

Meios de cultura e reguladores de crescimento na micropropagação de porta-enxertos de videira

VILLA, F.¹; PASQUAL, M.²; VILELA, X. M. S.²

¹ D.Sc., Professora Adjunta, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Rua Pernambuco, 1777, Centro, Campus Marechal Cândido Rondon, PR. E-mail: fvilla2003@hotmail.com

² D.Sc., Professor, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus Universitário, s/n, Lavras, MG. E-mail: mpasqual@ufla.br

RESUMO

A micropropagação de videira é utilizada, principalmente, para a obtenção de plantas uniformes, livres de vírus e num curto espaço de tempo. Com o objetivo de aprimorar técnicas de micropropagação de porta-enxertos de videira (*Vitis* sp.), segmentos nodais com cerca 2,5 cm e duas gemas axilares, provenientes de brotações pré-estabelecidas *in vitro*, foram excisados e inoculados em diferentes meios, suplementado com quatro concentrações de cinetina e quatro de 6-benzilaminopurina (BAP), em todas as combinações possíveis. O pH foi ajustado para 6,4 (meio DSD1) e 5,8 (demais meios) antes da adição de 6 g dm⁻³ de ágar e da esterilização a 121 °C e 1 atm por 20 min. Após a inoculação, os explantes foram transferidos para sala de crescimento a 25 ± 2 °C, irradiância de 35 µmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 h, onde permaneceram nessas condições por 70 dias. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, utilizando-se de quatro repetições constituídas de três tubos contendo um explante cada. Verificou-se maior número de brotações de ‘Kobber 5BB’ em meio de cultura Kc. Para o porta-enxerto ‘VR043-43’, o meio mais adequado na multiplicação *in vitro* foi o DSD1. Melhores resultados na micropropagação de ‘R110’ e pouca formação de calos foram observados na ausência dos reguladores de crescimento no meio de cultivo.

Palavras-chave: *Vitis* sp.; cultura de tecidos; BAP; cinetina.

CULTURE MEDIA AND GROWTH REGULATORS IN THE MICROPROPAGATION OF GRAPEVINE ROOTSTOCKS

ABSTRACT

Micropropagation of grapevine is mainly used for obtaining uniform, virus-free plants and in a short time. With the aim to improve techniques of micropropagation of grapevine (*Vitis* sp.) rootstocks, nodal segments of nearly 2,5 cm in length and two axillary buds from plants *in vitro* were excised and inoculated in different culture media, supplemented with four concentrations of kinetin and four concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP), in all possible combinations. The pH was adjusted to 6,4 (DSD1) and 5,8 (MS) prior to the addition 6 g dm⁻³ of agar and sterilization at 121 °C and 1 atm during 20 minutes. After inoculation, the explants were transferred to growth room at a temperature of 25 ± 2 °C, irradiance of 35 µmol m⁻² s⁻¹ and photoperiod of 16 hours, remaining in these conditions during 70 days. The experiment design used was the completely randomized design, involving four replications and three tubes containing one explant each. Higher number of shoots of ‘Kobber 5BB’ was verified in the culture medium Kc. For the rootstock ‘VR043-43’, the most appropriate culture

medium for the multiplication *in vitro* was DSD1. The best results in the micropropagation of 'R110' and little formation of callus were observed in the absence of growth regulators in the culture medium.

Keywords: *Vitis* sp.; tissue culture; BAP; kinetin.

INTRODUÇÃO

A micropropagação da videira é utilizada com diversos objetivos, entre eles a multiplicação rápida de plantas, a propagação de novos híbridos, a obtenção de matrizes livres de vírus e preservação de germoplasmas. Para a multiplicação de explantes, dois métodos são sugeridos. Um deles visa aumentar a eficiência da micropropagação, pela proliferação de gemas axilares com altos níveis de citocinina no meio. O outro método sugerido é baseado na formação de uma única planta enraizada em meio isento de regulador vegetal, a partir de um segmento nodal utilizado como explante (BOUQUET & TORREGROSA, 2003).

Entre os fatores que interferem no desenvolvimento de brotações *in vitro* destacam-se o genótipo, meio de cultivo e os reguladores de crescimento (BORGHEZAN et al., 2003). O meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e suas variações em macronutrientes é o mais utilizado nos trabalhos de micropropagação de videira (Biasi et al., 1998). Entretanto, outros meios de cultura também foram testados para esse cultivo *in vitro*, como o C₂D (CHÉE et al., 1984) e DSD1 (SILVA & DOAZAN, 1995).

Diversos são os reguladores de crescimento utilizados na cultura *in vitro* da videira, entre eles, o principal é a citocinina BAP (6-benzilaminopurina) em concentrações que variam de 2,2 a 8,8 µmol (DZAZIO et al., 2002; PEIXOTO & PASQUAL, 1996) e a auxina ANA (ácido naftalenoacético). Contudo, a concentração e o tipo de reguladores, para melhorar a proliferação de brotações, variaram entre os diferentes genótipos estudados.

Muitos autores, como Bouquet & Torregrosa (2003), salientam que a presença de reguladores de crescimento no meio de cultura pode levar a instabilidade genética, como mudanças de ploidias e rearranjo cromossômico. Contudo, a concentração e o tipo de citocinina, para melhorar a proliferação de brotações, variaram entre os diferentes genótipos estudados. Para híbridos de videira a cinetina teve efeito positivo no comprimento da parte aérea das brotações (NOVÁK & JUVOVÁ, 1983). Diversos autores também observaram a superioridade do BAP em relação às outras citocininas (GRAY & BENTON, 1990).

Diante do exposto, conduziu-se este trabalho com objetivo de avaliar a micropropagação de três porta-enxertos, em diferentes meios de cultivo, com a adição de diferentes concentrações de BAP e cinetina.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimento 1

Segmentos nodais do porta-enxerto de videira 'R110' (*Vitis berlandieri* x *V. rupestris*) com cerca 2,5 cm e 2 gemas axilares, oriundos de brotações pré-estabelecidas *in vitro* foram excisados e inoculados em meio de cultura DSD1 (SILVA & DOAZAN, 1995), suplementado com quatro concentrações de cinetina (0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) e quatro de BAP (0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹), em todas as combinações possíveis. O pH foi

ajustado para 6,4 antes da adição de 6 g cm^{-3} de ágar e da autoclavagem a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ e 1 atm por 20 min.

Experimento 2

Segmentos nodais dos porta-enxertos de videira ‘Kobber 5BB’ (*Vitis berlandieri* x *V. riparia*) e ‘VR043-43’ (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*) com cerca 2,5 cm e 2 gemas axilares, oriundos de brotações pré-estabelecidas *in vitro* foram excisados e inoculados em 10 meios de cultivo [$\frac{1}{2}$ MSM; MSM (Monteiro, 2000); $\frac{1}{2}$ BDS; BDS (Dunstan & Short, 1977); $\frac{1}{2}$ DSD1; DSD1 (SILVA & DOAZAN, 1995); $\frac{1}{2}$ Kc; Kc (KNUDSON, 1946); $\frac{1}{2}$ OM e OM (RUGINI, 1984)]. O pH foi ajustado para 5,8 antes da adição de 6 g cm^{-3} de ágar e da autoclavagem a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ e 1 atm por 20 min.

Posteriormente à inoculação, os explantes dos dois experimentos foram transferidos para sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, irradiância de $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fornecida por tubos fluorescentes de 20W, luz do dia especial e fotoperíodo de 16 h diárias; onde permaneceram nessas condições por 70 dias. O delineamento experimental nos dois casos foi inteiramente casualizado, utilizando-se de quatro repetições constituídas de três tubos contendo um explante cada.

Foram avaliados número de folhas, número de raízes por planta, comprimento da maior raiz e da parte aérea, peso da biomassa da parte aérea e de calos. Os dados foram analisados pelo software Sisvar (FERREIRA, 2000), utilizando regressão polinomial para as concentrações dos reguladores de crescimento e teste de médias (Scott-Knott) para os porta-enxertos e meios de cultivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1

A análise de variância apresentou efeito significativo dos tratamentos para todas as variáveis analisadas, ocorrendo interação entre os fatores citocinina e BAP (Tabela 1). Os resultados obtidos por Silva et al. (2000), Moreira (2000) e Borghezán et al. (2003), indicaram diferenças significativas entre as variedades e clones de videira relacionadas ao desenvolvimento *in vitro* e produção de biomassa.

Tabela 1. Análise de variância para número de folhas (NF), número de raízes (NR), comprimento das raízes (CR), comprimento da parte aérea (CPA) e peso da matéria fresca da parte aérea (PMPA)

Fontes de variação	GL	Quadrados médios					
		NF	CPA	NR	CMR	PFPA	PFCA
BAP	3	0,979*	2,217*	0,5296*	1,512*	0,0016 ^{ns}	0,0038 ^{ns}
CIN	3	0,0424*	0,554*	0,4829*	0,748*	0,0004 ^{ns}	0,00031 ^{ns}
B x CIN	9	0,2504*	0,244*	0,4484*	0,597*	0,00069 ^{ns}	0,0010*
Erro	48						
CV (%)		12,13	11,07	34,02	39,31	1,78	2,45

** Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F. ns = não significativo; B = BAP, CIN = cinetina.

Para número de folhas verificou-se significância em todas as concentrações utilizadas de cinetina (Figura 1). Com incremento nas concentrações de BAP observou-se decréscimo de forma linear na ausência, 2,0 e 4,0 mg dm⁻³ de cinetina. Maior número ocorreu na ausência dos reguladores de crescimento. Dzazio et al. (2002) e Machado et al. (2006) obtiveram resultados semelhantes ao desse trabalho, em que o número de folhas por brotação de *Vitis* spp. foi maior na testemunha, ou seja, na ausência de citocinina.

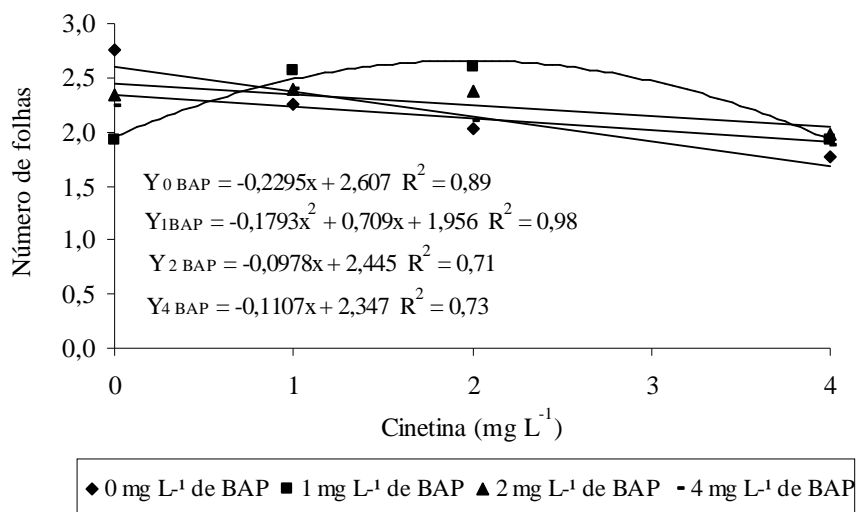


Figura 1. Número de folhas de porta-enxerto de videira, cultivado *in vitro* em meio de cultura MS adicionado de BAP e cinetina.

A citocinina BAP teve efeito negativo no número e comprimento das raízes e na altura das plantas, sendo mais evidente nas maiores concentrações testadas (Figuras 2, 3 e 4, respectivamente). Na ausência de BAP, esses parâmetros morfológicos foram melhores.

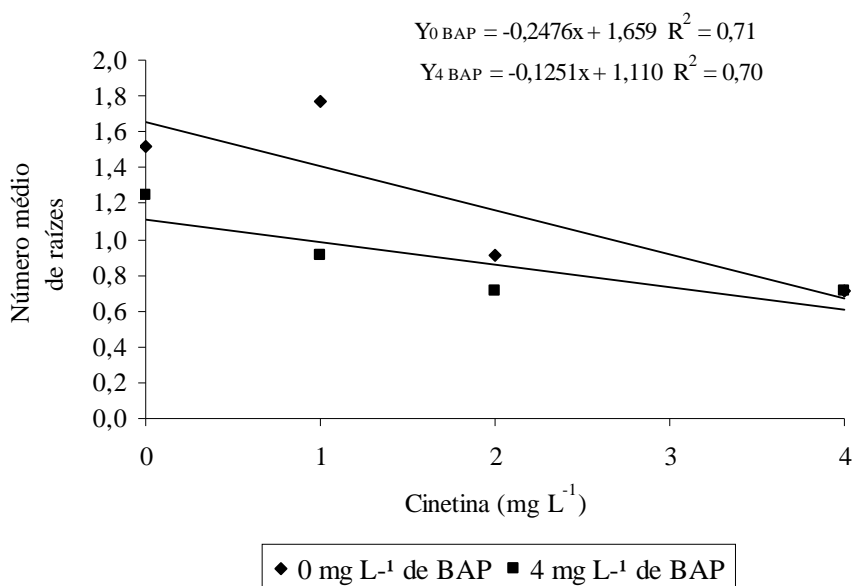


Figura 2. Número de raízes de porta-enxerto de videira, cultivado *in vitro* em meio de cultura MS adicionado de BAP e cinetina.

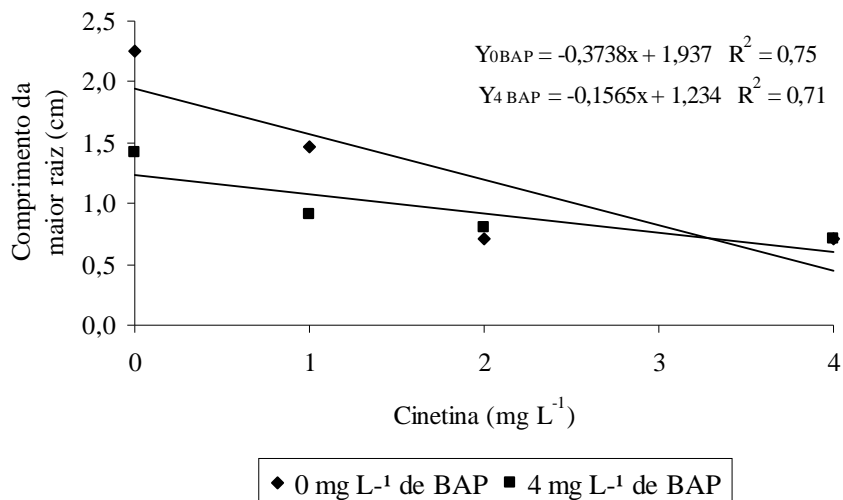


Figura 3. Comprimento da maior raiz de porta-enxerto de videira, cultivado *in vitro* em meio de cultura MS adicionado de BAP e cinetina.

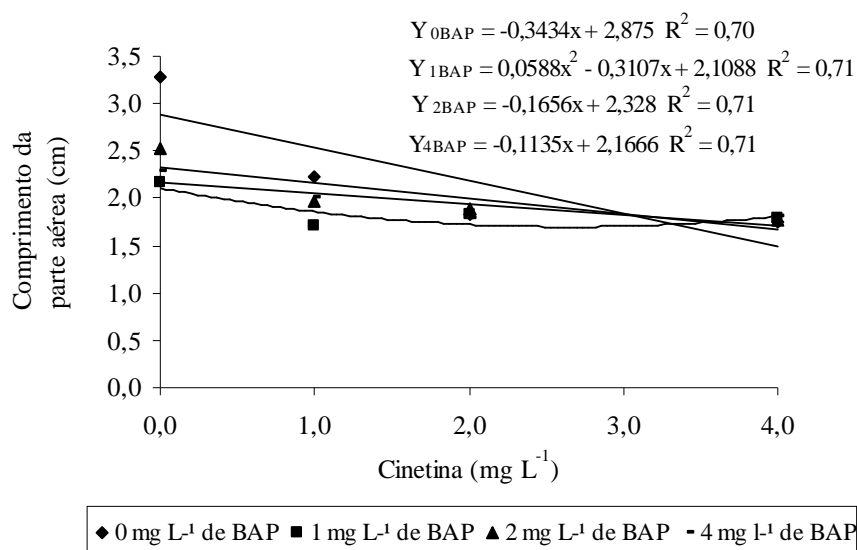


Figura 4. Comprimento da parte aérea de porta-enxerto de videira, cultivado *in vitro* em meio de cultura MS adicionado de BAP e cinetina.

A produção de brotações pouco alongadas com a adição de BAP no meio de cultura, também foi observada com as cultivares ‘Thompson Seedless’, ‘Sonaka’ e ‘Tas-e-Ganesh’, sendo necessária uma fase de alongamento (Mhatre et al., 2000). Além disso, concentrações muito elevadas também são prejudiciais, causando a formação de brotações anormais e hiperhídricas. Concentrações maiores que 1 mg dm⁻³ de BAP adicionadas tornaram-se tóxicas na micropropagação de ‘Paulsen 1103’, ocasionando uma redução drástica no número de brotações (Coletto et al., 2008).

Segundo Dzazio et al. (2002), concentrações de BAP devem ser adequadas para cada cultivar, otimizando o processo para a obtenção de brotações de boa qualidade

e com mínimo de vitrificação, mesmo que a taxa de crescimento seja menor. Pois, fases subsequentes dependem do bom estado fisiológico das brotações.

Melhor formação do sistema radicular foi observada na ausência de BAP (Figuras 2 e 3). Da mesma forma, Biasi et al. (1998) obtiveram resultados próximos a 100% de enraizamento com o porta-enxerto 'Jales', em meio de cultura sem regulador de crescimento. Entretanto, Gray & Benton (1990) obtiveram 55% de enraizamento em brotações de *Vitis rotundifolia* cultivadas em meio MS sem a presença de regulador de crescimento.

As concentrações de BAP testadas reduziram a formação de raízes do porta-enxerto de videira 'R110'. Para porta-enxertos de videiras, a rizogênese *in vitro* é fortemente influenciada pelo genótipo (Roubelakis-Angelakis & Zivanovitch, 1991), enraizando facilmente pelo uso de meio de cultura sem regulador de crescimento ou com adição de auxina (Gray & Fisher, 1985).

Observou-se formação de calo em 100% dos explantes, na presença ou ausência das duas citocininas testadas (Figura 5). Mesmo na ausência de cinetina foi verificada a formação de calos. Maior peso fresco de calos foi observado com a adição de 2 mg dm⁻³ dessa citocinina. Embora não seja desejada a formação de calos nesse caso, registraram-se menores valores na ausência das citocininas, evidenciando assim que o meio de cultivo sem a adição desses reguladores é mais adequado para a multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de videira 'R110'.

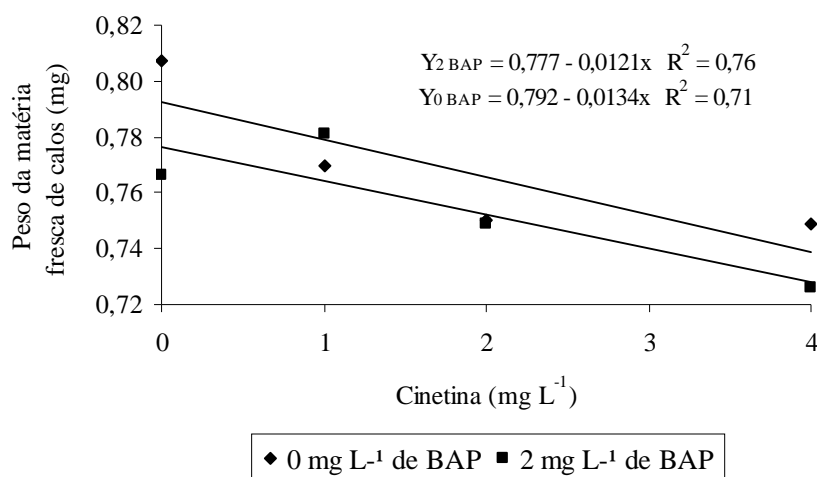


Figura 5. Peso da matéria fresca de calos de porta-enxerto de videira, cultivado *in vitro* em meio de cultura MS adicionado de BAP e cinetina.

Experimento 2

Os dados obtidos neste trabalho revelaram que houve interação entre os porta-enxertos e meios de cultura para alguns parâmetros estudados (Tabelas 2 e 3). Em meio de cultivo BDS não se observou interação significativa para nenhuma das variáveis analisadas. Talvez os macro e micronutrientes contidos nesse meio não sejam suficientes para o desenvolvimento *in vitro* de espécies lenhosas (como a videira), ou tóxicos, mesmo em pequenas quantidades (Tabela 4).

Tabela 2. Avaliação de parâmetros morfológicos *in vitro* em porta-enxertos de videira cultivados em diferentes meios de cultura

Meios de cultura	Porta-enxerto	NF	CPA	PFPA
50% MSM	Kobber 5BB	---	4,18 a*	---
	VR043-43	---	2,82 b	---
100% MSM	Kobber 5BB	---	2,67 a	---
	VR043-43	---	2,03 b	---
50% DSD1	Kobber 5BB	17,75 b	2,01 b	1,10 b
	VR043-43	23,83 a	2,56 a	1,25 a
100% DSD1	Kobber 5BB	---	2,16 b	1,15 b
	VR043-43	---	3,02 a	1,36 a
50% Kc	Kobber 5BB	---	---	---
	VR043-43	---	---	---
100% Kc	Kobber 5BB	24,17 a	2,72 a	---
	VR043-43	13,42 b	1,99 b	---
50% OM	Kobber 5BB	---	---	---
	VR043-43	---	---	---
100% OM	Kobber 5BB	---	---	1,11 b
	VR043-43	---	---	1,27 a

NF = número de folhas, CPA = comprimento da parte aérea, PFPA = peso fresco da parte aérea. *Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna, para o mesmo parâmetro, não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scot-Knott. --- = interação não significativa.

Tabela 3. Avaliação de parâmetros morfológicos *in vitro* em porta-enxertos de videira cultivados em diferentes meios de cultura. UFLA, Lavras, 2008

Meios de cultura	Porta-enxerto	NR	CMR	PFCA
50% MSM	Kober 5BB*	---	2,85 a	---
	VR043-43	---	1,73 b	---
100% MSM	Kober 5BB	---	---	1,32 a
	VR043-43	---	---	1,06 b
50% DSD1	Kober 5BB	1,31 b	1,15 b	---
	VR043-43	2,38 a	3,23 a	---
100% DSD1	Kober 5BB	1,31 b	1,56 b	---
	VR043-43	1,99 a	3,36 a	---
50% Kc	Kober 5BB	---	---	1,12 a
	VR043-43	---	---	1,00 b
100% Kc	Kober 5BB	---	1,22 b	---
	VR043-43	---	1,97 a	---
50% OM	Kober 5BB	---	1,00 b	---
	VR043-43	---	1,93 a	---
100% OM	Kober 5BB	1,00 b	1,00b	---
	VR043-43	2,05 a	2,33 a	---

NR = número de raízes, CMR = comprimento da maior raiz, PFCA = peso fresco de calos. *Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna, para o mesmo parâmetro, não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scot-Knott. --- = interação não significativa.

Tabela 4. Componentes dos cinco meios de cultivo estudados (BDS, OM, MSM, Kc e DSD1), contendo macro e micronutrientes

Componentes do meio	Meios de cultura				
	BDS	OM	MSM	Kc	DSD1
	Volume da solução estoque adicionada ao meio (mL)				
NH ₄ NO ₃	3,87	4,99	12,12	---	1,21
NH ₄ H ₂ PO ₄	20	---	---	---	---
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,36	---	---	20	---
KNO ₃	26,63	11,57	16	---	10,52
H ₃ BO ₃					
KH ₂ PO ₄	---	---	---	5	---
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O					
H ₃ BO ₃					
KH ₂ PO ₄	---	---	---	---	5
CoCl ₂ .6H ₂ O					
H ₃ BO ₃					
KI					
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	5	---	---	---	---
CoCl ₂ .6H ₂ O					
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O					
H ₃ BO ₃					
KH ₂ PO ₄					
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	---	---	5	---	---
CoCl ₂ .6H ₂ O					
H ₃ BO ₃					
KH ₂ PO ₄					
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	---	5	---	---	---
CoCl ₂ .6H ₂ O					
KI					
KCl	---	25	---	---	---
CaCl ₂ .2H ₂ O	17,05	---	---	---	---
Ca(NO ₃).4H ₂ O	---	15	32,5	25	12,5
MgSO ₄ .7H ₂ O					
MnSO ₄ .H ₂ O					
ZnSO ₄ .7H ₂ O	5	20	20	5	5
CuSO ₄ .5H ₂ O					
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	5	5	10	5	5
FeSO ₄ .7H ₂ O					
Tiamina (HCl)		10 mL			
Ác. Nicotínico		(MS) + 45			
Piridoxina	20 + 5 mL	mL da sol.	10	---	20
(HCl)	da Tiamina	100 mg L ⁻¹			
	estoque	de ácido			
		nicot.			
Glicina	---	---	25	---	---
Mio-inositol	50	---	50	---	5
Carvão ativado	---	---	---	0,2%	---
Sacarose	3%	3%	3%	2%	2%

Caldas et al. (1990) discutem a utilização da forma inorgânica do nitrogênio sobre o crescimento e desenvolvimento de culturas de tecidos, destacando o nitrato como a melhor forma para algumas culturas, como cenoura, roseira, entre outras espécies. Por outro lado, a utilização de nitrogênio na forma amoniacal causa sintomas de toxidez às células e tecidos vegetais, devendo-se utilizar, no cultivo *in vitro*, uma combinação das duas formas de nitrogênio (Sargent & King, 1974). No meio BDS são adicionadas 3 fontes de nitrogênio (N) sob forma de amônio. Talvez este excesso de nitrogênio cause às brotações um efeito tóxico.

O efeito da composição dos meios de cultura sobre o desenvolvimento das cultivares de videira *in vitro* foi constatado também por Roubelakis-Angelakis & Zivanovitch (1991). Vários autores, como Alvarez et al. (1989), no entanto, sugerem que, em várias espécies, as diferentes respostas dos genótipos *in vitro* estão relacionadas ao conteúdo endógeno de hormônios. Os efeitos do genótipo sobre os parâmetros de crescimento *in vitro* foram estudados em 23 cultivares de videira. Os dados obtidos mostraram grandes variações, como por exemplo, o número de nós/planta variou de 4,8 a 8,0. Como no presente estudo, vários autores também observaram uma variabilidade dos parâmetros morfológicos *in vitro* de genótipos de videira (Nali et al., 2005).

Maior número de folhas de 'VR043-43' e 'Kobber 5BB' foi obtido em 50% do meio DSD1 e 100% do meio Kc, respectivamente (Tabela 1). Na Tabela 1 pode-se verificar significância para comprimento da parte aérea dos dois genótipos nos meios MSM, DSD1 e 100% Kc. Maior peso fresco da parte aérea de 'Kobber 5BB' e 'VR043-43' ocorreu somente em meio DSD1 e 100% OM, respectivamente. Estas diferenças nas respostas dos genótipos estudados se devem ao fato de que, esses dois meios possuem formulações diversas de macro e micronutrientes.

Diferenças entre meios de cultivo também foram observadas na micropropagação de um porta-enxerto de *Prunus* sp. (Radmann et al., 2009). Em estudo com quatro diferentes meios, os mesmos autores observaram que os meios QL e WPM permitiram obter melhor desempenho de crescimento das brotações de 'GxN-9'.

Na Tabela 2 verifica-se o desempenho superior e significativo do porta-enxerto Kobber em 50% do meio MSM, para comprimento da maior raiz. Maior número de raízes e comprimento da maior raiz de 'VR043-43' foram obtidos em 50% e 100% de meio DSD1 e 100% do meio de cultivo OM.

O peso da matéria fresca de calos foi afetado pelo genótipo e tipo de meio de cultura utilizado, sendo observado maior peso fresco em explantes de 'Kobber 5BB' multiplicados em 100% de meio MSM e 50% de Kc (Tabela 2). A formação de calos não é desejada na micropropagação de espécies de *Vitis*. Provavelmente os meios de cultura citados acima (100% MSM e 50% Kc) não sejam adequados para multiplicação *in vitro* de explantes de 'Kobber 5BB'. Entretanto, nesses meios de cultivo, explantes de 'VR043-43' teriam menor formação de calos e conseqüentemente, melhor desempenho.

Alguns meios de cultura são considerados ideais na micropropagação de frutíferas de clima temperado. O estabelecimento *in vitro* e a micropropagação de 'Kobber 5BB', 'VR043-43', 'Paulsen 1103' e 'R110' foram realizados com sucesso através de microestacas de gemas axilares multiplicadas em meio de cultura DSD1 (Borghezán et al., 2003).

CONCLUSÕES

Observa-se melhores resultados na micropropagação do porta-enxerto 'R110', com pouca formação de calos; na ausência de BAP e cinetina.

Maior número de brotos do porta-enxerto 'Kobber 5BB' ocorre em meio Kc.

O meio de cultivo que se destaca como mais adequado na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto 'VR043-43' é o DSD1, havendo pouca formação de calos na ausência dos reguladores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, R.; NISSEN, S. J.; SUTTER, E.G. Relationship between índole-3-acetic acid levels in apple (*Malus pumila* Mill) rootstocks cultured *in vitro* and adventitious root formation in the presence of indole 3-butyric-acid. **Plant Physiology**, Rockville, v. 89, p.439-443, 1989.

BIASI, L.A.; PASSOS, I.R.S.; POMMER, C.V. Micropropagação do porta-enxerto de videira Jales. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.33, n.10, p.1587-1594, 1998.

BORGHEZAN, M.; MORAES, L.K.A.; MOREIRA, F.M.; SILVA, A.L. Propagação *in vitro* e avaliação de parâmetros morfofisiológicos de porta-enxertos de videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.7, p. 783-789, 2003.

BOUQUET, A.; TORREGROSA, L. Micropropagation of the grapevine (*Vitis* spp.). In: JAIN, S.M. (Ed.). **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2003. p.319-352.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP; EMBRAPA, CNPH, 1990. p.340-345.

CHÉE, R.; POOL, R.M.; BUCHER, D. A method for large scale *in vitro* propagation of *Vitis*. **New York's Food and Life Sciences Bulletin**, New York, v.109, p.1-9, 1984.

COLETTI, L.S.; MARTINS, C.R.; GOULART, M. Micropropagação de porta-enxerto de videira Paulsen 1103 "in vitro", com diferentes concentrações de citocinina. **Revista FZVA**, Uruguaiana, v.15, n.1, p. 102-108, 2008.

DUNSTAN, D.I.; SHORT, K.C. Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa*. **Physiologia Plantarum**, v.41, p.70-72, 1977.

DZAZIO, P.M.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira '420A'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.3, p.759-764, 2002.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar. 2000, p.225-258.

GRAY, D.J.; BENTON, C.M. Micropropagation and plant establishment of muscadine grape. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v.103, p.300-302, 1990.

GRAY, D.J.; FISHER, L.C. *In vitro* shoot propagation of grape, hybrids and cultivars. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Wruter Haven, v.98, p.172-174, 1985.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, West Palm Beach, v. 15, p. 214-217, 1946.

MACHADO, M.P.; BIASI, L.A.; RITTER, M.; RIBAS, L.L.F.; KOEHLER, H.S. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de videira 'VR043-43' (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.4, p.648-655, 2006.

MHATRE, M.; SALUNKHE, C.K.; RAO, P.S. Micropropagation of *Vitis vinifera* L: towards na improved protocol. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.84, p.357-363, 2000.

MOREIRA, F.M. **Avaliação morfo-fisiológica e bioquímica do porta-enxerto de videira "Paulsen 1103" *in vitro***. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2000, 91p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhaguen, v.15, p.473-497, 1962.

NALI, L.R.; ALMEIDA, W.A.B.; MELO, N.F. Propagação *in vitro* de videiras. **Magistra**, Cruz das Almas, v.17, n.2, p.96-100, 2005.

NOVÁK, F.J.; JUVOVÁ, Z. Clonal propagation of grapevine through *in vitro* axillary bud culture. **Scientia Horticulturae**, v.18, n.3, p.231-240, 1983.

RADMANN, E.B.; BIANCHI, V.J.; SOUZA, T.M.; FACHINELLO, J.C.; OLIVEIRA, R.P. Influência da composição do meio de cultivo e do tipo de explante na

micropropagação do porta-enxerto de *Prunus* sp. 'GxN-9'. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.10, n.2, p.95-101, 2009.

ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A.; ZIVANOTIC, S. B. A new culture medium for *in vitro* rhizogenesis of grapevine (*Vitis* spp.) genotypes. **HortScience**, Alexandria, v. 26, n.12, p.1551-1553, 1991.

RUGINI, E. *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. **Scientia Horticulture**, v.24, p.123-134, 1984.

SARGENT, P.A.; KING, J. Investigations of growth promoting factors in conditioned soybean root cells and in the liquid medium in which they grow: ammonium, glutamine, and amino acids. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.52, n.7, p.1747-1755, July 1974.

SILVA, A.L.; DOAZAN, J. P. Une méthode d'irradiation aux rayons gamma appliquée à des porte-greffes de Vigne *in vitro*. **Journal International of Science of Vigne et Vin**, v. 29, p.1-9, 1995.

SILVA, A.L.; HARISCAIN, P.; OLLAT, N.; DOAZAN, J.P. Comparative *in vitro* development of five grapevine rootstock varieties and mutants from the cultivar 'Gravesac'. **Acta Horticulturae**, v.528, p.51-358, 2000.