

ORGANOGENESE IN VITRO DE VIDEIRA

Luiz Ronaldo Nali¹; Weliton Antonio Bastos de Almeida²; Nataniel Franklin de Melo³

¹Mestre em Ciências Agrárias, Fitotecnia, Universidade Federal da Bahia. C.P.: 082, CEP: 44380-000, Cruz das Almas-BA. e-mail: ronaldonali@uol.com.br

²Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Campus Universitário. CEP: 44380-000, Cruz das Almas-BA. e-mail: weliton@ufba.br

³Embrapa Semi-Árido. C.P.: 23, CEP: 56300-970, Petrolina-PE. e-mail: nataniel@cpatsa.embrapa.br

RESUMO: A produção de uvas de mesa e de vinho destaca-se entre as principais atividades do agronegócio irrigado do Vale do São Francisco. Os programas de melhoramento são fundamentais para a sustentabilidade da atividade. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da N6-benzilaminopurina (BAP), na organogênese *in vitro* de sete cultivares de videira. Explantes foliares contendo pecíolo foram inoculados em meio NN suplementado com 10 µM, 12,5 µM e 15,0 µM de BAP associados a 0,1 µM NAA e um tratamento controle sem reguladores vegetais. Os explantes permaneceram no escuro por 15 dias e em seguida foram mantidos em condição de fotoperíodo de 16 horas por 60 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 7 x 4, com quatro repetições. Os parâmetros avaliados aos 75 dias da inoculação foram: percentagem de explantes responsivos (PER) e índice de regenerantes por explante (IR/E), sendo o último estabelecido por meio de notas: (0) ausência; (1) 1 a 3; (2) 4 a 7 e (3) acima de 7 regenerantes. A percentagem de explantes responsivos variou de 0% na cultivar Benitaka, até 50% na cultivar Thompson Seedless. O aumento nas concentrações de BAP produziu diferenças significativas no IR/E para as cultivares Petit Shiraz, Crimson Seedless e Superior Seedless. De modo geral, os explantes inoculados na ausência de reguladores vegetais não responderam à indução da organogênese. As cultivares com índice acima de 7 regenerantes por explante foram Petit Shiraz e Red Globe, utilizando-se 15,0 µM e 10,0 µM de BAP, respectivamente.

Palavras-chave: *Vitis*, propagação, cultura de tecidos

IN VITRO ORGANOGENESIS OF GRAPEVINE

ABSTRACT: Viticulture is an important economical activity in the irrigated São Francisco river Valley. The breeding programs are basic for the sustainability of the activity. The objective of this research was to evaluate the effect of N6-benzylaminopurin (BAP) in the *in vitro* organogenesis of seven grapevine cultivars. Leaf explants with petiole were inoculated in NN culture medium, supplemented with: 10 µM, 12.5 µM e 15.0 µM BAP associated with 0.1 µM NAA and a control without growth regulators. The experiment was completely randomized design, in a factorial scheme, with seven cultivars, four treatments and four replicates. The parameters evaluated 75 days after the inoculation were: percentage of explant regeneration (PER) and rate of regenerants per explant (IR/E), through a rating system: (0) absence; (1) 1 - 3; (2) 4 - 7; (3) more than 7 regenerants. The percentage of explant regeneration varied from 0%, in the cultivar Benitaka up to 50%, in the cultivar Thompson Seedless. Increased concentrations of BAP promoted significant differences in the IR/E for cultivars Petit Shiraz, Crimsom Seedless and Superior Seddless. Control explants of all cultivars did not respond to the organogenesis induction. The cultivars with more than 7 regenerants per explant were Petit Shiraz and Red Globe, with 15.0 µM BAP and 10.0 µM BAP, respectively.

Key words: *Vitis*, propagation, tissue culture

INTRODUÇÃO

A vitivinicultura destaca-se como uma das principais atividades do agronegócio irrigado do Vale do Rio São Francisco, representando aproximadamente 95% das exportações nacionais de uvas finas para mesa, e com participação crescente no setor vinícola

nacional (Anuário Brasileiro de Fruticultura, 2004). Por outro lado, a deficiência de materiais adaptados à região, especialmente apirênicos, aliado à suscetibilidade a doenças e pragas têm aumentado os custos de produção (Camargo et al., 1997). Neste caso, os trabalhos de melhoramento genético, através de métodos convencionais, resultam muitas vezes em

alterações indesejáveis no genoma de variedades tradicionais. Assim, a transformação genética, uma técnica não convencional, tem sido proposta com o objetivo de acelerar os programas de melhoramento e superar as barreiras de incompatibilidade entre as espécies (Meredith, 1996).

Um pré-requisito essencial para o sucesso dessa técnica biotecnológica é o desenvolvimento de protocolos de regeneração e obtenção de clones idênticos à planta matriz em condições *in vitro* (Monette, 1988). Neste sentido, alguns processos morfogênicos, como formação de gemas e raízes (organogênese) ou embriões somáticos (embriogênese) são muito utilizados. Entretanto, para o êxito destes, tornam-se indispensáveis os conhecimentos resultantes do desenvolvimento de áreas da bioquímica, fisiologia e genética de plantas (Ramalho e Santos, 1990).

A regeneração de videiras via organogênese *in vitro* tem sido descrita a partir de diferentes explantes, tais como folhas peciolares (Stamp et al., 1990; Pêros et al., 1998), lâmina foliar (Martinelli et al., 1996), pecíolos (Tang e Mullins, 1990), segmentos internodais (Rajasekaran e Mullins, 1981) e brotos proliferativos (Mezetti et al., 2002). Em todos os trabalhos citados, o adicionamento de reguladores vegetais, principalmente citocininas, foi fundamental para a resposta organogênica.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da N6-benzilaminopurina (BAP) no processo de regeneração via organogênese *in vitro*, em sete cultivares de videira.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do explante

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semi-Árido em Petrolina-PE no período 2003-2004. Foram utilizadas plantas *in vitro*, obtidas a partir de gemas axilares, das cultivares de videira Cabernet Sauvignon, Petit Shiraz, Benitaka, Red Globe, Superior Seedless, Thompson Seedless e Crimson Seedless (uvas para vinho, apirênicos e com semente), cultivadas no Vale do Rio São Francisco. Segmentos nodais, com aproximadamente 0,5 cm de comprimento, foram excisados das plantas cultivadas *in vitro* e inoculados em tubos de ensaio (150 x 25 mm) contendo 15 mL de meio Galzy (Galzy, 1964) suplementado com 4,4 μM de BAP (benzilaminopurina), 2 mg L⁻¹ de glicina, 100 mg L⁻¹ de inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 5 g L⁻¹ de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. O material foi mantido por 30 dias em condição de fotoperíodo de 16 h, 25 °C e intensidade luminosa de 40 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$. As duas folhas superiores mais desenvolvidas das brotações obtidas foram excisadas com

parte do pecíolo e tiveram sua nervura central cortada transversalmente, e estas foram utilizadas como explantes.

Indução da organogênese *in vitro*

Os explantes foram inoculados em embalagem de vidro (12 cm de altura por 8 cm de diâmetro) com tampa de rosca, contendo 50 mL de meio e introduzidos com sua face adaxial sobre meio de cultura NN (Nitsch e Nitsch, 1969), suplementado com 2 mg L⁻¹ de glicina, 100 mg L⁻¹ de inositol, 20 g L⁻¹ de sacarose e as seguintes combinações de reguladores vegetais: 10,0 μM , 12,5 μM , 15,0 μM de BAP, associadas a 0,1 μM ANA e um controle com ausência de reguladores vegetais. O meio foi solidificado com 5 g L⁻¹ de ágar e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120 °C por 20 minutos. As culturas foram incubadas durante as duas primeiras semanas em condição de escuro. A partir da segunda semana foram colocadas em condição de fotoperíodo de 16 h, 25 °C e intensidade luminosa de 40 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 4 (combinações de reguladores de crescimento) x 7 (cultivares) e quatro repetições, com seis explantes por parcela. A avaliação do percentual de explantes responsivos (PER) (aqueles com gemas e/ou brotos) e o índice de regenerantes por explante (IR/E) (número de gemas e/ou brotos) foi realizada aos 75 dias após a inoculação dos explantes. O IR/E foi avaliado por um sistema de notas, segundo observação em microscópio estereoscópico, sendo: (0) ausência; (1) de 1 a 3; (2) de 4 a 7; (3) acima de 7 regenerantes. Os dados foram transformados para $\sqrt{x + 1}$ e analisados utilizando o programa estatístico SisVar (Sistema de análise de variância) (Ferreira, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os explantes regenerativos apresentaram formação de calo na região do corte peciolar nos primeiros 15 dias de cultivo, com coloração clara e tornando-se esverdeados quando colocados na condição de luz. A partir da transferência para a condição de luminosidade, observou-se maior atividade organogênica na base do pecíolo e na região adjacente (faces abaxial e adaxial) dos explantes, com formação assíncrona de brotos, folhas, gemas e calos associados ao explante original (Figura 1a-c), caracterizando uma organogênese indireta. Por outro lado, ocorreu formação de gemas adventícias em menor intensidade na parte excisada da região das nervuras da lâmina foliar, também com prévia formação de calos. A origem das gemas verificadas foi similar à citada por Colby et al. (1991), que em estudos anatômicos de brotações adventícias em folhas com pecíolo em

videira, observaram a presença de três regiões distintas no pecíolo com aparente atividade meristemática. Da mesma forma, Torregrosa e Bouquet (1996) descreveram a iniciação do promeristema na camada externa de células próxima à região peciolar excisada.

Os resultados também mostraram diferenças genotípicas significativas entre cultivares de videira, em relação à competência e determinação dos explantes. Houve variação no percentual de explantes responsivos, com taxa de 0%, para a cultivar Benitaka, até 50% na cultivar Thompson Seedless, conforme observado na Tabela 1. A análise do percentual de explantes responsivos (PER), para o grupo de genótipos estudados, mostra que as cultivares apirênicas Thompson Seedless e Crimson Seedless apresentaram os maiores PER na concentração de 10 μM BAP com 50,0 e 41,7%, respectivamente, sendo significativamente diferente das outras cultivares nesta concentração. Observou-se ainda que o aumento da concentração de BAP nestas cultivares, proporcionou efeito antagônico no percentual de explantes responsivos. Já nas cultivares Petit Shiraz e Superior Seedless, à medida que se aumentou a concentração de BAP houve efeito positivo no percentual de explantes responsivos, obtendo-se 30,8 e 33,3 %, respectivamente, na concentração de 15,0 μM de BAP. Para as cultivares Red Globe e Cabernet Sauvignon, o maior

percentual foi obtido na concentração de 12,5 μM , com 13,0 e 16,7 %, respectivamente, a partir da qual houve decréscimo na resposta organogênica, embora na cultivar Cabernet Sauvignon não houve diferença significativa entre as concentrações de 12,5 e 15,0 μM de BAP. Entretanto, os explantes da cultivar Benitaka, apresentaram descoloração lâminar e necrose intensa nas partes excisadas, não respondendo à regeneração adventícia. Este fato, também ocorreu no tratamento com ausência de reguladores vegetais em todas as cultivares.

A influência do genótipo na capacidade de regeneração, verificada neste trabalho, já foi reportada por alguns autores em videira (Martinelli et al., 1996; Peres et al., 1999). Nesse caso, vários fatores são considerados como responsáveis pelas diferentes respostas organogênicas verificadas nas distintas cultivares. Dentre estes, destaca-se que no processo de regeneração, explantes com intensidades variadas de determinação celular adquirem nova competência, através da ação de sinais químicos (balanço hormonal citocinina/auxina), que ativam seletivamente determinado grupo de genes (epigênese), ocorrendo diferentes respostas na formação de calos, gemas e/ou embriões (Segura, 1993). Além disso, para Cary et al. (2001), a falha de competência de um tecido reflete a falta de receptores para a classe hormonal utilizada para induzir o processo organogênico.

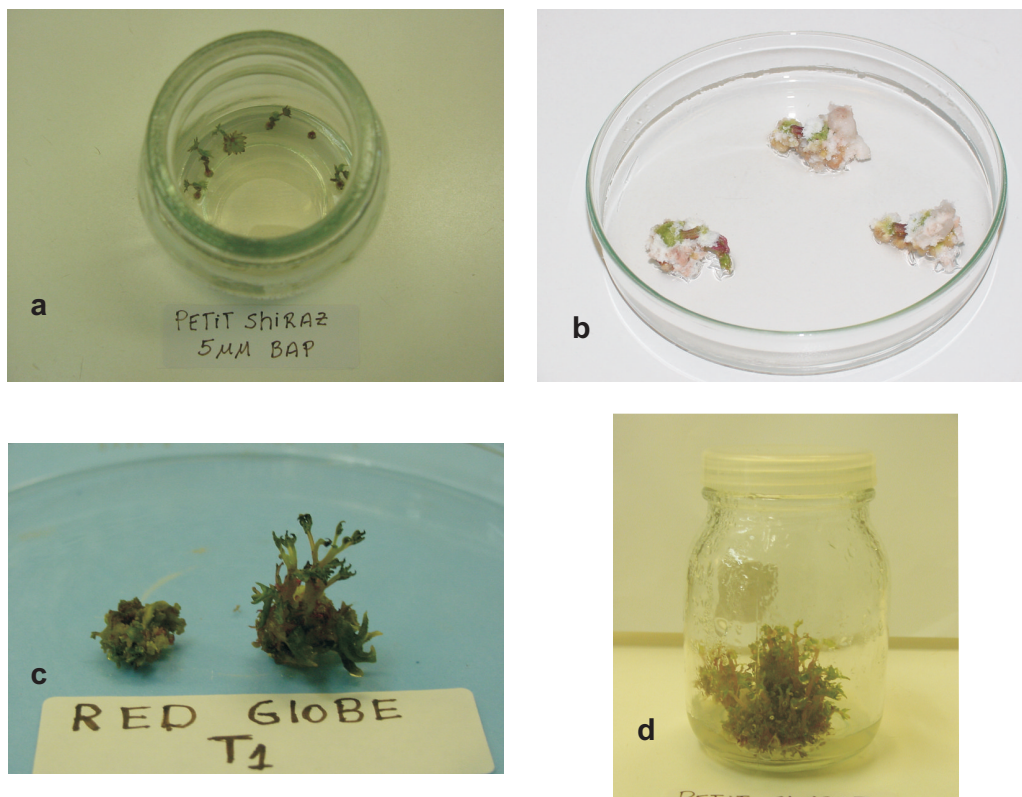


Figura 1 - Organogênese *in vitro* a partir de explantes foliares de videira: a) explantes introduzidos em meio de cultura NN; b) explantes evidenciando formação de calos com 15 dias de cultivo; c) gemas e brotos adventícios formados; d) múltiplas brotações formadas após 75 dias do cultivo *in vitro*.

Tabela 1 - Percentual de explantes responsivos (PER) das cultivares Petit Shiraz, Red Globe, Superior Seedless, Thompson Seedless, Crimson Seedless, Cabernet Sauvignon e Benitaka em função de diferentes concentrações de BAP em meio NN. Petrolina-PE.

Cultivares	Concentrações de BAP (M)*		
	10,0	12,5	15,0
Petit Shiraz	6,2 b B	12,5 a B	30,8 a A
Red Globe	11,1 b A	13,0 a A	0,0 b B
Superior Seedless	11,1 b B	28,5 a A	33,3 a A
Thompson Seedless	50,0 a A	33,3 a B	16,6 a B
Crimson Seedless	41,7 a A	20,0 a B	0,0 b C
Cabernet Sauvignon	0,0 b A	16,7 a B	12,5 b B
Benitaka	0,0 b A	0,0 b A	0,0 b A

* Em razão da ausência de BAP no meio não proporcionar resposta nas cultivares, este tratamento não foi considerado na análise estatística.

Valores seguidos pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 0,05 de probabilidade.

O aumento nas concentrações relativas de BAP produziu diferentes respostas para o percentual de explantes responsivos nas cultivares estudadas. Segundo Skoog e Miller (1957), as concentrações absolutas de citocinina e auxina são menos importantes que suas concentrações relativas na indução da organogênese. O efeito das citocininas e auxinas aplicadas ao meio de cultura parece ser o reflexo dessas substâncias alterando o metabolismo hormonal endógeno de citocininas/auxinas nas células vegetais (Peres, 2002). Assim, para as cultivares Red Globe, Thompson Seedless e Crimson Seedless é possível que as mais elevadas concentrações de BAP interagindo com o nível endógeno de citocininas tenham causado efeito fitotóxico, inibindo a diferenciação celular. Por outro lado, para as cultivares Petit Shiraz e Superior Seedless, o suprimento exógeno mais elevado favoreceu à indução da organogênese. É possível que o nível endógeno de citocininas e/ou a quantidade de receptores hormonais sejam baixo, nestas cultivares, necessitando de maiores concentrações exógenas de BAP.

Por outro lado, os resultados relativos ao parâmetro índice de regeneração por explante (IR/E) mostraram que as cultivares Petit Shiraz e Red Globe foram as únicas que obtiveram nota 3, ou seja, apresentaram taxa acima de 7 regenerantes/explantes, quando submetidas às concentrações de 15,0 e

10,0 µM BAP, respectivamente (Figura 2). A avaliação conjunta dos parâmetros estudados (PER e IR/E), mostrou que nem sempre a maior percentagem de explantes responsivos está associada à taxa mais eficiente de regeneração por explante. Estes resultados estão relacionados com as características fisiológicas e morfológicas das células que, segundo Kerbauy (1999), variam em função de fatores genéticos, fatores ligados aos caracteres originados durante a ontogênese e, por último, do ambiente. Com essa análise conjunta dos parâmetros estudados, verifica-se que a cultivar Petit Shiraz foi aquela que proporcionou o maior número de gemas e/ou brotos quando se utilizou a concentração de 15,0 M de BAP. Neste caso, estima-se que é possível obter, em média, 240 brotações após 75 dias do cultivo *in vitro*, nas condições deste trabalho (30% de PER e 8,0 para IR/E).

Trabalhos de transformação genética têm reportado a importância da utilização de explantes não meristemáticos em protocolos de regeneração de plantas *in vitro*, com a finalidade de eliminar ou reduzir a obtenção de plantas quiméricas (Cervera et al., 1998; Almeida et al., 2003). Assim, o sistema de regeneração de plantas *in vitro* obtido neste trabalho, poderá ser utilizado em futuros trabalhos de transferência gênica para as cultivares de videira estudadas, exceto para a cultivar Benitaka que não apresentou resposta organogenética.

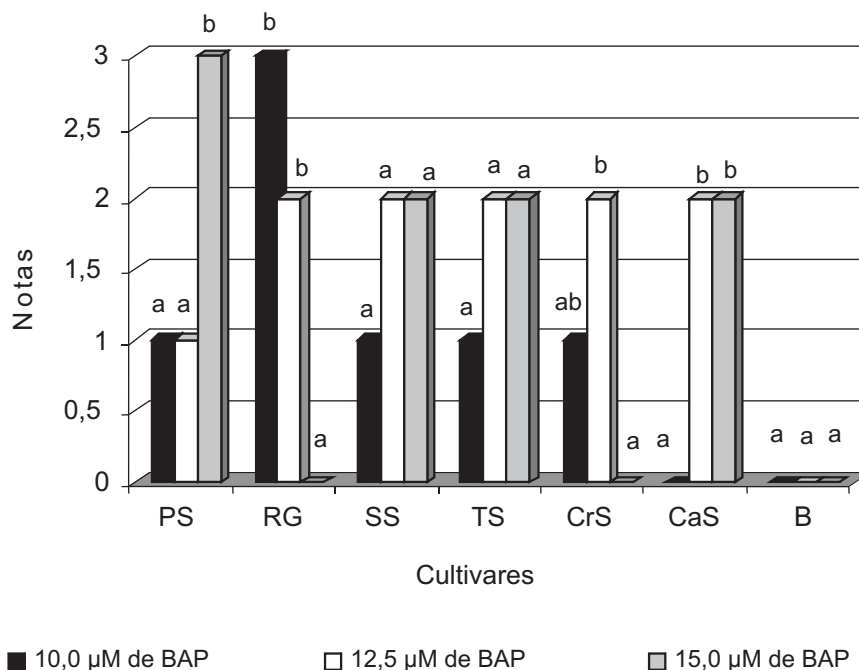


Figura 2 - Índice de regeneração por explante em cultivares de videira PS (Petit Shiraz), RG (Red Globe), SS (Superior Seedless), TS (Thompson Seedless), CrS (Crimson Seedless), CaS (Cabernet Sauvignon) e B (Benitaka), em função de diferentes combinações de BAP. Barras seguidas pela mesma letra, dentro de cada cultivar, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tuckey a 0,05 de probabilidade.

CONCLUSÕES

1. A utilização de BAP é essencial para a resposta organogênica nas cultivares estudadas, exceto para a cultivar Benitaka.

2. As cultivares Thompson Seedless e Crimson Seedless são as que apresentam o maior percentual de explantes responsivos (PER), com 50 e 41,7 %, respectivamente.

3. A cultivar Petit Shiraz, na concentração de 15,0 µM de BAP, apresentou o maior número de gemas e/ou brotos após 75 dias de cultivo *in vitro*.

4. As concentrações de 10,0 µM de BAP para as cultivares Thompson Seedless e Crimson Seedless; 10,0 e 12,5 µM para Red Globe; 12,5 µM para Cabernet Sauvignon; 15,0 µM para Petit Shiraz e 12,5 e 15,0 µM para Superior Seedless, todas elas combinadas com 0,1 µM de ANA, são as que proporcionam os melhores resultados para a organogênese *in vitro*.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, W. A. B.; MOURAO FILHO, F. A. A.; PINO, L. E.; RODRIGUEZ, A. P. M.; MENDES, B. M. J. Genetic transformation and plant recovery from mature tissues

of *Citrus sinensis* L. Osbeck. **Plant Science**, n. 164, p. 203-211, 2003.

Anuário Brasileiro da Fruticultura 2004. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2004. p. 32-39.

CAMARGO, U. A.; MASHIMA, C. H.; CZERMAINSKI, A. B. C. **Avaliação de cultivares de uvas apirênicas no Vale do São Francisco**. Bento Gonçalves: Embrapa-CNPUV, 1997. 8p. (Embrapa-CNPUV. Comunicado Técnico, 26).

CARY, A.; UTTAMCHANDANI, S. J.; SMETS, R.; VAN ONCKELEN, H. A.; HOWELL, S. H. H. *Arabidopsis* mutants with increased organ regeneration in tissue culture are more competent to respond to hormonal signals. **Planta**, Berlin, v. 213, p. 700-707, 2001.

CERVERA, M. et al. Genetic transformation and regeneration of mature tissue of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. **Transgenic Research**, v. 7, p. 51-59, 1998.

COLBY, S. M.; JUNCOSA, A. M.; MEREDITH, C. P. Cellular differences in *Agrobacterium* susceptibility and regenerative capacity restrict the development of transgenic grapevines. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 116, p. 351-361, 1991.

- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância), para Windows 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCarlos, 2000. p. 255-258.
- GALZY, R. Technique de thermothérapie des virus de la vigne. **Annales des Epiphyties**, Paris, v. 15, p. 245-256, 1964.
- KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. E.; BUSSO, J. A.(Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, SPI; Embrapa-CNPQ, v. 2, p. 519-531, 1999.
- MARTINELLI, L.; POLETTI, V.; BRAGAGNA, P.; POZNANSKI, E. A study on organogenic potential in the *Vitis* genus. **Vitis**, Geneva, NY, v. 35, n. 4, p. 159-161, 1996.
- MEREDITH, C. P. GENERAL ASSEMBLY OF THE OIV, 76th, 1996. Cape Town, Republic of South Africa. **Proceedings...** Cape Town: OIV, 1996.
- MEZZETTI, B.; PANDOLFINI, T.; NAVACCHI, O.; LANDI, L. Genetic transformation of *Vitis vinifera* via organogenesis. **BMC Biotechnology**, v. 2, n.18, 2002. Disponível em <<http://www.biomedcentral.com>>. Acesso em: (02 jun. 2004).
- MONETTE, P. L. Grapevine (*Vitis vinifera* L.). In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin:Springer-Verlag, v. 6, p. 3-37. 1988.
- NITSCH, J. P.; NITSCH, C. Haploid plants from pollen grains. **Science**, Washington, v. 163, p. 85-87, 1969.
- PERES, L. E. P.; AMAR, S.; KERBAUY, G. B.; SALATINO, A.; ZAFFARI, G. R.; MERCIER, H. Effects of auxin-cytokinin and ethylene treatments on the endogenous ethylene and auxin-to-cytokinin ratio related to direct root tip conversion of *Catsetum fimbriatum* Lindl.(Orchidaceae) into buds. **Journal Plant Physiology**, Stuttgart, v. 155, p. 551-555, 1999.
- PERES, L. E. P. As bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*: um conhecimento útil para o desenvolvimento de protocolos biotecnológicos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, Ano IV, número 25, p. 44-48, 2002.
- PÈROS, J. P.; TORREGROSA, L.; BERGER, G. Variability among *Vitis vinifera* cultivars in micropropagation, organogenesis and antibiotic sensitivity. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, n. 319, p. 171-179, 1998.
- RAJASEKARAN, K.; MULLINS, M. G. Organogenesis in interno de explants of grapevines. **Vitis**, Geneva, NY, v. 20, p. 218-227, 1981.
- RAMALHO, M.; SANTOS, J. B. P. **Genética na agropecuária**. São Paulo: Globo, 1990. 359 p.
- SEGURA, J. Morfogénesis *in vitro*. In: BIETO, J. A.; TALON, M. (Ed.). **Fisiologia y bioquímica vegetal**. Madrid: Ed. Interamericana, 1993. 625p.
- STAMP, J. A.; COLBY, S. M.; MEREDITH, C. P. Improved shoot organogenesis from leaves of grape. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 115, p. 1038-1042, 1990.
- SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium Society Experimental Biology**, v. 11, p. 118-131, 1957.
- TANG, F. A.; MULLINS, M. G. Adventitious bud formation in leaf explants of some grapevine rootstock and scion cultivars. **Vitis**, Geneva, NY, v. 29, p. 151-158, 1990.
- TORREGROSA, L.; BOUQUET, A. Adventitious bud formation and shoot development from *in vitro* leaves of *Vitis x Muscadinia* hybrids. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 45, p. 245-52, 1996.

Recebido:01/03/2007

Aceito:21/05/2007