo mundo demonstrou a sua grande suscetibilidade à doenças na parte aérea da planta e a pragas de solo, sendo que através da comercialização houve a propagação para outras regiões onde a viticultura havia se desenvolvido sem as pragas. Além disso, algumas doenças fúngicas que levam a necrose da planta (como o míldio e oídio) destruíram muitos vinhedos na América e na Europa, nos anos de 1845 a 1885. A sequência destes fatos levou a necessidade de desenvolvimento de programas de melhoramento genético que tinham como objetivo mais importante à obtenção de novas cultivares, não só adaptadas às novas condições ambientais impostas pela expansão da viticultura, como de resistência a uma série de doenças (SOUZA, 1996).

Por meio do melhoramento genético é possível obter redução de custos, ganho de produtividade e qualidade de frutos. Avanços significativos têm sido obtidos desde os primórdios da viticultura, por meio da seleção individual, seleção clonal, desenvolvimento de novas cultivares via hibridações e, inclusive, pela obtenção de plantas transgênicas, com o uso da biotecnologia (CAMARGO, 2008).

Os primeiros trabalhos publicados sobre o melhoramento da videira no Brasil foram escritos em 1895 por Pereira Barreto e seus colaboradores. Mais tarde, entre 1930 e 1940, Paulino Recch, Nicolau Martorano e Pedro Araujo, dedicaram-se ao melhoramento da videira obtendo espécies de valores comerciais (SANTOS-NETO, 1955). Entretanto, foi o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) que lançou inúmeras cultivares, com destaque para os porta-enxertos IAC 313, IAC 571, IAC 572 e IAC 766 (POMMER, 1993).

No Submédio do Vale do São Francisco, região semiárida e polo da viticultura nacional, a biotecnologia tem sido utilizada principalmente na eliminação de vírus, na seleção, manutenção e multiplicação de plantas com caracteres desejáveis e na obtenção de novas cultivares de uvas de mesa sem sementes (MELO, 2004). As cultivares tradicionais de *Vitis viniferas* cultivadas nesta região, ‘Thompson Seedless’ e ‘Sugraone’, apresentam produções reduzidas e irregulares, além de elevada suscetibilidade a doenças, causando grandes prejuízos aos viticultores da região (LEÃO et al; 2013). Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de novas cultivares de uvas finas sem sementes, adaptadas às condições

edafoclimáticas brasileiras, resistentes às principais doenças acometidas na cultura, com elevada fertilidade de gemas em campo e qualidade ajustada com as demandas de mercado internacional (MAIA et al., 2012).

A apirenia tem determinação genética e pode ser classificada por dois tipos: partenocarpia ou estenoespermocarpia (PRATT, 1971). Na partenocarpia, ocorre o desenvolvimento do fruto sem que haja fecundação das flores, não havendo vestígios de sementes. Já a estenoespermocarpia é caracterizada pela formação de sementes-traço no fruto, que são praticamente imperceptíveis na degustação (DAMIÃO FILHO; MÔRO, 2001).

A estenoespermocarpia é caracterizada pela ausência de sementes ou apirenia, o que implica no uso de técnicas de cultura de tecidos, capazes de prevenir o aborto do embrião e de promover seu desenvolvimento até a obtenção da planta (MULLINS, 1990). Esta característica é uma herança genética e é determinada pela formação de sementes-traço no fruto, geralmente imperceptíveis na degustação. Nesse caso, o desenvolvimento do fruto depende da fertilização e formação do embrião, mas o desenvolvimento da semente não se completa devido ao aborto do embrião e degeneração do endosperma (STOUT, 1936).

A técnica de resgate de embriões pode ser utilizada como ferramenta para o melhoramento genético de videira. Isto pode ser feito por meio da coleta e cultivo *in vitro* de óvulos, seis a oito semanas após a polinização, com posterior resgate do embrião, que é colocado para germinação em meio de cultura específico. Na maioria das cultivares avaliadas por Emershad et al. (1984), foi observado o início desse processo na oitava semana após a polinização, mas alguns autores já observaram este fenômeno ocorrer de 2 a 10 semanas após a polinização. Através deste procedimento, são geradas plântulas com novas combinações genéticas (STOUT, 1936; PASSOS, 1985; EMERSHAD; RAMMING; 1989; MELO, 2004).

Resultados mais importantes da aplicação da técnica de resgate de embriões imaturos de uvas sem sementes começaram a ser publicados somente em meados da década de 80 nos Estados Unidos e em Israel. Com base nesses trabalhos, o resgate de embriões passou a ser utilizado nos programas de melhoramento da videira em diversos países, como Austrália, Bulgária, França, África do Sul, Argentina e Espanha. No Brasil a técnica vem sendo utilizada desde o início da década de 1990 (AMARAL et al., 2001).

O resgate de embriões em videira permite o cruzamento entre variedades apirênicas, pois nestas o embrião imaturo aborta no início do desenvolvimento, não permitindo a formação da semente (EMERSHAD; RAMMING, 1984). Através do cruzamento entre estes

indivíduos é gerada uma população com variabilidade genética, na qual poderá ser praticada a seleção visando à obtenção de um ou mais indivíduos que reúnam caracteres de interesse (LEÃO; BORGES, 2009).

Cruzamentos entre variedades sem sementes podem originar 85% de progênes sem sementes (CAIN et al., 1983; EMERSHAD; RAMMING, 1984). Entretanto, a eficiência na obtenção de plantas a partir da utilização das sementes-traço de cruzamentos entre genitores apirenos ainda é baixa, representando um aproveitamento que varia entre 2 e 15% (BARLASS et al., 1988; AMARAL et al., 2001, RAZI et al., 2013), o que implica o uso de outros artifícios para aprimorar a técnica.

O sucesso no resgate de embriões imaturos de plantas, especialmente da videira, depende em grande parte da sua fase de maturidade, idade do óvulo e a composição do meio de cultivo (SHARMA et al., 1996; LI et al., 2014). No entanto, o uso de reguladores de crescimento antes da floração também tem proporcionado um resultado bastante satisfatório sobre o aumento da população de videiras obtidas através de resgate de embriões (BORDELON; MOORE, 1994; BARATHY et al., 2003).

Por outro lado, as plantas são capazes de produzir substâncias orgânicas naturais comumente denominadas de fitormônios, as quais causam respostas fisiológicas sobre o seu desenvolvimento, podendo atuar e influenciar em diversos locais do vegetal. Entretanto, havendo a necessidade de aumentar o desempenho produtivo da planta, substâncias sintéticas que produzem efeito semelhante podem ser empregadas, sendo denominadas de reguladores de crescimento ou fitorreguladores (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Os fitorreguladores mais utilizados são as auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno (TAIZ; ZEIGER, 2017). Os reguladores começaram a fazer parte dos tratamentos culturais da videira com diversas finalidades, dentre elas no aumento do tamanho das bagas, bem como no controle do crescimento vegetativo, aceleração ou retardo da maturação dos frutos, maior indução no enraizamento de estacas, e influência na micropropagação (PIRES; MAIA, 2012).

A combinação no uso de reguladores tem mostrado efeitos benéficos para as plantas, visto que são necessários para estimular a divisão celular. A ação conjunta das citocininas com auxinas, por exemplo, tem atuado na definição dos meristemas e no caule ou raiz que será formado (SKOOG & MILLER, 1957). Entretanto, as citocininas podem contrastar o efeito das auxinas, pois estas são responsáveis pela expansão celular nos tecidos dos frutos,

ainda que a quantidade de auxina seja maior na semente que nas células do fruto ao seu redor (KERBAUY, 2012). As citocininas por sua vez, difundem-se nas sementes e como repositório para a divisão celular no ovário, agindo nos meristemas de embriões sendo, portanto, fundamentais para o desenvolvimento da semente (ATKINS et al., 1998).

As giberelinas estão associadas à promoção do crescimento caular e a indução de crescimento da altura das plantas. Em embriões imaturos é encontrada uma concentração muito grande de ácido giberélico, ocorrendo além da sua síntese, liberação de giberelina no endosperma durante a germinação (TAIZ; ZEIGER, 2017). Em ação conjunta com citocininas, as giberelinas também promovem a germinação e minimizam os efeitos inibitórios do ABA (GUERRA, 2004).

As auxinas, possivelmente, causam um aumento das paredes celulares, alcançando uma maior absorção e retenção de água e solutos. Contudo, relata-se que é possível que a semente em desenvolvimento ou o embrião produzam outra molécula sinalizadora, além da auxina, que em ação conjunta regularia a expansão e a atividade de dreno das células do fruto circunvizinhas às sementes e induziria o aumento de volume (MERCIER, 2004).

A aplicação de reguladores de crescimento, antes ou depois da floração, tem sido utilizada com bastante sucesso para aumentar o desenvolvimento das sementes-traço em cruzamentos de uvas estenoespermocárpicas (BORDELON; MOORE, 1994; BHARATHY et al, 2003; KHOSHANDAN et al., 2017), assim como testes de melhores épocas para a sua coleta em campo, considerando também a influência do genótipo utilizado (GUO et al, 2011; JI et al, 2013; LIU et al, 2013).

Dessa forma, objetivou-se no presente trabalho verificar a eficiência da aplicação de reguladores de crescimento na obtenção de plantas híbridas de videira, bem como a relação entre a melhor época para coleta de cachos no campo e a inoculação de óvulos utilizando a técnica de resgate de embriões e ferramentas de seu cultivo *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, A. L.; OLIVEIRA, P. R. D. D.; CZERMAINSKI, A. B. C.; CAMARGO, U. A. Embryo growth stages on plant obtention from crosses between seedless grape parents. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 647-651, 2001.
- ATKINS, C. A.; EMERY, R. J. N.; MA, Q. Cis and trans isomers of cytokinins in seed development of lupin. **Plant Biology**, n. 585, 1998.
- BHARATHY, P. V.; KARIBASAPPA, G. S.; BIRADAR, A. B.; KULKARNI, D. D.; SOLANKE, A. U.; PATIL, S. G.; AGRAWAL, D. C. Influence of pre-bloom sprays of benzyladenine on in vitro recovery of hybrid embryos from crosses of Thompson Seedless and 8 seeded varieties of grape (*Vitis* spp.). **VITIS-Journal of Grapevine Research**, n. 42, p. 199-202, 2003.
- BHARATHY, P. V.; KARIBASAPPA, G. S.; PATIL, S. G.; AGRAWAL, D. C. In ovule rescue of hybrid embryos in Flame Seedless grapes - Influence of pre-bloom sprays of benzyladenine. **Scientia horticultruae**, v. 106, n. 3, p. 353-359, 2005.
- BORDELON, B. P.; MOORE, J. N. Promoting stenospermic grape seed trace development and germination with plant growth regulators. **Journal of the American Society for Horticultural Sciences**, n.119, p. 719–726, 1994.
- CAIN, D. W.; EMERSHAD, R. L.; TARAIOLO, R. E. In-ovulo embryo culture and seedling development of seeded and seedless grapes (*Vitis vinifera* L.). **Vitis**, v. 22, n. 1, p. 9-14, 1983.
- CAMARGO, U. A. Impacto das cultivares brasileiras de uva no mercado interno e potencial no mercado internacional. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 12., 2008, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008. p. 37-42.
- EMERSHAD R.L.; RAMMING D.W.; Serpe M.D. In ovulo embryo development and plant formation from stenospermic genotypes of *Vitis vinifera*. **Am J Bot** 76:397–402, 1989.

EMERSHAD; R.L.; RAMMING, D.W. In-ovulo embryo culture of *Vitis vinifera* L. cv. 'Thompson Seedless'. *HortScience* 17:576, 1982.

EMERSHAD, R. L.; RAMMING, D. W. In-ovulo embryo culture of *Vitis vinifera* L. cv. 'Thompson Seedless'. **American Journal of Botany**, New York, v. 71, n. 6, p. 873-877, 1984.

GUERRA, M. P. Giberelinas. In: KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. 1 Ed. Guanabara Koogan, p.279-292, 2004.

GUO, Y., ZHAO, Y., LI, K., LIU, Z., LIN, H., GUO, X., & LI, C. In vitro embryo rescue culture of F1 progenies from crosses between tetraploid grape and *Vitis amurensis* Rupr. **African Journal of Agricultural Research**, 6(21), 4906-4909, 2011.

JI, W., LI, Z. Q., ZHOU, Q., YAO, W. K., & WANG, Y. J. Breeding new seedless grape by means of in vitro embryo rescue. **Genetics and Molecular Research**, 12, 859-869, 2013.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. 2 Ed. Guanabara Koogan, 217p. 2012.

KHOSHANDAM, L.; BANEH, H. D.; MARANDI, R. J.; DARWISHZADEH, R. Effect of BA and ovule developmental stages on embryo rescue in Perlette grape cultivar (*Vitis vinifera* L.). **European Online Journal of Natural and Social Sciences**, v. 6, n. 1, p. 1, 2017.

LAIBACH, F. Ectogenesis in plants. **J Hered** 20:201–208, 1929.

LAIBACH, F. Taubwerden von Bastardsamen und die kunstliche Aufzucht fruh absterbender Bastardembryonen. **Z Bot** 17:417–459, 1925.

LEÃO, P. C. S.; BORGES, R. M. E. **Melhoramento genético da videira**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 61 p. il. (Embrapa Semiárido. Documentos, 224), 2009.

LEÃO, P. C. S.; OLIVEIRA, V. R.; NUNES, B. T. G.; MARTINS, B. E. S. Eficiência na obtenção de híbridos por meio da técnica de resgate de embriões para desenvolvimento de cultivares de uvas sem sementes no Semiárido brasileiro: 2011-2012. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 7., 2013, Uberlândia. **Variedade melhorada: a força da nossa agricultura: anais**. Viçosa, MG: SBMP, p. 146-149, 2013.

LEÃO, P. C. S.; POSSÍDIO, E. L. de. Histórico da videira. In: LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M. (Ed.). **A viticultura no Semiárido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semiárido, cap. 1, p. 13-17, 2000.

LEDBETTER, C. A.; SHONNARD, C. B. Improved seed development and germination of stenospermic grapes by plant growth regulators. **Journal of Horticultural Science**, v. 65, n. 3, p. 269-274, 1990.

LI, J.; WANG, X.; WANG, X.; WANG, Y. Embryo rescue technique and its applications for seedless breeding in grape. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 120, n. 3, p. 861-880, 2014.

MAIA, J. D. G.; RITSCHER, P.; CAMARGO, U. A.; SOUZA R. T. de; FAJARDO, T. V.; NAVES, R. de L.; GIRARDI, C. L. **‘BRS Vitória’ nova cultivar de uva de mesa sem sementes com sabor especial e tolerante ao míldio**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 12 p. il. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 126), 2012.

MELO, N. F de. Contribuição da biotecnologia no desenvolvimento da viticultura no Vale do São Francisco. In: SEMINÁRIO NOVAS PERSPECTIVAS PARA O CULTIVO DA UVA SEM SEMENTES NO VALE DO SÃO FRANCISCO, Petrolina. **Palestras...** Petrolina: Embrapa Semiárido, 2004. 1 CD-ROM. (Embrapa Semiárido. Documentos, 185), 2004.

MERCIER, H. Auxinas. In: KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. 1 Ed. Guanabara Koogan, in.p.217-249, 2004.

MULLINS, M. G. Tissue culture and the genetic improvement of grapevines: a review. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 280, p. 11-22, 1990.

PASSOS, I. R. da S.; TERRA, M. M.; PIRES, E. J. P. Pesquisas com a videira no IAC: cultura in vitro. **O Agrônomo**, Campinas, v. 37, n. 3, p. 155-160, 1985.

PIRES, E. J. P., MAIA, J. D. G. Uso de reguladores vegetais na videira Niágara. in: MAIA, J. D. G.; CAMARGO, U. A. O cultivo da videira Niágara no Brasil. **Brasília: Embrapa**, p. 275-284, 2012.

POMMER, C. V. Uva, in: **O melhoramento de plantas no Instituto Agronomico**. Edss. Angela M. C. Furlani e Glauco Pinto Viegas. Campinas, IAC, v.1, pp. 489-524, 1993.

RAZI, M., JALILI MARANDI, R., DOULATI BANEH, H., HOSSEINI, B., DARVISHZADEH, R. Effect of Paternal Genotypes Sprays with BA and IAA Concentration on Embryo Rescue of F1 Progenies from 'Askari' (Vitis vinifera L.) Cultivar. **Journal of Agricultural Science and Technology**, 15(5), 1023-1031, 2013.

RITSCHER, P. S.; SEBBEN, S. de S. Embrapa Uva e Vinho: novas cultivares brasileiras de uva. 2010.

SANTOS-NETO, J. R.A. S. Grape breeding in Brazil. **Bragantia**, v. 14, n. UNICO, p. 237-258, 1955.

SCHOPFER, W. H. **Plants and vitamins**. Waltham: The Chronica Botanica Company, 293 p., 1943.

SHARMA, D. R.; KAUR, R.; KUMAR, K. Embryo rescue in plants – a review. **Euphytica**, Wageningen, v. 89, p. 325-337, 1996.

SIMÕES NETO, D. E.; MOREIRA, C. N.; LIMA, R. O. R.; MELO, L. J. O. T. Desempenho de genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) em diferentes ambientes do Estado de Pernambuco. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 7., 1999, Londrina, PR. **Anais...** Londrina, p. 29-33, 1999.

SKOOG. F, MILLER C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symp Soe Exp Biol.**; 11:118-231, 1957.

SOUZA, J. S. I. de. História da viticultura. In: SOUSA, J. S. I. de. **Uvas para o Brasil**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, cap. 1, p. 13-52, 1996.

STOUT, A. B. Seedlessness in grapes. New York: State Agricultural Experiment Station, 68 p. (**Technical Bulletin**, 238), 1936.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 719p., 2017.

LIU, S. M., SYKES, S. R., CLINGELEFFER, P. R. Improved in ovulo embryo culture for stenospermocarpic grapes (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Agricultural Research*, 54(9), 869-876, 2003.

CAPÍTULO 1
RESGATE DE EMBRIÕES EM CACHOS DE UVAS APIRÊNICAS TRATADOS COM
REGULADORES DE CRESCIMENTO

RESUMO

A obtenção de novas cultivares de uvas finas sem sementes é uma das principais atividades dos programas de melhoramento genético de videira. Para isso são utilizadas técnicas de resgate de embriões que, associados a outros métodos como a aplicação de reguladores de crescimento, possibilitam a obtenção de maiores quantidades de plantas. O presente estudo teve por objetivo avaliar a eficiência da aplicação de reguladores de crescimento na obtenção de embriões provenientes de dois cruzamentos de videira. Foram realizadas duas pulverizações nos cachos, utilizando-se ANA, BAP, AG3 e a combinação de ANA + BAP e BAP + AG3, sendo a primeira dez dias antes da floração, e a segunda sete dias após a emasculação das flores. Os óvulos obtidos foram inoculados em meio proposto por Galzy, suplementado com 30g/L de sacarose, 0,1g/L de inositol, 0,002 g/L de glicina, 0,1mg/L de ácido indolacético (AIA) e 5g/L de ágar, com pH ajustado para 5,7. Foram quantificados o número de bagas e de óvulos produzidos, o número de embriões resgatados, e após 60 dias de cultivo em meio de cultura, o número de embriões germinados de cada tratamento. Os cachos que receberam a aplicação de GA3 ou ANA no cruzamento ‘Marroo Seedless’ x ‘CG 351’ e de apenas AG3 no cruzamento ‘Marroo Seedless’ x ‘Jupiter’, obtiveram um aumento significativo da quantidade de plantas híbridas (20%), quando comparadas ao controle. Entretanto, o efeito foi negativo quando as pulverizações foram realizadas utilizando combinações de reguladores com BAP.

Palavras-chave: *Vitis* spp., Videira, Melhoramento genético, Estenoespermocarpia, Hibridização.

ABSTRACT

Obtaining new seedless fine grapes cultivars is one of the main activities of genetic breeding programs of vine. For this, embryo rescue techniques are used, which, together with other methodologies such as the application of growth regulators, allow obtaining larger quantities of plants obtained. This study aimed to verify the effect of application of plant growth regulators in order to obtain hybrid populations through the *in vitro* embryo rescue in two crosses of grapevine. Two sprays were applied to the bunches, using NAA, BAP, GA3 and a combination of NAA + BAP and BAP + GA3, a first, ten days before flowering and a second, seven days after flower emasculation. The ovules obtained were inoculated in a medium proposed by Galzy (1964) supplemented with 30g/L sucrose, 0,1g/L inositol, 0,002g/L glycine, 0,1mg/L indoleacetic acid (AIA) and 5g/L of agar, with pH adjusted to 5.9. Were quantified the number of berries and ovules produced, the number of embryos rescued, and after 60 days in culture medium, the number of germinated embryos of each treatment also were quantified. The bunches that receive an application of AG3 or NAA at the cross 'Marroo Seedless' x 'CG 351' and only GA3 at the 'Marroo Seedless' x 'Jupiter', achieved a significant increase in the amount of hybrid plants (20%) when compared to the control. However, the effect was negative when spraying was performed using combinations of the phytohormones.

Keywords: *Vitis* spp., Genetic breeding, Stenospermocarpy, Hybridization.

INTRODUÇÃO

A viticultura é uma das atividades econômicas mais importantes no Vale do Submédio do São Francisco. Seu desenvolvimento ganhou destaque no cenário nacional, não apenas pelo volume de produção, mas especialmente pelos altos rendimentos obtidos e pela qualidade da uva produzida (TECCHIO et al., 2014). No ano de 2016, a produção nacional de uvas foi de aproximadamente 973 mil toneladas, em uma área colhida de 77 mil hectares. Desse total, cerca de 243 mil toneladas foram produzidas somente em Pernambuco, gerando um rendimento médio de 35 toneladas por hectare (IBGE, 2017), o que demonstra o elevado nível de tecnologia empregado na região.

A produção de uvas finas sem sementes das cultivares ‘Thompson Seedless’, ‘Crimson Seedless’ e ‘Sugraone’ foram as mais importantes economicamente até a última década, mas apresentaram pouca adaptação ao ambiente tropical, levando ao aumento dos custos de produção devido às baixas produtividades, irregularidade entre safras, suscetibilidade ao míldio, oídio e à rachadura de bagas, causando grandes prejuízos aos viticultores (LEÃO, 2013). Estes fatos despertaram o interesse pela introdução de novas cultivares e diversificação da matriz produtiva de uvas de mesa nesta região.

Deste modo, um dos maiores desafios da viticultura nacional, principalmente na produção de uvas para exportação, é o desenvolvimento de novas cultivares de uvas finas sem sementes, que apresentem adaptação às condições edafoclimáticas brasileiras e qualidade ajustada com as demandas de mercado internacional (MAIA, 2012).

Nesse caso, um dos métodos que vêm sendo utilizados na obtenção de novas cultivares de uvas sem sementes é a técnica de resgate de embriões imaturos, por apresentar maior eficiência devido ao aumento da frequência de indivíduos sem sementes na progênie (MELO, 2004). Entretanto, a percentagem de embriões obtidos nos trabalhos realizados no Vale do São Francisco ainda é muito baixa (LEÃO et al, 2013; NUNES et al, 2014; NUNES et al, 2015).

Outro método utilizado com bastante sucesso é a aplicação de fitorreguladores antes, durante ou após a floração para aumentar o desenvolvimento de sementes traço em cruzamentos de uvas sem sementes. Alguns relatos mostram que cultivares de uvas sem sementes tratadas com reguladores apresentaram um aumento significativo no tamanho dos

óvulos e na quantidade de embriões germinados, resultando na obtenção de uma maior população de plântulas híbridas (LEDBETTER; SHONNARD, 1990; BORDELON, 1994; BHARATHY, 2005).

Aguero et al. (1995) e Bharathy et al. (2003), utilizando pulverizações com benziladenina (BA) em cachos resultantes de cruzamentos realizados em cultivares sem sementes, observaram o aumento no tamanho dos óvulos no momento do resgate de embriões, e maior percentagem na obtenção de plantas híbridas. O uso de pulverizações com giberelina também tem mostrado resultados satisfatórios, Ledbetter e Shonnard (1990) obtiveram um percentual de 56% na germinação de sementes-traço da cultivar 'C35-33', quando comparado ao tratamento controle, que obteve apenas 12,4%.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi verificar a eficiência da aplicação de reguladores de crescimento na obtenção de populações de videira, a fim de aumentar o número de plântulas híbridas obtidas nas progênies.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Os cruzamentos foram realizados em videiras cultivadas no Campo Experimental de Bebedouro da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, localizada nas coordenadas geográficas 09°09' S e 40°22' W e altitude de 365,5 m. O procedimento utilizado foi de emasculação do progenitor feminino e polinização proposto por Santos-Neto (1955) (Figura 1). Os grãos de pólen utilizados foram coletados anteriormente e armazenados em dessecador. Como progenitor feminino foi utilizado a cultivar 'Marroo Seedless' e como masculino as cultivares 'CG 351 ou Arizul' e 'Jupiter'. As cultivares foram selecionadas de acordo com a eficiência genotípica na realização dos cruzamentos em trabalhos anteriores (NUNES et al, 2015).

Reguladores de crescimento

O experimento foi conduzido em dois tipos de cruzamentos (cruzamento 1: 'Marroo Seedless' x 'CG 351') e (cruzamento 2: 'Marroo Seedless' x 'Jupiter'), sendo conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizados, com seis tratamentos, sendo cinco tratamentos com a aplicação de diferentes doses isoladas ou combinadas de reguladores de

crescimento, e uma testemunha (controle) sem essa aplicação. Os reguladores de crescimento utilizados foram o ácido naftalenoacético (ANA), a benzilaminopurina (BAP) e o ácido giberélico (GA3) (Tabela 1).

As aplicações foram realizadas em dois períodos: 10 dias antes da floração e 7 dias após a polinização, em 5 plantas com a mesma época de poda, conforme trabalhos realizados por Bharathy et al. (2005). As soluções com os fitoreguladores foram preparadas no mesmo dia da aplicação. Os compostos químicos foram pesados, diluídos em seus solventes apropriados e colocados em pulverizadores de spray individuais. Foram adicionadas duas gotas de espalhante adesivo para melhor fixação e absorção do produto.

Tabela 1. Reguladores de crescimento e doses utilizadas em pulverizações de cachos de videira na Embrapa Semiárido, Petrolina-PE, 2018.

Regulador	1ª aplicação (d.a.f) ¹	Doses (mg/L)	2ª aplicação (d.a.e) ²	Doses (mg/L)
ANA	10	20	7	20
BAP	10	50	7	50
GA3	10	50	7	50
ANA+BAP	10	20+50	7	20+50
BAP+GA3	10	50+50	7	50+50
Controle	---	0	---	0

¹d.a.f: dias antes da floração; ²d.a.e: dias após a emasculação

Inoculação de óvulos

Cinco cachos de cada tratamento foram emasculados e polinizados, sendo coletados sete semanas após a polinização e levados para o Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido. Em câmara de fluxo laminar foi realizado a desinfestação das bagas, por meio de lavagem em água destilada autoclavada, imersão em álcool a 70% (v/v) por 1 minuto e em hipoclorito de sódio a 0,2% por 20 minutos sob agitação.

Após a desinfestação das bagas, os óvulos foram extraídos e inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura proposto por Galzy (1964), suplementado com PVP (0,0015 g/L), inositol (0,1 g/L), glicina (0,002g/L), ágar (4,0 g/L) sacarose (30g/L), e pH ajustado para

5,9 antes da autoclavagem a 120 °C por 20 min. Posteriormente, o material foi mantido em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h e temperatura de 23±27 °C.

Resgate de embriões

Aos 45 dias após a inoculação dos óvulos foi realizado o isolamento e a inoculação dos embriões produzidos em novo meio de cultura. Foi utilizado o meio de cultura WPM (LLOYD & McCOWN, 1980), suplementado com sacarose (30g/L), inositol (0,1g/L), glicina (0,002g/L), BAP (1mg/L), PVP (0,1g/L), ágar (5,0 g/L), sendo o pH ajustado para 5,9 antes da autoclavagem. O material foi cultivado em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h, temperatura de 25±2 °C e radiação fotossintética ativa de 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Avaliações

Foram quantificados o número de bagas e de óvulos produzidos (no momento da inoculação de bagas), o número de embriões resgatados (no momento do resgate), e após 30 dias de cultivo em meio de cultura, o número de embriões germinados de cada tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2000), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obtenção de embriões de videira

De uma maneira geral as percentagens de resgate de embriões foram significativamente maiores nos cachos dos tratamentos que receberam as pulverizações com reguladores GA3 e ANA, quando comparados àqueles do tratamento controle e em combinação com BAP. Para o número de bagas produzidas, foi observado uma maior quantidade no tratamento controle (183) do cruzamento 1. Já no cruzamento 2 a maior quantidade foi obtida no tratamento ANA + BAP (333). Entretanto, os valores de óvulos inoculados, embriões resgatados e germinados não foram influenciados pela quantidade de

bagas obtidas. De acordo com Fregoni (1987), bagas com maiores números de sementes apresentam teores hormonais mais elevados, o que pode estar relacionado com a baixa obtenção de embriões nos tratamentos onde foram obtidos os maiores números de sementes (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito de aplicações de reguladores de crescimento em cachos resultantes do cruzamento de videiras sobre o resgate e a obtenção *in vitro* de embriões zigóticos.

Tratamento	Número de bagas produzidas	Número de óvulos inoculados	Embriões resgatados (%)	Embriões germinados (%)
Cruzamento 1: ‘Marroo Seedless’ x ‘CG 351’				
CONTROLE	183	170	36.46 c	21.76 b
ANA	98	60	63.33 a	48.33 a
BAP	161	216	31.94 c	21.75 b
GA3	60	68	63.23 a	47.05 a
ANA + BAP	161	86	23.26 d	12.79 c
BAP + GA3	130	79	51.90 b	27.82 b
CV (%)			6,68	13,18
Média			45,02	29,93
Cruzamento 2: ‘Marroo Seedless’ x ‘Jupiter’				
CONTROLE	275	318	25.15 d	18.55 d
ANA	161	218	50.91 b	27.97 c
BAP	247	158	48.10 b	32.91 b
GA3	182	221	56.11 a	40.72 a
ANA + BAP	333	76	38.16 c	17.10 d
BAP + GA3	309	139	49.72 b	28.13 c
CV (%)			3,71	5,80
Média			44,69	27,56

Médias seguidas das mesmas letras em cada coluna, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Os cachos tratados com ANA geraram um maior valor percentual de embriões resgatados no cruzamento 1 (63,33%). Os cachos tratados com GA3 se destacaram nos dois cruzamentos realizados, com valores médios de 63,23% e 56,11%, respectivamente. Por outro lado, os menores valores percentuais de resgate de embrião foram obtidos com o uso da combinação de ANA + BAP, e também no tratamento controle para os dois tipos cruzamentos avaliados. Os embriões apresentaram coloração branca e brilhante situados na extremidade do óvulo, sendo encontrado em sua maioria, em estágio de desenvolvimento torpedado.

Aguero et al. (2000), estudaram os efeitos da aplicação de reguladores de crescimento em cultivares sem sementes, e demonstraram que o uso de giberelina foi eficaz para o desenvolvimento de sementes-traço, confirmando a ação indutiva de crescimento do GA3.

Na Tabela 2 observa-se ainda que a aplicação de ANA ou GA3 nos cachos foi mais eficiente do que a aplicação de BAP para induzir a germinação de embriões, com um percentual de obtenção de 48,33 e 47,05% de embriões germinados no cruzamento 1, quando comparadas com o tratamento controle que obteve 21,76 e 18,55% respectivamente. Entretanto, quando associados a outros reguladores (combinações ANA + BAP e BAP + GA3) observa-se uma diminuição significativa da germinação. Este resultado provavelmente indica uma consequência da associação com o BAP, já que as citocininas podem ter efeito antagônico a outros reguladores, pois são responsáveis pela divisão e expansão celulares nos tecidos dos frutos, ainda que a quantidade dos outros reguladores seja maior na semente que nas células do fruto ao seu redor (KERBAUY, 2012). Por outro lado, o efeito de cada regulador também está relacionado aos genótipos envolvidos, podendo induzir respostas diferentes em cada caso. Como exemplo, podemos citar os resultados relatados por Barathy et al (2005) e Khoshandan et al (2017), que observaram um maior percentual de germinação de embriões quando os cachos das cultivares ‘Thompson Seedless’ e ‘Flame Seedless’ foram pré-tratados com a citocinina BAP, obtendo 47,5% e 33% de germinação, respectivamente.

CONCLUSÕES

A aplicação de GA3 e ANA em cachos de videira resultantes do cruzamento entre ‘Marroo Seedless’ x ‘CG 351’, e de apenas do GA3 em cachos resultantes do cruzamento ‘Marroo Seedless’ x ‘Jupiter’, aumentou significativamente a percentagem de embriões resgatados e plântulas desenvolvidas. Entretanto, quando se utiliza esses reguladores de crescimento em combinações, esse efeito passa a ser negativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUERO, C. et al. Effect of gibberellic acid and uniconazol on embryo abortion in the stenospermocarpic grape cultivars Emperatriz and Perlon. **Plant Growth Regulation**, v. 30, n. 1, p. 9-16, 2000.

AGUERO, C.; RIQUELME, C.; TIZIO, R. Embryo rescue from seedless grapevines (*Vitis vinifera* L.) treated with growth retardants. **Vitis**, v. 34, n. 2, p. 73-76, 1995.

BHARATHY, P. V., KARIBASAPPA, G. S., BIRADAR, A. B., KULKARNI, D. D., SOLANKE, A. U., PATIL, S. G., AGRAWAL, D. C. Influence of pre-bloom sprays of benzyladenine on in vitro recovery of hybrid embryos from crosses of Thompson Seedless and 8 seeded varieties of grape (*Vitis* spp.). **VITIS-Journal of Grapevine Research**, n. 42, p. 199-202, 2003.

BHARATHY, P. V., KARIBASAPPA, G. S., PATIL, S. G., AGRAWAL, D. C. In ovulo rescue of hybrid embryos in Flame Seedless grapes—Influence of pre-bloom sprays of benzyladenine. **Scientia horticulturae**, v. 106, n. 3, p. 353-359, 2005.

BORDELON, B. P.; MOORE, J. N. Promoting stenospermic grape seed trace development and germination with plant growth regulators. **Journal of the American Society for Horticultural Sciences**, n.119, p. 719–726, 1994.

EMERSHAD, R. L.; RAMMING, D. W. In-ovulo embryo culture of *Vitis vinifera* L. cv. ‘Thompson Seedless’. **American Journal of Botany**, New York, v. 71, n. 6, p. 873-877, 1984.

FERREIRA, D. F. **Sistemas de análise estatística para dados balanceados**. Lavras: UFLA/DEX/SISVAR, 2000. 145 p.

FLEMION, F. After-ripening at 5 C favours germination of grape seeds. **Contributions from the Boyce Thompson Institute**, v. 9, p. 7-15, 1937.

FREGONI, M. Viticultura Generali. Roma: **Reda**, 1987. 728 p.

GALZY, R. Technique de thermothérapie des virus de la vigne. **Annales des Epiphyties**, Paris, v. 15, p. 245-256, 1964.

GRAY, D. J.; MORTENSON, J. A. Initiation and maintenance of long term somatic embryogenesis from anthers and ovaries of *Vitis longii* 'Microsperma'. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 9, 73-80, 1987.

IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Rio de Janeiro v.30 n.4 p.1-84 abril.2017.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. 1 Ed. Guanabara Koogan, 2004. 217p.

KHOSHANDAM, L.; BANEH, H. D.; MARANDI, R. J.; DARWISHZADEH, R. Effect of BA and ovule developmental stages on embryo rescue in Perlette grape (*Vitis vinifera* L.) cultivar. **European Online Journal of Natural and Social Sciences**, v. 6, n. 1, p. 1, 2017.

LEAO, P. C. S. de; OLIVEIRA, V. R.; NUNES, B. T. G.; MARTINS, B. E. S. Eficiência na obtenção de híbridos por meio da técnica de resgate de embriões para desenvolvimento de cultivares de uvas sem sementes no Semiárido brasileiro: 2011-2012. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 7., 2013, Uberlândia. **Variedade melhorada: a força da nossa agricultura: anais**. Viçosa, MG: SBMP, p. 146-149, 2013.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v.30, p.421-427, 1980.

LEDBETTER, C. A.; SHONNARD, C. B. Improved seed development and germination of stenospermic grapes by plant growth regulators. **Journal of Horticultural Science**, v. 65, n. 3, p. 269-274, 1990.

MAIA, J. D. G.; RITSCHER, P.; CAMARGO, U. A.; SOUZA R. T. de; FAJARDO, T. V.; NAVES, R. de L.; GIRARDI, C. L. **'BRS Vitória' nova cultivar de uva de mesa sem**

sementes com sabor especial e tolerante ao míldio. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2012. 12 p. il. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 126).

SANTOS-NETO, J. R.A. S. Grape breeding in Brazil. **Bragantia**, v. 14, n. UNICO, p. 237-258, 1955.

NUNES, B. T. G.; PEDROSO, A. D. das D.; MELO, N. F. de.; LEÃO, P. C. de S. Obtenção de híbridos de uvas sem sementes por meio da técnica de resgate de embriões durante o período de 2013-2014. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMIÁRIDO, 9., 2014, Petrolina. **Anais...** Petrolina: Embrapa Semiárido, p.103-108, 2014.

NUNES, B. T. G., PEDROSO, A. D. D., & LEAO, P. D. S. (2015). Influência do genótipo no desenvolvimento de híbridos de uvas de mesa por meio da técnica de resgate de embriões. In Embrapa Semiárido-Resumo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 8., 2015, Goiânia. O melhoramento de plantas, o futuro da agricultura e a soberania nacional: anais. Goiânia: UFG: SBMP, 2015.

NUNES, B. T. G.; PEDROSO, A. D. das D.; MELO, N. F. de.; LEÃO, P. C. de S. Obtenção de híbridos de uvas sem sementes por meio da técnica de resgate de embriões durante o período de 2014-2015. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMIÁRIDO, 10., 2015, Petrolina. **Anais...** Petrolina: Embrapa Semiárido, p.185-190, 2015.

PASSOS, I. R. da S.; TERRA, M. M.; PIRES, E. J. P. Pesquisas com a videira no IAC: cultura in vitro. **O Agrônomo**, Campinas, v. 37, n. 3, p. 155-160, 1985.

STOUT, A. B. Seedlessness in grapes. New York: **State Agricultural Experiment Station**, 1936. 68 p. (Technical Bulletin, 238).

TECCHIO, M. A.; HERNANDES, J. L.; PIRES, E. J. P.; MOURA, M. F.; TERRA, M. M. **Cultivo da videira para mesa, vinho e suco.** In: Cultivo de fruteiras de clima temperado em regiões subtropicais e tropicais. Lavras: Ed. UFLA, 2014. 507 p.

CAPÍTULO 2

DIFERENTES ÉPOCAS DE INOCULAÇÃO E RESGATE DE EMBRIÕES
NA OBTENÇÃO DE POPULAÇÕES HÍBRIDAS DE VIDEIRA

RESUMO

A técnica de resgate de embriões de uvas sem sementes previne o aborto do embrião imaturo e através de metodologias do cultivo *in vitro* promovem o seu desenvolvimento até a obtenção da planta. O aborto do embrião ocorre em vários períodos variáveis pós-fertilização e a época em que os óvulos são coletados é determinante para o sucesso do resgate. O objetivo desse estudo foi determinar os melhores períodos de coleta e cultivo *in vitro* de óvulos de videira em dois cruzamentos. Foram coletados seis cachos de cada cruzamento em três épocas distintas (6, 7 e 8 semanas após a emasculação) e o resgate ocorreu aos 45 e 60 dias após a inoculação dos óvulos. Os embriões resgatados foram inoculados em meio de cultura WPM, suplementado com sacarose (30g/L), inositol (0,1g/L), glicina (0,002g/L), BAP (1mg/L), PVP (0,1g/L), ágar (5,0 g/L) e pH ajustado para 5,9. Foram avaliados os números de óvulos produzidos, de embriões resgatados e de embriões germinados. A maior quantidade de óvulos produzidos embriões germinados foi observada no cruzamento ‘Marroo Seedless’ x ‘BRS Vitória’, quando os cachos foram coletados oito semanas após a polinização. O tempo de cultivo *in vitro* não influenciou nos resultados obtidos, podendo-se resgatar os embriões aos 45 ou 60 dias após a inoculação dos óvulos.

Palavras-chave: Melhoramento Genético, Meio de cultura, Polinização, Uva.

ABSTRACT

The technique of embryo rescue of seedless grapes cultivars is very efficient, since it prevents the abortion of the immature embryo and through *in vitro* cultivation methodologies promote its development until a plant is obtained. Abortion of the embryo in various post-fertilization variable periods and a time when the ovules are collected and determinant for the success of the rescue. The objective of the study was to determine the best periods of collection and *in vitro* cultivation of grapevine at two crosses. Six clusters of each cross were collected at three distinct times (6, 7 and 8 weeks after emasculation) and rescue occurred at two times (45 and 60 days after inoculation of the eggs). The embryos were inoculated in WPM medium supplemented with sucrose (30g/L), inositol (0,1g/L), glycine (0,002g/L), BAP (1mg/L), PVP (0,1g/L), agar (5,0 g/L) and pH adjusted to 5.9. The numbers of ovule produced, rescued embryos and germinated embryos were evaluated. The highest number of ovules produced and germinated embryos were observed at the 'Marroo Seedless' x 'BRS Vitória' cross, when the bunches were collected eight weeks after pollination. The *in vitro* culture time did not influence the results obtained, and the embryos could be rescued at 45 or 60 days after inoculation of the ovules.

Keywords: Genetic breeding, Culture médium, Pollination, Grape.

INTRODUÇÃO

A expansão da viticultura pelo mundo tornou o Brasil um grande exportador de uvas *in natura*, com a vantagem de conseguir produzir os frutos durante o ano todo. Entretanto, as melhores demandas do consumo no mercado são por uvas sem sementes. Nesse caso, a produção das cultivares tradicionais apirênicas (ou sem sementes) apresenta elevado custo de produção, baixa produtividade, rachadura de bagas e falta de resistência a várias doenças. Este cenário gerou a necessidade de programas de melhoramento que desenvolvessem novos genótipos mais adaptados de uva sem sementes, e que atendessem as exigências do mercado consumidor (NACHTIGAL, 2005).

A necessidade da obtenção de novas cultivares sem sementes com grande variabilidade genética, através de cruzamentos para a seleção de indivíduos apirênicos superiores, motivou o abandono da partenocarpia e a adoção da estenospermocarpia por todos os programas de melhoramento (CAMARGO et al., 1999). Como consequência é necessário o uso de técnicas de resgate de embrião, capazes de prevenir o seu aborto, promovendo seu desenvolvimento até a obtenção da planta (STOUT, 1936).

As hibridizações são realizadas com progenitores femininos emasculados e fecundados com grãos de pólen de outro progenitor masculino, sendo realizado há bastante tempo para gerar populações de uva sem semente com novas combinações genéticas (BARLASS E RAMMING, 1988; RAMMING et al., 1990).

Por outro lado, foi observado nesses cruzamentos que ocorre o aborto do embrião em períodos variáveis pós-fertilização. Devido a isso, torna-se necessário o uso da técnica de resgate de embriões, buscando viabilizar o sucesso na obtenção dos híbridos. Além disso, estudos em videira têm mostrado que os principais fatores que influenciam no resgate de embriões são a idade do óvulo após a sua remoção e o meio de cultura utilizado (Li, 2014). Na maioria das cultivares avaliadas por Emershad et al. (1989) foi observado o início deste processo entre a sexta e a décima semana após a polinização. Além disso, a época de maturação de cada genótipo também influenciou na obtenção de embriões resgatados e germinados, onde os de maturação tardia apresentaram os menores valores de embriões resgatados e germinados (POMMER, 1995).

O presente trabalho teve como objetivo determinar os melhores períodos pós-fertilização para coleta e de cultivo *in vitro* de óvulos de videira, visando o resgate e o desenvolvimento de embriões zigóticos para geração de populações híbridas de uvas de mesa.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Os cruzamentos foram realizados no período de 08/08/2016 a 31/08/2016, em videiras cultivadas no Campo Experimental de Bebedouro da Embrapa Semiárido, Petrolina-PE, localizada nas coordenadas geográficas 09°09' S e 40°22' W e altitude de 365,5 m. Foi utilizado o procedimento clássico de emasculação do progenitor feminino seguido de polinização manual, conforme descrito por Neto (1955). Como progenitores femininos foram utilizadas as cultivares 'CNPUV 24' e 'Marroo Seedless', e como masculinos as cultivares 'BRS Vitória' e 'CG 102295', em dois cruzamentos: 'Marroo Seedless' x 'BRS Vitória' e 'CNPUV 24' x 'CG 102295'. A época de maturação de cada genótipo foi determinada de acordo com trabalhos realizados por Leão et al. (2013) (Tabela 1).

Tabela 1. Características e maturação dos genótipos de videira utilizados nos cruzamentos realizados no Campo Experimental de Bebedouro da Embrapa Semiárido, Petrolina-PE, 2018.

Genótipos	Espécie	Origem	Fenologia	Maturação
BRS Vitória	Híbrido interespecífico	'BRS Linda' x 'CNPUV 681-29'	95	Precoce
CG 102295	<i>Vitis vinifera</i> L.	-	104	Mediana
CNPUV 24	Híbrido interespecífico	SI	110	Mediana
Marroo Seedless	Híbrido interespecífico	'Carolina Blackrose' x 'Ruby Seedless'	106	Mediana

SI- não há informações divulgadas deste híbrido, visto que ele ainda está em fase de experimentação.

Inoculação de óvulos

Dezoito cachos de cada cruzamento foram emasculados e polinizados. Em seguida, seis cachos de cada cruzamento foram coletados (Figura 1A) em três épocas (seis, sete e oito

semanas após a polinização – s.a.p.) e levados para o Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido, onde foi realizado a desinfestação das bagas (Figura 1B) em câmara de fluxo laminar, por meio de lavagem em água destilada autoclavada, imersão em álcool a 70% por 1 minuto e em hipoclorito de sódio a 20% por 20 minutos sob agitação.

Após a desinfestação das bagas, os óvulos foram extraídos (Figura 1C) e inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura proposto por Galzy (1964) (Figura 1D), suplementado com PVP (0, 15 g/L), inositol (0,1 g/L), glicina (0,002g/L), ágar (4,0 g/L) sacarose (30g/L), e pH ajustado para 5,9 antes da autoclavagem a 120 °C por 20 min. Posteriormente, foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h e temperatura de 23 ± 2 °C.

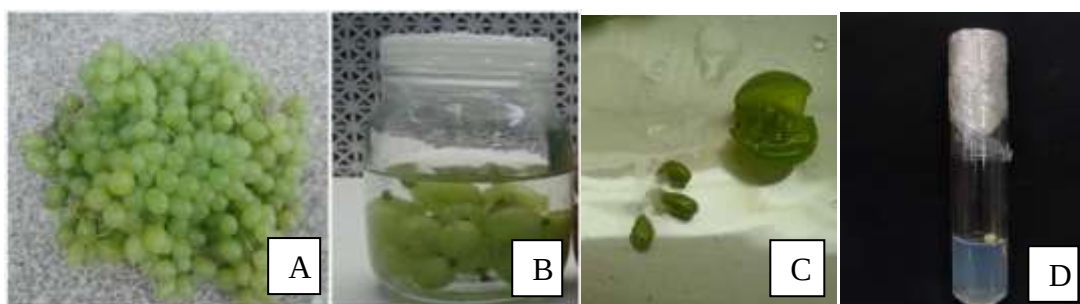


Figura 1. Etapas da coleta, desinfestação e inoculação *in vitro* de óvulos de videira. A- Coleta de cacho; B- Desinfestação de bagas; C- Extração de óvulos; D- Óvulo inoculado em meio de cultura. Fotos: Autora, 2017.

Resgate de embriões

A quantidade total de óvulos obtidos de cada cruzamento foi dividida em dois lotes (lote 1 e lote 2), sendo realizado o resgate dos embriões aos 45 dias (lote 1) e 60 dias (lote 2) após a inoculação dos mesmos. O procedimento foi realizado com o auxílio de microscópio estereoscópio e os embriões resgatados foram inoculados em meio de cultura WPM (LLOYD; McCOWN, 1980), suplementado com sacarose (30g/L), inositol (0,1g/L), glicina (0,002g/L), BAP (1mg/L), PVP (0,1g/L), ágar (5,0 g/L), sendo o pH ajustado para 5,9 antes da autoclavagem. Os embriões resgatados foram cultivados durante 60 dias em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h, temperatura de 25 ± 2 °C e radiação fotossintética ativa de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Avaliações

Foram avaliados os números de óvulos produzidos, de embriões resgatados e de embriões germinados. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3x2 (2 cruzamentos, 3 épocas de coleta dos óvulos e 2 épocas de cultivo dos óvulos) em três repetições. A análise estatística foi realizada utilizando-se o Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores – SANEST (ZONTA; MACHADO, 1984) e os dados transformados para raiz ($x + 0,5$), sendo as médias comparadas a 5% de significância pelo teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 apresenta os resultados para os números de óvulos produzidos, de embriões resgatados e de embriões germinados em seis, sete e oito semanas após a polinização, nos dois cruzamentos de videira realizados (C1: ‘CNPUV 24’ x ‘CG 102295’ e C2: ‘Marroo Seedless’ x ‘BRS Vitória’).

As respostas foram significativamente diferentes nos dois cruzamentos realizados para todas as variáveis analisadas. A maior quantidade de óvulos obtidos e inoculados foi observada no C2, quando os mesmos foram coletados oito semanas após a polinização. Já para o C1 não ocorreu o mesmo, sendo obtido um maior número de óvulos sete semanas após a polinização. De maneira geral, para estes cruzamentos, os maiores valores médios de óvulos foram obtidos oito semanas após a polinização (54,9 óvulos).

Em trabalhos realizados por Ji et al (2013), as melhores épocas para obtenção de óvulos também foram bem distintas para cada cruzamento realizado, variando de cinco até nove semanas após a polinização. Estes resultados demonstram que a época ideal para coleta e inoculação dos óvulos ou sementes traço varia em função dos genótipos utilizados como genitores.

Tabela 2. Números de óvulos produzidos e inoculados, embriões resgatados e embriões germinados em dois cruzamentos de videira, com inoculação dos óvulos às seis, sete e oito semanas após a polinização. Campo Experimental de Bebedouro da Embrapa Semiárido, Petrolina – PE, 2018¹.

Óvulos produzidos e inoculados				
Cruzamento/ Tratamento²	6 s.a.p³	7 s.a.p	8 s.a.p	Média
C1	36,6 aC	61,9 aA	41,3 bB	46,0 A
C2	16,6 bB	17,3 bB	77,6 aA	32,3 B
Média	26,6 c	39,6 b	59,4 a	
CV (%)	3,15			
Embriões resgatados				
Cruzamento/ Tratamento	6 s.a.p	7 s.a.p	8 s.a.p	Média
C1	4,89 bB	8,66 aA	4,16 bB	5,76 B
C2	2,62 cC	4,14 bB	26,21 aA	8,68 A
Média	3,7 c	6,4 b	15,2 a	
CV (%)	7,35			
Embriões germinados				
Cruzamento/ Tratamento	6 s.a.p	7 s.a.p	8 s.a.p	Média
C1	1,36 aA	2,15 aA	2,31 aA	1,92 B
C2	0,93 bB	1,08 bB	14,7 aA	3,99 A
Média	1,14 b	1,61 b	8,5 a	
CV (%)	12,16			

¹Médias seguidas por letras distintas minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância; ²C1: ‘CNPUV 24’ x ‘CG 102295’ e C2: ‘Marroo Seedless’ x ‘BRS Vitória’; ³s.a.p.: semanas após a polinização

Em relação ao número médio de embriões resgatados (Tabela 2), houve diferença entre os períodos para os dois cruzamentos. O melhor período para inoculação de óvulos e resgate de embriões para o C1 foi em sete semanas após a polinização, enquanto para o C2 foi em oito semanas após a polinização.

No caso do número de embriões germinados, não houve diferença estatística entre os tratamentos no C1. No processo de estenoespermocarpia o desenvolvimento do embrião e do endosperma ocorre logo após a fertilização. Entretanto, de três a seis semanas inicia-se um processo de degeneração do endosperma, resultando na formação de frutos com traços de sementes devido à morte do embrião (CAMARGO et al., 1999). Por outro lado, observou-se no C2 maiores valores quando os óvulos foram inoculados oito semanas após a polinização. Nesse caso, o ciclo de cada genótipo, bem como a interação de suas características

moleculares (genes) são fundamentais para o estabelecimento de novos genótipos apirênicos. As diferentes respostas obtidas nos resultados observados entre os dois tipos de cruzamento podem estar relacionadas com diferenças genotípicas e de compatibilidade genética, resultantes de hibridações anteriores, bem como com as taxas de fertilização de cada indivíduo (LIU et al 2003; SUN et al, 2011).

Não houve diferença significativa nem interação entre os dois períodos de cultivo *in vitro* dos embriões resgatados, o que comprova que o resgate realizado aos 45 ou 60 dias de cultivo não influenciou os resultados obtidos (Dados não apresentados).

CONCLUSÕES

Os genótipos envolvidos nos cruzamentos influenciam significativamente na quantidade de óvulos produzidos bem como no resgate e germinação de embriões.

A época para o resgate e a germinação de embriões é genótipo dependente, obtendo-se maior número de embriões resgatados e germinados quando se realizou inoculação 8ª semana após a polinização, nos cruzamentos ‘CNPUV 24’ x ‘CG 102295’ e ‘Marroo Seedless’ x ‘BRS Vitória’.

Não há influência da época de resgate dos embriões sobre o aumento de embriões resgatados e germinados nos dois cruzamentos considerados neste estudo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARLASS M; RAMMING D.W.; Davis H.P. In ovulo embryo culture: a breeding technique to rescue seedless 9 seedless table grape crosses. **Austr Grapegrow Winemak** 292:123–125, 1988.

CAMARGO, U. A.; AMARAL, A. L.; OLIVEIRA, P. R. D. Uva sem sementes: uso da biotecnologia na busca de novas cultivares apirênicas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 2, n. 10, p. 108-112, 1999.

DAMIÃO FILHO, C. F.; MÔRO, F. V. **Morfologia externa das espermatófitas**. FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, p. 52, 2001.

EMERSHAD, R.L.; RAMMING, D.W.; SERPE, M.D. *In ovulo* embryo development and plant formation from stenospermic genotypes of *Vitis vinifera* L. **American Journal of Botany**, Bronx, New York, v. 76, p. 397-402, 1989.

GALZY, R. Technique de thermothérapie des virus de la vigne. **Annales des Epiphyties**, Paris, v. 15, p. 245-256, 1964.

JI, W., LI, Z. Q., ZHOU, Q., YAO, W. K., & WANG, Y. J. Breeding new seedless grape by means of in vitro embryo rescue. *Genetics and Molecular Research*, 12(1), 859-869, 2013.

LEAO, P. D. S., da SILVA, S. F., SOARES, E., & dos SANTOS, J. I. B. Caracterização fenológica de acessos de uvas para processamento do Banco de Germoplasma da Embrapa Semiárido. **Embrapa Semiárido-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**. 2013

LI, J.; WANG, X.; WANG, X.; WANG, Y. Embryo rescue technique and its applications for seedless breeding in grape. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 120, n. 3, p. 861-880, 2014.

LIU, S. M., SYKES, S. R., CLINGELEFFER, P. R. Improved in ovulo embryo culture for stenospermocarpic grapes (*Vitis vinifera* L.). **Australian Journal of Agricultural Research**, 54(9), 869-876, 2003.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v.30, p.421-427, 1980.

NACHTIGAL, J. C. Uvas sem sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 1, p. 0-0, 2005.

POMMER, C. V.; RAMMING, D. W.; EMERSHAD, R. L. Influence of grape genotype, ripening season, seed trace size, and culture date on in ovule embryo development and plant formation. **Bragantia**, v. 54, n. 2, p. 237-249, 1995.

PRATT, C. Reproductive anatomy in cultivated grapes - a review. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 22, n. 2, p. 92-109, 1971.

RAMMING, D. W.; EMERSHAD, R. L.; SPIEGEL-ROY, P.; SAHAR, N.; BARON, I. Embryo culture of early ripening seeded grape (*Vitis vinifera*) genotypes. **HortScience** 25, 339-342, 1990.

SANTOS-NETO, J. R.A. S. Grape breeding in Brazil. **Bragantia**, v. 14, n. UNICO, p. 237-258, 1955.

STOUT, A.B. Seedlessness in grapes. New York Agricultural Experiment Station, (**Techn. Bull.**, 238) 1936.

SUN, L., ZHANG G.J., YAN, A., XU, H. The study of triploid progenies crossed between different ploidy grapes. **Afr. J. Biotechnol.** 10: 5967-5971, 2011.

TORREGROSA, L.; BOUQUET, A. *In vitro* propagation of *Vitis* x *Muscadinia* hybrids by microcuttings or axillary budding. **Vitis**, Geneva, v. 34, n. 4, p. 237-238, 1995.

ZONTA, E. P., & MACHADO, A. A. SANEST—Sistema de análise estatística para microcomputadores. **Pelotas: UFPel**. 1984.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A aplicação de AG3 e ANA foram eficientes no aumento de plantas híbridas obtidas para estes cruzamentos.
- As aplicações realizadas com BAP diminuíram o número de obtenção de plantas.
- Os genótipos selecionados influenciam na obtenção de plantas.
- A melhor época para inoculação de óvulos nos dois cruzamentos realizados foi na oitava semana após a polinização.
- A época de resgate de embriões não influenciou nos resultados obtidos, podendo ser realizado aos 45 ou 60 dias após a inoculação de óvulos.