

# CULTURA IN VITRO DE MERISTEMAS DE VIDEIRA. I. CONCENTRAÇÕES DO HORMÔNIO 6-BA EM MEIO PRIMÁRIO <sup>(1)</sup>

ILENE RIBEIRO DA SILVA PASSOS <sup>(2, 5)</sup>, MARO RAN-IR SONDAHL <sup>(3)</sup>,  
IVAN JOSÉ ANTUNES RIBEIRO <sup>(4)</sup>, MAURILO MONTEIRO TERRA <sup>(2, 5)</sup>,  
e ERASMO JOSÉ PAIOLI PIRES <sup>(2, 5)</sup>

## RESUMO

Visando desenvolver metodologia para cultura de meristemas de videira in vitro foram testadas quatro doses do hormônio 6-BA (6-benzilaminopurina) em meio primário, o qual constou do meio básico de Nitsch & Nitsch. Brotos apicais do cultivar A Dona foram esterilizados, os meristemas com um ou dois primórdios foliares foram excisados e, após breve período de pré-incubação, inoculados em meio primário. Os explantes foram avaliados quanto a viabilidade, tamanho, número de folhas e rapidez no desenvolvimento, concluindo-se que as duas doses intermediárias, quais sejam, 2,0 e 5,0  $\mu\text{M}$  de 6-BA foram as mais apropriadas para utilização em meio primário para o cultivar A Dona.

**Termos de indexação:** cultura in vitro; videira; 6-BA (6-benzilaminopurina).

## 1. INTRODUÇÃO

Os híbridos apirenos IAC 'A Dona', 'Iracema', 'Aurora' e 'Maria' possuem bagas de tamanho pequeno, e as tentativas de aumentá-las mediante

---

<sup>(1)</sup> Recebida para publicação em 10 de maio de 1984.

<sup>(2)</sup> Seção de Viticultura, Instituto Agrônomo (IAC), Caixa Postal 28, 13100 – Campinas (SP).

<sup>(3)</sup> Seção de Genética, IAC.

<sup>(4)</sup> Seção de Microbiologia Fitotécnica, IAC.

<sup>(5)</sup> Com bolsa de suplementação do CNPq.

duplicação do número de cromossomos pela aplicação de colchicina têm sido infrutíferas. Este fato provavelmente se deva à constituição de suas gemas, envoltas por grande número de folhas, alta cerosidade e pêlos. Todavia, a poliploidia no caso dos cultivares apirenos, seria muito vantajosa, pois o tamanho das bagas poderia ser aumentado, com positivos reflexos econômicos.

Durante as últimas duas décadas, a cultura de meristema tem sido extensivamente utilizada na propagação agâmica, em vista da rapidez com que se consegue a multiplicação de diversos vegetais e da estabilidade genética intrínseca às células do meristema (KARTHA, 1981). A aplicação mais importante dessa técnica, de acordo com KARTHA (1981), é a produção de clones livres de patógenos, especialmente vírus, e a sua manutenção pela técnica de criopreservação. Esses foram também os objetivos de BARLASS et alii (1982) e NOVAK & JUVOVÁ (1983) em seus trabalhos com videira.

BARLASS & SKENE (1983) descreveram um método rápido para obtenção de plantinhas de videira, fragmentando brotos apicais e utilizando cultura líquida no meio primário. Após testarem vários hormônios, BARLASS & SKENE (1980b) concluíram que o mais adequado é a citocinina 6-benzilaminopurina (6-BA). Utilizando  $10,0\mu\text{M}$  de 6-BA obtiveram em meio primário o que denominaram de "estruturas semelhantes a folhas" originadas de primórdios foliares, que em meio secundário proliferaram a partir de suas bases (BARLASS & SKENE, 1980a). NOVAK & JUVOVÁ (1983) estudaram também diversos hormônios e concentrações para o desenvolvimento em meio primário, determinando a concentração de  $10,0\mu\text{M}$  de 6-BA como a mais apropriada.

Visando, então, à obtenção e multiplicação de clones de videira livres de vírus e cultivares apirenos com bagas de maior tamanho mediante a poliploidização, iniciou-se uma série de testes com a finalidade de desenvolver metodologia sobre a cultura de meristema em videira. Em observações preliminares, doze meios de cultura foram avaliados, sendo alguns com auxinas e acrescidos de citocininas, outros acrescidos de ácido giberélico e, finalmente, meios com altas concentrações de citocininas (maiores de  $10,0\mu\text{M}$  de 6-BA), sem que resultados realmente satisfatórios fossem obtidos.

Neste trabalho, estudaram-se os efeitos de níveis variados de 6-BA no meio primário, visando à determinação da concentração ideal de 6-BA para a cultura de meristema do cultivar apireno A Dona.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados brotos apicais de videira do cultivar A Dona (híbrido complexo IAC), coletados em condições de campo no Centro Experi-

mental de Campinas e na Estação Experimental de Jundiaí, ambos pertencentes ao Instituto Agrônomo de Campinas, e no Sítio Extra-Vitis, de propriedade do Sr. Luís Carbonari, localizado no bairro do Traviú, em Jundiaí (SP).

Os brotos apicais, logo após sua coleta, passaram por uma primeira lavagem em água corrente de torneira e foram esterilizados com uma solução comercial de hipoclorito de sódio na concentração de 20%, sob agitação durante vinte minutos. A seguir, sofreram três-quatro lavagens sucessivas com água destilada esterilizada, por dez minutos sob constante agitação.

Os brotos apicais foram dissecados em câmara asséptica de fluxo laminar, sob lupa estereoscópica, tirando-se cada uma de suas folhas e escamas que recobrem o meristema, com a ajuda de agulhas e lâminas montadas em varetas. O meristema exposto foi cortado com dois ou mais primórdios foliares, para garantir sua sobrevivência *in vitro*, e transferido para o meio de pré-incubação ou meio de placa.

O meio de pré-incubação constou, por litro, de: soluções de macronutrientes de MURASHIGE & SKOOG (1962), na metade das concentrações; solução de micronutrientes de NITSCH & NITSCH (1969) também na metade das concentrações; solução de vitaminas de NITSCH & NITSCH (1969) em sua concentração normal; inositol: 10ml de uma solução 550 $\mu$ M; cisteína: 10ml de uma solução 500 $\mu$ M; sacarose 30g; carvão ativado: 4g; ágar: 7g. O pH foi ajustado para 5,5.

Após um a cinco dias de permanência no meio de pré-incubação, fez-se a contagem do número de meristemas inviáveis (oxidados ou contaminados) e dos viáveis. Estes últimos foram transferidos sob condição de câmara asséptica de fluxo laminar para os meios primários diferenciados (tratamentos). O meio primário constou, por litro, de: solução salina de NITSCH & NITSCH (1969), com o nitrogênio na forma de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  colocado em dobro e os micronutrientes na metade das concentrações; inositol: 10ml de uma solução 550 $\mu$ M; cisteína: 10ml de uma solução 500 $\mu$ M. O pH foi ajustado para 5,5.

A fim de verificar o nível hormonal mais adequado de 6-BA necessário ao desenvolvimento inicial do meristema, utilizaram-se quatro concentrações: 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 $\mu$ M, para os tratamentos 1, 2, 3 e 4 respectivamente.

Foram utilizadas cinco repetições, correspondentes às diferentes datas de inoculação em meio de pré-incubação (12/9/83; 29/9/83; 5/10/83; 6/10/83 e 18/10/83). O número de meristemas empregados foi variável entre as diversas repetições, a saber: 51, 37, 72, 110 e 12, para a primeira, segunda, terceira, quarta e quinta repetição respectivamente, em vista das suas diferen-

tes disponibilidades. Em cada frasco contendo o meio primário, foram colocados até quatro meristemas.

Os explantes, uma vez inoculados no meio primário, foram constantemente observados, transferindo-se os sadios para um frasco com meio de cultura equivalente, quando se constatava contaminação no meio.

Foram realizadas duas avaliações gerais dos explantes, a primeira em 2/11/83 e, a segunda, em 2/12/83, considerando-se o número de meristemas viáveis que se encontravam nos três primeiros estádios de desenvolvimento, sem a presença de folhas (avaliação visual do aumento do diâmetro do meristema, sendo o estádio 1, o menor), o número de plantinhas viáveis que possuíam uma, duas ou mais de duas folhas, o número de meristemas com calo e o de meristemas estagnados, oxidados ou contaminados.

Com base nos totais de tratamentos, calculou-se para cada um deles a participação percentual de cada item avaliado em relação aos respectivos números de meristemas inoculados em meio primário, sendo os tratamentos comparados segundo a magnitude dos valores obtidos. Para esse cálculo, o número de meristemas considerados no tratamento 1 foi 69; no 2, 74; no 3, 65 e, no 4, 51, totalizando 259 meristemas. Esse número diferiu um pouco do total das repetições mencionadas, pois 23 meristemas, em estádios iniciais, foram perdidos.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores obtidos na avaliação feita um a cinco dias após inoculação no meio de pré-incubação revelaram a ocorrência de poucas perdas de explantes (11%) nessa primeira fase. Com base em experimentos preliminares, infere-se que seriam ainda menores à medida que se dispusesse de material de campo mais vigoroso e sob melhores condições de assepsia, tanto na sala de transferência quanto nos instrumentos.

Na primeira avaliação da fase seguinte, isto é, que diz respeito ao teste de concentrações de 6-BA, não foi possível dispor de dados concretos para norteio exato de procedimento, pelo pouco tempo de permanência dos explantes no meio primário. O número de meristemas diferenciados foi apenas de 5 (do total de 282 explantes inoculados), ocorrendo 1 para  $1,0\mu\text{M}$  de 6-BA, 2 para  $2,0\mu\text{M}$ , 1 para  $5,0\mu\text{M}$  e 1 para  $10,0\mu\text{M}$ . Entretanto, nos experimentos de BARLASS & SKENE (1983), em meio primário, os autores conseguiram a diferenciação dos meristemas em "estruturas semelhantes a folhas" em um mês, utilizando meio líquido e  $10,0\mu\text{M}$  de 6-BA. Evita-se, porém, a utilização de meio líquido por causa do risco de se perder grande parte do material por contaminação. O meio líquido, contudo, talvez possa

ser vantajoso em relação ao meio sólido, acelerando o processo de diferenciação, graças ao maior contato do meio de cultura com o explante.

Um mês após a avaliação anterior, fez-se uma segunda avaliação dos materiais em meio de cultura primário, cujos resultados constam do quadro 1. Nesta, os meristemas viáveis puderam ser classificados segundo seis estádios progressivos de desenvolvimento, sendo os três primeiros e os três últimos relativos à ausência (explante) e à presença de folhas (plantinha) respectivamente.

Quanto aos meristemas inviáveis, isto é, os estagnados, os oxidados e os contaminados, os únicos que independem dos tratamentos são os contaminados e, de acordo com o quadro 1, foram os que ocorreram em maior porcentagem. Para os oxidados, não se nota nenhuma tendência com o aumento das doses. Para os estagnados, contudo, nota-se certa tendência à diminuição da porcentagem com o aumento da dose, o que está coerente com a função do hormônio 6-BA, que é promover o desenvolvimento e diferenciação do meristema.

A ocorrência de calo não é esperada nem desejada neste caso. Não é esperada porque se utilizou apenas um tipo de hormônio, qual seja, a citocinina 6-BA. Não é desejada, pois não se quer diferenciação a partir de células de calo que, devido à sua instabilidade genética, poderiam provocar variabilidade no material. Sua ocorrência, no entanto, pode ser causada por uma contaminação no meio de cultura, por alguma auxina. De acordo com os dados do quadro 1, nota-se que essa ocorrência foi baixa, e parece não ter relação com os níveis de 6-BA utilizados.

Nota-se ainda, quanto aos meristemas viáveis, que no tratamento 1 a diferenciação dos explantes foi lenta: a maior porcentagem concentra-se nos estádios 1 e 2 (56%), havendo ainda 7% do tamanho 3 e 12% nos estagnados, com um total de 75% em estádios iniciais, com três meses em meio de cultura. Isso contra 69% do tratamento 2, 52% do 3 e 48% do 4. Evidencia-se, assim, que  $1,0\mu\text{M}$  de 6-BA foi uma concentração muito baixa para o desenvolvimento e diferenciação dos meristemas. Nesse tratamento, entretanto, obtiveram-se as "estruturas semelhantes a folhas" (Figura 1a), descritas por BARLASS & SKENE (1983), quando utilizaram  $10,0\mu\text{M}$  de 6-BA em meio primário líquido para meristemas fragmentados de videira. Segundo os mesmos autores, transferindo-se tais estruturas para um meio secundário, cuja única diferença do anterior é ser geleificado com ágar, elas proliferam a partir de suas bases, propiciando grande multiplicação do material.

Para o tratamento 4, no qual se utilizaram  $10,0\mu\text{M}$  de 6-BA, porém, os meristemas do cultivar A Dona concentraram-se também nos estádios iniciais, sendo que nos 8% com folhas, estas se encontravam atrofiadas,

QUADRO 1 – Dados, na segunda avaliação em meio primário, referentes aos explantes e plantinhas de videira obtidos in vitro para o cultivar A Dona

Tratamento	6-BA	Tamanho			Folha			Meristema				Total inoculado
		1	2	3	Uma	Duas	Mais de duas	Estagnado	Oxidado	Contaminado	Com calo	
	$\mu\text{M}$								%			
1	1,0	28	28	7	10	1	0	12	1	12	1	100
2	2,0	23	22	15	11	5	3	9	4	8	0	100
3	5,0	9	31	9	8	5	3	3	6	25	2	100
4	10,0	24	24	0	8	0	0	0	4	39	2	100

evidenciando que a quantidade de hormônio para esse cultivar foi excessiva.

A maior porcentagem de plantinhas foi obtida nos tratamentos 2 (Figura 1b) e 3 (Figura 1c), os únicos que apresentaram plantinhas com mais de duas folhas, as quais possuíam aspecto normal.

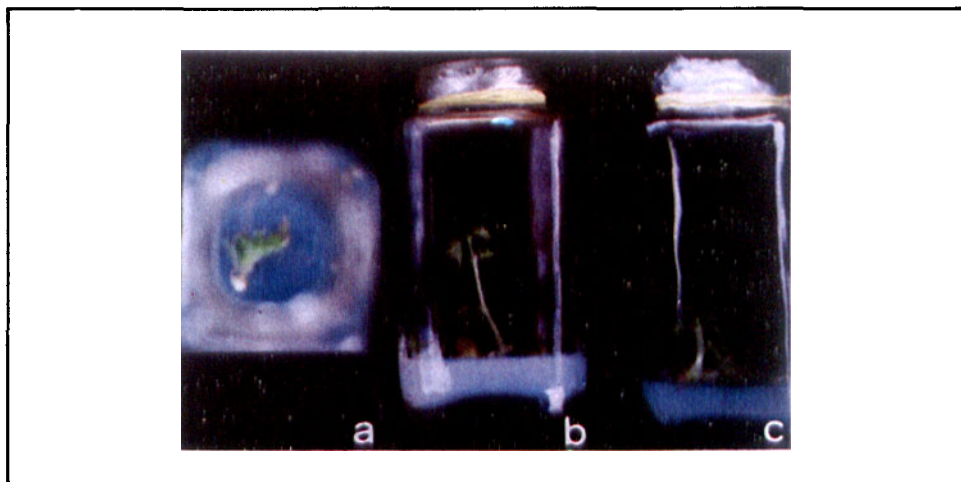


FIGURA 1 – Aspecto médio das plantinhas de 'A Dona' cultivadas in vitro. a: Tratamento 1, onde se utilizou  $1\mu\text{M}$  de 6-BA. b: Tratamento 2, onde se utilizaram  $2,0\mu\text{M}$  de 6-BA. c: Tratamento 3, onde se utilizaram  $5,0\mu\text{M}$  de 6-BA.

Desse modo, foram definidos os níveis de  $2,0$  e  $5,0\mu\text{M}$  de 6-BA como os mais adequados a utilizar em meio primário, quando se cultivam in vitro meristemas de videira do 'A Dona'.

## SUMMARY

IN VITRO CULTURE OF GRAPEVINE MERISTEM.  
I. 6-BA CONCENTRATION IN PRIMARY MEDIUM

Aiming at the development of a methodology for 'in vitro' grapevine meristem tip culture, the effects of four concentrations (1.0; 2.0; 5.0 and 10.0  $\mu\text{M}$ ) of 6-BA (6 benzylaminopurine) cytokinin on growth and development of grapevine 'A Dona' isolated meristem tips in primary medium using basal medium of Nitsch & Nitsch were tested. Shoot tips were sterilized, meristems were then excised and after a brief period of pre-incubation were inoculated in primary medium. Viability, size, number of leaves and development speed of those meristem tips were studied. The concentrations of 2.0 and 5.0  $\mu\text{M}$  seemed to be the most appropriate to seedless A Dona cultivar.

**Index terms:** in vitro culture; grapevine; 6-BA (6-benzylaminopurine)

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARLASS, M. & SKENE, K.G.M. *In vitro* propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices. *Vitis*, 17:335-340, 1983.
- \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Studies on the fragmented shoot apex of grapevine. I. The regenerative capacity of leaf primordial fragments *in vitro*. *Journal of Experimental Botany*, 31(121):483-488, 1980a.
- \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Studies on the fragmented shoot apex of grapevine. II. Factor affecting growth and differentiation *in vitro*. *Journal of Experimental Botany*, 31(121):489-495, 1980b.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; WOODHAM, R.C. & KRAKE, L.R. Regeneration of virus-free grapevines using *in vitro* apical culture. *Annals of Applied Biology*, 101:291-295, 1982.
- KARTHA, K.K. Meristem culture and cryopreservation — methods and application. In: THORPE T.A., ed. *Plant cell tissue and organ culture*. Berlin, Springer, 1981. p.181-211.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497, 1962.
- NITSCH, J.P. & NITSCH, C. Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163:85-87, 1969.
- NOVAK, F.J. & JUVOVÁ, Z. Clonal propagation of grapevine through "in vitro" axillary bud culture. *Scientia Horticulturae*, 18:231-240, 1983.