

ESTABELECIMENTO, MICROPROPAGAÇÃO E CULTIVO MÍNIMO
IN VITRO DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE *Vitis* spp.

LIDIANE MIRANDA DA SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2022

ESTABELECIMENTO, MICROPROPAGAÇÃO E CULTIVO MÍNIMO
IN VITRO DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE *Vitis* spp.

LIDIANE MIRANDA DA SILVA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Orientadora: Prof^a. Virginia Silva Carvalho

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2022

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

S586

Silva, Lidiane Miranda da.

ESTABELECIMENTO, MICROPROPAGAÇÃO E CULTIVO MÍNIMO *IN VITRO* DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE *Vitis* spp. / Lidiane Miranda da Silva. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

102 f. : il.

Bibliografia: 66 - 79.

Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2022.
Orientadora: Virginia Silva Carvalho.

1. Videiras. 2. Propagação clonal. 3. Segmentos nodais. 4. Germoplasma. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 631.5233


ESTABELECIMENTO, MICROPROPAGAÇÃO E CULTIVO MÍNIMO
IN VITRO DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE *Vitis* spp.

LIDIANE MIRANDA DA SILVA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Aprovada em 25 de fevereiro de 2022.


Comissão Examinadora:



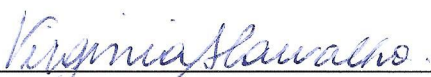
Dr. Nataniel Franklin de Melo (D.Sc., Ciências Biológicas) - Embrapa Semiárido



Prof.^a Claudete Santa Catarina (D.Sc., Biotecnologia) - UENF



Prof.^a Telma Nair Santana Pereira (Ph.D, Plant Breeding) - UENF



Prof.^a Virginia Silva Carvalho (D.Sc., Fitotecnia) – UENF
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

Eu dedico essa tese a Deus por ter me proporcionado todos os recursos para concluir e alcançar todos os meus sonhos e pelo amor e cuidado com minha vida!

A minha mãe Denice Miranda da Silva, ao meu pai Nilson Gomes da Silva (*in memoriam*), aos meus irmãos Deborah, Denílson, Lídio e Nilson Junior que são minha base e minha força!

Não te mandei eu? Sê forte e corajoso; não temais, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus é contigo, por onde quer que andares.

Josué cap. 1 versículo 9

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me ajudar durante todo o decorrer do doutorado, por ter guardado a minha vida, não ter me deixado faltar nada e também por sempre estar presente em todos os momentos bons e difíceis que passei, sou imensamente grata pelo seu amor por mim;

A minha mãe Denice e ao meu pai Nilson (*in memoriam*) por serem a minha base e inspiração de vida. Aos meus irmãos Deborah, Denílson, Lídio e Nilson por estarem presentes em toda a minha vida, me apoiando e torcendo por mim em todos os momentos;

Aos meus irmãos da igreja Maranata por sempre estarem em oração por mim, sendo muitas vezes a minha família em Campos. Agradeço imensamente aos meus amigos Otacílio Damásio, Vinicius Manhães, Robson Noia, Matheus Alvez, Moisés, Frederico Dias, Kalliane Zaira, Nádia Botini, Priscila Simione, Roberta Sales, Murilo Salardani, Kissila Motta, Graziela Santana, Daniel Miranda, Moisés Ambrósio e Karina Fontana, por todos os momentos incríveis que passei com vocês, meus quatro anos não seriam os mesmos sem o apoio e amizade de todos vocês;

Agradeço ao meu grupo de laboratório em especial Otacílio Damásio, Vinicius Manhães, Roberta Sales, Clarissa, Kíssila e Renato, pelo apoio na condução e avaliações dos meus experimentos e amizade, pelas conversas que em muitas vezes foram essenciais para a condução dos experimentos, além, da companhia e das muitas risadas, sendo por muitas vezes minha família;

A minha orientadora Virginia Silva Carvalho por me conceder a oportunidade de trabalhar em conjunto com seu laboratório, pela orientação, pelos conselhos, pelas maravilhosas confraternizações do laboratório, pela compreensão e paciência, além, da amizade que certamente construímos ao longo dos quatro anos, obrigada professora;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela estrutura e oportunidade de realizar o curso de doutorado;

Agradeço à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ, pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento da pesquisa;

Aos meus conselheiros, Claudete Santa Catarina e Alexandre Pio Viana, por todos os ensinamentos, conselhos e contribuições durante o doutorado;

Aos professores do PPGMP, pelos ensinamentos durante esses quatro anos;

Ao secretário da pós-graduação, José Daniel, por sempre ser solícito, amigo, atencioso e incentivador, me ajudando e me orientando em qualquer dúvida que tinha em relação às disciplinas e documentos do programa;

Aos colegas do curso de PPGMP, pelos quatro anos de estudo que compartilhamos e ao grupo Ganho Genético por me proporcionar momentos incríveis de muito conhecimento e empenho na organização de eventos, contribuindo para o meu aperfeiçoamento profissional;

E a todos que, de alguma forma, estiveram comigo durante esse período e que contribuíram para a realização desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIB	Ácido Indolbutírico
B.O.D.	Câmara incubadora B.O.D
BA	6-Benziladenina
BAG	Banco de Germoplasma
C.V. (%)	Coefficiente de variação
CCTA	Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias
DBC	Delineamento em Blocos ao Acaso
DIC	Delineamento Inteiramente ao Acaso
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GA₃	Ácido Giberélico
LFIT	Laboratório de Fitotecnia
MS	Sais minerais de Murashige e Skoog, 1962
NaClO	Hipoclorito de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
UENF	Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Gráfico do desdobramento dos cinco diferentes conteúdos de BA nos híbridos CH1.3 e CH5.1 para a característica de altura da parte aérea das brotações.....22
- Figura 2-** Micropropagação dos híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. Imagens **(A)** Vedação coberta por membranas microporosas (VM) **(B)** Vedação de polipropileno (AM); **(C)** 1;2, multiplicação *in vitro*; **(D)** – 1;2 alongamento e enraizamento das brotações; **(E)** Híbridos após enraizamento *in vitro* – 1;2;3 CH1.2; CH5.1; CH1.3 em cultivados sem as membranas microporosas; 4;5;6 cultivados em vedações cobertas por membranas, respectivamente.....27
- Figura 3-** Aspectos anatômicos da epiderme da folha dos três híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. Microscopia óptica evidenciando a densidade estomática, comprimento do poro estomático e área do poro estomático na epiderme da face abaxial. (a,b) híbrido CH1.2, (c, d) CH1.3, (e, f) híbrido CH1.3. Est – estômato; PE – Poro estomático.....29

Figura 4- Concentração de CO ₂ (%) em diferentes momentos em período de 24 horas em recipientes <i>in vitro</i> contendo plantas dos três híbridos interespecíficos de <i>Vitis</i> spp. As médias seguidas de letras diferentes minúsculas diferem entre os híbridos e maiúsculas diferem entre as vedações de acordo com o teste de Tukey, a 5%.....	31
Figura 5- Imagens (A) Híbridos aclimatizados em casa de vegetação após 60 dias. A- 1;2 -CH1.2 e CH5.1 provenientes de vedações sem membranas. Imagens – 3;4 CH1.3 e CH5.1 plantas obtidas em vedações presentes de membrana, após 60 dias aclimatizados. Imagens B1 são os híbridos aclimatizados em casa de vegetação; B2, B3 e B4 são os híbridos CH1.2 e CH5.1 e CH1.3 em casa de vegetação, obtidos por meio da micropropagação e plantados em vasos plásticos de polipropileno em substrato Basaplant©.....	34
Figura 6- Matriz bivariada- correlação de Pearson entre características biométricas, anatômicas e fisiológicas dos três híbridos de <i>Vitis</i> spp na fase de alongamento e enraizamento <i>in vitro</i> . Vermelho e ajustes (r= -) representam correlações negativas e azul representa correlações positivas a nível de significância é p<0,05.....	36
Figura 7- Imagens das videiras pré-estabelecidas <i>in vitro</i> . Foto A: CH1.2; Foto B: CH1.3 com 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	43
Figura 8- Escala de avaliação da coloração dos segmentos nodais dos híbridos interespecíficos de <i>Vitis</i> spp. em cultivo mínimo <i>in vitro</i> . A) 1 = folhas verde-escuras, B) 2 = folhas verde-claras, C) 3 = folhas cor amarelada, D) folhas cor marrom (explante morto)	44
Figura 9- Cultivo mínimo <i>in vitro</i> aos 180 dias de cultivo dos dois híbridos interespecíficos avaliados. A, B e C = Híbrido CH1.2 cultivado em 10, 20 e 30 g de sacarose, respectivamente. D, E e F = Híbrido CH1.3 em 10, 20 e 30 g de sacarose, em sala de cultivo 27±2°C.....	60

Figura 10- Cultivo mínimo *in vitro* aos 180 dias de cultivo dos dois híbridos interespecíficos avaliados. A, B e C = Híbrido CH1.2 cultivado em 10, 20 e 30 g de sacarose, respectivamente. D, E e F = Híbrido CH1.3 em 10, 20 e 30 g de sacarose, em câmara B.O.D em temperatura $\pm 18^{\circ}\text{C}$61

LISTAS DE TABELAS

- Tabela 1-** Descrição dos genitores dos híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. pertencentes ao programa de melhoramento de videiras – UENF.... 13
- Tabela 2-** Desinfestação de segmentos nodais dos híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. em diferentes níveis de hipoclorito de sódio.....20
- Tabela 3-** Desinfestação de segmentos nodais de três híbridos interespecíficos de *Vitis* spp.....20
- Tabela 4-** Análise de variância do teste de cinco diferentes conteúdos de BA em dois híbridos (CH1.3 e CH5.1) interespecíficos de *Vitis* spp.....21
- Tabela 5-** Tabela de média dos cinco diferentes conteúdos de BA nos híbridos interespecíficos CH1.3 e CH5.1 de *Vitis* spp.....22
- Tabela 6-** Análise de variância da fase de multiplicação *in vitro* dos híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. em diferentes vedações de polipropileno presente ou não de membranas microporosas.....23
- Tabela 7-** Médias observadas das características morfológicas dos três híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. na fase de multiplicação *in vitro*.....24

Tabela 8- Análise de variância da fase de alongamento e enraizamento <i>in vitro</i> dos híbridos interespecíficos de <i>Vitis</i> spp. em diferentes vedações de polipropileno presente ou não de membranas microporosas.....	25
Tabela 9- Médias das características morfológicas dos três híbridos interespecíficos de <i>Vitis</i> spp. na fase de alongamento e enraizamento <i>in vitro</i>	25
Tabela 10- Análise de variância da anatomia da epiderme foliar dos híbridos interespecíficos de <i>Vitis</i> spp. em diferentes vedações de polipropileno presente ou não de membranas microporosas.....	28
Tabela 11- Médias observadas da anatomia da epiderme foliar dos três híbridos interespecíficos de <i>Vitis</i> spp. na fase de alongamento e enraizamento <i>in vitro</i>	28
Tabela 12- Análise de Variância dos pigmentos fotossintéticos dos híbridos interespecíficos <i>Vitis</i> spp. em diferentes vedações de polipropileno presente ou não de membranas microporosas.....	30
Tabela 13- Médias observadas dos pigmentos fotossintéticos dos três híbridos interespecíficos de <i>Vitis</i> spp. na fase de alongamento e enraizamento <i>in vitro</i>	30
Tabela 14- Análise de Variância do acúmulo de CO ₂ dos híbridos interespecíficos de <i>Vitis</i> spp. após 55 dias <i>in vitro</i> , em diferentes vedações de polipropileno presente ou não de membranas microporosas.....	31
Tabela 15- Análise de Variância da fase de aclimatização dos híbridos interespecíficos <i>Vitis</i> spp. em diferentes vedações de polipropileno presente ou não de membranas microporosas.....	33
Tabela 16- Desdobramento das médias da aclimatização dos três híbridos interespecíficos de <i>Vitis</i> spp. em função da vedação ausente e presente de membrana aos 60 dias em casa de vegetação.....	33

Tabela 17- Análise de variância do cultivo mínimo <i>in vitro</i> aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> dos dois híbridos de <i>Vitis</i> spp.....	46
Tabela 18- Médias das características de altura da parte aérea e sobrevivência aos 60 dias da conservação por cultivo mínimo <i>in vitro</i> dos híbridos de <i>Vitis</i> spp	46
Tabela 19- Médias das características de altura da parte aérea e sobrevivência aos 60 dias da conservação por cultivo mínimo <i>in vitro</i> dos híbridos de <i>Vitis</i> spp nos diferentes níveis de sacarose.....	47
Tabela 20- Médias das características de altura da parte aérea e sobrevivência aos 60 dias da conservação por cultivo mínimo <i>in vitro</i> dos híbridos de <i>Vitis</i> spp em diferentes condições de cultivo.....	47
Tabela 21- Análise de desdobramento do híbrido dentro de cada nível de sacarose para a característica número de folhas dos híbridos conservados por 60 dias.....	48
Tabela 22- Desdobramento da temperatura dentro de cada nível de sacarose para a característica número de folhas dos híbridos conservados por 60 dias.....	48
Tabela 23- Desdobramento do híbrido dentro de cada nível de sacarose (a) e desdobramento da sacarose dentro de cada nível híbrido (A) para a característica de coloração das folhas dos híbridos conservados por 60 dias.....	49
Tabela 24- Desdobramento do híbrido dentro de cada nível de temperatura (a) e desdobramento da temperatura dentro de cada nível híbrido (A) para a característica de coloração das folhas dos híbridos conservados por 60 dias.....	49
Tabela 25- Desdobramento do híbrido dentro de cada nível de sacarose (a) e desdobramento da sacarose dentro de cada nível híbrido (A) para a característica de coloração das folhas dos híbridos conservados por 60 dias.....	50

Tabela 26- Análise de variância do cultivo mínimo <i>in vitro</i> aos 120 dias de cultivo <i>in vitro</i> dos dois híbridos de <i>Vitis</i> spp.....	51
Tabela 27- Desdobramento do híbrido dentro de cada nível de temperatura (a) e desdobramento da temperatura dentro de cada nível híbrido (A) para a característica altura da parte aérea e coloração das folhas dos híbridos conservados por 120 dias.....	51
Tabela 28- Desdobramento do híbrido dentro de cada nível de sacarose (a) e desdobramento da sacarose dentro de cada nível híbrido (A) para a característica altura da parte aérea e coloração das folhas dos híbridos conservados por 120 dias.....	52
Tabela 29- Desdobramento do híbrido dentro de cada nível de sacarose (a) e o desdobramento da sacarose dentro de cada híbrido (A) para a característica de número de folhas dos híbridos conservados por 120 dias.....	53
Tabela 30- Desdobramento do híbrido dentro de cada nível de temperatura (a) e o desdobramento da temperatura dentro de cada híbrido (A) para a característica de número de folhas dos híbridos conservados por 120 dias.....	53
Tabela 31- Desdobramento da sacarose dentro de cada nível de temperatura (a) e o desdobramento da temperatura dentro de cada nível de sacarose (A) para a característica de sobrevivência dos híbridos conservados por 120 dias.....	54
Tabela 32- Desdobramento da sacarose dentro de cada nível de temperatura (a) e o desdobramento da temperatura dentro de cada nível de sacarose (A) para a característica de presença de raiz dos híbridos conservados por 120 dias.....	54
Tabela 33- Análise de desdobramento da presença de raiz nos híbridos interespecíficos de <i>Vitis</i> spp. em função da interação entre as diferentes temperaturas e concentrações e sacarose após 120 dias em cultivo mínimo <i>in vitro</i>	55

Tabela 34- Análise de variância do cultivo mínimo <i>in vitro</i> aos 180 dias de cultivo <i>in vitro</i> dos dois híbridos de <i>Vitis</i> spp.....	56
Tabela 35- Desdobramento dos híbridos dentro de cada nível de sacarose (a) e o desdobramento da sacarose dentro de cada híbrido (A) para a característica de sobrevivência dos híbridos conservados por 180 dias.....	56
Tabela 36- Desdobramento dos híbridos dentro de cada nível de sacarose (a) e o desdobramento da sacarose dentro de cada híbrido (A) para a característica de sobrevivência dos híbridos conservados por 180 dias.....	57
Tabela 37- Análise de desdobramento da altura da parte aérea de segmentos nodais de híbridos interespecíficos de <i>Vitis</i> spp. em função da interação entre as diferentes temperaturas e concentrações e sacarose após 180 dias em cultivo mínimo <i>in vitro</i>	57
Tabela 38- Desdobramento da sacarose dentro de cada híbrido para a característica de sobrevivência dos híbridos conservados por 180 dias.....	58
Tabela 39- Desdobramento da sacarose dentro de cada híbrido para a característica número de folhas dos híbridos conservados por 180 dias.....	58
Tabela 40- Desdobramento da sacarose dentro de cada híbrido para a característica coloração dos híbridos conservados por 180 dias.....	59
Tabela 41- Desdobramento do híbrido dentro de cada nível de sacarose para a característica presença de raiz nos híbridos conservados por 180 dias.....	59
Tabela 42- Análise de variância da regeneração <i>in vitro</i> dos híbridos interespecíficos de <i>Vitis</i> spp. conservados <i>in vitro</i> durante 180 dias em diferentes níveis de sacarose e temperatura.....	62

Tabela 43- Análise de desdobramento dos fatores analisados para as características de sobrevivência na regeneração *in vitro* dos híbridos conservados *in vitro*, após 180 dias em diferentes níveis de sacarose e temperatura.....63

SUMÁRIO

RESUMO	xviii
ABSTRACT	xx
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Geral.....	4
2.2 Específicos	4
3. CAPÍTULOS	5
3.1. ESTABELECIMENTO, MICROPROPAGAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO DOS HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE <i>Vitis</i> spp.	5
3.1.1 INTRODUÇÃO	5
3.1.2 – REVISÃO DE LITERATURA	7
3.1.2.1 - A cultura da videira	7
3.1.2.2 - Importância econômica e melhoramento da videira.....	8
3.1.2.3 Cultura de tecidos vegetais e suas técnicas associadas à cultura da videira	9
3.1.2.4 Uso de membranas microporosas no cultivo <i>in vitro</i>	11
3.1.3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1.3.1 Descrição dos híbridos interespecíficos de <i>Vitis</i> spp.....	12
3.1.3.2- Estabelecimento <i>in vitro</i> dos híbridos interespecíficos de <i>Vitis</i> spp.	14
3.1.3.2.1 - Ensaio 1: Coleta e desinfestação do material	14

3.1.3.2.2 - Ensaio 2: Determinação do conteúdo de BA para a multiplicação <i>in vitro</i> dos híbridos interespecíficos de <i>Vitis</i> spp.	15
3.1.3.3 - Micropropagação de híbridos interespecíficos de <i>Vitis</i> spp. em microambientes com diferentes trocas gasosas	15
3.1.3.3.1 - Alongamento e enraizamento <i>in vitro</i> das brotações	16
3.1.3.3.2 - Conteúdo de CO ₂ nos recipientes <i>in vitro</i>	17
3.1.3.3.3 Determinação de pigmentos fotossintéticos	17
3.1.3.3.4 - Análises anatômicas	18
3.1.3.3.6 - Análises estatísticas.....	18
3.1.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
3.1.4.1 Estabelecimento <i>in vitro</i>	19
3.1.4.2 - Micropropagação de híbridos interespecíficos de <i>Vitis</i> spp. em microambientes com diferentes trocas gasosas	23
3.1.4.2.1 - Fase de multiplicação <i>in vitro</i>	23
3.1.4.2.2 - Fase de Alongamento e enraizamento das brotações	24
3.1.4.2.3 - Análises de anatomia da epiderme foliar e pigmentos fotossintéticos .	28
3.1.4.2.4 Acúmulo de CO ₂ dos três híbridos interespecíficos na presença e ausência da membrana microporosa	30
3.1.4.2.5 - Acclimatização dos híbridos interespecíficos de <i>Vitis</i> spp.	32
Fonte de Variação.....	33
3.1.4.2.6 - Correlação entre os atributos morfofisiológicos dos híbridos.....	35
3.1.5 – CONCLUSÃO	37
3.2. CULTIVO MÍNIMO <i>in vitro</i> DE SEGMENTOS NODAIS DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE <i>Vitis</i> spp.	38
3.2.1 INTRODUÇÃO	38
3.2.2 REVISÃO DE LITERATURA	40
3.2.2.1 Conservação de recursos genéticos de videiras	40
3.2.2.2 Conservação <i>in vitro</i> de videira	41
3.2.3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.2.3.1 Material vegetal	42
3.2.3.2 Experimento de cultivo mínimo <i>in vitro</i>	43
3.2.3.3 Análises estatísticas.....	45
3.2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45

3.2.4.1 Cultivo mínimo de segmentos nodais de híbridos interespecíficos de <i>Vitis</i> spp. aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	45
3.2.4.2 Cultivo mínimo de segmentos nodais de híbridos interespecíficos de <i>Vitis</i> spp. aos 120 dias de cultivo	50
3.2.4.3 Cultivo mínimo de segmentos nodais de híbridos interespecíficos de <i>Vitis</i> spp. aos 180 dias de cultivo <i>in vitro</i>	55
3.2.4.3.1 Regeneração dos híbridos pós-conservação <i>in vitro</i>	62
3.2.5 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

RESUMO

SILVA; Lidiane Miranda; Dra.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; fevereiro 2022; Estabelecimento, micropropagação e cultivo mínimo *in vitro* de híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. Orientadora: Dra. Virginia Silva Carvalho; Conselheiros: Dr. Alexandre Pio Viana e Dra. Claudete Santa Catarina.

Os programas de melhoramento genético de videiras costumeiramente enfrentam problemas relacionados à conservação de germoplasma de espécies e híbridos interespecíficos, devido grande parte das coleções serem em campo, e sofrem intempéries bióticas e abióticas que ocasionam perdas de materiais na coleção. E o Programa de Melhoramento Genético de videiras da UENF enfrenta problemas semelhantes em relação à conservação e propagação clonal do material genético pertencente ao programa e que restringe a realização de novos estudos os híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. que são de interesse para o melhoramento genético. Neste sentido, o presente trabalho buscou realizar estudos para padronização da micropropagação e conservação por cultivo mínimo *in vitro* de híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. pertencentes ao Programa de Melhoramento de Videira da UENF. Primeiramente, foram realizados dois ensaios para o estabelecimento *in vitro* dos híbridos. No primeiro ensaio foram testadas duas metodologias de desinfestação, no segundo ensaio foi realizado em DIC um esquema fatorial de 2x5 (híbridos: CH1.3 e CH5.1 x e quatro diferentes conteúdos 2,22; 4,44; 6,66; 8,88 $\mu\text{Mol L}^{-1}$ de BA e o controle, seis repetições. Após os ensaios foi realizado um experimento que foi conduzido em DIC em esquema fatorial 3x2

três híbridos CH.1.2 e CH.3; CH5.1; e dois tipos de vedação. Após a micropropagação, foi realizada a conservação por cultivo mínimo *in vitro* que foi conduzida em DIC em esquema fatorial 2x2x3, dois híbridos interespecíficos de (CH1.2 e CH1.3) *Vitis* spp., em temperaturas $18^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $27^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, e concentrações de 10, 20 e 30 g de sacarose durante 180 dias de cultivo *in vitro*. Por meio dos resultados encontrados nas metodologias testadas de desinfestação, conteúdos de BA, micropropagação em diferentes vedações e cultivo mínimo *in vitro* foi possível padronizar protocolos para a micropropagação e conservação dos híbridos pertencentes a coleção. Portanto, sugere-se utilizar-se da metodologia em que os híbridos primeiramente sejam tratados em casa de vegetação com 7 g L^{-1} do fungicida Cercobin® e posteriormente, desinfestar os segmentos nodais em um minuto em álcool 70%, 15 minutos em NaClO a 2% e enxaguar quatro vezes em água deionizada estéril em câmara de fluxo laminar e inocular em meio de cultura: $\frac{1}{2}$ MS com 30 g L^{-1} de sacarose $4,44$ ou $6,66\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de BA para o estabelecimento e multiplicação *in vitro* na ausência ou presença de membranas microporosas. Para conservar os híbridos sugere-se que os segmentos nodais sejam mantidos em temperatura de 18°C na concentração de 20 g L^{-1} sacarose por no máximo quatro meses de cultivo.

Palavras-chave: Videiras; Propagação Cloral; Segmentos Nodais; Germoplasma.

ABSTRACT

SILVA; Lidiane Miranda; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February 2022; Establishment, micropropagation and minimal *in vitro* cultivation of interspecific hybrids of *Vitis* spp. Advisor: D.Sc. Virginia Silva Carvalho; Counselors: D.Sc. Alexandre Pio Viana and D.Sc. Claudete Santa Catarina.

Grapevine genetic improvement programs usually face problems related to the conservation of germplasm of species and interspecific hybrids, as these collections are constantly in danger of being lost, because of exposure to environmental adversity, pest attacks, propagation problems and restrictions. budget. The UENF vine genetic improvement program faces similar problems in the conservation and clonal propagation of the genetic material belonging to the program, thus, restricting further studies to be carried out with interspecific hybrids of *Vitis* spp. that are of interest for genetic improvement. In this sense, the present work sought to carry out studies for the standardization of micropropagation and conservation by minimal *in vitro* cultivation of interspecific hybrids of *Vitis* spp. belonging to the UENF Vine Improvement Program. In this sense, the present work sought to carry out studies for the standardization of micropropagation and conservation by minimal *in vitro* cultivation of interspecific hybrids of *Vitis* spp. belonging to the UENF Vine Improvement Program. First, two tests were carried out for the *in vitro* establishment of the hybrids. In the first test two disinfection methodologies were tested, in the second test a 2x5 factorial scheme was carried out in DIC (hybrids: CH1.3 and CH5.1 x and five different contents 2.22; 4.44; 6.66; 8, 88 $\mu\text{Mol L}^{-1}$ of BA. After the

tests, an experiment was carried out in DIC in a 3x2 factorial scheme, three hybrids CH.1.2 and CH.3; CH5.1; and two types of sealing. After micropropagation, conservation was carried out by minimal *in vitro* culture, which was carried out in DIC in a 2x2x3 factorial scheme, two interspecific hybrids of (CH1.2 and CH1.3) *Vitis* spp., at temperatures of $18^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ and $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, and sucrose concentrations of 10, 20 and 30 g during 180 days of *in vitro* culture. Through the results found in the tested disinfection methodologies, BA contents, micropropagation in different fences and minimal *in vitro* cultivation, it was possible to standardize protocols for micropropagation and conservation of hybrids belonging to the collection. Therefore, it is suggested to use the methodology in which the hybrids are first treated in a greenhouse with 7 g L⁻¹ of the Cercobin® fungicide and later, to disinfect the nodal segments in one minute in 70% alcohol, 15 minutes in NaClO at 2% and rinsed four times in sterile deionized water in a laminar flow chamber and inoculated in a culture medium: ½ MS with 30 g L⁻¹ of sucrose 4.44 or 6.66 μmol L⁻¹ of BA for establishment and *in vitro* multiplication in the absence or presence of microporous membranes. To preserve the hybrids, it is suggested that the nodal segments are kept at a temperature of $18^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ at a concentration of 20 g sucrose for a maximum of four months of cultivation.

Keywords: Grapes; Chloral Propagation; Nodal Segments; Germplasm

1. INTRODUÇÃO

A família Vitaceae possui cerca de 900 espécies agrupadas em 14 gêneros, entre os quais apenas *Vitis* produz fruta, enquanto as demais espécies são para paisagismo e fonte de resistência a pragas e doenças. A Europa é responsável por aproximadamente 39% da produção mundial, seguida pela Ásia (32%), Américas (20%), África (6%) e Oceania (3%). Em 2017, a área de cultivo mundial foi de 7,53 milhões de hectares produzindo 73,3 milhões de toneladas de uvas (OIV, 2018). Em todo o mundo, existem mais de 70 espécies dentro do gênero *Vitis*, com muitos dos cultivares comercialmente importantes atribuídas a *Vitis vinifera* (Li et al., 2020).

No entanto, são encontrados problemas na produção brasileira e mundial, que são principalmente relacionados à ocorrência de pragas e doenças, que estão causando um declínio gradual na vitalidade produtiva das cultivares de videira (Skiada et al., 2009). A hibridação interespecífica é o principal meio pelo qual se faz a transferência de características de resistência nos programas de melhoramento genético (Payán e Martin, 1975). Dessa forma, a hibridação interespecífica é a melhor maneira de transferir genes de resistência das espécies silvestres de *Vitis* para a espécie cultivada.

Consequentemente, algumas espécies e híbridos interespecíficos estão incluídos em bancos de germoplasma para manter a diversidade genética necessária para programas de melhoramento de videiras (Schuck et al., 2011). A diversidade genética de plantas perenes, incluindo videiras, é geralmente mantido em campo como coleções vivas (Santana et al., 2008; Leão e Motoike, 2011).

Essas coleções estão constantemente em perigo de serem perdidas, devido a exposição à adversidade do ambiente, ataques de pragas, problemas de propagação e restrições orçamentárias, para não mencionar seu potencial para espalhar pragas e doenças, que são barreiras importantes para troca de germoplasma (Engelmann, 2009).

Estratégias biotecnológicas, baseadas em conceitos de células vegetais *in vitro* e cultura de tecidos e órgãos foram desenvolvidos como uma medida alternativa e auxiliar em resposta aos problemas relacionados com a conservação de germoplasma vegetal no campo (Scherwinski-Pereira e Costa, 2010; Vasanth e Vivier, 2011). Essas técnicas também têm o potencial de superar algumas das limitações inerentes aos métodos convencionais de conservação *ex situ*, e para facilitar a troca de germoplasma livre de pragas com outras instituições de pesquisa (Ray e Bhattacharya, 2010).

Um requisito crucial para o sucesso da conservação *in vitro* é o desenvolvimento de protocolos de micropropagação, uma vez que a existência de protocolos de propagação e regeneração bem estabelecida são decisivos para a posterior recuperação, utilização, e troca de germoplasma conservado (Wang et al., 2004; Scherwinski-Pereira e Costa, 2010). Para isto, é essencial ensaios que permitam padronizar concentrações de fitorreguladores, entre outros reagentes que compõem o meio de cultura. Tem se utilizado estratégias de cultivo que otimizam e melhoram as trocas de gases do ambiente externo para o interior do frasco. As membranas microporosas estão sendo inclusas nas tampas dos frascos, estudos realizados com este sistema de vedação apresentaram resultados significativos no cultivo *in vitro* de diversas espécies de plantas, por proporcionar plantas vigorosas, alta porcentagem de sobrevivência quando aclimatizadas (Martins et al., 2020).

Em relação a conservação *in vitro* encontram-se dois métodos: a criopreservação e a conservação *in vitro* por cultivo mínimo. A técnica por meio do cultivo mínimo exige estudos que testam níveis de temperatura, sacarose, luminosidade e entre outros fatores que interferem na conservação *in vitro* e que estendem ou reduzem o prazo de conservação.

As culturas *in vitro* sob temperaturas baixas e acima do congelamento (entre 4 e 20°C) tem sido eficazes para a conservação de várias espécies frutíferas. Em geral, espécies de frutas tropicais são mais sensíveis ao armazenamento em temperaturas abaixo de 15°C do que as espécies da zona temperada. Culturas de

clima temperado e tropical, como framboesa, amora, maçã, pêra e maracujazeiro, podem ser conservados em temperaturas acima de 4°C com relativo sucesso (Scherwinski-Pereira e Costa, 2010; Sales et al., 2020), no entanto, ainda se encontram poucos estudos realizados com espécies e híbridos de videiras sendo necessário o desenvolvimento de protocolos eficientes para aplicar a criopreservação.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo do presente trabalho foi buscar padronizar o estabelecimento, a micropropagação e a conservação por cultivo mínimo *in vitro* dos híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. pertencentes do Programa de Melhoramento de Videira da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

2.2 Específicos

A) Testar metodologias de desinfestações e diferentes conteúdos de BA, para promover e padronizar de forma eficiente o estabelecimento *in vitro* e a micropropagação dos híbridos *Vitis* spp.;

B) Investigar a eficiência das membranas microproposas nas fases da micropropagação para otimizar a aclimatização de híbridos interespecíficos de *Vitis* spp.;

C) Testar diferentes níveis de temperatura e concentrações de sacarose, para padronizar um ambiente de cultivo *in vitro* que seja eficiente para a conservação dos híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. por meio do cultivo mínimo.

3. CAPÍTULOS

3.1. ESTABELECIMENTO, MICROPROPAGAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO DOS HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE *Vitis* spp.

3.1.1. INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa 6º lugar na produção de uvas de mesa (Alston e Sambucci, 2019). Grande parte da produção de uvas no Brasil é destinada para o consumo *in natura* e agroindústria. Neste sentido, os produtores e melhoristas buscam cada vez mais cultivares que apresentam alta produtividade, maior rendimento, resistência a pragas e doenças, tolerância aos estresses abióticos, como a adaptação às regiões brasileiras que apresentam altas temperaturas (Hannin, 2019).

Para atingir esses objetivos, foi desenvolvido um programa de melhoramento da videira que investiga tecnologias para o desenvolvimento da viticultura, envolvendo uma parceria entre a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e a Universidade da Califórnia (UCDavis – EUA). Em 2009, cruzamentos interespecíficos foram realizados para a geração de populações segregantes, e as sementes foram enviadas para a UENF para a implementação

do programa de melhoramento (Santos et al., 2018; Santos et al., 2019; Amaral et al., 2020).

O Programa de Melhoramento de videiras desenvolvido na UENF identificou que alguns híbridos interespecíficos apresentam resistência a doença Míldio (*Plasmopara vitícola*) e ao nematoide *Pratylenchus brachyurus*. Foram verificados que há baixo efeito aditivo dos genes no controle da resistência ao míldio e ao nematoide das lesões radiculares, ao passo que, os maiores efeitos genéticos foram de natureza dominante, e desta forma, considera-se a propagação vegetativa a via mais eficiente para maximizar o ganho genético como estratégia para o melhoramento visando a resistência. Porém, os híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. pertencentes ao germoplasma do programa apresentam dificuldades de propagação via estaquia, devido apresentarem baixa taxa de enraizamento (Santos et al., 2018; Santos et al., 2019; Amaral et al., 2020).

A micropropagação é uma alternativa para a propagação destes híbridos, sendo, portanto, uma ferramenta que promove a obtenção do material vegetal com alta qualidade e enraizados, além de permitir a continuidade do melhoramento genético das populações segregantes e o uso dos híbridos resistentes ao *Pratylenchus brachyurus* e Míldio como porta-enxertos (Arifuzzaman et al., 2016; San Pedro et al., 2017; Alizadeh et al., 2018; Amiri et al., 2019).

Cada vez mais se tem buscado o aperfeiçoamento das técnicas de micropropagação, incluindo melhorar principalmente o microambiente das plantas cultivadas *in vitro* (Martins et al., 2020; Fortini et al., 2021). A melhoria do microambiente *in vitro* tem otimizado a micropropagação de diversas espécies de plantas, contribuindo na maior sobrevivência das plantas quando aclimatizadas (Rodrigues et al., 2019). As vedações que apresentam membranas permeáveis a gás tem sido uma alternativa viável de favorecer o microambiente *in vitro* como a redução da umidade, maior troca gasosa e conseqüentemente menor acúmulo de gases como o CO₂ e etileno, estas alterações contribuem para o melhor desenvolvimento das plantas *in vitro* e otimizam a micropropagação (Saldanha et al., 2012; Murthy et al., 2014; Nguyen et al., 2016).

3.1.2 – REVISÃO DE LITERATURA

3.1.2.1 - A cultura da videira

A videira é uma das mais antigas espécies de plantas que foi domesticada pelo homem (Sato, 2000). Nos registros arqueológicos coletados no Irã, o cultivo da videira teve início por volta de 5400 a 5000 a.C. (McGovern et al., 1996). Estudos paleontológicos revelam que a videira surgiu no período Terciário há milhões de anos, provavelmente onde está situada a atual Groenlândia. Essas videiras primitivas, se dispersaram principalmente em duas direções, a américo-asiática e a eurasiática. Já no período Quaternário, durante o início da era glacial, a videira sobreviveu em apenas alguns centros de refúgio, levando a adaptação das variedades às condições climáticas e, posteriormente com o cultivo pelo homem durante milhares de anos, surgiu vasta diversidade de variedades espalhadas por todo o mundo (Alvarenga et al., 1998).

As videiras são plantas trepadeiras, lenhosas e perenes, podendo ser monoicas, dioicas ou hermafroditas (Galet, 1998). As plantas são geralmente caracterizadas pela presença de gavinhas opostas às folhas, sendo as gavinhas consideradas brotações modificadas (Gerrath et al., 2004). Seus frutos são bagas, os quais são constituídos por casca, polpa e sementes e durante o seu desenvolvimento passam por modificações quanto ao tamanho, composição, cor, textura e sabor (Coombe e McCarthy, 2000; Kennedy, 2002).

O gênero *Vitis* é dividido em dois subgêneros: *Muscadinia* Planch e *Eu vitis* Planch, cujas espécies estão agrupadas de acordo com sua morfologia e origem geográfica (Galet, 1998). O subgênero *Muscadinia* é constituído por apenas três espécies, sendo elas: *V. rotundifolia*, uva comum conhecida em todo o sudeste dos Estados Unidos; *V. munsoniana*, variante semitropical de *V. rotundifolia* nativa do sul da Flórida; e *V. popenoei*, nativa tropical do sul do México, sendo suas bagas apreciadas tanto para o consumo *in natura* como para processamento de sucos e vinhos (Conner e Maclean, 2013). Já o subgênero *Eu vitis* Planch, é constituído por mais de 60 espécies, sendo *V. vinifera* L. e *V. labrusca* L. as que possuem maior importância econômica (Fengqin et al., 1990; Alleweldt et al., 1991; Giovannini, 2008).

A espécie *V. vinifera* L. é de origem europeia, na qual estão agrupadas 90% das cultivares destinadas à produção de vinhos. Já *V. labrusca* L. é de origem americana e apresenta características rústicas, principalmente quanto a sua resistência às doenças (Giovannini, 2008).

A forma de propagação comercial da videira é por estaquia ou por enxertia. A estaquia é indicada para videiras rústicas, como por exemplo, as americanas e híbridas. A enxertia é obrigatória para as cultivares de uvas finas viníferas, sendo indicada até mesmo para as videiras americanas e híbridas, pois, com a utilização de um porta-enxerto adequado, além do controle de pragas como a filoxera que ataca as raízes, obtém-se melhor produção e qualidade do fruto (Nachtigal e Mazzarolo, 2008). Além disso, a micropropagação também é uma alternativa viável para produção clonal de mudas de videiras, pois proporciona a obtenção de material vegetativo sadio e com características agronômicas desejadas, possibilitando a melhoria da qualidade na implantação dos vinhedos, já que um dos maiores problemas do setor vitícola é a falta de mudas com garantia de qualidade fitossanitária, ofertadas aos produtores (Dzazio et al., 2002; Biasi, 2003; Ribeiro, 2006; Ribeiro et al., 2010; Ribeiro, 2012).

3.1.2.2 - Importância econômica e melhoramento da videira

A videira é uma das fruteiras de maior importância econômica em todo o mundo. A Europa detém a maior parte da produção mundial, os países que se destacam com maior produção de uvas no mundo são: Itália, França e Espanha (Conab, 2017). No Brasil, o consumo de vinho baseia-se principalmente em produtos provenientes de outros países (Almeida et al., 2015) e, desde 2014, tem ocorrido um aumento significativo na importação de vinho e de outros derivados da uva.

No ano de 2018, a importação de vinho e de outros derivados alcançou números de 53,09 milhões de litros no primeiro semestre de 2018, ultrapassando os números observados no mesmo período do ano anterior, que foram de 50,04 milhões de litros. Em 2018 o Brasil exportou cerca de 1,59 milhão de litros de vinhos e outros derivados da uva, resultando em aumento de 39,23% em relação ao volume de 1,14 milhão exportado no mesmo período do ano anterior. No Brasil, o Rio Grande do Sul é considerado como principal estado produtor e, estima-se, que

a região da Serra Gaúcha seja responsável por mais de 80% da produção nacional de vinho (CONAB, 2018).

As uvas finas para mesa, são uvas que se caracterizam por apresentar bagas grandes e polpa firme, cujo cultivo no Brasil abrange todas as regiões estando, porém, restrito ao uso de praticamente uma só cultivar que é a 'Itália'. A falta de opções deve-se à dificuldade de adaptação das uvas finas às condições brasileiras em função da sua alta suscetibilidade às doenças fúngicas e à baixa fertilidade de gemas de muitas cultivares, especialmente de uvas apirênicas (sem semente), em condições tropicais (Leão et al., 2009; Maia et al., 2013). As principais demandas imediatas do setor produtivo são por cultivares de uvas coloridas para o mercado interno e cultivares sem semente para o mercado externo, que apresentem um baixo custo de produção, principalmente em relação à mão de obra para raleio das bagas. Numa visão de médio e longo prazo, entretanto, há que se considerar um programa de melhoramento visando seleção para a resistência a doenças e a adaptação ao meio de cultivo, visando reduzir o custo com o uso de produtos químicos para o controle fitossanitário (Santana et al., 2012; Maia et al., 2013)

O grande apelo econômico da viticultura impulsiona a pesquisa no Brasil, bem como, programas de melhoramento de videira que vem buscando a obtenção de novas cultivares mais tolerantes aos diversos fatores climáticos do país e resistentes a pragas e doenças (Camargo, 2011). No melhoramento da videira existem várias estratégias para alcançar os objetivos propostos, como o uso de métodos de melhoramento, avaliando as principais características de interesse do programa. introdução de novos genótipos, seleção massal, seleção clonal. Além de ferramentas de biotecnologia como micropropagação, resgate de embriões para viabilização de sementes em cruzamentos de uvas e uso de marcadores moleculares que permitem o estudo da diversidade genética, mapeamento de QTLs e a seleção assistida (Riaz et al., 2006; Camargo et al., 2011; Viana et al., 2016).

3.1.2.3 Cultura de tecidos vegetais e suas técnicas associadas à cultura da videira

A cultura de tecidos vegetais possibilita o cultivo *in vitro* de células, tecidos, órgãos e plantas inteiras que são cultivados em ambiente asséptico em um meio

de cultura nutritivo e sob condições controladas, como a densidade de fluxo de fótons, fotoperíodo e temperatura (Carvalho et al., 2011).

O cultivo *in vitro* de plantas não apenas proporciona a propagação em grande escala de plantas clonadas, mas também possibilita o desenvolvimento de outras técnicas como a biologia molecular, bioprocessamento, sendo técnicas que abrem portas para o aprimoramento de pesquisas de melhoramento vegetal (Akin-Ildowu et al., 2009).

Assim, são desenvolvidos protocolos de estabelecimento e cultivo *in vitro*, além dos processos iniciais no estabelecimento como a desinfestação, outros componentes como o meio de cultura e balanceio de fitorreguladores são essenciais para o cultivo *in vitro*. O meio MS desenvolvido por Murashige e Skoog em 1962, que é composto por macro, micronutrientes e vitaminas de White é o mais utilizado no cultivo *in vitro* de diversas espécies, incluindo as videiras. Os fitorreguladores também possuem grande importância para o sucesso do cultivo *in vitro* por influenciarem o desenvolvimento das plantas fazendo então parte da formulação do meio de cultura que é fundamental para o crescimento de células, órgãos ou tecidos *in vitro* (Smith, 2013).

A utilização da micropropagação para videira é uma ferramenta importante para a propagação de material vegetativo em larga escala e para a formação de um vinhedo com material de boa qualidade fitossanitária (Dzazio et al., 2002), viabilizando a implantação da cultura em nossa região rompendo a dependência da importação de matrizes advindas da Europa (Coletto et al., 2008). Para realizar a micropropagação, é necessário dominar todas as etapas do processo que vai desde o estabelecimento da cultura *in vitro*, a multiplicação, enraizamento e aclimatização das mudas (Fachinello; Hoffmann; Nachtigal, 2005; Bastos et al., 2007).

Diversos trabalhos relacionados à micropropagação de videiras já foram realizados, devido a técnica ser base para a introdução de outras técnicas que são essenciais para auxiliar o processo de melhoramento e cultura das videiras, as técnicas utilizadas além da micropropagação das plantas, são o cultivo de meristemas apicais com objetivo de eliminação de vírus, termoterapia, conservação *in vitro*, criopreservação, cultivo *in vitro* de sementes e embriões zigóticos (Arifuzzaman et al., 2016; Alizadeh et al., 2018; Strioto et al., 2019). No entanto, ainda há uma necessidade de estudos mais específicos para a micropropagação

de espécies lenhosas, pois as mesmas possuem ampla diversidade genética e podem apresentar certa dificuldade de desenvolvimento, principalmente devido a problemas relacionados à contaminação e à oxidação dos explantes (Grattapaglia; Machado, 1998). Além disso, variedades de uma mesma espécie podem apresentar respostas diferentes em relação à micropropagação, tornando necessário a adaptação de protocolos específicos (Carvalho et al., 2011).

3.1.2.4 Uso de membranas microporosas no cultivo *in vitro*

Metodologias como o uso de membranas microporosas faz parte dos ajustes de protocolos desenvolvidos para melhoria do cultivo *in vitro* das plantas, estas membranas melhoram as condições de cultivo das plantas *in vitro*, possibilitando o aumento de trocas gasosas do meio interno com o externo (Jackson, 2005).

A sacarose é adicionada ao meio de cultivo para compensar a baixa taxa fotossintética das plantas, fornecendo carbono e é considerada uma ótima fonte de energia para as plantas (Kozai e Kubota, 2001). Também, possui papel fundamental no crescimento de folhas e da área foliar de plantas *in vitro* (Ribeiro et al., 2007).

As plantas clorofiladas cultivadas *in vitro* são forçadas a atuar heterotroficamente após a sacarose ser a principal fonte de carbono e não mais o CO₂ atmosférico (Zabayed et al., 2004), podendo essa mudança ser a principal responsável pelo retardo no crescimento e também a principal causa da baixa porcentagem de sobrevivência de plantas na fase de aclimatização (Mosaleeyanon et al., 2004).

O microambiente dentro dos frascos de cultura parece ser um ambiente homogêneo, mas na verdade é o responsável pela variabilidade no comportamento das culturas, uma vez que os fatores determinantes para a qualidade do microambiente são: tipos de frasco, tipo de tampa e quantidade de meio presente. A forma de vedação empregada interfere nas trocas gasosas entre o microambiente dentro do frasco e o ar atmosférico, ocasionando o aumento da concentração de CO₂ e etileno dentro dos frascos (Filho et al., 2002; Souza et al., 2007).

Os gases mais concentrados *in vitro* são o O₂, CO₂ e o etileno, sendo que o O₂ e CO₂ são os principais substratos para a fotossíntese, enquanto o etileno é

considerado um hormônio vegetal capaz de influenciar o desenvolvimento, bem como a expansão celular, senescência e diferenciação de órgãos em baixas concentrações (Jackson, 2005; Sales, 2020). Esse acúmulo de gases pode aumentar com o aumento da pigmentação tecidual, junto a capacidade fotossintética da planta e também, a quantidade de biomassa vegetal em um determinado espaço no frasco de cultivo (Gonçalves et al., 2008). É comprovado que a alta concentração de compostos gasosos produzidos por plantas cultivadas *in vitro* podem de certa forma afetar a morfogênese e crescimento de várias espécies cultivadas *in vitro* (Marino e Berardi, 2004).

Porém, poucos trabalhos evidenciam o uso das membranas para a micropropagação e espécies de videiras, o que seria interessante, pois a videira é uma planta lenhosa e libera grande quantidade de etileno no meio de cultura, além de considerar os benefícios do uso das membranas para o cultivo *in vitro* e redução do impacto que as plantas sofrem quando aclimatizadas, conseqüentemente, proporcionando maior porcentagem de sobrevivências das mesmas (Saldanha et al., 2012; Fortini et al., 2021).

3.1.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1.3.1 Descrição dos híbridos interespecíficos de *Vitis* spp.

Os híbridos são pertencentes à coleção de germoplasma de videiras do projeto de melhoramento de videira - UENF. As videiras foram obtidas através de quatro cruzamentos interespecíficos realizado na Universidade de Daves na Califórnia – EUA. Os cruzamentos realizados foram (Cr1) *Vitis romanetii* C166-043 x 07355-075; (Cr2) 06354-047 x Cereza; (Cr3) 06354-047 x Nocera; (C4) A96-19 x 0737-25 (Tabela 1).

Tabela 1- Descrição dos genitores dos híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. pertencentes ao programa de melhoramento de videiras – UENF

Genitores	Características
Nocera (<i>V. vinifera</i>)	- Tem origem em populações de uvas de mesa. Nocera pode estar identificada de forma incorreta, mas tem bagas grandes e com boa qualidade de sabor
07355-075 (<i>V. vinifera</i>)	- Apresenta bagas grandes, sendo <i>V. vinifera</i> pura, pertencente a um importante background de uvas de mesa.
06354-047 (<i>V. vinifera</i> x <i>V. rotundifolia</i>)	- Apresenta bagas grandes, pertencente a um importante background de uvas de mesa. É originado do cruzamento entre el-78 x Chenin Blanc. el-78 é uma geração avançada de <i>V. vinifera</i> / <i>V. rotundifolia</i> de Olmo (Texas).
Cereza (<i>V. vinifera</i>)	- É um genótipo com bagas grandes; é <i>V. vinifera</i> pertencente a uma casta uvas de mesa de alta qualidade.

As sementes destes cruzamentos foram doadas para a Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro. A coleção apresenta 63 híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. dentre estes, estão presentes híbridos que são resistentes ao nematoide *Pratylenchus brachyurus* e ao míldio *Plasmopara vitícola* (Santos et al., 2018; Amaral, 2019). Os híbridos foram cultivados em vasos com capacidade para 7 L, contendo mistura de solo: areia na proporção 2:1 (v:v), e mantidos para estabelecimento das mudas em casa de vegetação na Unidade de Apoio à Pesquisa da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

3.1.3.2- Estabelecimento *in vitro* dos híbridos interespecíficos de *Vitis* spp.

Para promover o estabelecimento *in vitro* dos híbridos, foram realizados dois ensaios:

3.1.3.2.1 - Ensaio 1: Coleta e desinfestação do material

Foram testadas duas metodologias para o estabelecimento *in vitro*. Três híbridos (CH3.8, CH5.1, CH3.18), pertencentes à coleção de germoplasma de *Vitis* spp UENF, com quatro repetições, com uma parcela de quatro tubos contendo um segmento. Na primeira metodologia foram coletadas aleatoriamente 52 estacas semilenhosas de aproximadamente 4 a 8 cm de altura das matrizes dos híbridos de *Vitis* spp. cultivados em casa de vegetação pertencentes aos cinco cruzamentos interespecíficos. Posteriormente, foram conduzidas ao laboratório de cultura de tecidos vegetais CCTA/LFIT e imersas em água deionizada acrescida de 10 gotas de tween 20^o e enxaguadas três vezes em água corrente. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, os segmentos nodais foram excitados e imersos em álcool 70% por um minuto e logo depois foram colocadas em soluções de 100 ml contendo hipoclorito de sódio a 1, 2, 3 e 4% acrescidas de duas gotas de Tween 20^o.

Na segunda metodologia foram avaliados nodal por tubo. As plantas matrizes, em casa de vegetação, foram tratadas com 7 g L⁻¹ do fungicida Cercobin[®]. Após sete dias, foram retiradas estacas lenhosas de 4 a 8 cm de altura. Estas foram cultivadas em bandejas com água utilizando como suporte uma placa de poliestireno expandido. A água foi trocada a cada dois dias e as bandejas foram colocadas em câmara de crescimento com temperatura e luz controlada. Após 20 dias, as brotações formadas foram retiradas e desinfestadas em câmara de fluxo laminar: um minuto em álcool 70%, 15 minutos em NaClO a 2% e enxaguadas quatro vezes em água deionizada estéril.

Os segmentos nodais com aproximadamente 5 mm foram cultivados *in vitro* em frascos de vidro (50 × 100 mm) inoculados em meio de cultura contendo metade da concentração dos sais minerais do MS e complexo vitamínico de White (Murashige e Skoog, 1962) com 30,0 g L⁻¹ de sacarose, 200,0 mg L⁻¹ de PVP, 8,88 µmol L⁻¹ ANA e solidificado com 6,0 g L⁻¹ de ágar Sigma, pH 5,7. Após 65 dias de cultivo *in vitro*, a contaminação por fungos (CF) e bactérias (CB) e a taxa de sobrevivência dos explantes (TS) foram avaliadas.

3.1.3.2.2 - Ensaio 2: Determinação do conteúdo de BA para a multiplicação *in vitro* dos híbridos interespecíficos de *Vitis* spp.

O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado em um esquema fatorial de 2x5 (híbridos: CH1.3 e CH5.1 x e quatro diferentes conteúdos 2,22; 4,44; 6,66; 8,88 $\mu\text{Mol L}^{-1}$ e o tratamento controle na ausência de Benziladenina, seis repetições, que foram compostas por dois frascos com duas plantas cada.

O meio de cultura contendo metade da concentração dos sais minerais do MS, complexo vitamínico de White (Murashige e Skoog, 1962), myo-inositol 0,1 g L^{-1} , 30 g L^{-1} de sacarose, acrescido dos cinco diferentes conteúdos de BA, pH ajustado para 5,7 e solidificado com 6 g L^{-1} de ágar Sigma[®]. Cada frasco (50 x 100 mm) conteve 40 ml do meio de cultura, posteriormente, foram autoclavados por 20 minutos a 121°C e 1,1 atm de pressão.

O experimento foi mantido durante 60 dias em sala de cultivo com fotoperíodo de 16:8 horas luz: escuro, irradiância de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes luz do dia (OSRAM[®]) e temperatura de 27 \pm 2°C. Ao final do período de cultivo foram mensurados altura da parte aérea das brotações (mm), número de brotos, sobrevivência (%) e número de folhas.

3.1.3.3 - Micropropagação de híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. em microambientes com diferentes trocas gasosas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em um esquema fatorial 3x2 três híbridos CH.1.2 e CH.3; CH5.1; e dois tipos de vedação: tampa de polipropileno 56 mm de diâmetro interno, 3 mm de espessura e 12 mm de altura com e sem membrana microporosa, com quatro repetições. Em cada tampa de polipropileno foram feitos dois orifícios, de 1,0 cm^3 de diâmetro cada, que foram cobertos com as membranas microporosas. Cada membrana foi composta por duas camadas de fita microporosa e uma de politetrafluoroetileno (Saldanha et al., 2012). Cada repetição foi composta por três frascos (50 x 100 mm) com dois explantes em cada, nas fases de: multiplicação, alongamento e enraizamento e aclimatização.

As plantas matrizes, em casa de vegetação, foram tratadas com 7 g L⁻¹ do fungicida Cercobin®. Após sete dias, foram retiradas estacas lenhosas de 4 a 8 cm de altura e foram cultivadas em bandejas com água utilizando como suporte uma placa de poliestireno expandido. A água foi trocada a cada dois dias e as bandejas foram colocadas em câmara de crescimento com temperatura e luz controlada.

Após 20 dias, as brotações formadas foram retiradas e desinfestadas em câmara de fluxo laminar: um minuto em álcool 70%, 15 minutos em NaClO a 2% e enxaguadas quatro vezes em água deionizada estéril. Após a desinfestação foram retirados os segmentos nodais com aproximadamente 5 mm e transferidos para o meio de cultura: ½ MS com 30 g L⁻¹ de sacarose, 4,44 µmol L⁻¹ de BA (Bazinl adenina), e solidificado com 6,0 g L⁻¹ de ágar bacteriológico Sigma®, pH 5,7. O meio de cultura foi distribuído em 40 ml por frasco (50 × 100 mm).

Os frascos com meio de cultura foram autoclavados por 20 minutos a 121°C e 1,1 atm. de pressão. Os frascos foram vedados com as diferentes vedações e mantido em sala de cultivo com fotoperíodo de 16:8 horas luz: escuro, irradiância de 50 µmol m⁻² s⁻¹ e temperatura de 27±2°C, durante 60 dias. Ao final dos 60 dias de multiplicação, foram mensurados a altura da parte aérea das brotações (mm), o número de brotos, o número de folhas e a sobrevivência (%).

3.1.3.3.1 - Alongamento e enraizamento *in vitro* das brotações

As brotações foram transferidas para o meio de cultura na metade das concentrações de sais minerais do MS e complexo vitamínico de White (Murashige e Skoog, 1962), myo-Inositol 0,1 g L⁻¹, 30 g L⁻¹ de sacarose, 4,44 µmol L⁻¹ de ácido giberélico e 4,44 µmol L⁻¹ ácido indobutírico (AIB) (Trevisan et al., 2005), o pH ajustado para 5,7 e solidificado com 6 g L⁻¹ de bacteriológico Sigma®. Foram distribuídos 50 ml por frasco de vidro (50 × 100 mm), e selados com as diferentes vedações. As brotações permaneceram 55 dias em sala de cultivo.

Após o período de cultivo foram mensurados altura da parte aérea das plantas (mm), presença de raiz, massa da matéria fresca (g), número de folhas e área foliar. Para determinar a área foliar, as folhas foram fixadas em papel branco, fotografado com uma câmera digital e processado com Software ImageJ (Schneider et al., 2012). Foi também mensurado o acúmulo de CO₂ nos frascos selados cobertos por membranas ou não, onde foi realizado análises anatômicas da

epiderme foliar, e realizado a determinação dos pigmentos fotossintéticos de clorofila *a*, *b* e carotenoides.

3.1.3.3.2 - Conteúdo de CO₂ nos recipientes *in vitro*

O conteúdo de CO₂ foi analisado após 55 dias de cultivo *in vitro*, sendo medido por quatro vezes completando um período de 24 horas (07:00, 15:30, 00:30 e 07:00 horas). As medidas foram realizadas em duas repetições de cada tratamento por vez. A amostra gasosa contendo 5 ml de CO₂ foi injetada em um cromatógrafo de gases (Thermo Scientific®, modelo Trace 1310, Italy) equipado com um *loop* de 1 ml, coluna empacotada Porapak Q, detector de ionização em chamas e metanador. As condições da análise foram: pressão de 120 KPa no injetor e temperaturas do forno, injetor, detector e metanador, respectivamente, de 80°C, 150°C, 300°C e 360°C, o metanador foi utilizado para medição do CO₂. Foi realizada uma curva de calibração utilizando gás padrão, assim, gerando uma regressão linear que permitiu quantificá-lo em ppm nas amostras. Foi realizada a calibração dos dados observados por meio da fórmula em que:

Δ % = concentração de CO₂ em porcentagem ou em ppm.

$$\left\{ \frac{\Delta\% * 10 (\text{volume do espaço vazio})}{(\text{Peso fresco do material vegetal (g)} * (\text{Horas de armazenamento}))} \right\} = \text{ml kg} - \text{hr}$$

Posteriormente, os resultados em ml kg – hr foram convertidos para porcentagem (%).

3.1.3.3.3 Determinação de pigmentos fotossintéticos

Primeiramente, foi pesado 20 mg discos foliares, removidos da 3^o folha completamente expandida do ápice. Os discos de folha foram colocados em 400 µL de DMSO (dimetil sulfóxido), onde permaneceram por 48h no escuro (Santos et al., 2008). As absorbâncias das amostras em 665, 645 e 480 nm foram determinadas em uma cubeta de quartzo de 10 mm usando o Genesys

Espectrofotômetro 10UV (Thermo Scientific). O cálculo da clorofila *a*, da clorofila *b* e dos carotenoides foi feito de acordo com Wellburn (1994).

3.1.3.3.4 - Análises anatômicas

Para a análise epidérmica foliar, seguiu-se a metodologia de dissociação de Franklin (Franklin, 1945). Foram separadas folhas com aproximadamente 70 mm de largura dos três híbridos de cada tratamento. Seguindo a metodologia as porções foliares foram colocadas em tubos de ensaio com água oxigenada (Volume 30) e ácido acético glacial na proporção de 1:1 e mantidas em estufa a 60°C por 48 horas. Após este período, as amostras foram lavadas em água destilada e em etanol 50%. Com auxílio de um pincel separou-se as duas superfícies epidérmicas, que foram coradas com fucsina básica e montadas em gelatina glicerinada. Todas as lâminas foram observadas em microscópio óptico Axioplan ZEISS (Oberkochen, Germany). As imagens obtidas foram processadas e analisadas utilizando o sistema digital de processamento de imagens Image Pro-Plus. A condutância estomática máxima teórica foi calculada a partir da relação entre a densidade e comprimento do poro estomático (Boer et al., 2016), de acordo com a seguinte equação (Equação 1):

$$G_{\max} = D \times L \text{ (Eq 1),}$$

em que G_{\max} é a condutância estomática máxima teórica (mm s^{-1}), D é a densidade estomática (mm^2) e L é o comprimento estomático (μm).

3.1.3.3.5 - Aclimatização das Plantas

As plantas enraizadas obtidas *in vitro* na fase de enraizamento foram transferidas para a casa de vegetação mantendo o mesmo número de tratamentos em DBC. Ao final dos 60 dias de cultivo *ex vitro* foram analisadas a porcentagem de sobrevivência (%), a massa da matéria seca (g) e da matéria fresca (g) dos três híbridos interespecíficos de *Vitis* spp.

3.1.3.3.6 - Análises estatísticas

As pressuposições de normalidade e de homogeneidade dos tratamentos foram observadas nos experimentos realizados, pelos testes de Shapiro Wilk e

Bartlett, respectivamente, para que então as observações pudessem ser submetidas à análise de variância (ANOVA). Os dados da fase de aclimatização, e análise de CO₂ foram transformados pela equação de $y + 0,5$ e submetidos à análise de variância. Em seguida, foram submetidos à comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As variáveis observadas na fase de alongamento e enraizamento das brotações (parte aérea das plantas (mm), presença de raiz, massa da matéria fresca (g), número de folhas e área foliar, densidade estomática, comprimento do poro estomático, G_{max} , clorofila *a*, *b* e carotenoides) foram submetidos à matriz de correlação de Pearson a nível de significância $p < 0,05$. As análises univariadas (Anova e Teste de Tukey) e bivariadas (correlação de Pearson) foram feitas com o auxílio do programa R© software e software Sisvar (R Core Team, 2019; Ferreira et al., 2011).

3.1.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.4.1 Estabelecimento *in vitro*

O manejo de contaminantes na cultura *in vitro* de células, tecidos e órgãos depende inicialmente do uso de plantas estoques livres de patógenos e da combinação de métodos de desinfestação ou explantes estabelecidos de matrizes livres de fungos e bactérias (Cassells, 2000), além disto, protocolos eficientes de assepsia de meristemas são essenciais para o estabelecimento *in vitro*, preferencialmente se o mesmo for de baixo custo. Por isso, a primeira metodologia utilizada buscou identificar qual a concentração de hipoclorito de sódio eficiente para a desinfestação em câmara de fluxo laminar dos segmentos nodais e verificar se o método direto de desinfestação seria eficiente, a segunda metodologia buscou promover de forma eficiente o estabelecimento dos híbridos *in vitro*.

Foi observado que os explantes em geral apresentaram baixa contaminação por bactérias, porém, a contaminação por fungos foi bem evidente no controle e nos explantes desinfestados a 1% com hipoclorito de sódio. As concentrações mais altas proporcionaram menor contaminação fúngica variando de 50% na concentração de 1% de hipoclorito de sódio e 94,33% na concentração de 2%

hipoclorito de sódio, a sobrevivência foi relativamente baixa variando de 5,60 a 28,0% não se diferenciando estatisticamente entre os tratamentos (Tabela 2).

Neste sentido, utilizou-se a segunda metodologia, em que foi realizado o pré-tratamentos das matrizes com fungicida Cercobin®, sendo posteriormente, testada em três híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. (Tabela 3). A sobrevivência dos híbridos variou de 60 a 95% de sobrevivência e a ausência de fungos variou de 95% a 100% e bactérias de 87,39 a 97,36% não se diferenciando estatisticamente entre os três híbridos avaliados.

Tabela 2- Desinfestação de segmentos nodais dos híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. em diferentes níveis de hipoclorito de sódio

Hipoclorito de sódio (%)	Ausência de bactéria (%)	Ausência de fungo (%)	Sobrevivência dos explantes (%)
Controle	96,67 a	27,66 b	5,60 a
1,0 %	99,39 a	50,0 ab	11,33 a
2,0 %	87,90 a	94,33 a	16,66 a
3,0 %	100,0 a	77,66 ab	28,10 a
4,0 %	96,09 a	89,0 a	28,0 a
CV (%)	13,73	29,95	14,41
Média	98,60	66,53	17,93

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a $p \leq 0,05$ de probabilidade.

Tabela 3- Desinfestação de segmentos nodais de três híbridos interespecíficos de *Vitis* spp.

Híbrido de <i>Vitis</i> spp.	Ausência de fungo (%)	Ausência de bactéria (%)	Sobrevivência dos explantes (%)
CH3.13	95,0 a	87,39 a	60,0 a
CH3.7	100,0 a	92,60 a	82,5 a
CH1.2	100,0 a	97,36 a	95,0 a
CV (%)	5,87	20,62	13,42
Média	98,33	86,66	87,83

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a $p \leq 0,05$ de probabilidade.

No ensaio 2 (Tabela 5) foi observado que o conteúdo de $4,44 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi o mais adequado para promover o maior número de brotações, o número de folhas, a altura da parte aérea das brotações e a sobrevivência dos explantes. Além disto, foi observado pela análise de variância (Tabela 4) a interação significativa para a característica tamanho de parte aérea das brotações (Figura 1).

O ensaio 2 possui extrema importância para o estabelecimento dos segmentos nodais dos híbridos de videiras, sendo necessário, devido a interferência genotípica que cada híbrido pode apresentar na fase de estabelecimento *in vitro*. Alizadeh et al. (2018) obtiveram resultados semelhantes ao encontrado no presente estudo, em que, o mesmo obteve sucesso na micropropagação de dois híbridos interespecíficos de videiras na concentração de $8,88 \mu\text{mol L}^{-1}$, e relata ser essencial para o estabelecimento dos mesmos.

Mahmoudzadeh et al. (2018) apresentam resultados semelhantes ao presente trabalho, em que realiza a multiplicação *in vitro* de híbridos interespecíficos de videiras cultivados em meio de cultura completo de sais MS e vitamina de White suplementado a $4,44 \mu\text{mol L}^{-1}$ e apresentam nos seus resultados de estudo molecular a influência genotípica de cada híbrido no número de brotações. Foi possível observar por meio dos resultados apresentados na tabela de análise de variância (Tabela 4) que a influência dos híbridos nas características analisadas é menor quando comparada com os diferentes conteúdos de BA, sendo a concentração $4,44 \mu\text{mol L}^{-1}$ a mais eficiente para promover maior número de brotações dos híbridos analisados, os resultados apresentados do ensaio 2 permite que a mesma concentração de $4,44 \mu\text{mol L}^{-1}$ seja utilizada para promover o estabelecimento e conservação *in vitro* dos demais híbridos da coleção de videiras da UENF (Tabela 5).

Tabela 4- Análise de variância do teste de cinco diferentes conteúdos de BA em dois híbridos CH1.3 e CH5.1 de *Vitis* spp.

Fonte de Variação	GL	Quadrado médio			
		Número de folhas das brotações	Altura da parte aérea das brotações (mm)	Taxa de sobrevivência (%)	Número de Brotações (%)
Híbridos	1	15,812 ^{ns}	3,777 ^{ns}	0,0007*	2,38193*
Conteúdos de BA	5	23,066*	122,817*	0,7894*	4,24426*
Conteúdos x híbridos	4	8,203 ^{ns}	54,808*	0,5411 ^{ns}	1,56096 ^{ns}
Erro	40	5,767	10,740	0,0887	0,8408
CV (%)	-	41,45	36,66	17,88	28,98
Média	-	2,95	7,33	0,78	1,49

*Significativo e ^{ns} não significativo a $p \leq 0,05$ de probabilidade de erro pelo teste de F.

Tabela 5- Tabela de média dos cinco diferentes conteúdos de BA nos híbridos interespecíficos CH1.3 e CH5.1 de *Vitis* spp.

Conteúdos de BA (benziladenina) $\mu\text{mol L}^{-1}$	Número de Folhas das brotações	Parte Aérea das brotações (mm)	Taxa de Sobrevivência (%)	Número de brotações
0,0	1,85 b	2,20 c	40,0 b	1,04 b
2,22	3,65 ab	6,27 cb	90,0 a	1,41 ab
4,44	5,20 a	11,90 a	100,0 a	1,54 a
6,66	1,80 ab	7,88 ab	80,0 ab	1,31 ab
8,88	2,25 ab	8,41 ab	80,0 ab	1,43 ab
CV (%)	41,45	36,66	17,88	28,98
Média	2,95	7,33	0,78	1,49

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a $p \leq 0,05$ de probabilidade.

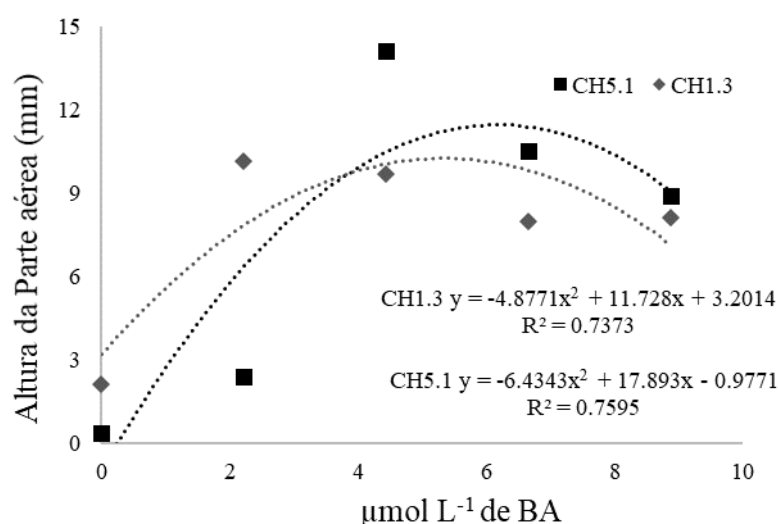


Figura 1- Gráfico do desdobramento dos cinco diferentes conteúdos de BA nos híbridos CH1.3 e CH5.1 para a característica de altura da parte aérea das brotações.

A análise de regressão permitiu verificar o comportamento de cada híbrido dentro de cada conteúdo de BA, sendo possível identificar que o híbrido CH5.1 apresentou maior altura das brotações na concentração 4,44 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BA e o híbrido CH1.3 apresentou um comportamento semelhante, apresentando maior altura da parte aérea nas concentrações de 2,22 e 4,44 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A característica de altura da parte aérea das brotações fornece maior número de segmentos nodais, proporcionando maior número de brotações na multiplicação das *Vitis* spp.

3.1.4.2 - Micropropagação de híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. em microambientes com diferentes trocas gasosas

3.1.4.2.1 - Fase de multiplicação *in vitro*

O presente estudo fornece os primeiros dados sobre a micropropagação em vedações cobertas ou não por membranas microporosas de híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. pertencentes ao Programa de Melhoramento de videiras - UENF. Os resultados mostram que os fatores analisados (vedações x híbridos) são independentes nas fases de multiplicação e alongamento e enraizamento *in vitro*, mas são dependentes na fase de aclimatização (Tabela 6).

Tabela 6- Análise de variância da fase de multiplicação *in vitro* dos híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. em diferentes vedações de polipropileno presente ou não de membranas microporosas

Fonte de variação	Quadrado médio				
	GL	Número de Folhas	Altura das Brotações (mm)	Sobrevivência (%)	Número de Brotações
Vedações	1	75,815 ^{ns}	0,0063 ^{ns}	0,1666 ^{ns}	17,255 ^{ns}
Híbridos	2	479,166*	4,106 ^{ns}	0,1666 ^{ns}	97,950*
V x H	2	27,081 ^{ns}	0,559 ^{ns}	0,1666 ^{ns}	9,177 ^{ns}
Erro	18	30,65	2,19	0,05	17,29
CV (%)	-	35,46	44,83	25,71	44,42
Média Geral	-	15,61	3,31	0,91	9,36

*Significativo e ^{ns} não significativo a $p \leq 0,05$ de probabilidade de erro pelo teste de F.

Na fase de multiplicação *in vitro* foi observado que as variáveis de sobrevivência e altura das brotações não foram significativas a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Porém, as características de número das folhas e brotações diferenciaram entre os híbridos CH5.1, CH1.3 e CH1.2. Os híbridos CH1.3 e CH1.2 apresentaram número de folhas de 21,27 e 18,77 e número de brotações 12,27 e 10,33, respectivamente (Fig. 2 (c 1,2); Tabela 7). O híbrido CH5.1 teve número de

folhas e brotações inferior aos dois híbridos estudados com 6,79 e 6,47, respectivamente.

Tabela 7- Médias observadas das características morfológicas dos três híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. na fase de multiplicação *in vitro*

Híbridos de <i>Vitis</i> spp.	Número de folhas	Número de brotações	Altura das brotações (mm)	Sobrevivência (%)
CH1.5	6,79b	5,47 b	2,87 a	100 a
CH1.2	18,77a	10,33 ab	3,22 a	75,0 a
CH1.3	21,27a	12,27 a	3,77 a	100 a
CV (%)	35,46	44,42	24,14	25,71
Média Geral	15,61	9,36	1,77	91,00

Características de crescimento dos híbridos de *Vitis* spp. na fase de multiplicação após 60 dias de cultivo *in vitro*. Letras minúsculas compara médias entre os híbridos, e letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey de $p \leq 0,05$ de probabilidade.

Resultados semelhantes foram encontrados por Barbosa et al. (2021) que não encontraram influência das vedações presente ou ausente de membrana microporosa na fase *in vitro* da micropropagação de Baru em meio MS acrescido de 30 g sacarose. A sacarose é uma fonte de carboidrato que contribui no desenvolvimento das plantas *in vitro*, principalmente em plantas cultivadas em tampas completamente vedadas, assim proporcionando que as plantas *in vitro* possam se desenvolver mesmo estando em um microambiente que apresenta maior umidade e maior acúmulo de CO₂ (Taiz et al., 2021).

3.1.4.2.2 - Fase de Alongamento e enraizamento das brotações

Foi observado que não houve a interação entre os fatores híbridos e vedações nesta fase. Porém, as médias se diferiram entre os híbridos nas características de número de folhas e altura da parte aérea, CH1.3 apresentou 91,14 mm de altura da parte aérea e em média 16,75 de número de folhas (Figura. 2 – D/1 e 2; E/1 a 6) (Tabela 8).

Tabela 8- Análise de variância da fase de alongamento e enraizamento *in vitro* dos híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. em diferentes vedações de polipropileno presente ou não de membranas microporosas

Quadrado médio						
Fonte de Variação	GL	Altura da Parte Aérea (mm)	Matéria Fresca (g)	Área Foliar (mm ²)	Número de folhas	Presença de Raiz (%)
Vedações (V)	1	0,546 ^{ns}	0,06 ^{ns}	1,054 ^{ns}	41,343 ^{ns}	2,081 ^{ns}
Híbridos (H)	2	29,208*	1,10 ^{ns}	3,345*	99,218*	0,0084 ^{ns}
V x H	2	7,010 ^{ns}	0,99 ^{ns}	9,227 ^{ns}	120,93 ^{ns}	1,0408 ^{ns}
Erro	18	2,86	2,51	48,33	20,06	0,02
CV (%)	-	20,72	28,28	34,31	30,76	15,06
Média Geral	-	69,28	2,18	10,0	14,56	0,95

*Significativo e ^{ns} não significativo a $p \leq 0,05$ de probabilidade de erro pelo teste de F.

Tabela 9- Médias das características morfológicas dos três híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. na fase de alongamento e enraizamento *in vitro*

Híbridos de <i>Vitis</i> spp.	Altura da parte aérea (mm)	Matéria fresca (g)	Área foliar (mm ²)	Número de folhas	Presença de raiz (%)
CH1.3	91,14 a	1,70 a	8,61 ab	16,75 a	100,0 a
CH1.2	48,76 b	1,26 a	13,12 a	16,43 a	83,0 a
CH5.1	67,94 ab	1,70 a	8,28 b	10,50 b	100,0 a
CV (%)	20,72	28,28	34,31	30,76	15,06
Média Geral	69,28	2,18	10,0	14,56	95,0

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey em $p \leq 0,05$.

A área foliar, altura da parte aérea e número de folhas apresentaram diferenças significativas para três híbridos. Para CH1.2 a altura da parte aérea de 48,76 mm e 16,43 número de folhas e para CH5.1 a altura de 67,94 mm de parte aérea e 10,50 número de folhas. O CH1.2 apresentou a média de 16,43 número de folhas e área foliar de 13,12. O CH5.1 foi o que apresentou a menor média de 8,28 de área foliar em mm², enquanto CH1.3 e CH1.2 apresentaram 8,61 (mm²) e 13,12 (mm²), respectivamente (Figura 2 – C (1 a 4) (Tabela 9).

A altura da parte aérea foi diferente para os três híbridos, sendo para o CH1.3 48,14 mm e 48,76 e 67,94 para os híbridos CH5.1 e CH1.2, respectivamente.

A presença de raiz foi de 100% de enraizamento para os híbridos CH1.3 e CH5.1 e 85% para CH1.2. não se diferindo entre os mesmos, e massa da matéria fresca (g).

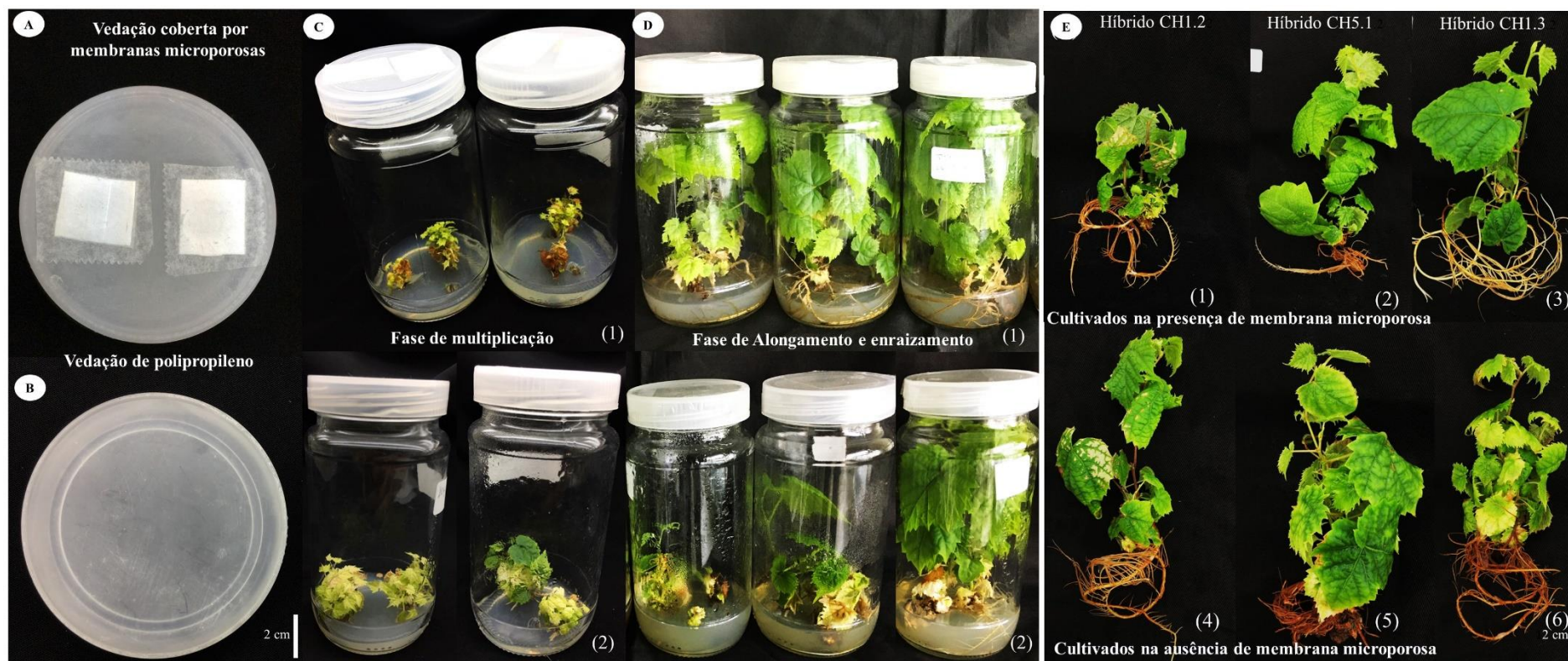


Figura 2- Micropropagação dos híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. Imagens **(A)** Vedação coberta por membranas microporosas (VM) **(B)** Vedação de polipropileno (AM); **(C)** 1;2, multiplicação *in vitro*; **(D)** – 1;2 alongamento e enraizamento das brotações; **(E)** Híbridos após enraizamento *in vitro* – 1;2;3 CH1.2; CH5.1; CH1.3 em cultivados sem as membranas microporosas; 4;5;6 cultivados em vedações cobertas por membranas, respectivamente.

3.1.4.2.3 - Análises de anatomia da epiderme foliar e pigmentos fotossintéticos

Na anatomia foliar as características de densidade estomática de CH1.3, CH1.2 e CH5.1 foram de 49,94, 54,97 e 74,20 mm², respectivamente. O comprimento do poro estomático foi de 15,20 para CH1.3, 14,42 para CH1.3 e 18,60 para CH5.1 µm. A área do estômato dos híbridos foi de 553,64, 537,88 e 102,54 µm, respectivamente. A condutância estomática apresentou diferença significativa entre os híbridos CH1.3 que foi de 752,73, do CH1.2 foi de 786,18 e do CH5.1 foi de 1388,51 (Figura 3; Tabela 10).

Tabela 10- Análise de Variância da anatomia da epiderme foliar dos híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. em diferentes vedações de polipropileno presente ou não de membranas microporosas

Quadrado médio					
Fonte de Variação	GL	Densidade Estomática	Comprimento do Poro Estomático	Área do Poro Estomático	Condutância Estomática
		(mm ²)	(µm ²)	(µm ²)	(µm ²)
Híbridos (H)	2	983,644*	29,699*	768147,015*	393251,402*
Vedações (V)	1	58,918 ^{ns}	5,749 ^{ns}	1454,869 ^{ns}	2610,065 ^{ns}
V x H	2	47,056 ^{ns}	19,129 ^{ns}	17061,621 ^{ns}	58403,083 ^{ns}
Erro	12	202,50	7,72	4739,10	84328,26
CV (%)	-	23,83	16,08	17,30	29,76
Média Geral	-	59,71	17,28	398,02	975,811

*Significativo e ^{ns} não significativo a p≤0,05 de probabilidade de erro pelo teste de F.

Tabela 11- Médias observadas da anatomia da epiderme foliar dos três híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. na fase de alongamento e enraizamento *in vitro*

Híbridos de <i>Vitis</i> spp.	Número de estômatos (mm ²)	Poro estomático (µm ²)	Área do estômato (µm ²)	Gmax
CH1.3	49,94 b	15,20 ab	553,64 b	752,73 b
CH1.2	54,97 ab	14,42 b	537,88 a	786,18 b
CH5.1	74,20 a	18,60 a	102,54 b	1388,51 a
CV (%)	23,83	8,06	17,30	28,79
Média geral	59,71	3,99	398,02	985,81

Médias seguidas da mesma letra na coluna, em cada estrutura anatômica, não diferenciam de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

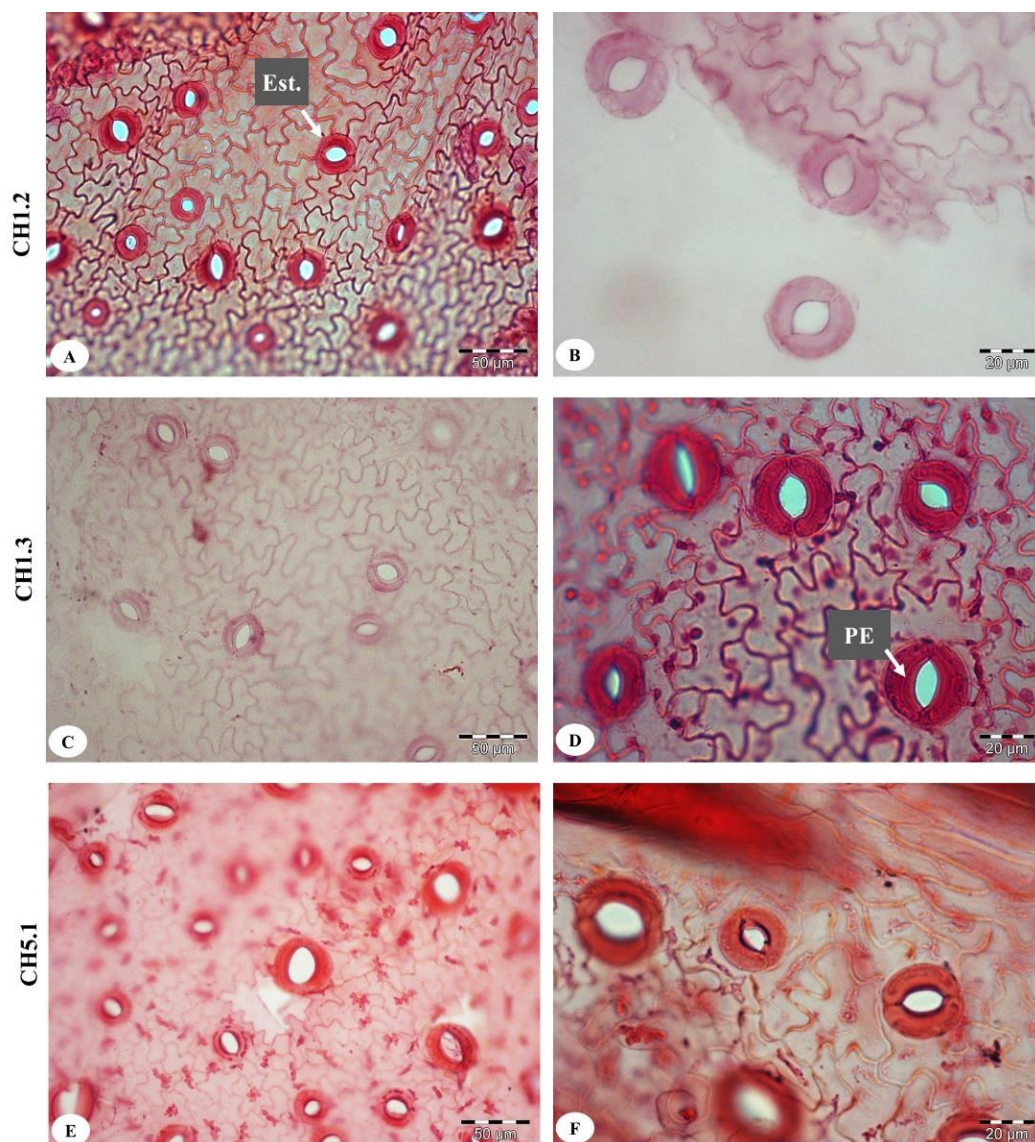


Figura 3- Aspectos anatômicos da epiderme da folha dos três híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. Microscopia óptica evidenciando a densidade estomática, comprimento do poro estomático e área do poro estomático na epiderme da face abaxial. (a,b) híbrido CH1.2, (c, d) CH1.3, (e, f) híbrido CH5.1. Est – estômato; PE – Poro estomático.

Na análise dos pigmentos fotossintéticos a clorofila *a* e carotenoides se diferiram estatisticamente (Tabela 12). O CH1.3 apresentou 24,84 $\mu\text{g cm}^2$ de clorofila *a*, e CH1.2 e CH5.1 apresentaram 25,65 e 27,57 $\mu\text{g cm}^2$, respectivamente. Para pigmentos de carotenoides foram observados as maiores médias para CH1.3 (3643,14 $\mu\text{g cm}^2$ de carotenoides) e CH1.2 (3626,90 de $\mu\text{g cm}^2$). O CH5.1 apresentou menor média de 3125,85 de $\mu\text{g cm}^2$ de carotenoides (Tabela 13).

Tabela 12- Análise de Variância dos pigmentos fotossintéticos dos híbridos interespecíficos *Vitis* spp. em diferentes vedações de polipropileno presente ou não de membranas microporosas

Fonte de variação	Quadrado médio			
	GL	Clorofila a	Clorofila b	Carotenoides
Vedações (V)	1	1,756 ^{ns}	32,421 ^{ns}	16227,81 ^{ns}
Híbridos (H)	2	8,596*	134,20*	518897,60*
V x H	2	0,801 ^{ns}	136,05 ^{ns}	57909,56 ^{ns}
Erro	12	0,87	104,60	82665,04
CV (%)	-	3,64	24,90	8,30
Média Geral	-	25,69	41,07	3465,29

*Significativo e ^{ns} não significativo a $p \leq 0,05$ de probabilidade de erro pelo teste de F.

Tabela 13- Médias observadas dos pigmentos fotossintéticos dos três híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. na fase de alongamento e enraizamento *in vitro*

Híbridos de <i>Vitis</i> spp.	Clorofila a $\mu\text{g cm}^2$	Carotenoides $\mu\text{g cm}^2$	Clorofila b cm^2
CH1.3	24,84 b	3643,14 a	43,28 a
CH1.2	25,65 b	3626,89 a	44,29 a
CH5.1	27,57 a	3125,85 b	35,64 a
CV (%)	3,64	24,90	24,90
Média Geral	25,69	3465,29	41,07

Médias seguidas da mesma letra na coluna, em cada estrutura anatômica, não diferenciam de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.1.4.2.4 Acúmulo de CO₂ dos três híbridos interespecíficos na presença e ausência da membrana microporosa

A interação entre os fatores (vedações x híbridos) foi significativa para a concentração de CO₂ (%) ao longo do período de 24 horas (Tabela 14).

Tabela 14- Análise de variância do acúmulo de CO₂ dos híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. após 55 dias *in vitro*, em diferentes vedações de polipropileno presente ou não de membranas microporosas

Fonte de Variação	Quadrado médio	
	GL	CO ₂ (%)
Híbridos (H)	2	35,145*
Vedações (V)	1	58,384*
Horários	2	14,210 ^{ns}
H x V	4	23,394*
Erro	16	2,76
CV (%)	-	18,58
Média Geral	-	3,77

No geral as vedações cobertas por membranas microporosas apresentaram menor acúmulo de CO₂, e o híbrido CH1.3 foi o que apresentou menor concentração do gás em vedações cobertas por membranas, sendo de 0,23% de CO₂ e em vedação convencional de polipropileno apresentou 0,94% de CO₂. Os híbridos CH1.5 e CH5.1, dentro da vedação coberta por membranas não diferiram entre si, apenas diferiram entre as vedações apresentando concentrações de 0,29 e 0,14% de CO₂, porém diferiram entre si na ausência dela e diferiram entre as vedações, sendo o híbrido CH1.3 com maior acúmulo de CO₂, depois CH1.2 (0,47% de CO₂) e CH5.1 (0,19% de CO₂) (Figura 4).

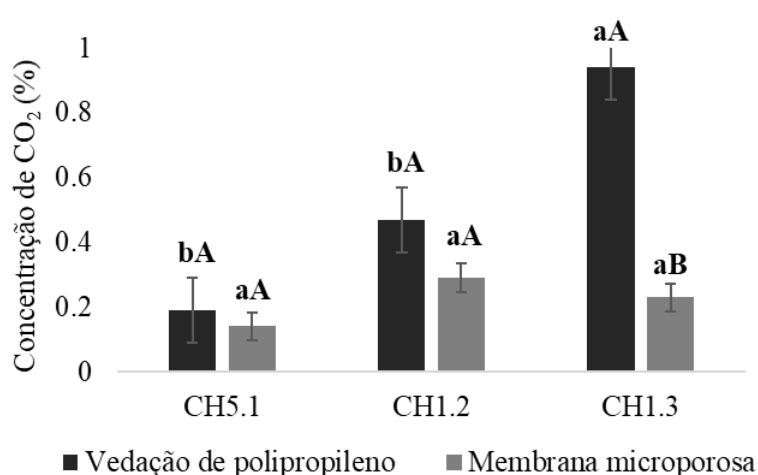


Figura 4- Concentração de CO₂ (%) em diferentes momentos em período de 24 horas em recipientes *in vitro* contendo plantas dos três híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. As médias seguidas de letras diferentes minúsculas diferem entre os híbridos e maiúsculas diferem entre as vedações de acordo com o teste de Tukey, a 5%.

O microambiente *in vitro* é um fator determinante na sobrevivência das plantas quando aclimatizadas, na análise de CO₂ foi observado que o microambiente ausente de membranas apresentou maior acúmulo de CO₂ quando comparado com o microambiente sob vedações presente de membrana. A quantidade de CO₂ *in vitro* normalmente se apresenta negativa, isto se deve ao baixo fluxo de gases do ambiente externo para o interior do frasco, implicando diretamente nas trocas gasosas e conseqüentemente na fotossíntese das plantas (Ribeiro et al., 2019).

Como observado no presente trabalho, as vedações presentes de membrana contribuíram positivamente na redução do acúmulo de CO₂ dentro dos frascos, que resulta em um ambiente *in vitro* com menor umidade. O frasco com menor umidade permite que as plantas tenham uma melhor absorção dos nutrientes e da água do meio de cultura, resultando em um maior alongamento das plantas (Arigita et al., 2010; Xiao et al., 2011; Saldanha et al., 2013). Resultados semelhantes foram encontrados por Fortini et al. (2021), quando identificaram aumento significativo no crescimento e biomassa de *Vernonia condensata* cultivada em vedações com maior fluxo de gases em microambiente com menor umidade.

Na via metabólica de CO₂ quando há o maior acúmulo de CO₂ em contrapartida encontra-se menor acúmulo de etileno, devido ao CO₂ em grande quantidade pode atuar como inibidor de etileno, permitindo a sobrevivência das plantas cultivadas *in vitro* em um ambiente completamente fechado. As plantas cultivadas *in vitro* sob vedações presentes de membrana estão em um microambiente com maior entrada e saída dos gases do meio externo para o interior do frasco, assim, encontram-se menor acúmulo de gases, como por exemplo, o CO₂ observado no presente trabalho.

3.1.4.2.5 - Aclimatização dos híbridos interespecíficos de *Vitis* spp.

Foi observado que as vedações presentes da membrana microporosa influenciaram significativamente a sobrevivência, massa da matéria seca e fresca dos híbridos CH1.3 e CH5.1 quando aclimatizados, sendo possível inferir que as vedações cobertas por membranas otimizam positivamente a fase de aclimatização dos dois híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. porém, esta influência depende das características morfofisiológicas de cada híbrido, visto que, o híbrido CH1.2 não apresentou maior taxa de sobrevivência das plantas cultivadas na presença da membrana microporosa (Tabela 15).

Tabela 15- Análise de Variância da fase de aclimatização dos híbridos interespecíficos *Vitis* spp. em diferentes vedações de polipropileno presente ou não de membranas microporosas

Fonte de Variação	Quadrado médio			
	GL	Sobrevivência (%)	Matéria fresca (g)	Matéria seca (g)
Bloco	2	645,09 ^{ns}	0,59 ^{ns}	7,81 ^{ns}
Vedações	1	0,133 ^{ns}	0,622 ^{ns}	0,135 ^{ns}
Híbridos	2	0,446 ^{ns}	3,893 ^{ns}	0,013 ^{ns}
V x H	2	0,312*	0,383*	0,669*
Erro	10	578,32	0,23	0,23
CV (%)	-	17,86	38,19	32,54
Média Geral	-	0,96	1,62	1,04

*Significativo e ^{ns} não significativo a $p \leq 0,05$ de probabilidade de erro pelo teste de F. Os dados foram transformados utilizando o logaritmo $y + 0.5$.

Na fase de aclimatização dos três híbridos foi observado interação significativa entre os fatores analisados. Os híbridos CH1.3 e CH5.1 apresentaram porcentagens iguais a 100% de sobrevivência das plantas cultivadas na presença da membrana microporosa, o CH1.3, não apresentou sobrevivência das plantas cultivadas na ausência da membrana.

Tabela 16- Desdobramento das médias da aclimatização dos três híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. em função da vedação ausente e presente de membrana aos 60 dias em casa de vegetação

Híbridos de <i>Vitis</i> spp.	Sobrevivência (%)		Matéria fresca (g)		Matéria seca (g)	
	Ausente membrana	Presente membrana	Ausente membrana	Presente membrana	Ausente membrana	Presente membrana
CH5.1	33,0 aB	100 aA	0,81aB	2,34aA	0,88aA	1,30aA
CH1.2	60,0 aA	0,0 bB	1,51aA	0,0bB	1,29aA	0,0aA
CH1.3	0,0 aB	100 aA	0,0aB	2,62aA	0,0aB	1,35aB
CV (%)	19,85		32,54		38,19	
Média Geral	37,50		1,04		16,20	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e por letras maiúsculas entre linhas não diferem entre si na coluna, letras maiúsculas iguais não diferem entre linhas, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os híbridos CH5.1 e o CH1.2 apresentaram médias de 33% e 60% de sobrevivência na ausência da membrana, sendo esta última média a maior taxa de sobrevivência do CH1.2. De forma geral a taxa de sobrevivência do CH1.2 foi menor que aos demais híbridos estudados (Figura 5 – A 1, 2 e 3; e B – 1, 2, 3 e 4) (Tabela 16). Plantas cultivadas em ambiente fechado normalmente reduzem a demanda por água com o fechamento dos poros estomáticos, resultando em menor densidade dos tecidos vasculares das plantas, assim, reduzindo a sobrevivência das plantas quando aclimatizadas (Marino e Berardi, 2004; Fanourakis et al., 2016), como observado nos híbridos CH1.3 e CH5.1 cultivados na ausência da membrana.

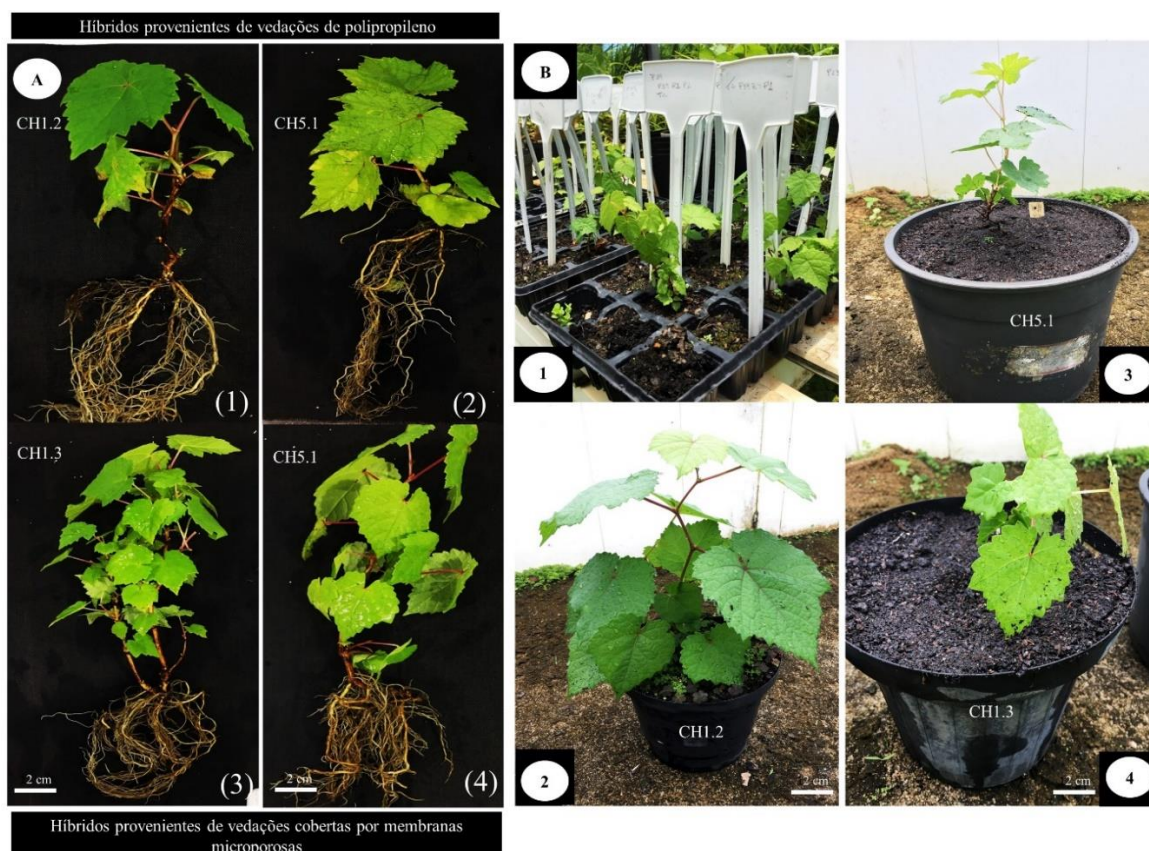


Figura 5- Imagens **(A)** Híbridos aclimatizados em casa de vegetação após 60 dias. **A- 1;2** -CH1.2 e CH5.1 provenientes de vedações sem membranas. Imagens – 3;4 CH1.3 e CH5.1 plantas obtidas em vedações presentes de membrana, após 60 dias aclimatizados. Imagens **B1** são os híbridos aclimatizados em casa de vegetação; **B2, B3 e B4** são os híbridos CH1.2 e CH5.1 e CH1.3 em casa de vegetação, obtidos por meio da micropropagação e plantados em vasos plásticos de polipropileno em substrato Basaplant©.

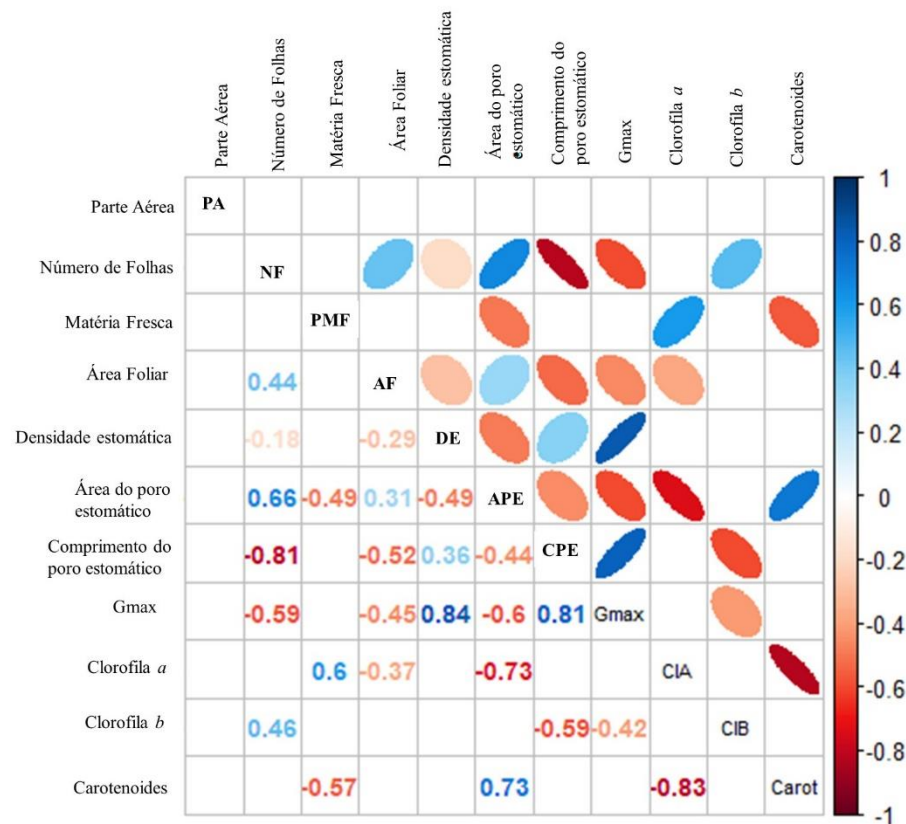
3.1.4.2.6 - Correlação entre os atributos morfofisiológicos dos híbridos

A matriz de correlação de Pearson permitiu observar a forma que as características estudadas se correlacionaram em cada ambiente, permitindo assim a sobrevivência dos três híbridos nas fases do cultivo *in vitro* e quando aclimatizados.

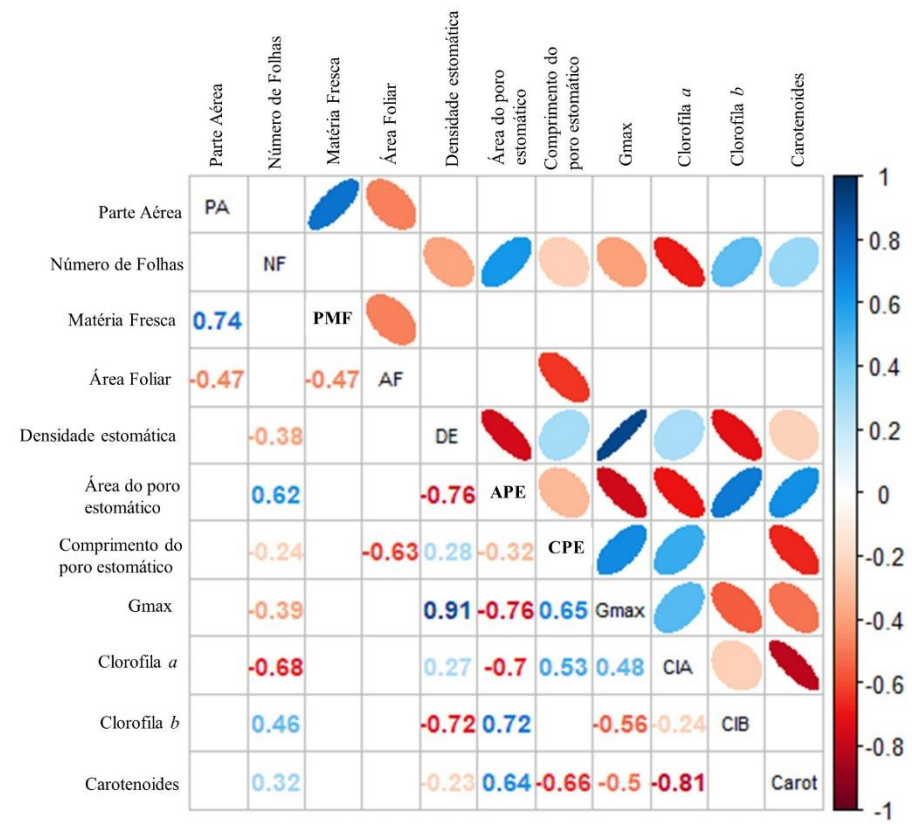
As características observadas apresentaram correlações significativas dentro de cada microambiente. No microambiente presente das membranas microporosas, foi verificado que a característica altura da parte aérea, todas as demais se correlacionaram e foram significativas. No microambiente sem a membrana, todas as características se relacionaram de forma positiva e negativa (Figura 6).

A matriz apresenta as correlações positivas e negativas dos híbridos dentro de cada ambiente, sendo verificado a divergência nas estratégias de desenvolvimento dos híbridos em relação a vedação. Uma das principais características observada é a condutância estomática (G_{max}), a mesma atribuiu uma correlação negativa ($r = -0,76$) quanto a área do poro estomático. A diminuição da condutância estomática é acompanhada por um declínio na fotossíntese e o aumento da eficiência do uso da água, apresentando maior controle estomático quando se há menor disponibilidade de água (Janssen et al., 2020). O mecanismo de condutância estomática responde à forma como a planta lida com o déficit hídrico e a demanda de evapotranspiração do ambiente.

O maior controle estomático permite que as plantas possam sustentar a demanda de evapotranspiração (Maréchaux et al., 2018). Como foi observado nos resultados da fase de enraizamento do híbrido CH1.2 que apresentou menor área do poro estomático, maior área foliar e número de folhas, esta última atribuída em uma correlação negativa com o G_{max} , portanto, possibilitando que o CH1.2 cultivado na ausência da membrana sobrevivesse quando aclimatizado, além disto, essa mesma correlação não foi identificada nas características dos híbridos cultivados no microambiente presente de membrana microporosa. Desta forma, foi possível inferir que as características morfofisiológicas correlacionam diretamente com o microambiente, atribuindo assim, a sobrevivência ou não dos híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. quando aclimatizados.



(a) Vedação de polipropileno coberta por membranas microporosas



(b) Vedação de polipropileno ausente de membranas microporosas

Figura 6- Matriz bivariada - correlação de Pearson entre características biométricas e anatômicas e fisiológicas dos três híbridos de *Vitis* spp na fase de alongamento e enraizamento *in vitro*. Vermelho e ajustes ($r = -$) representam correlações negativas e azul representa correlações positivas a nível de significância é $p < 0,05$.

3.1.5 – CONCLUSÃO

Portanto, para a micropropagação dos híbridos recomenda-se a segunda metodologia de desinfestação e utiliza-se de meio de cultura suplementado com $4,44 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BA para o estabelecimento e multiplicação *in vitro* de segmentos nodais dos híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. A micropropagação dos híbridos pode ser realizada na presença e ausência da membrana, entretanto o cultivo na presença das membranas favoreceu maior sobrevivência na fase de aclimatização dos dois híbridos (CH1.3 e CH5.1) dos três que foram estudados.

3.2. CULTIVO MÍNIMO *in vitro* DE SEGMENTOS NODAIS DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE *Vitis* spp.

3.2.1 INTRODUÇÃO

Os recursos genéticos vegetais são uma reserva natural de genes essenciais para a manutenção da produção de alimentos, fibras e medicamentos. Porém, o crescimento desordenado da população humana e a exploração dos ecossistemas, são ameaças reais a esses recursos, caso não sejam devidamente conservados (Kavani, 2011; Civatti et al., 2014).

A conservação *ex situ* tem por objetivo conservar a integridade genética e a variabilidade presente em um dado momento fazendo uso de diferentes metodologias como bancos de sementes, coleções vivas e *in vitro* (Cerqueira-Silva et al., 2016). Para a conservação em bancos de sementes, elas devem ser desidratadas até os menores níveis de água inicial e armazenadas em baixas temperaturas (Kavani, 2011). Nas coleções vivas as plantas são mantidas a campo. A conservação *in vitro* pode ser realizada pela criopreservação e pelo cultivo mínimo *in vitro*.

Diante desse quadro, a conservação *in vitro* por cultivo mínimo apresenta-se como alternativa viável para a manutenção da variabilidade genética em bancos de germoplasma de videiras. Para a implementação destas metodologias, o espaço requerido é pequeno e as coleções são mantidas longe das mudanças climáticas e

livres do ataque de pragas e doenças por médios e longos períodos (Pacheco et al., 2016). O cultivo mínimo *in vitro* consiste em manter a cultura sob taxas de crescimento limitado, por meio da aplicação de compostos que provocam estresse osmótico, inibidores de crescimento no meio de cultura e redução da temperatura de incubação (Withers, 1983). A vantagem é a manutenção de muitos acessos em um pequeno espaço físico, com custos reduzidos e livres dos riscos que existem no campo (Cid, 2001; Canto et al., 2004).

Os bancos de germoplasmas *ex vitro* e *in vitro* são essenciais no desenvolvimento de programas de melhoramento genético. Para desenvolver o Programa de Melhoramento de videiras na UENF foi constituído um germoplasma com uma coleção de 63 genótipos de plantas a campo. A coleção *in vitro* fornece material para novas abordagens acerca de métodos de conservação *in vitro* de vários de genótipos. O programa de melhoramento da videira busca desenvolver variedades resistentes a doenças como o nematoide (*Pratylenchus brachyurus*) e o míldio (*Plasmopara viticola*). Os primeiros trabalhos, do referido programa, se iniciaram com a introdução de germoplasma oriundo da Universidade da Califórnia, em Davis, com foco na avaliação da diversidade genética de diversos híbridos, avaliação para a resistência ao nematoide e ao míldio, estabelecimento desses híbridos *in vitro* e análises fisiológicas para relações hídricas, com vistas na utilização destes híbridos como novos porta-enxertos (Santos et al., 2018; Santos et al., 2019; Santos et al., 2019; Amaral, 2019).

Embora o cultivo mínimo *in vitro* possa ser considerado um método promissor para a conservação de germoplasma em videiras, são poucos os trabalhos encontrados na literatura, visando desenvolver protocolos para a conservação *in vitro* por meio do cultivo mínimo de espécies e híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. (Faria et al., 2006; Garcia et al., 2011b). Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo para o cultivo mínimo *in vitro* de segmentos nodais de híbridos interespecíficos de *Vitis* spp., por meio da redução de sacarose e da temperatura.

3.2.2 REVISÃO DE LITERATURA

3.2.2.1 Conservação de recursos genéticos de videiras

A conservação *in situ* e *ex situ* de germoplasma são abordagens complementares para armazenamento de germoplasma necessários para preservar a diversidade genética de espécies particulares que fornecem a matéria-prima para programas de melhoramento (Scherwinski-Pereira e Costa, 2010; Vasanth e Vivier, 2011).

O Brasil mantém a maior coleção de germoplasma de *Vitis* na América do Sul, com aproximadamente 1400 acessos, que incluem cultivares, híbridos interespecíficos e espécies silvestres. Um banco ativo de germoplasma (BAG) de videira é mantido no estado do Rio Grande do Sul, em Bento Gonçalves, na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Uva e Vinho. A coleção inclui 655 acessos de *V. vinifera*, 64 acessos de *V. labrusca* e híbridos e 561 acessos de híbridos interespecíficos (Maia et al., 2015). Na Região Nordeste do país, a Embrapa Semiárido mantém aproximadamente 267 acessos de videira conservados, composto por 168 cultivares de *V. vinifera*, oito cultivares de *V. labrusca*, 73 híbridos interespecíficos, 8 espécies silvestres americanas, além de 10 acessos sem informação sobre origem (Maia et al., 2015).

Outras coleções com menor número de acessos são mantidas por empresas de pesquisa nacional nos estados de Santa Catarina (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina [Epagri]), Minas Gerais (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais [Epamig]), São Paulo (Instituto Agrônomo de Campinas [IAC]) e Paraná (Instituto Agrônomo do Paraná [Iapar]) (Maia et al., 2015).

Tradicionalmente, coleções de plantas mantidas a campo, em casa de vegetação e *in vitro* têm sido utilizadas para conservar o germoplasma de videira (Maia et al., 2015). A manutenção de plantas no campo é dispendiosa, requer extensiva área plantada, além da vulnerabilidade a estresses bióticos e abióticos (Pathirana et al., 2016). A manutenção de bancos *in vitro* requer frequentes manuseios de culturas, o que resulta em uma elevação de custos, risco de perda

do acesso vegetal e principalmente apresenta potencial para gerar variação somaclonal (Mathew et al., 2018; Wang et al., 2014). Neste sentido, outras estratégias de conservação *ex situ* para os recursos genéticos de plantas devem ser consideradas que, além da manutenção do material vegetal por longos períodos de tempo, preservem a estabilidade genética durante o armazenamento.

3.2.2.2 Conservação *in vitro* de videira

Para conservação *in vitro* existem duas formas de conservação que podem ser realizadas: por cultivo mínimo *in vitro* e criopreservação. A criopreservação é uma das técnicas mais utilizadas para videiras, porém, os protocolos de criopreservação normalmente são difíceis de serem reproduzíveis, devido à influência do genótipo e explantes que podem dificultar a formação de bancos criogênicos para videiras, mas quando bem estabelecido se torna vantajoso por proporcionar a conservação dos explantes por tempo indeterminado e sem grandes manutenções (Plessis et al., 1991; Ganino et al., 2012). Outra técnica que permite que o material possa ser conservado por longo período *in vitro* é a técnica por meio do cultivo mínimo que contribui com a manutenção de muitos acessos em um pequeno espaço físico, com custos reduzidos, livres dos riscos que existem no campo e permite que o material vegetal possa estar mais acessível em BAG (Cid, 2001; Canto et al., 2004).

Esta técnica promove o crescimento lento das plantas, devido ocorrer o retardo no metabolismo de desenvolvimento das mesmas (Roca et al., 1991), aumentando o intervalo de subcultivo *in vitro* e diminuindo o número de subcultivos (Withers e Williams, 1998; Fortes e Pereira, 2001; Sá et al., 2011). A redução do crescimento do explante é geralmente obtida pela manipulação do meio de cultura (redução da concentração de macronutrientes, micronutrientes e vitaminas), diminuição da temperatura de incubação, redução ou supressão da intensidade luminosa, ou modificações da atmosfera de cultura (Withers, 1983). Assim sendo, tem sido possível conservar *in vitro* diversas culturas como: videiras, maracujazeiro, batata-doce e entre outras (Withers, 1983; Islam et al., 2003; Souza et al., 2009; Reed et al., 2011; Santos et al., 2011).

O laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (Setor de Horticultura do LFIT) pertencente à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro desenvolve pesquisas relacionadas à conservação via cultivo mínimo e mantém *in vitro* coleções de germoplasma de batata-doce (30 acessos). Generoso et al., (2018) desenvolveram protocolos de conservação de maracujazeiro-azedo *in vitro*, bem como, Sales (2020) para a cultivar de maracujazeiro-azedo 'UENF Rio Dourado', todas mantidas por via cultivo mínimo. Porém, para a cultura da videira esta técnica ainda é pouco explorada, e não se tem ainda os híbridos pertencentes ao Programa de Melhoramento de videiras da UENF conservados *in vitro*. A técnica de cultivo mínimo para os híbridos de *Vitis* UENF é essencial, devido os mesmos apresentarem dificuldades de adaptação aos fatores climáticos da região Norte Fluminense, proporcionando ser uma alternativa viável de conservação.

3.2.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.3.1 Material vegetal

Foram selecionados dois híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. (CH1.2 e CH1.3) pertencentes ao Programa de Melhoramento de videiras - UENF, pré-estabelecidos *in vitro* em meio de cultura com metade dos sais minerais do MS e complexo vitamínico de White, myo-Inositol 0,1 g L⁻¹, 30 g L⁻¹ de sacarose, 4,44 μmol L⁻¹ de ácido giberélico e 4,44 μmol L⁻¹ ácido indol-butírico (AIB) (Trevisan et al., 2005), cultivados em frascos de vidro (50 × 100 mm) em sala de cultivo com fotoperíodo de 16:8 horas luz: escuro, irradiância de 50 μmol m⁻² s⁻¹ e temperatura de 27±2°C, com 60 dias de cultivo.



Figura 7- Imagens das videiras pré-estabelecidas *in vitro*. Foto A: CH1.2; Foto B: CH1.3 com 60 dias de cultivo *in vitro*.

3.2.3.2 Experimento de cultivo mínimo *in vitro*

O experimento foi conduzido em DIC em esquema fatorial 2x2x3, dois híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. (CH1.2 e CH1.3), em duas temperaturas de $18\pm 1^\circ\text{C}$ e $27\pm 2^\circ\text{C}$ e três concentrações de sacarose (10, 20 e 30 g). O experimento foi avaliado aos 60, 120 e 180 dias de cultivo mínimo. Para avaliação utilizou-se 12 repetições de cada tratamento. Cada repetição foi constituída por três tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) contendo 10 ml de meio de cultura e um explante.

Os segmentos nodais com aproximadamente 5 mm foram excisados das plantas pré-estabelecidas e transferidos para os tubos de ensaio contendo o meio de cultura retirados e transferidos para o meio de cultura com metade dos sais minerais do MS e complexo vitamínico de White, suplementado com as três diferentes concentrações de sacarose (10,20 e 30 g), $4,44 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BA, e solidificado com $6,0 \text{ g L}^{-1}$ de ágar bacteriológico Sigma®, pH 5,7, autoclavados por 15 minutos a 121°C e 1,1 atm.

Os segmentos nodais foram mantidos por 60, 120 e 180 dias em duas condições de cultivo: Condição 1 – Câmera B.O.D em condições de cultivo durante seis meses em temperatura que variou em 18 ± 1 a $19\pm 1^\circ\text{C}$, e condição 2 - Sala de cultivo com fotoperíodo de 16:8 horas de luz:escuro e luminosidade fornecida por lâmpadas OSRAM® luz do dia com intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) com temperatura de $27\pm 2^\circ\text{C}$ (Temperatura obtida por meio de equipamento Data Logger). As plantas foram avaliadas após 60, 120 e 180 dias quanto à sobrevivência, número de folhas e número de raízes. Além disso, foi realizada a avaliação da coloração da planta, que seguiu uma escala de cores (1: verde-escuro, 2: verde-claro e 3: amarelo e 4: marrom) (Generoso, 2018; Sales 2020) (Figura 8).

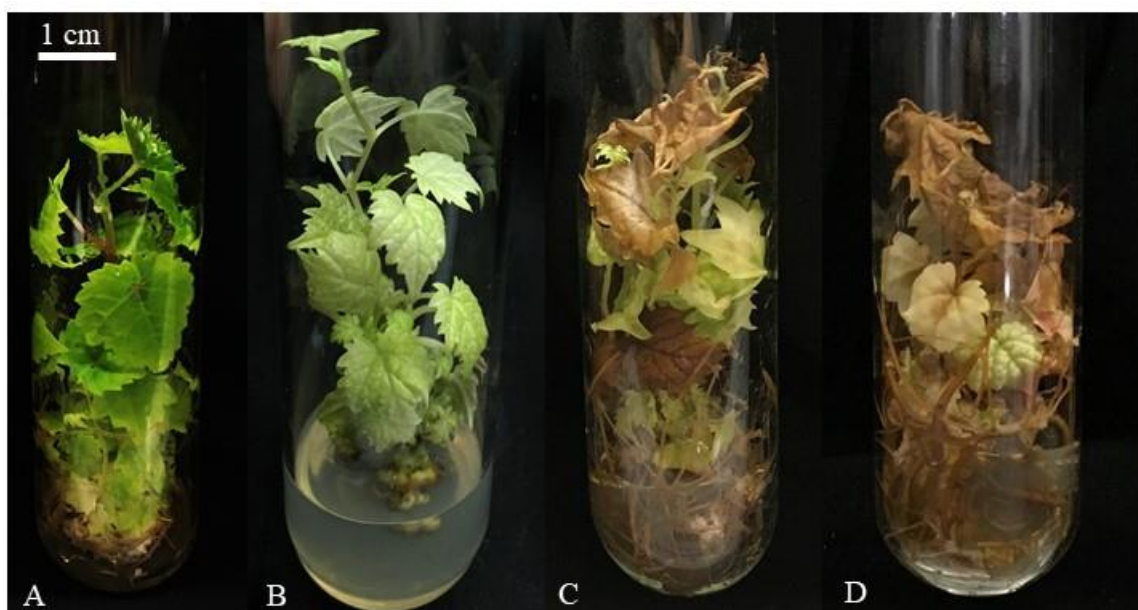


Figura 8- Escala de avaliação da coloração dos segmentos nodais dos híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. em cultivo mínimo *in vitro*. A) 1 = folhas verde-escuras, B) 2 = folhas verde-claras, C) 3 = folhas amareladas (Clorose) (D) 4= folhas marrons (necrose).

Após seis meses de cultivo *in vitro* foram retiradas três repetições de cada tratamento para serem transferidas para o meio de regeneração constituído pelo meio de cultura na metade das concentrações de sais minerais do MS e complexo vitamínico de White, myo-Inositol $0,1 \text{ g L}^{-1}$, 30 g L^{-1} de sacarose, $4,44 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido giberélico e $4,44 \mu\text{mol L}^{-1}$ ácido indolbutírico (AIB) (Trevisan et al., 2005), o

pH ajustado para 5,7 e solidificado com 6 g L⁻¹ de bacteriológico Sigma®. Foram distribuídos 40 ml de meio de cultura por frasco de vidro (125 mm x 60 mm) e os frascos foram autoclavados por 20 minutos a 121°C e 1,1 atm.

Foram mantidos durante 60 dias em B.O.D com temperatura média de 18±1°C (fotoperíodo de 16:8 horas de luz:escuro e luminosidade fornecida por lâmpadas OSRAM® luz do dia com intensidade luminosa de 25 µmol m⁻² s⁻¹) ou na sala de crescimento com temperatura de 27±2°C (fotoperíodo de 16:8 horas de luz:escuro e luminosidade fornecida por lâmpadas OSRAM® luz do dia com intensidade luminosa de 54 µmol m⁻² s⁻¹).

3.2.3.3 Análises estatísticas

Foram observadas as características de altura da parte aérea, sobrevivência, número de folhas, presença de raízes e coloração das folhas durante 180 dias de conservação, e foi verificado a sobrevivência das plantas após serem regeneradas. Os dados observados foram submetidos a testes iniciais de homogeneidade e normalidade, utilizando os testes de Bartlett, respectivamente. Foi necessário utilizar da transformação por raiz quadrada (y+1) para a variável sobrevivência na regeneração das plantas. Em seguida, foi realizada a análise de variância e os graus de liberdade dos tratamentos e suas interações, os resultados foram desdobrados pelo teste Tukey a 5% de probabilidade com o auxílio do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011).

3.2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.4.1 Cultivo mínimo de segmentos nodais de híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. aos 60 dias de cultivo *in vitro*

Aos 60 dias de cultivo foi possível observar as características avaliadas dentro de cada fator (Tabela 17). Os resultados observados na análise de variância mostram que para a característica de altura da parte aérea as interações não foram significativas, ou seja, os fatores apresentaram comportamento independente para

a presente característica, em que as médias diferem entre si dentro de cada fator analisado pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foi observado que os fatores híbridos (H) x sacarose (S) e temperatura x sacarose interagiram significativamente nas características número de folhas e coloração. Além disto, foi verificado que a característica coloração apresentou também interação significativa entre os fatores híbrido x temperatura. A sobrevivência não apresentou diferença significativa e os híbridos não apresentaram presença de raiz após 60 dias de cultivo.

Tabela 17- Análise de variância do cultivo mínimo *in vitro* aos 60 dias de cultivo *in vitro* dos dois híbridos de *Vitis* spp.

Fator de variação	GL	Quadrado médio			
		Altura da parte aérea	Sobrevivência (%)	Número de folhas	Coloração das folhas
Híbrido (H)	1	1060,14*	0,264 ^{ns}	1226,91*	0,0492 ^{ns}
Sacarose (S)	2	350,68*	0,3935 ^{ns}	32,342 ^{ns}	0,9589*
Temperatura (T)	1	182,75*	0,6379 ^{ns}	244,781*	1,4112*
H x S	2	6,139 ^{ns}	0,2752 ^{ns}	91,458*	1,3492*
H X T	1	17,072 ^{ns}	0,3526 ^{ns}	18,392 ^{ns}	2,3581*
T x S	2	45,124 ^{ns}	0,2061 ^{ns}	73,868*	1,166*
H x S x T	2	35,158 ^{ns}	0,3213 ^{ns}	24,223 ^{ns}	0,1269 ^{ns}
Erro	-	29,014	0,3409 ^{ns}	10,698	0,2139
CV (%)	-	26,73	12,20	22,35	28,46
Média	-	20,15	100,0	14,63	1,64

*Significativo e ^{ns} não significativo a $p \leq 0,05$ de probabilidade de erro pelo teste de F.

Os híbridos apresentam diferença significativa para altura de parte aérea, no qual, o híbrido CH1.3 se destaca com a maior média de 22,86 de altura, quando comparado com CH1.2 que foi de 17,43 (Tabela 18).

Tabela 18- Médias das características de altura da parte aérea e sobrevivência aos 60 dias da conservação por cultivo mínimo *in vitro* dos híbridos de *Vitis* spp.

Híbridos de <i>Vitis</i> spp.	Altura da parte aérea (mm)	Sobrevivência (%)
CH1.2	17,43 b	98,14 a
CH1.3	22,86 a	100,0 a
CV (%)	26,84	12,20
Média	20,15	100,0

Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si na coluna, de acordo com o teste de Tukey a $p \leq 0,05$ de probabilidade.

O fator níveis de sacarose diferem-se entre si e a concentração de 10g se destaca com a menor média para a altura de parte aérea, esta resposta é importante considerando que para a conservação *in vitro* quanto mais lento for o crescimento da planta, mais tempo se leva para realizar o subcultivo da mesma, desta forma, a menor concentração influencia positivamente o crescimento dos híbridos *in vitro* aos 60 dias de cultivo (Tabela 19).

Tabela 19- Médias das características de altura da parte aérea e sobrevivência aos 60 dias da conservação por cultivo mínimo *in vitro* dos híbridos de *Vitis* spp nos diferentes níveis de sacarose

Sacarose (g)	Altura da parte aérea (mm)	Sobrevivência (%)
10	17,11 b	97,24 a
20	21,30 a	100,0a
30	22,13 a	97,16 a
CV (%)	26,84	12,20
Média	20,15	100,0

Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si na coluna, de acordo com o teste de Tukey a $p \leq 0,05$ de probabilidade.

A temperatura influenciou significativamente o cultivo mínimo aos 60 dias, no qual, as plantas cultivadas em ambiente $27 \pm 2^\circ\text{C}$ apresentaram a altura de 21.26mm e foi observado que a temperatura de $18 \pm 1^\circ\text{C}$ reduziu consideravelmente o tamanho das plantas (Tabela 20).

Tabela 20- Médias das características de altura da parte aérea e sobrevivência aos 60 dias da conservação por cultivo mínimo *in vitro* dos híbridos de *Vitis* spp em diferentes condições de cultivo

Temperatura	Altura da parte aérea (mm)	Sobrevivência (%)
$18 \pm 1^\circ\text{C}$	19,01 b	95,86 a
$27 \pm 2^\circ\text{C}$	21,26 a	100,0 a
CV (%)	26,84	12,20
Média	20,15	100,0

Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si na coluna, de acordo com o teste de Tukey a $p \leq 0,05$ de probabilidade.

Para a característica número de folhas foi observado a interação significativa entre os fatores híbridos x sacarose (Tabela 21) e temperatura x sacarose (Tabela 22). O híbrido CH1.3 apresentou as maiores médias para a característica de número de folhas, quanto aos níveis de sacarose foi possível verificar que a concentração de 10 g proporcionou o menor número de folhas para o híbrido CH1.2 (Tabela 21) e a condição de cultivo em temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ influenciou o menor número de folhas do híbrido em 10g de sacarose em ambos os híbridos. Enquanto, as plantas conservadas em ambiente de temperatura a $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ mantiveram a média de 12,41 a 13,22 nos diferentes níveis de sacarose.

Tabela 21- Análise de desdobramento do híbrido dentro de cada nível de sacarose para a característica número de folhas dos híbridos conservados por 60 dias

Número de folhas		
Sacarose (g)	CH1.2	CH1.3
10	9,29 b B	18,31 a A
20	12,81 b A	17,2 a A
30	12,21 b A	17,14 a A
CV (%)	22,35	
Média	14,63	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e por letras maiúsculas entre linhas não diferem entre si na coluna, letras maiúsculas iguais não diferem entre linhas, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 22- Desdobramento da temperatura dentro de cada nível de sacarose para a característica número de folhas dos híbridos conservados por 60 dias

Número de folhas		
Sacarose (g)	$18\pm 1^{\circ}\text{C}$	$27\pm 2^{\circ}\text{C}$
10	13,22 a A	14,17 b A
20	14,26 a A	15,75 ab A
30	12,41 a B	17,90 a A
CV (%)	22,35	
Média	14,63	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e por letras maiúsculas entre linhas não diferem entre si na coluna, letras maiúsculas iguais não diferem entre linhas, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A característica coloração se diferiu entre as médias dos níveis de sacarose, variando a intensidade da coloração verde a verde-claro (Tabela 23). As folhas verdes representam as plantas vivas e saudáveis dentro do ambiente de cultivo. O

híbrido CH1.3 foi o que apresentou as folhas com a intensidade mais verde, sendo a média de 1,29 na concentração de 10 g de sacarose. Foi observado que à medida que os níveis de sacarose foram aumentados, conseqüentemente, foi observado maior média na coloração das folhas. Segundo a escala de cores as folhas apresentaram coloração verde-claro, como observado nas concentrações de 20 e 30 g de s

Tabela 23- Desdobramento do híbrido dentro de cada nível de sacarose (a) e desdobramento da sacarose dentro de cada nível híbrido (A) para a característica de coloração das folhas dos híbridos conservados por 60 dias

Coloração das folhas		
Sacarose (g)	CH1.2	CH1.3
10	1,64 a A	1,29 b B
20	1,56 a A	1,77 a A
30	1,61 a A	1,86 a A
CV (%)	28,46	
Média	1,62	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). No intervalo de 1 a 1,5 das médias de coloração, foi considerada a cor verde. No intervalo de 1,6 a 2,5, foi considerado verde-claro.

A interação entre híbridos x temperatura demonstrou que as folhas do híbrido CH1.3 se apresentaram com cores de verde-claro, quando comparado com o híbrido CH1.2 e que a temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ influenciou a coloração mais verde para as folhas do mesmo híbrido (Tabela 24).

Tabela 24- Desdobramento do híbrido dentro de cada nível de temperatura (a) e desdobramento da temperatura dentro de cada nível híbrido (A) para a característica de coloração das folhas dos híbridos conservados por 60 dias

Coloração das folhas		
Híbrido Vitis spp.	18±1 °C	27±2 °C
CH1.2	1,57 b A	1,63 b A
CH1.3	1,87 a A	1,41 a B
CV (%)	28,46	
Média	1,62	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). No intervalo de 1 a 1,5 das médias de coloração, foi considerada a cor verde. No intervalo de 1,6 a 2,5, foi considerado verde-claro.

Foi observado na tabela 25 que as folhas apresentaram maior clorose, conforme os níveis de sacarose aumentaram na condição de cultivo em temperatura de $18\pm 1^\circ\text{C}$, como verificado nas concentrações de 20 e 30 g. No entanto na temperatura de $27\pm 2^\circ\text{C}$ não apresentou diferença significativa entre os níveis de coloração, permanecendo as folhas verdes durante aos 60 dias de cultivo.

Tabela 25- Desdobramento do híbrido dentro de cada nível de sacarose (a) e desdobramento da sacarose dentro de cada nível híbrido (A) para a característica de coloração das folhas dos híbridos conservados por 60 dias

Coloração das folhas		
Sacarose	$18\pm 1^\circ\text{C}$	$27\pm 2^\circ\text{C}$
10	1,40 b A	1,52 a A
20	1,77 a A	1,56 a A
30	2,0 a A	1,49 a B
CV (%)	29,39	
Média	1,62	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($P\leq 0,05$). No intervalo de 1 a 1,5 das médias de coloração, foi considerada a cor verde. No intervalo de 1,6 a 2,5, foi considerado verde-claro.

3.2.4.2 Cultivo mínimo de segmentos nodais de híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. aos 120 dias de cultivo

Aos 120 dias de cultivo *in vitro*, foi observado uma mudança nas características avaliadas (Tabela 26).

O desdobramento do híbrido dentro dos níveis de sacarose apresenta médias significativas para altura da parte aérea e coloração das folhas (Tabela 26). Foi possível observar por meio dos resultados apresentados que a concentração de sacarose 10 g novamente destacou-se, pois o híbrido CH1.2 apresentou a menor média para altura de 18,81, enquanto o híbrido CH1.3 apresentou a menor altura na concentração de 30 g de sacarose nos 120 dias de cultivo.

Tabela 26- Análise de variância do cultivo mínimo *in vitro* aos 120 dias de cultivo *in vitro* dos dois híbridos de *Vitis* spp.

Quadrado médio						
Fator de variação	GL	Altura da parte aérea	Sobrevivência (%)	Número de folhas	Presença de raiz (%)	Coloração das folhas
Híbrido (H)	1	4987,59 *	0,278*	595,11*	0,4012*	5,526*
Sacarose (S)	2	239,11 ^{ns}	0,288*	209,91*	0,1068*	6,561*
Temperatura (T)	1	8671,61*	0,074 ^{ns}	659,26*	0,0155 ^{ns}	3,054*
H x S	2	2280,47*	0,119 ^{ns}	366,46*	0,0286 ^{ns}	5,648*
H X T	1	1204,47*	0,0074 ^{ns}	144,01*	0,0071 ^{ns}	1,074 ^{ns}
T x S	2	49,5029 ^{ns}	0,1771*	5,203 ^{ns}	0,0689*	0,557 ^{ns}
H x S x T	2	327,36 ^{ns}	0,05 ^{ns}	66,372 ^{ns}	0,0687*	4,955 ^{ns}
Erro	-	113,11	0,05	22,854	0,0126	0,437
CV (%)	-	33,01	28,0	27,59	9,81	29,70
Média	-	32,21	80,33	17,32	33,05	2,22

*Significativo e ^{ns} não significativo a $p \leq 0,05$ de probabilidade de erro pelo teste de F.

Em relação a interação do híbrido x temperatura foi possível identificar que a temperatura de $18 \pm 1^\circ\text{C}$ apresentou a menores médias, sendo possivelmente a mais indicada para conservação dos híbridos interespecíficos de *Vitis* spp., a mesma temperatura proporcionou a média de 27,59 e 21,0 para os híbridos CH1.3 e CH1.2, respectivamente (Tabela 27).

Tabela 27- Desdobramento do híbrido dentro de cada nível de temperatura (a) e desdobramento da temperatura dentro de cada nível híbrido (A) para a característica altura da parte aérea e coloração das folhas dos híbridos conservados por 120 dias

Altura da parte aérea (mm)		
Híbridos de <i>Vitis</i> spp.	$18 \pm 1^\circ\text{C}$	$27 \pm 2^\circ\text{C}$
CH1.2	21,0 b B	31,36 b A
CH1.3	27,59 a B	48,60 a A
CV (%)	33,01	
Média	32,21	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e por letras maiúsculas entre linhas não diferem entre si na coluna, letras maiúsculas iguais não diferem entre linhas, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A relação dos níveis de sacarose e altura da parte aérea e coloração das folhas também foi significativa, sendo observado que as concentrações de 10 e 20 g apresentaram a menor altura, sendo estas, as concentrações mais eficientes para manter a conservação das plantas nos 120 dias de cultivo (Tabela 28).

A coloração das folhas foi influenciada pelo fator híbrido, sendo verificado que o CH1.3 apresentou plantas com colorações de verde-claro a folhas clorofiladas, enquanto o híbrido CH1.2 não apresentou mais folhas verdes nos 180 dias de cultivo *in vitro*, apenas folhas verde-claras (Tabela.28).

Tabela 28- Desdobramento do híbrido dentro de cada nível de sacarose (a) e desdobramento da sacarose dentro de cada nível híbrido (A) para a característica altura da parte aérea e coloração das folhas dos híbridos conservados por 120 dias

Sacarose (g)	Altura da parte aérea (mm)		Coloração das folhas	
	CH1.2	CH1.3	CH1.2	CH1.3
10	18,81 b B	43,67 a A	2,01 a A	1,61 b B
20	28,49 b A	41,08 a A	2,02 a B	2,68 a A
30	32,23 a A	29,54 a B	2,06 a B	2,97 a A
CV (%)	33,01		27,59	
Média	32,21		17,32	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e por letras maiúsculas entre linhas não diferem entre si na coluna, letras maiúsculas iguais não diferem entre linhas, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade. No intervalo de 1 a 1,5 das médias de coloração, foi considerada a cor verde. 1,6 a 2,5 foi considerado verde-claro. No intervalo de 2,6 a 3,2 folhas clorofiladas.

Os níveis de sacarose influenciaram o número de folhas, em que, para o híbrido CH1.2 o maior número de folhas foi observado na concentração de 10 g de sacarose que foi a média de 14,45 quando comparada com o híbrido CH1.3. Porém, em relação aos níveis de sacarose dentro de cada híbrido a concentração de 10 g proporcionou o maior número de folhas e a concentração de 30 g proporcionou o número 14,48 folhas. Em relação ao ambiente, a temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ influenciou no aumento do número de folhas, enquanto a temperatura de $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ reduziu o número em ambos os híbridos (Tabelas 29 e 30).

Tabela 29- Desdobramento do híbrido dentro de cada nível de sacarose (a) e o desdobramento da sacarose dentro de cada híbrido (A) para a característica de número de folhas dos híbridos conservados por 120 dias

Número de folhas		
Sacarose (g)	CH1.2	CH1.3
10	14,45a B	24,16 a A
20	15,65a B	19,42 b A
30	15,81a AB	14,48 c a
CV (%)	27,59	
Média	17,32	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e por letras maiúsculas entre linhas não diferem entre si na coluna, letras maiúsculas iguais não diferem entre linhas, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 30- Desdobramento do híbrido dentro de cada nível de temperatura (a) e o desdobramento da temperatura dentro de cada híbrido (A) para a característica de número de folhas dos híbridos conservados por 120 dias

Número de folhas		
Híbrido de <i>Vitis</i> spp	18±1 °C	27±2 °C
CH1.2	14,02 a B	16,49 b B
CH1.3	16,25 a A	22,46 a A
CV (%)	27,59	
Média	17,32	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e por letras maiúsculas entre linhas não diferem entre si na coluna, letras maiúsculas iguais não diferem entre linhas, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O ambiente em conjunto com a alta quantidade de sacarose ocasionou maior morte das plantas (Tabela 31) aos 120 dias de cultivo, se contrapondo com as outras duas concentrações de sacarose que de 10 e 20 g que proporcionaram maior sobrevivência.

Tabela 31- Desdobramento da sacarose dentro de cada nível de temperatura (a) e o desdobramento da temperatura dentro de cada nível de sacarose (A) para a característica de sobrevivência dos híbridos conservados por 120 dias

Sobrevivência (%)		
Sacarose (g)	18±1 °C	27±2 °C
10	91,0 a A	85,34 a A
20	75,0 b A	83,34 a A
30	81,16 ab A	65,29 b B
CV (%)	28,0	
Média	88,0	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e por letras maiúsculas entre linhas não diferem entre si na coluna, letras maiúsculas iguais não diferem entre linhas, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Aos 120 dias de cultivo, foi possível observar a presença de raízes. As plantas cultivadas em ambiente de cultivo sob temperatura de 18±1°C apresentaram maior percentual de raiz quando comprado com o ambiente da sala de cultivo a 27±2°C, porém os níveis de sacarose influenciaram significativamente a presença de raiz, sendo a concentração de 30 g a que apresentou maior porcentagem na temperatura de 27±2°C que foi 51% de presença nas plantas cultivadas (Tabela 32).

Tabela 32- Desdobramento da sacarose dentro de cada nível de temperatura (a) e o desdobramento da temperatura dentro de cada nível de sacarose (A) para a característica de presença de raiz dos híbridos conservados por 120 dias

Presença de Raiz (%)		
Sacarose (g)	18±1 °C	20±2 °C
10	30,50 a A	13,32 b B
20	40,16 a A	29,20 b A
30	34,16 a B	51,37 a A
CV (%)	9,81	
Média	33,05	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e por letras maiúsculas entre linhas não diferem entre si na coluna, letras maiúsculas iguais não diferem entre linhas, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise de desdobramento (Tabela 33) apresenta a interação tripla para a presença de raiz aos 120 dias. Foi verificado que o CH1.2 cultivado em $18\pm 1^\circ\text{C}$ e em 10 g de sacarose apresentou a menor porcentagem de raiz que foi de 8,25%, sendo verificado que os níveis de sacarose influenciaram a maior presença de raiz à medida que os níveis foram aumentando. Foi possível observar também que novamente há grande influência do genótipo sobre a produção de raízes, no qual, apresentou diferenças discrepantes entre os híbridos. A temperatura influenciou somente para o híbrido CH1.3, em que as plantas cultivadas em $27\pm 2^\circ\text{C}$ e 10 g apresentaram a menor porcentagem de raízes que foi de 22,16%, quando comparada com as plantas cultivadas em ambiente de sala de cultivo.

Tabela 33- Análise de desdobramento da presença de raiz nos híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. em função da interação entre as diferentes temperaturas e concentrações e sacarose após 120 dias em cultivo mínimo *in vitro*

Presença de Raiz (%)				
Sacarose (g)	$18\pm 1^\circ\text{C}$		$27\pm 2^\circ\text{C}$	
	CH1.2	CH1.3	CH1.2	CH1.3
10	8,25 b B A	52,75 a A A	5,15 b B A	22,16 a B B
20	36,08 a A A	44,25 a A A	2,75 b B A	55,66 a A A
30	30,09 a AB A	38,83 a A A	44,41 a A A	58,33 a A A
CV (%)	9,81			
Média	33,05			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha (para híbrido), maiúscula na coluna (para sacarose), e maiúscula em negrito na coluna (para as temperaturas), não diferem entre si pelo teste Tukey ($P\leq 0,05$).

3.2.4.3 Cultivo mínimo de segmentos nodais de híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. aos 180 dias de cultivo *in vitro*.

Aos 180 dias de cultivo foi possível observar as características avaliadas dentro de cada fator: híbrido x sacarose x condições de cultivo (Tabela 34).

Tabela 34- Análise de variância do cultivo mínimo *in vitro* aos 180 dias de cultivo *in vitro* dos dois híbridos de *Vitis* spp.

Fator de variação	GL	Quadrado médio				
		Altura da parte aérea (mm)	Sobrevivência (%)	Número de folhas	Presença de Raiz (%)	Coloração das folhas
Híbrido (H)	1	1459,43 ^{ns}	1,361*	709,63*	0,1332 ^{ns}	9,853*
Sacarose (S)	2	275,52*	1,29*	1184,88*	0,1576*	16,508*
Temperatura (T)	1	3798,97*	0,267*	526,09*	0,0776 ^{ns}	0,807 ^{ns}
H x S	2	12215,11*	0,757*	2083,47*	1,0089*	4,357*
H X T	1	2366,58*	0,046 ^{ns}	22,814 ^{ns}	0,1114 ^{ns}	0,332 ^{ns}
T x S	2	283,19 ^{ns}	0,001 ^{ns}	78,300 ^{ns}	0,0125 ^{ns}	0,739 ^{ns}
H x S x T	2	1387,87*	0,029 ^{ns}	90,162 ^{ns}	0,0096 ^{ns}	0,153 ^{ns}
Erro	-	420,6	0,062	64,825	0,0417 ^{ns}	0,637
CV (%)	-	56,51	53,58	51,55	8,32	27,14
Média	-	26,72	40,0	13,56	16,81	2,94

*Significativo e ^{ns} não significativo a $p \leq 0,05$ de probabilidade de erro pelo teste de F.

O desdobramento do híbrido dentro dos níveis de sacarose aos 180 dias revelou que as plantas cultivadas a 10 e 20 g de sacarose ainda se mantinham estáveis em relação à altura das plantas, proporcionando as maiores alturas (Tabela 35). A concentração de 30 g de sacarose reduziu a parte aérea das plantas, essa resposta é ocasionada devido a maior parte das plantas cultivadas nessas condições já estarem em estado de senescência como observado nas figuras 9 e 10.

Tabela 35- Desdobramento dos híbridos dentro de cada nível de sacarose (a) e o desdobramento da sacarose dentro de cada híbrido (A) para a característica de Altura da parte aérea dos híbridos conservados por 180 dias

Sacarose (g)	Altura da parte aérea (mm)	
	CH1.2	CH1.3
10	21,36 b B	51,13 a A
20	41,70 a A	21,75 b B
30	36,27 a A	6,72 b C
CV (%)	56,51	
Média	26,72	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e por letras maiúsculas entre linhas não diferem entre si na coluna, letras maiúsculas iguais não diferem entre linhas, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foi observado que a temperatura influenciou a altura da parte aérea dos híbridos, atribuindo a menor altura para o ambiente em $18\pm 1^\circ\text{C}$ (Tabela 36). Desta forma, sendo a temperatura ideal para manter as videiras por maior tempo conservadas *in vitro*.

Tabela 36- Desdobramento dos híbridos dentro de cada nível de sacarose (a) e o desdobramento da sacarose dentro de cada híbrido (A) para a característica de altura da parte aérea dos híbridos conservados por 180 dias

Híbridos de <i>Vitis</i> spp.	Altura da parte aérea	
	$18\pm 1^\circ\text{C}$	$27\pm 2^\circ\text{C}$
CH1.2	31,89 a A	33,86 a A
CH1.3	17,33 b B	35,74 a A
CV (%)	56,51	
Média	26,72	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e por letras maiúsculas entre linhas não diferem entre si na coluna, letras maiúsculas iguais não diferem entre linhas, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A interação tripla também foi significativa para a característica altura da parte aérea, sendo possível identificar que a interação dos fatores temperatura a $18\pm 1^\circ\text{C}$, e 10 g de sacarose mantêm as plantas vivas durante 180 dias de cultivo *in vitro* (Tabela 37).

Tabela 37- Análise de desdobramento da altura da parte aérea de segmentos nodais de híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. em função da interação entre as diferentes temperaturas e concentrações e sacarose após 180 dias em cultivo mínimo *in vitro*

Sacarose (g)	Altura da parte aérea (mm)			
	$18\pm 1^\circ\text{C}$		$27\pm 2^\circ\text{C}$	
	CH1.2	CH1.3	CH1.2	CH1.3
10	18,45 b B A	38,46 a A B	24,04 a A A	63,81 a A B
20	45,05 a A A	7,56 a B B	38,35 a A A	35,93 b B A
30	32,21 a AB A	5,97 b B A	40,0 a A A	7,47 b C A
CV (%)	56,51			
Média	26,72			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha (para híbrido), maiúscula na coluna (para sacarose), e maiúscula em negrito na coluna (para as temperaturas), não diferem entre si pelo teste Tukey ($P\leq 0,05$).

A maior sobrevivência das plantas ocorreu nas plantas que foram cultivadas em 10 g de sacarose, este resultado foi observado em ambos os híbridos (Tabela 38), que contribuíram com 52,0 e 62,5% de sobrevivência para o híbrido C1.2 e CH1.3, respectivamente. Em relação ao número de folhas foi observado que as concentrações de 10 e 20 g apresentaram as menores médias para o híbrido CH1.2 (Tabela 39).

Tabela 38- Desdobramento da sacarose dentro de cada híbrido para a característica de sobrevivência dos híbridos conservados por 180 dias

Sacarose (g)	Sobrevivência (%)	
	CH1.2	CH1.3
10	52,0 a A	62,5 a A
20	55,56 a A	18,04 b B
30	40,0 a A	10,0 b B
CV (%)	53,58	
Média	40,0	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e por letras maiúsculas entre linhas não diferem entre si na coluna, letras maiúsculas iguais não diferem entre linhas, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 39- Desdobramento da sacarose dentro de cada híbrido para a característica número de folhas dos híbridos conservados por 180 dias

Sacarose (g)	Número de folhas	
	CH1.2	CH1.3
10	13,03 b B	23,79 a A
20	19,82 a A	7,7 b B
30	14,24 a AB	2,45 b B
CV (%)	51,55	
Média	13,56	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e por letras maiúsculas entre linhas não diferem entre si na coluna, letras maiúsculas iguais não diferem entre linhas, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foi verificado que a coloração das folhas apresentou mudança significativa a medida do tempo de conservação, como resultado da conservação em 180 dias, as folhas em grande parte se apresentaram verde-clara para cor amarelo (Tabela 40).

Tabela 40- Desdobramento da sacarose dentro de cada híbrido para a característica coloração dos híbridos conservados por 180 dias

Coloração das folhas		
Sacarose (g)	CH1.2	CH1.3
10	2,32 a B	2,22 a B
20	3,01 b A	3,53 a A
30	2,71 b AB	3,85 a A
CV (%)	27,14	
Média	2,94	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). No intervalo de 2,6 a 3,5 das médias de coloração, foi considerada a cor amarela. No intervalo de 3,5 a 4,5, foi considerado cor marrom.

Aos 180 dias de cultivo mínimo foi observado a influência do híbrido sob a presença de raiz nos diferentes níveis de sacarose. O híbrido CH1.3 apresentou baixa porcentagem de enraizamento (3,36%) em 10 g de sacarose, enquanto, o CH1.2 apresentou 49,00% de raízes nas plantas cultivadas em 10 g de sacarose.

Outra relação foi encontrada nas concentrações de 20 e 30 g de sacarose, em que foi observado a presença de 11,04 e 18,69 no híbrido CH1.2 e 19,29 e 5,54 de raízes no híbrido CH1.3, respectivamente (Tabela 41).

Tabela 41- Desdobramento do híbrido dentro de cada nível de sacarose para a característica presença de raiz nos híbridos conservados por 180 dias

Presença de raiz (%)		
Sacarose (g)	CH1.2	CH1.3
10	3,96 b B	43,00 a B
20	11,04 a A	19,29 b A
30	18,69 a A	5,54 b B
CV (%)	8,32	
Média	16,81	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). No intervalo de 2,6 a 3,5 das médias de coloração, foi considerada a cor amarela. No intervalo de 3,5 a 4,5, foi considerado cor marrom.

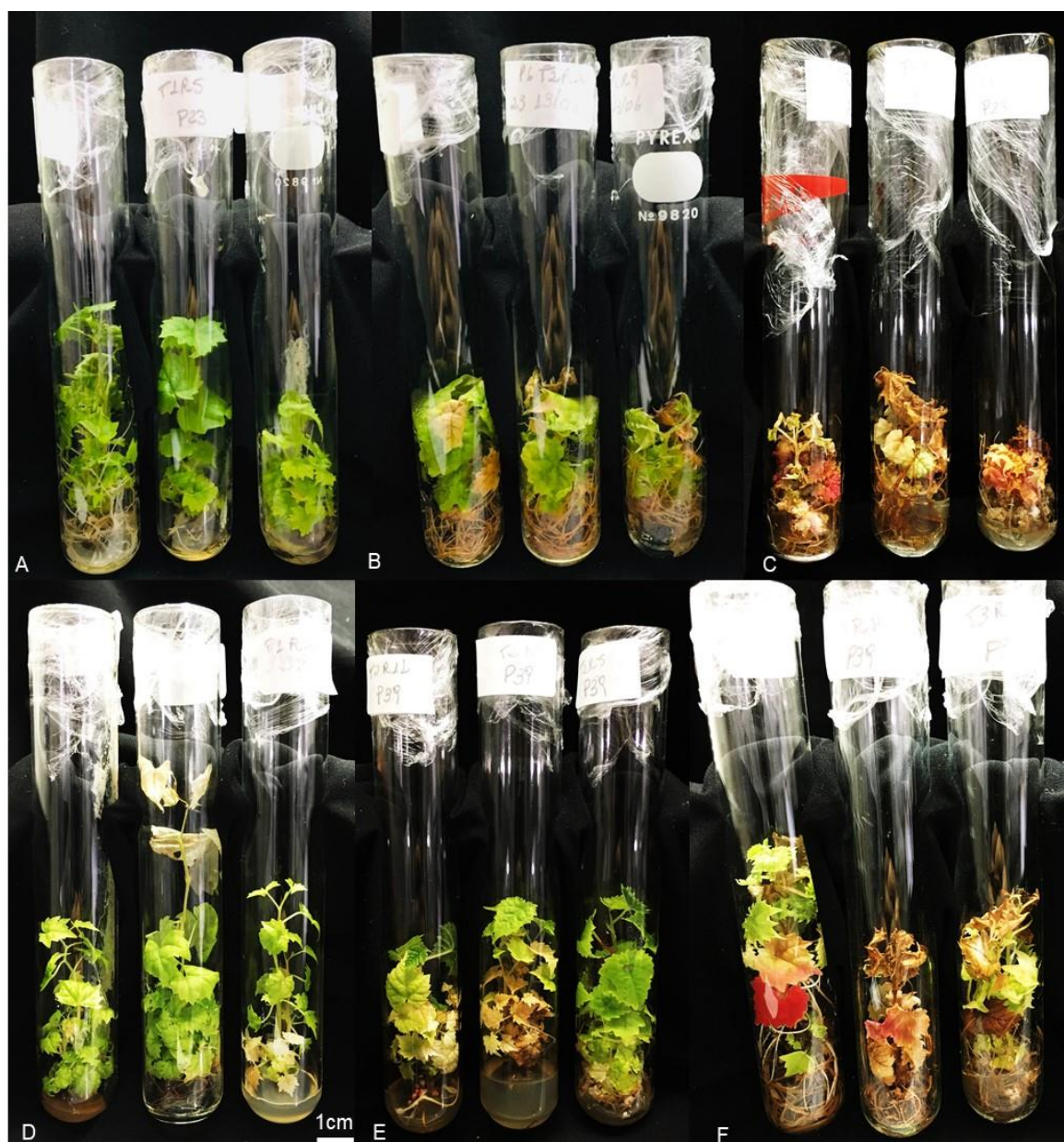


Figura 9- Cultivo mínimo *in vitro* aos 180 dias de cultivo dos dois híbridos interespecíficos avaliados. A, B e C = Híbrido CH1.2 cultivado em 10, 20 e 30 g de sacarose, respectivamente. D, E e F = Híbrido CH1.3 em 10, 20 e 30 g de sacarose, em sala de cultivo $27\pm 2^{\circ}\text{C}$.

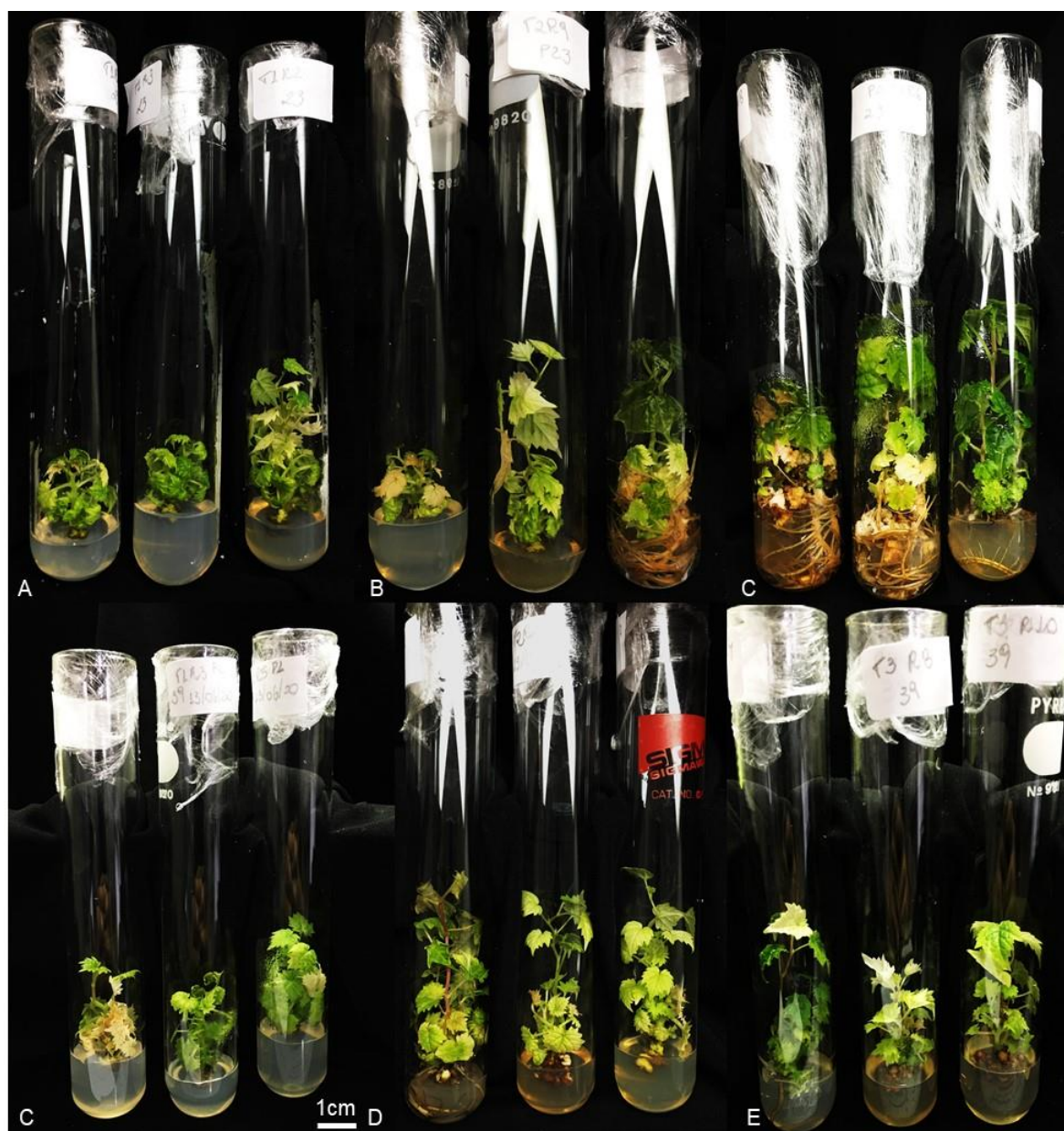


Figura 10- Cultivo mínimo *in vitro* aos 180 dias de cultivo dos dois híbridos interespecíficos avaliados. A, B e C = Híbrido CH1.2 cultivado em 10, 20 e 30 g de sacarose, respectivamente. D, E e F = Híbrido CH1.3 em 10, 20 e 30 g de sacarose, em câmara B.O.D em temperatura $18\pm 1^{\circ}\text{C}$.

3.2.4.3.1 Regeneração dos híbridos pós-conservação *in vitro*

A sobrevivência das plantas quando regeneradas apresentaram interação significativa entre os fatores analisados (Tabela 42). O ambiente de cultivo interferiu na regeneração *in vitro* das plantas. O híbrido CH1.3 apresentou diferença, as plantas do híbrido cultivadas em B.O.D 18±1°C a 10 g de sacarose apresentou 100% de sobrevivência na regeneração, enquanto, as cultivadas em ambiente 27±2°C não sobreviveram (Tabela 43).

O híbrido CH1.3 não apresentou diferença entre as médias de sobrevivências nos diferentes níveis de sacarose e temperatura. Foi observado que ao longo da conservação *in vitro* a concentração de 10 g de sacarose se destacou durante todo o tempo de cultivo, proporcionando as maiores médias nas características observadas das plantas quando cultivadas em B.O.D a 18±1°C.

Tabela 42- Análise de variância da regeneração *in vitro* dos híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. conservados *in vitro* durante 180 dias em diferentes níveis de sacarose e temperatura

Quadrado médio		
Fator de Variação	GL	Sobrevivência
Híbrido (H)	1	0,0374 ^{ns}
Temperatura (T)	1	0,1474 ^{ns}
Sacarose (S)	2	0,2525 ^{ns}
T x G	1	0,074 ^{ns}
T x S	4	0,143*
G x S	2	0,009 ^{ns}
H x T x S	2	0,197 ^{ns}
Erro		0,24
CV (%)		18,06
Média		1,14

*Significativo e ^{ns} não significativo a $p \leq 0,05$ de probabilidade de erro pelo teste de F.

Tabela 43- Análise de desdobramento dos fatores analisados para as características de sobrevivência na regeneração *in vitro* dos híbridos conservados *in vitro*, após 180 dias em diferentes níveis de sacarose e temperatura

Sacarose (g)	Sobrevivência (%)			
	18±1 °C		27±2 °C	
	CH1.2	CH1.3	CH1.2	CH1.3
10 g	67,0 a A A	100,0 a A A	67,0 a A A	0,0 a B A
20 g	67,0 a A A	0,0 a A B	0,0 a A A	67,0 a A A
30 g	33,0 a A A	0,0 a A B	33,0 a A A	0,0 a A A
CV (%)	12,05			
Média Geral	33,0			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha (para híbrido), maiúscula na coluna (para sacarose), e maiúscula em negrito na coluna (para as temperaturas), não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Após 60 dias no meio de regeneração, as plantas sobreviventes foram aclimatizadas em DBC em casa de vegetação durante 30 dias. A temperatura da casa de vegetação ao longo dos 30 dias variou em média de 30±2°C e umidade relativa de 68,55% (Data Logger) com mínima de 25°C e máxima de 32°C. Após, este período foi observado que os híbridos aclimatizados não sobreviveram. Na literatura, são escassos os trabalhos sobre a conservação *in vitro* por cultivo mínimo de espécies e híbridos de videiras, bem como, o relato de plantas sobreviventes na fase de aclimatização pós-conservação *in vitro*. Ao longo do presente trabalho foi observado que os híbridos CH1.3 e CH1.2 apresentaram relativamente uma porcentagem baixa de sobrevivência quando aclimatizados (Capítulo 1) e quando cultivados *in vitro* em condições de cultivo na temperatura de 27±2°C. Portanto, ainda é necessário a busca de conhecimento para investigar meios que amenizem o impacto que os híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. pertencentes ao Programa de Melhoramento de videiras da – UENF sofrem quando são transferidos do ambiente *in vitro* para serem aclimatizados.

No geral foi observado que, as condições de cultivo na temperatura de 18±1°C favoreceu o cultivo mínimo e permitiu maior sobrevivência das plantas até o período de 120 dias, sendo este o prazo limite que as plantas podem ser

conservadas sem realizar o subcultivo. Generoso (2018), em seu trabalho com *P. edulis*, destaca que a temperatura influencia a sobrevivência das plantas no cultivo mínimo *in vitro*. Aos 180 dias na temperatura de 27°C, apresentou maior média de sobrevivência quando comparado com as plantas mantidas no cultivo mínimo na temperatura de 27°C, encontrando resultados semelhantes ao presente trabalho, estando de acordo com a literatura que relata que a conservação *in vitro* de fruteiras normalmente se realizada sob temperaturas mais amenas (Silva et al., 2018).

Ao longo da conservação *in vitro* foi possível observar a influência genotípica, por meio das diferenças morfofisiológicas que cada híbrido apresentou nas diferentes interações duplas ou triplas. A influência genotípica influenciou principalmente a sobrevivência dos híbridos durante o cultivo mínimo, que possibilitou o total de sobrevivência de 62% de plantas do híbrido CH1.3 ao final de 120 dias de cultivo, quando cultivado em 10 g de sacarose e o híbrido CH1.2 a sobrevivência variou em média 40 a 55% nos diferentes níveis de sacarose. Mahmoudzadeh (2018) relata resultados semelhantes, em relação ao efeito genótipo, porém, para a característica de brotação, o mesmo observou em seu trabalho que a cultivar videira Paykani apresentou maior número de brotações, quanto as demais cultivares estudadas, impulsionando assim, o estabelecimento e multiplicação da mesma.

Em relação aos níveis de sacarose as concentrações de 10 e 20 g se destacaram por favorecer o crescimento lento das plantas *in vitro* e permitir maior sobrevivência de ambos os híbridos ao final de 180 dias.

A sacarose funciona como um osmorregulador no meio de cultura, que em alta concentração impede que as plantas resgatem em maior quantidade os sais minerais contido no meio de cultura, e conseqüentemente, reduz o crescimento da planta *in vitro* (Caldas, 1998; Stefanello et al., 2009). A redução no crescimento das plantas cultivadas em maiores níveis de sacarose ocorre devido a sacarose atuar removendo o excesso da água intracelular, por gradiente osmótico, fazendo com que o crescimento da cultura ocorra de forma mais lenta (Dumet et al., 1993; Shibli et al., 2006). Generoso (2018) encontrou resultados semelhantes para o cultivo de maracujazeiro-azedo, que os segmentos nodais cultivados em meio de cultura a ½ MSM em combinação com 10 e 20 g L de sacarose, assim, de acordo com o encontrado no presente trabalho.

3.2.5 CONCLUSÃO

Para o cultivo mínimo *in vitro* dos híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. indica-se o cultivo dos segmentos nodais em temperatura de $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ em meio de cultura suplementado com 10 g L^{-1} de sacarose por um período de quatro meses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alizadeh, M., Singh, S. K., Patel, V. B., Deshmukh, P. S. (2018). *In vitro* clonal multiplication of two grape (*Vitis* spp.) rootstock genotypes. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 28(1), 1-11.
- Alleweldt, G., Spiegel-Roy, P., Reisch, B. (1991). Grapes (*Vitis*). Genetic Resources of Temperate. *Fruit and Nut Crops*, 290(7): 291-330
- Almeida, A. N., Bragagnolo, C., Chagas, A. L. S. (2015). A Demanda por Vinho no Brasil: elasticidades no consumo das famílias e determinantes da importação. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, 53(3): 433-454.
- Alston, J. M., Olena, S. (2019). "Grapes in the world economy." The grape genome. *Springer*, 1-24.
- Alvarenga, A. A., Abrahão, E., Regina, M. A., Antunes, L. E. C., Pereira, A. F. (1998). Origem e classificação botânica da videira. *Informe Agropecuário*, 19(194): 5-8.
- Amaral, B.D., Viana, AP., Santos, E.A., Ribeiro, R.M., Silva, F.A., Ambrósio, M., Walker, A. M. (2020). Prospecting for resistance of interspecific hybrids of *Vitis* spp. to *Plasmopara viticola*. *Euphytica*, 216(5), 1-14.

- Amiri, S., Mohammadi, R., Akbari, R. (2019). The Effects of cytokinin and auxin interactions on proliferation and rooting of seedless grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. 'Sultanine'. *Erwerbs-Obstbau*, 61(1):85-92.
- Arifuzzaman, M.D., Sabiha S., Md. Saddam, H., Saifullah., Rifat Al Naser., Samiul, A., Jakir, H. (2016). Paraphernalia of Growth Regulators During *In Vitro* micropropagation of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) from Shoot Tips and Nodal Segments. *Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences*, 3(4):326-331
- Barbosa, G. G., Targa, V. M. I., Otoni, W. C., Rondon, J. N., Costa, F. A. (2021). Cultivo *in vitro* de embrião zigótico de baru influenciado por tipos de vedações e concentrações de sacarose. *Brazilian Journal of Development*, 7(4), 42390-42408.
- Bastos, L. P.; Moreira, M. J. S.; Costa, M. A. P. C.; Rocha, M. C.; Hansen, D. S.; Silva, S. A.; Dantas, A. C. V. L.; Sousa, C. S. (2007). Cultivo *in vitro* de Mangabeira (*Hancornia speciosa*). *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v.5, supl. 2, p.1122-1124.
- Bettoni, J. C.; Dalla Costa, M.; Gardin, J. P. P.; Kretzschmar, A. A.; Pathirana, R. (2016.). Cryotherapy: a new technique to obtain grapevine plants free of viruses. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 38, p.1-13.
- Bi, W. L.; Hao, X. Y.; Cui, X. H.; Volk, G. M.; Wang, Q. C. (2018). Droplet-vitrification cryopre-servation of *in vitro*-grown shoot tips of grapevine (*Vitis* spp.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, New York, v. 54, p. 590-599.
- Biasil, A.; Passos, I.R. da S.; Pommer, C.V. (1998) Micropropagação do porta-enxerto de videira Jales. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.33, p.1587-1594.
- Camargo, U, A., Tonietto, J., Hoffmann, A. (2011). Progressos na viticultura brasileira, *Revista Brasileira de Fruticultura*, Volume Especial: 144-149.

- Canto, A. M. M., Souza, F. V. D., Costa, M. A. C., Souza, A. S., Ledo, C. A. S., Cabral, J. R. S., (2004) Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39(7): 717-720.
- Cassells, A. C., Walsh, C. (1998). Characteristics of *Dianthus* microplants grown in agar and polyurethane foam using air-tight and water-permeable vessel lids. *Physiology and control of plant propagation in vitro*. Luxembourg: CEC, 122-126.
- Cid, L. P. B. (2001). A propagação *in vitro* de plantas: O que é isso?. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 19(1): 16-21.
- Civatti, L. M., Marchi, M. N. G., Torres-Silva, G., Assis, J. G. A., Bellintani, M. C. (2014). Cryoconservation of plant germplasm native to Brazil. *African Journal Biotechnology*, 13: 3847–3859.
- CONAB. (2018). Companhia Nacional de Abastecimento. Análise mensal - Uva industrial. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/>. Acesso em: 05 de dezembro 2021.
- CONAB. (2019). Companhia Nacional de Abastecimento. Análise mensal - Uva industrial. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/>. Acesso em: 05 de janeiro 2022.
- Conner, Patrick J., Maclean, Dan. (2013). Fruit anthocyanin profile and berry color of muscadine grape cultivars and *Muscadinia* germplasm. *HortScience*, 48(10): 1235-1240.
- Coombe, B. G., Mccarthy, M. G. (2000). Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(2): 131-135.

- Boer, H. J., Price, C. A., Wagner-Cremer, F., Dekker, S. C., Franks, P. J., Veneklaas, E. J. (2016). Optimal allocation of leaf epidermal area for gas exchange. *New Phytologist*, 210(4), 1219-1228.
- Dumet D. (1993) Importance of source for de acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. *Cryo-letters*, 14: 243- 250.
- Dzazio, P.M.; Biasi, L.A.; Zanette, F. (2002). Micropropagação do porta-enxerto de videira '420-A'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.24, p.759-764,
- ENGELMANN, F. (2009). Use of biotechnologies for conserving plant biodiversity. *Acta Horticulturae*, v.812, p.63-82.
- Fachinello, J. C.; Hoffmann, A.; Nachtigal, J. C. (2005). Propagação de plantas frutíferas. Brasília: *EMBRAPA Informação Tecnológica*. 221p.
- Fanourakis, D., Bouranis, D., Giday, H., Carvalho, D. R. A., Rezaei, N. A., Ottosen, C. O. (2016). Improving stomatal functioning at elevated growth air humidity: a review. *Journal of Plant Physiology* 207:51–60.
- Faria, G. A., Costa, M. A. P. C., Junghans, T. G., Ledo, C. A. S., Souza, A. S. (2006) Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28: 267–270.
- Fengqin, Z., Fangmei, L., Dabin, G. (1990). Studies on germplasm resources of wild grape species (*Vitis* spp.) in China. *Vitis*, 1: 50-57.
- Ferreira, M.E., Grattapaglia, D. (1998) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220p
- Filho, W. B., Pereira A. M. S., França, S. C., Furlan, M. (2002). Indução de metabólitos bioativos em culturas de células de *Maytenus illicifolia*. *Eclética Química*, 27: 403-416.

- Fortes, G.L.R., Pereira, J.E.S. (2001). Preservação *in vitro* da batata com ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidrato. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 36(10):1261-1264.
- Fortini, E. A., Batista, D. S., Rodrigues, T. C. M., Felipe, S. H. S., Correia, L. N. F., Chagas, K, Otoni, W. C. (2021). Gas exchange rates and sucrose concentrations affect plant growth and production of flavonoids in *Vernonia condensata* grown *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC), 1-13.
- Franklin, G. L. (1945). Preparation of thin sections of synthetic resins and wood-resin composites, and a new acerating method for wood. *Nature*, v. 155, p. 51,
- Galet, P. (1998). Grape varieties and rootstocks varieties. Paris: *Oenoplurimédia*, 315 p.
- Ganino, T.; Silvanini, A.; Beghé, D.; Be-Nelli, C.; Lambardi, M.; Fabbri, A. (2012) Anatomy and osmotic potential of the Vitis rootstock shoot tips recalcitrant to cryopreservation. *Biologia Plantarum*, Dordrecht, v.56, p. 78-82.
- Garcia, R., Pacheco, G., Falcão, E., Borges, G., Mansur, E. (2011) Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). *Plant Cell, Tissue Organ and Culture*, 106: 47–54.
- Gerrath, J. M., Wilson, T., Posluszny, U. (2004). Morphological and anatomical development in the Vitaceae. VII. Floral development in *Rhoicissus digitata* with respect to other genera in the family. *Canadian Journal of Botany*, 82(2): 198-206.
- Giovannini, E. (2008). *Produção de uvas para vinho, suco e mesa*. Porto Alegre: *Renascença*, 364p.
- Gonçalves, L. A., Geraldine, R. M., Picoli, E. A. T., Vendrame, W. A., Carvalho, C. R., Otoni, W. C. (2008). *In vitro* propagation of *Herreria salsaparilha* Martius (Herreriaceae) as affected by different sealing materials and gaseous exchanges. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92: 243-250.

- Grattapaglia, D., Machado, M. A. (1998). Micropropagação. In: Torres, A. C., Caldas, L. S., Buso, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Embrapa, São Paulo-SP, 1: 184-250.
- Hannin, H. (2019). Breeding, consumers and market issues: main evolutions in the vine and wine industry. *Acta Horticulturae*, (1248), 1–6.
- Islam, M. T., Leunufna, S., Dembele, D. P., Keller, E. R. J. (2003). *In vitro* conservation of four mint (*Mentha* spp.) accessions. *Plant Tissue Culture*, 13(1): 37-46.
- Jackson, M. B. (2005) Aeration stress in plant tissue culture. In: Hvoslef-Eide, A. K., Preil, W. Liquid culture systems for in vitro plant propagation. *Netherlands: Springer*, p. 459-473.
- Kaviani, B. (2011). Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. *Australian Journal Crop Science*, 5: 778–800.
- Kennedy, J. (2002). Understanding grape berry development. *Practical Winery and Vineyard*, 4: 1-5.
- Kozai, T., Kubota, C. (2001). Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. *Journal of Plant Research*, 114: 525-537.
- Leão, P. C. S., Cruz, C. D., Motoike, S. Y. (2013). Diversity and genetic relatedness among genotypes of *Vitis* spp. using microsatellite molecular markers. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35: 799-808
- LEÃO, P.C. de S.; MOTOIKE, S.Y. (2011). Genetic diversity in table grapes based on RAPD and microsatellite markers. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.46, p.1035-1044.
- Li, S., Li, Z., Zhao, Y., Zhao, J., Luo, Q., Wang, Y. (2020). New disease-resistant, seedless grapes are developed using embryo rescue and molecular markers. *3 Biotech*, 10(1): 4.

- Mahmoudzadeh, H. (2018). *In vitro* regeneration of virus-free grapevine (*Vitis Vinifera* L.) in some commercial cultivars. *International Journal of Agricultural and Natural Sciences*, 1(1), 69-74.
- Maia, J. D. G., Rirschel, P., Camargo, U. A., Souza, R. T. de, Fajardo, T. V. M., Naves, R. de L., Girardi, C. L. (2013). 'BRS 'Isis' Nova cultivar de uva de mesa, sem sementes e tolerante ao míldio. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, Comunicado Técnico, 143. 20p.
- Maia, J. D. G.; Carmargo, U. A.; Tonietto, J.; Zanús, M. C.; Quecini, V.; Ferreira, M. E.; Ritschel, P. (2015). Grapevine breeding programs in Brazil. In Reynolds, A. (Ed.). Grapevine breeding programs for the wine industry-traditional and molecular techniques. Sawston :Wood head Publishing, p. 247-271.
- Maréchaux, I., Bonal, D., Bartlett, M., Burban, B., Coste, S., Courtois, E., Dulormne, M., Jean-Yves, G., Mira, E., Mirabel, A., Sack, L., Stahl, C., Chave, J. (2018). Dry-season decline in tree sapflux is correlated with leaf turgor loss point in a tropical rainforest. *Functional Ecology*, v. 32, p. 2285–2297.
- Marino, G., Berardi, G. (2004) Different sealing materials for Petri dishes strongly affect shoot regeneration and development from leaf explants of quince 'Ba29'. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Planta*, 40: 384-388.
- Martins, J. P. R., Rodrigues, L. C. D. A., Silva, T. D. S., Rossini, F. P., Gontijo, A. B. P. L., Falqueto, A. R., (2020). Morphophysiological responses of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae) to excess copper during *in vitro* culture. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 1-10.
- Mathew, L.; Mclachlan, A.; Jibrán, R.; Burritt, D. J.; Pathirana, R. Cold. (2018) Antioxidant and osmotic pre-treatments maintain the structural integrity of meristematic cells and improve plant regeneration in cryopreserved kiwifruit shoot tips. *Protoplasma*, Berlin, v. 255, p. 1-13.

- McGovern, P. E., Glusker, D. L., Exner, L. J., Voigt, M. M. (1996). Neolithic resinated wine. *Nature*, 381(6582): 480-481.
- Mosaleeyanon, K., Cha-Um, S., Kirdmanee, C. (2004) Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets *in vitro* under a CO₂ enriched with decreased sucrose concentrations in the medium. *Scientia Horticulturae*, 103: 51-63.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, v.15, p.473-479.
- Murthy, H. N., Lee, E. J., Paek, K. Y. (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.118:1–16.
- Nachtigal, J. C., Mazzarolo, A. (2008). Uva: o produtor pergunta, a Embrapa responde. *Área de Informação da Sede-Col Criar Plantar ABC 500P/500R Saber (INFOTECA-E)*.
- Nguyen, Q. T., Xiao, Y., Kozai, T. (2016). Photoautotrophic micropropagation. In: Kozai T, Niu G, Takagaki M (eds) *Plant factory: an indoor vertical farming system for efficient quality food production*, 1st edn. *Academic Press, New York*, pp 271–283.
- Pacheco, G., Garcia, R., Lugato, D., Vianna, M., Mansur, E. (2012). Plant regeneration, callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis. *Scientia Horticulturae*, 144: 42–47.
- Pathirana, R.; Mclachlan, A.; Hedder-ley, D.; Carra, a.; Carimi, F.; Panis, B. (2015). Removal of leafroll viruses from infected grapevine plants by droplet vitrification. *Acta Horticulture*, Leuven, v. 1083, p. 491-498.
- Payán, F. R., Martin, F. W. (1975) Barriers to the hybridization of *Passiflora* species. *Euphytica*, 24: 709-716.

- Plessis, p. c.; Leddet, c.; Collas, a.; De-reudde, J. (1993) Cryopreservation of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay shoot tips by encapsulation-dehydration: effects of pre-treatment, cooling and post culture conditions. *Cryo-Letters*, Lewes, v. 14, p. 309-320.
- Ray, A.; Bhattacharya, S. (2010). Storage and conversion of *Eclipta alba* synseeds and RAPD analysis of converted plantlets. *Biologia Plantarum*, v.54, p.547-550.
- Reed, B. M., Sarasan, V., Kane, M., Bunn, E., Pence, V. C. (2011). Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 47:1–4.
- Riaz, S., Krivanek, A, F., Xu, K., Walker, M. A. (2006). Refined mapping of the Pierce's disease resistance locus, PdR1, and Sex on an extended genetic map of *Vitis rupestris* × *V-arizonica*. *Theoretical and Applied Genetics*, 113: 1317- 1329.
- RIBEIRO, A. P. *Micropropagação, avaliação da variação somaclonal e detecção de vírus em videira*. (2012) 128f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- RIBEIRO, D.W. *Morfogênese in vitro da videira: Variedades Paulsen 1103, VR043-43, Cabernet Sauvignon*. (2006). 68f. Dissertação (Mestrado em recursos Genéticos Vegetais) – Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
- Ribeiro, J.; Bastos, D.; de Oliveira, E. A. G.; Pinto, M. (2010) Produção de mudas micropropagadas de videira, mangueira e goiabeira. Documentos, 232. Petrolina: Embrapa Semiárido, p.21.
- Ribeiro, L, M., Sorgato, J. C., Scalon, S., Soares, J. S., Ribeiro, I. S. (2019) Influência da luz, ventilação natural e tamanho do frasco no crescimento e desenvolvimento de denphal (Orchidaceae). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 14(3), e5957.

- Ribeiro, M. V., Lima, C. S. M., Bandeira, J. M., Rubin, S., Benitez, S. C., Peters, J. A., Braga, E. J. B. (2007) Concentrações de sacarose e tipos de vedação no cultivo *in vitro* de *Melissa officinalis* L. *Revista Brasileira de Biociências*, 5: 843-845.
- Roca, W.M., Arias, D.I., Chaves, R. (1991) Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma. In: Roca, W.M., Mroginski, L.A. (Ed.). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali: *Centro Internacional de Agricultura Tropical*, p. 697-714.
- Rodrigues, F. R., Bispo, D. A. A. S., Brandão, H. N., Soares, T. L., Almeida, W. A. B., Santana, J. R. F. (2019). The impact of medium composition and photosynthetically active radiation level on the initial *in vitro* growth and production of flavonoids of *Vernonia condensata* Baker. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 18, p. 1-8.
- Sales, R.A. *Nitrato de prata na conservação in vitro de segmentos nodais do maracujazeiro-azedo UENF Rio Dourado*. (2020). Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 64 p.
- Saldanha, C. W., Otoni, C. G., Azevedo, J. L., Dias, L. L. C., Rêgo, M M., Otoni, W. C. (2012). A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfafra glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 110:413–422.
- Sá, A.J., Lédo, A.S., Lédo, C.A.S. (2011). Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, 41(1):57-62.
- Saldanha, C. W., Otoni, C. G., Notini, M. M., Kuki, K. N., Cruz, A. C. F., Neto, A.R., Dias, L. L. C., Otoni, W. C. (2013). A CO₂-enriched atmosphere improves *in vitro* growth of Brazilian ginseng [*Pfafra glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 49:433–444. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9529-5>

- San Pedro, T., Peiró, R., Villanova, J., Olmos, A., Gisbert, C. (2017). *In vitro* propagation of *Vitis vinifera* L. cv. 'Monastrell'. *Electronic Journal of Biotechnology*, 27, 80-83.
- Santana, J. C., Hidalgo, E., De Lucas., A. I., Recio, P., Ortiz, J. M., Martín, J. P. (2007) Identification and relationships of accessions grown in the grapevine (*Vitis vinifera* L.) Germplasm Bank of Castilla y León (Spain) and the varieties authorized in the VQPRD areas of the region by SSR marker analysis. *Genet Resources and Crop Evolution*, 55: 573-583.
- Santana, J.C.; Hidalgo, E.; Lucas, A.I. de; Recio, P.; Ortiz, J.M.; Martín, J.P.; Vuste, J.; Arranz, C.; Rubio, J.A. (2008). Identification and relationships of accessions grown in the grapevine (*Vitis vinifera* L.) Germplasm Bank of Castilla y León (Spain) and the varieties authorized in the VQPRD areas of the region by SSR-marker analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v.55, p.573-583.
- Santos, M. C., Lédo, A. S., Lédo, C. A. S, Souza, F. V. D., Junior, J. F. S. (2011). Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. *Revista Ciência Agronômica*, 42(3): 735-741.
- Santos, P. R., Viana, A. P., Gomes, V. M., Preisigke, S. C., Santos, E. A., Cavalcante, N. R., Walker, M. A. (2018). Clonal selection in interspecific *Vitis* spp. hybrids resistant to the root-lesion nematode *Pratylenchus brachyurus* by REML/BLUP. *Fruits*, 73(3).
- Santos, P. R., Viana, A. P., Santos, E. A., Barros, W. F. H., Riaz, S., Walker, A. M. (2019). Molecular genetic diversity in segregates of *Vitis*: implications for the breeding of grapevine aiming at resistance to *Pratylenchus brachyurus*. *Euphytica*, 215(4), 1-10.
- Scherwinski, J.E.; Costa, F.H.S. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas: estratégias, princípios e aplicações. In: Barreto Cid, L.P. (Org.). Cultivo *in vitro* de plantas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p.177-234

- Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671-675.
- Schuck, M.R.; Biasi, L.A.; Mariano, A.M.; Lipski, B.; Riaz, S.; Walker, M.A. (2011). Obtaining interspecific hybrids, and molecular analysis by microsatellite markers in grapevine. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.46, p.1480-1488.
- Silva, R. D. C., Luis, Z. G., Scherwinski-Pereira, J. E. (2012). Short-term storage *in vitro* and large-scale propagation of grapevine genotypes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47(3), 344-350.
- Skiada, F.G.; Grigoriadou, K.; Maliogka, V.I.; Katis, N.I. (2009). eleftheriou, e.p. Elimination of grapevine leafroll-associated virus 1 and grapevine rupestris stem pitting-associated virus from grapevine cv. Agiorgitiko, and a micropropagation protocol for mass production of virus-free plantlets. *Journal of Plant Pathology*, v.91, p.177-184.
- Smith, M. A. L., Spomer, A. (1995). Vessels, gels, liquid, media, and support systems. *In: Aitken-Christie, J., Kozai, T., Smith, M. A. L. Automation and enviromental contro in plant tissue culture*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 371-404.
- Souza, A. S., Souza, F. V. D., Santos-Serejo, J. A., Junghans, T. G., Paz, O. P., Montarroyos, A. V. V., Santos, V. S., Morais, L. S. (2009). Preservação de germoplasma vegetal, com ênfase na conservação *in vitro* de variedades de mandioca. Circular Técnica 90, Cruz das Almas – BA, Embrapa Mandioca e Fruticultura, 24p.
- Souza, J. A., Donini, L. P., Silva, L. C., Corrêa, M. G. S., Schuch, M. W. (2007). Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira M-9 em função da vedação, sacarose e material de suporte do meio de cultura. *Scientia Agraria*, 2: 161-164.
- Strioto, D. K., Pepineli, A. C., Eisele, T. G., Marinelli, G. C., Mangolin, C. A., Cantagali, L. B., ... & Maria de Fátima, P. S. (2019). Clonal propagation of cv. Italy grapes

and the generation of genetic divergence among vineyards. *Scientia Horticulturae*, 244, 263-269.

Trevisan, F., Mendes, B. M. J. (2005) Optimization of *in vitro* organogenesis in passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Scientia Agricola*, 62: 346–350.

Vettorazzi, R. G., Carvalho, V. S., Sudré, C. P., Rodrigues, R. (2017) Developing an *in vitro* optimized protocol to sweet potato landraces conservation. *Acta Scientiarum Agronomy*, 39(3): 359-367.

Viana, A.P., Resende, M. D. V., Riaz, S., Walker, M. A. (2016) Genome selection in fruit breeding: application to table grapes. *Scientia Agricola*. 73: 142-149.

Wang, B.; Wang, R. R.; Cui, Z. H.; Bi, W. L.; Li, J. W.; Li, B. Q.; ozudogru, e. a.; volk, g. m.; wang, q. c. Potential applications of cryogenic technologies to plant genetic improvement and pathogen eradication. *Biotechnology Advances*, Amsterdam, v. 32, p. 583-595, 2014.

Wang, Q.; Mawassi, M.; Sahar, N.; Li, P.; Violeta, C.T.; Gafny, R.; Sela, I.; Tanne, E.; Perl, A. Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) embryogenic cell suspensions by encapsulation–vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.77, p.267-275, 2004.

Wellburn AR. (1994). The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144:307-313.

Withers, L. A. (1983). Germplasm storage in plant biotechnology. In: Mantell, S. H., Smith, H. (eds), *Plant biotechnology*, p. 187-218.

Withers, L.A., Williams, J.T. (1998) Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: Torres, C.A., Caldas, L.S., Buso, J.A. (Ed). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa – SPI: Embrapa, CNPH, p. 297-329.

Xiao, Y., Niu, G., Kozai, T. (2011). Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 105:149–158.

Zabayed, S. M. A., Afreen, F., Kozai, T. (2004). Recent advancement in research on photoautotrophic micropropagation using large culture vessels with forced ventilation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Planta*, 40: 450-458.