



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS



EIRYANNE FONSECA DE MENEZES

**CULTIVO *IN VITRO*, CITOGENÉTICA E APLICAÇÃO DE FUNGOS
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (GLOMEROMYCOTA) NO
ESTABELECIMENTO *EX VITRO* DE VARIEDADES E DO HÍBRIDO
APIRÊNICO INTRAESPECÍFICO DE VIDEIRA (*VITIS VINIFERA* L.)**

FEIRA DE SANTANA – BA

2013

EIRYANNE FONSECA DE MENEZES

**CULTIVO *IN VITRO*, CITOGENÉTICA E APLICAÇÃO DE
FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES
(GLOMEROMYCOTA) NO ESTABELECIMENTO *EX
VITRO* DE VARIEDADES E DO HÍBRIDO APIRÊNICO
INTRAESPECÍFICO DE VIDEIRA (*VITIS VINIFERA* L.)**

FEIRA DE SANTANA – BA

2013

EIRYANNE FONSECA DE MENEZES

**CULTIVO *IN VITRO*, CITOGENÉTICA E APLICAÇÃO DE
FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES
(GLOMEROMYCOTA) NO ESTABELECIMENTO *EX
VITRO* DE VARIEDADES E DO HÍBRIDO APIRÊNICO
INTRAESPECÍFICO DE VIDEIRA (*VITIS VINIFERA* L.)**

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

Orientador: Dr. Nataniel Franklin de Melo (Embrapa Semiárido/UEFS)

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Mayumi Yano de Melo (UNIVASF)

FEIRA DE SANTANA – BAHIA

2013

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

M51c Menezes, Eiryanne Fonseca de
Cultivo *in vitro*, citogenética e aplicação de fungos micorrízicos arbusculares (Glomeromycota) no estabelecimento *ex vitro* de variedades e do híbrido apirênico intraespecífico de videira (*vitis vinifera L.*) / Eiryanne Fonseca de Menezes. – Feira de Santana - BA, 2013.
72 f. : il.

Orientador: Nataniel Franklin de Melo
Co-orientadora: Adriana Mayumi Yano de Melo

Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais)– Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2013.

1. Videira – Cultivo *in vitro*. 2. Uvas apirênicas – Resgate de embrião. 3. Fungos micorrízicos arbusculares – Uso. 4. Aclimatização de videiras. 5. Uvas – Caracterização citogenética. I. Melo, Nataniel Franklin de. II. Melo, Adriana Mayumi Yano de. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Departamento de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 634.8

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana

(UEFS)

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho

(UFRPE)

Dr. Nataniel Franklin de Melo

(EmbrapaSemiárido)

Orientador e Presidente da Banca

FEIRA DE SANTANA – BAHIA

2013

À minha mãe Abigail e ao meu pai Carmelito, por todos os incentivos, esforços e abdições feitos para minha formação e pelo exemplo de vida que representam, **dedico**.

À minhas irmãs. Em especial à Neidyane, meu cunhado Aauto e meus sobrinhos, Maria Fernanda e Gabriel, por todo apoio e todo bem que representam em minha vida, **ofereço**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, meu guia, luz, escudo, força e refúgio. Por me conceder o dom da vida.

A toda minha família: Meus pais, irmãs, tias, tios, primos, que são a maior riqueza que possuo. Por toda torcida para que tudo desse certo.

‘In Memória’ as minhas tias, Carmelúcia Menezes de Almeida Paixão e Neusa Maria Menezes de Oliveira, e ao amigo, Wesley Nunes Barbosa. A alegria e entusiasmo perante a vida; bondade, garra, determinação em conseguir o que desejam, ombro e abraço amigo, cuidado e carinho com todos que conheciam, sempre fizeram parte da vida dos três. Bendito encontro na vida...

A meu orientador Dr. Nataniel Franklin de Melo e à minha co-orientadora Prof^a. Dr^a Adriana Mayumi Yano de Melo, pela oportunidade concedida desde a época de graduação até o mestrado. Pela paciência, compreensão, aprendizado, profissionalismo e pela ajuda nas correções. Serei eternamente grata por tudo de bom que me foi feito.

Ao professor Olímpio, da Universidade Estadual de Pernambuco-UPE/ Campus Petrolina, por toda atenção, ajuda e supervisão no Estágio em Docência.

A Adriana Rodrigues Passos, Francine Hiromi Ishikawa, José Ranieri de Ferreira Santana e Reginaldo de Carvalho, por aceitarem participar como membros da Banca Examinadora. E pelas sugestões feitas à dissertação.

Á todos os estudantes indígenas da Tribo Tuxá de Rodelas –BA, residentes na Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS, especialmente: Renira, Aline, Jaqueline, Deysiane, Maiane Neves, Élton Fábio, Elton, Maiane, Mariane, Jandair, Dorival Júnior, Aléssia, Leidiane, Joseane, Josevan e Fernanda; por toda amizade, ajuda, apoio e pelos momentos de descontração.

Às pesquisadoras: Francislene Angelotti, Patrícia Coelho de Souza Leão e Rita Mércia Estigarribia Borges, pelas informações, por toda atenção, disponibilidade em ajudar e pelos materiais vegetais concedidos.

A todos meus amigos, principalmente: Ayla, Aline, Cheylla, Gabriela, Renira, Rosimery e Warlla, que mesmo à distância se fizeram presentes me dando apoio e força. À Anne

Katherine, Carlos, Luana, Fany Mayara, Polyane e Tamylys, por toda compreensão pelos momentos de ausência.

À Regina Célia e Soniane Rodrigues, pela amizade e abrigo nessas idas e vindas à Feira de Santana.

Ao pesquisador e Supervisor do Laboratório de Biotecnologia, Dr. Visêlido de Oliveira Ribeiro e às pesquisadoras Ana Valeria e Juliana Martins Ribeiro por toda atenção concedida.

Ao secretário do PPG/RGV Alberto Vicente, por toda paciência, atenção, cuidado e sempre disponibilidade em ajudar.

Ao Coordenador e professor do PPG/RGV José Raniere de Ferreira Santana, por toda atenção, compreensão, conversas e conselhos valiosos que me foi concedido.

A todos os docentes do PPG/RGV, por toda atenção e conhecimento transmitido; principalmente: Adriana Rodrigues Passos, Carlos Alberto da Silva Ledo, Claudinéia Regina Pelacani Cruz, Hugo Neves Brandão, José Raniere Ferreira de Santana, Juan Tomás Ayala Osuna, Manoel Abílio de Queiroz, Roberto Lisboa Romão, Sandra Aparecida de Assis.

A todos meus colegas de Mestrado: Camila, Diego, Daniel, Edmilson, Fábio, Idiane, Marisol, Mara Márcia, Mara Rúbia, Mariana, Patrícia, Soniane e Verônica. E àqueles da turma de Doutorado: Ariana, Anderson, Cintia Luiza, Micaele, Mayana e Ronaldo. Pelos momentos de descontração dentro e fora de sala de aula, por toda ajuda e conhecimento compartilhado. Sentirei saudades de todos vocês.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

A toda equipe do Laboratório Microbiologia e Imunologia da Univasf: Alan, Alícia Melo, Aline Passos, Angélica Ricarte, Artênia Almeida, Amando Vieira, Eliene Matos, Flávia Coutinho, João Ricardo de Oliveira, Jorge Messias, Karen Mirella, Marcionila Mailheiros, Maria Eugênia, Maylane Rayane, Micheline Lins, Nayrlani Nayni, Percivaldo Xavier, Thaís Menezes, Tomás Azevedo, Vera Lúcia e Vinícios Amorim. Pela amizade e ajuda concedida.

A Jorge Messias do Nascimento e Karen Mirella Menezes de Souza, por toda ajuda concedida. Obrigada por compartilharem sem medo dos conhecimentos adquiridos. Conhecimentos estes de fundamental importância para o experimento com uso de fungos micorrízicos.

A toda equipe do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido: Ângela Katiússia, Elenício Gomes, Maria Tereza, Maria do Socorro, Michelly, Roberta e especialmente, à Arlindo Bento, Francisco Manuel, Bruna Emanuele, Danilo, Fabiana Perreira, Hugo Leonardo, Katherine, Jéssica Coelho, Larisse Larangeira, Márcio Texeira, Maziele, Micaele Costa, Layana, Thamires Dália, e Uiliane Soares, pelos momentos de descontração, por toda ajuda, apoio e amizade.

À Embrapa Semiárido pela disponibilidade da Infraestrutura para realização deste trabalho.

À Embrapa (SNT). Em especial a Rodrigo César Flores, pela atenção e sempre disponibilidade em ajudar. E pelo material vegetal doado para realização deste trabalho.

Aos funcionários Hélio Macedo, Fábio Moura e Francisco (Campo Experimental Bebedouro) e a Valfredo dos Santos, Cícero e Izaías (Campo Experimental Mandacaru), pelos materiais vegetais doados, por toda ajuda, paciência, atenção concedida.

À Elenício Gomes Coelho, Geraldo Freire e José de Assis, por toda atenção e ajuda.

À Uyara Alves e José Clétis por toda atenção e sempre disponibilidade em ajudar.

A Gislene Gama e Helena Bezerra pelo auxílio referente à normatização das referências bibliográficas. E às bibliotecárias Auxiliadora e Lúcia por toda atenção.

À Cláudia e Waldilene por toda paciência e atenção.

À Bruno, Danilo, Esmael Marinho, Gilmar, Hugo, José de Alencar, José Elias, Joacy da Silva e Mário pela ajuda concedida com os solos autoclavados.

A todos que não citei, mas que sempre contribuíram com palavras positivas e que torceram para que tudo desse certo.

Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser.. mas Graças a Deus, não somos o que éramos.

(Martin Luther King)

Jesus disse: (1) - Eu sou a videira, e meu pai é o lavrador. (2) Todos os ramos que não dão uvas ele corta, embora eles estejam em mim. Mas os ramos que dão uvas ele poda a fim de que fiquem limpos e deem mais uvas ainda. (3) Vocês já estão limpos por meio dos ensinamentos que eu lhes tenho dado. (4) Continuem unidos comigo, e eu continuarei unido com vocês. Pois, assim como o ramo só dá uvas quando está unido com a planta, assim também vocês só podem dar frutos se ficarem unidos comigo. (5) Eu sou a videira, e vocês são os ramos. Quem está unido comigo e eu com ele, esse dá muito fruto porque sem mim vocês não podem fazer nada. (6) Quem não ficar unido comigo será jogado fora e secará; será como os ramos secos que são juntados e jogados no fogo, onde são queimados. (7) Se vocês ficarem unidos comigo, e as minhas palavras continuarem em vocês, vocês receberão tudo que pedirem. (8) E a natureza gloriosa do meu Pai se revela quando vocês produzem muitos frutos e assim mostram que são meus discípulos. (9) Assim como o meu Pai me ama eu amo vocês; portanto, continuem unidos comigo por meio do meu amor por vocês.

(João 15: 1-9)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
	xiii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	
RESUMO GERAL	xiv
ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO DE LITERATURA	6
1. A Viticultura no Semiárido.....	6
2. Resgate de Embriões e Melhoramento Genético.....	7
3. Aplicações da Citogenética para o Melhoramento de Plantas.....	10
4. Aspectos Gerais dos Fungos Micorrízicos Arbusculares.....	12
5. Utilização de Fungos Micorrízicos Arbusculares na Etapa de Aclimatização de Mudas Micropropagadas.....	15
6. Referências Bibliográficas.....	17
CAPÍTULO 1: Resgate de embriões e avaliação do desenvolvimento <i>in vitro</i> de híbridos intraespecíficos de videira sem sementes (‘Superior x Thompson’)	26
Resumo.....	27
Abstract.....	28
Introdução.....	29
Material e Métodos.....	31
Resultados e Discussão.....	33
Conclusões.....	37
Referências Bibliográficas.....	38
CAPÍTULO 2: Eficiência de isolados de fungos micorrízicos arbusculares na aclimatização do híbrido intraespecífico de videira ‘superior seedless’ x ‘thompson seedless’	40
Resumo.....	41
Abstract.....	42
Introdução.....	43
Material e Métodos.....	45
Resultados e Discussão.....	47
Conclusões.....	52
Apêndice.....	53
Referências Bibliográficas.....	54
CAPÍTULO 3: Análise citogenética convencional e bandeamento CMA3/DAPI em híbrido intraespecífico de videira e seus progenitores (<i>Vitis vinifera</i> L.)	57
Resumo.....	58
Abstract.....	59
Introdução.....	60
Material e Métodos.....	61
Resultados e Discussão.....	63
Conclusões.....	65
Apêndice.....	66
Referências Bibliográficas.....	70
CONCLUSÕES GERAIS	72

LISTA DE TABELAS

	Páginas
CAPÍTULO 1: Resgate de embriões e avaliação do desenvolvimento <i>in vitro</i> de híbridos intraespecíficos de videira sem sementes ('Superior x Thompson').....	26
Tabela 1. Efeito do número de dias de cultivo <i>in vitro</i> de sementes-traço, sobre o desenvolvimento e germinação de embriões imaturos de híbridos de videira 'Superior x Thompson'.....	34
Tabela 2. Avaliação da micropropagação de três híbridos de videira ('Superior Seedless' x 'Thompson Seedless') obtidos de plântulas provenientes do resgate de embriões imaturos em diferentes estádios de desenvolvimento, após 90 dias de cultivo <i>in vitro</i>	36
CAPÍTULO 2: Eficiência de isolados de fungos micorrízicos arbusculares na aclimatização do híbrido intraespecífico de videira 'Superior Seedless' x 'Thompson Seedless'	40
Tabela 1. Área foliar (AF), matéria fresca foliar (MFF), matéria seca foliar (MSF), matéria fresca (MFA) e seca (MSA) parte aérea, matéria fresca (MFR) e seca (MSR) radicular no híbrido apirênico de videira 'Superior x Thompson', após 120 dias em casa de vegetação.....	47
Tabela 2. Número de folhas, altura e diâmetro do colo de híbridos de 'Superior x Thompson', inoculados ou não com fungos micorrízicos arbusculares, na fase de aclimatização após 120 dias na casa de vegetação, cujos resultados não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey 5%.....	49
Tabela 3. Teor de macronutrientes (g Kg^{-1}) em videira (híbrido 'Superior x Thompson') inoculadas ou não com FMA (<i>Acaulospora longula</i> , <i>Claroideoglosum etunicatum</i> e <i>Gigaspora albida</i>), após 120 dias em casa de vegetação.....	50
Tabela 4. Teor de micronutrientes (mg kg^{-1}) em videira (híbrido 'Superior x Thompson') inoculadas ou não com FMA (<i>Acaulospora longula</i> , <i>Claroideoglosum etunicatum</i> e <i>Gigaspora albida</i>), após 120 dias em casa de vegetação.....	51
CAPÍTULO 3: Análise citogenética convencional e bandeamento CMA3/DAPI em híbrido intraespecífico de videira e seus progenitores (<i>Vitis vinifera</i> L.).....	57
Tabela 1. Medições do conjunto cromossômico haploide das variedades de videira 'Superior Seedless', 'Thompson Seedless' e do híbrido intraespecífico 'Superior' x 'Thompson'.....	66

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
CAPÍTULO 1: Resgate de embriões e avaliação do desenvolvimento <i>in vitro</i> de híbridos intraespecíficos de videira sem sementes ('Superior x Thompson')	26
Figura 1. Cultivo <i>in vitro</i> de sementes-traço do híbrido de videira 'Superior Seedless x 'Thompson Seedless'. a) Sementes-traço 30 dias após a inoculação. b) Germinação <i>in vitro</i> de sementes-traço 120 dias após a inoculação; c) Semente-traço contendo embrião no estágio de desenvolvimento cordiforme (seta); d) Detalhe de embrião no estágio cordiforme; e) Detalhe de embrião em estágio de desenvolvimento indefinido; f) Semente-traço contendo embrião no estágio de desenvolvimento torpedo. Escalas em "a" e "b" correspondem a 2 cm com ampliações correspondentes em "c", "d", "e" e "f".....	35
CAPÍTULO 2: Eficiência de isolados de fungos micorrízicos arbusculares na aclimatização do híbrido intraespecífico de videira 'superior seedless' x 'thompson seedless'	40
Figura 1. a) Colonização micorrízica e b) Número de glomerosporos em videira (híbrido 'Superior x Thompson'), após 120 dias em casa de vegetação.....	49
Figura 2. Aclimatização de plantas de videira 'Superior x Thompson' inoculadas ou não com fungos micorrízicos arbusculares. Observe em C) da esquerda para direita, tratamentos: Controle não inoculado; inoculados com 1. <i>Acaulospora longula</i> , 2. <i>Gigaspora albida</i> e 3. <i>Claroideoglossum etunicatum</i>	53
Figura 3. Plantas de videira Superior x Thompson 30 dias após aclimatização. Da esquerda para direita, tratamentos: Controle não inoculado; inoculados com 1. <i>Acaulospora longula</i> , 2. <i>Claroideoglossum etunicatum</i> e 3. <i>Gigaspora albida</i>	53
CAPÍTULO 3: Análise citogenética convencional e bandeamento CMA3/DAPI em híbrido intraespecífico de videira e seus progenitores (<i>Vitis vinifera</i> L.)	57
Figura 1. Cromossomos metafásicos de três variedades de <i>Vitis vinifera</i> L. com $2n=38$. "a" metáfase e "b" prometáfase em 'Superior Seedless', "c" metáfase em 'Thompson Seedless', e "d" metáfase no híbrido intraespecífico 'Superior x Thompson'. Barra em "d" corresponde a 2 μ m.....	67
Figura 2 – Cromossomos metafásicos de três variedades de <i>Vitis vinifera</i> L. corados com CMA (amarelo) e DAPI (azul). "a" e "b" 'Superior Seedless', "c" e "d" 'Thompson Seedless', "e" e "f" híbrido intraespecífico 'Superior x Thompson'. Setas apontam para blocos CMA positivos em "a", "c" e "e". Barra em "f" corresponde a 2 μ m.....	68
Figura 3. Idiogramas das variedades e do híbrido intraespecífico. A) 'Superior Seedless'; B) 'Thompson Seedless'; C) 'Superior Seedless x Thompson Seedless'. Em amarelo bandas de CMA3+ nas regiões pericentroméricas e terminais.....	69

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIA	Ácido indolacético
Al	Alumínio
AT	Adenina e Timina
B	Boro
Ca	Cálcio
CE	Condutividade elétrica
CG	Citosina e Guanina
CMA3	Cromomicina A3
CPATSA	Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semiárido
Cu	Cobre
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Fe	Ferro
FMA	Fungo Micorrízico Arbuscular
HCl	Ácido Clorídrico
K	Potássio
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
M.O	Matéria Orgânica
N	Nitrogênio
Na	Sódio
P	Fósforo
pH	Potencial hidrônio
RPM	Rotação por minuto
S	Enxofre
SNT	Embrapa Transferência de Tecnologia
TCL	Comprimento cromossômico total
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UNIVASF	Universidade Federal do Vale do São Francisco
UR	Umidade relativa
Zn	Zinco

RESUMO GERAL

A videira representa uma das mais importantes culturas no Vale do São Francisco, por ser importante gerador de renda e desenvolvimento social. Destaca-se a produção para o mercado interno e externo, cujas exigências em competitividade demandam a necessidade de desenvolvimento de novos materiais genéticos para o produtor. Nesse caso, os programas de melhoramento genético para a cultura em condições tropicais tem empregado o cruzamento de variedades de uvas apirênicas, utilizando como suporte a técnica de resgate de embriões, que possibilita a obtenção de híbridos. Por outro lado, a caracterização citogenética de híbridos e parentais surge como ferramenta que pode gerar dados importantes para os programas de melhoramento genético da videira. Contraparte, a micropropagação, que é a técnica de maior aplicabilidade da cultura de tecidos, tem, como uma das muitas vantagens, a produção em larga escala de plantas em tempo menor que o habitual, e com garantia fitossanitária. Por outro lado, durante a fase de aclimatização da micropropagação da videira ocorrem perdas significativas. Nessa fase, pelos vários benefícios que proporcionam, os fungos micorrízicos arbusculares surgem como alternativa de uso, pois reduzem as perdas, tornando menos estressante a passagem das condições *in vitro* para *ex vitro*. Este estudo teve como objetivo avaliar citogeneticamente variedades e híbridos de videira, bem como estudar a associação micorrízica no estabelecimento *ex vitro* de mudas micropropagadas, buscando selecionar isolados eficientes em promover o crescimento e absorção de nutrientes em híbrido apirênico de videiras.

Palavras - chave: Fungos micorrízicos arbusculares, cromossomo, videira, cultura de tecidos, bandeamento cromossômico.

ABSTRACT

The grapevine is one of the most important crops in the San Francisco Valley, to be an important generator of income and social development. It is noteworthy production for the domestic and foreign market, whose requirements demand the need for competitive development of new genetic material to the producer. In this case, the breeding program for cultivation in tropical conditions has employed the crossing of varieties of seedless grapes, using as support embryo rescue technique, which enables the acquisition of hybrid course. Moreover, the cytogenetic characterization of hybrids and parental emerges as a tool that can generate important data for the breeding programs of the grapevine. Counterpart, micropropagation, which is the wider applicability of the technique of tissue culture, has, as one of the many advantages, the large scale production of plants in less time than usual and pathogen-free. During the acclimatization phase of grapevine micropropagation significant losses occur. The various benefits they provide, mycorrhizal fungi are an alternative because they reduce losses, making the transition less stressful conditions in vitro to ex vitro. This study aimed to evaluate cytogenetically vine varieties and hybrids, as well as study the mycorrhizal association in ex vitro establishment of plantlets, trying to select isolates effective in promoting growth and nutrient uptake in apirenic hybrid grapesvines.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal fungi, chromosome, grapevine, tissue culture, chromosome banding.

INTRODUÇÃO GERAL

A produção mundial de uva de mesa encontra-se numa área total de aproximadamente 206,3 milhões de km² distribuídos na Ásia (55,9%), Europa (17,9%), América (13,9%), África (12,1%) e Oceania (0,3%). Os principais países produtores em ordem decrescente são: China, Irã, Turquia, Índia, Egito, Itália, Estados Unidos, Chile e Brasil (RUIZ, 2011). É uma das culturas de grande importância ao nosso país, sendo cultivada em quatorze estados brasileiros, constituindo-se na base de sustentação da exploração agroindustrial de algumas regiões, não somente pela produção de uvas de mesa, mas também de matéria-prima para a elaboração de vinhos e vários derivados (MARTINS, 2005). A região do Submédio São Francisco apresenta destaque tanto na produção para exportação, respondendo por 97% da produção brasileira, como para o consumo interno (SILVA *et al.*, 2009). Quanto à produção de uvas no ano de 2011, MELLO (2011) afirmou que houve um aumento de 12,97%, porém não em todas as regiões. O maior aumento ocorreu no estado de Pernambuco (24,03%) devido ao aumento da área plantada em 2010. Entretanto, em 2011, foi no mesmo estado que houve a maior redução de área plantada (20,88%), o que resultará na redução da produção em 2012, após a tabulação dos dados oficiais.

A obtenção de novas variedades de uvas sem sementes, utilizando a técnica de resgate de embriões imaturos, apresenta alta eficiência, pois aumenta a frequência de indivíduos sem sementes na progênie. Esta técnica consiste na coleta e cultivo de sementes-traço 6 a 8 semanas após a polinização, e posterior resgate do embrião que germina em meio de cultura específico, gerando um ‘seedling’ ou um novo indivíduo. Os primeiros trabalhos sobre esta técnica foram publicados na década de 80 (CAIN *et al.*, 1983; EMERSHAD e RAMMING, 1984; EMERSHAD *et al.*, 1989; SPIEGEL ROY *et al.*, 1985), sendo atualmente utilizada em todos os programas de melhoramento da videira, visando a criação de variedades de uvas sem sementes. No Nordeste brasileiro, é importante a realização de estudos para confirmar o protocolo utilizado em outras regiões, considerando as peculiaridades do clima tropical.

Citogeneticamente, as espécies do subgênero *Vitis* possuem 38 cromossomos ($2n=6x=38$), enquanto as espécies do subgênero *Muscadinia* contêm 40 cromossomos ($2n=6x=40$). Em *Vitis*, a hipótese é que os progenitores ancestrais teriam possuído seis e sete pares cromossômicos, respectivamente. O cruzamento originou híbridos de

processamento de 13 monovalentes. Duplicações cromossômicas regeneraram tetraploides férteis ($4x=26$). Cruzamento posterior dos tetraploides com diploides separados produziram progenitores dos dois subgêneros *Vitis* com o número cromossômico atual (JACKSON, 2008).

A caracterização citogenética pode ser aplicada como instrumento de avaliação de plantas regeneradas *in vitro* e das plantas transformadas, em estudo sobre a instabilidade cromossômica em material conservado, nos estudos de evolução e citotaxonomia, e no auxílio à caracterização molecular pela localização de sequências específicas de DNA, através da hibridização *in situ*. A caracterização reprodutiva, que envolve a contagem do número cromossômico, a análise meiótica, a análise do saco embrionário e a análise da viabilidade do pólen, pode exigir cruzamentos controlados e estudos de progênies. Seu uso mais imediato é evitar anos de insucessos na condução de trabalhos de conservação, multiplicação e uso de germoplasma, além de fornecer informações valiosas, de uso direto em programas de pré-melhoramento e melhoramento de plantas (PEÑALOZA, 2004). Entre os estudos citogenéticos realizados nas mais diversas espécies, podemos destacar os realizados com *Vigna unguiculata* e *V. radiata* (BORTOLETI *et al.*, 2012); pera (YAMAMOTO *et al.*, 2012); *cactaceae* (ORTOLANI, 2007), videira (FALISTOCCO *et al.*, 2007) e maracujá (MELO, 2002).

Por outro lado, micorrizas são conhecidas pelo mutualismo entre a maioria das plantas e espécies de fungos do solo que colonizam o tecido cortical de suas raízes (SIEVERDING, 1991). A associação é importante para ambos, por oferecer condições para o desenvolvimento da planta e sobrevivência do fungo (SYLVIA, 1998). Este fato é devido ao aumento na absorção de água e nutriente do solo para o vegetal através da rede micelial extrarradicular, em troca de fotoassimilados indispensáveis ao desenvolvimento do fungo (NEWSHAM *et al.*, 1995).

Diversas pesquisas têm demonstrado a eficiência dos fungos micorrízicos arbusculares na produção de mudas de diversas frutíferas, tanto para aquelas providas da micropropagação e que passam pela fase de aclimatização (SAGGIN JR. & LOVATO, 1999), como para aquelas oriundas da propagação convencional (semente ou estacas) em telado/viveiro (SIQUEIRA, 1994).

O primeiro passo, para a aplicação de fungos micorrízicos arbusculares eficientes, deve ser obtido pela seleção de fungos nativos e/ou exóticos. Segundo SAGGIN e

SIQUEIRA (1996) é recomendável que sejam inoculados fungos provindos da mesma condição edafoclimática a qual se deseja aplicá-los, pois estes geralmente apresentam melhor performance quando comparados aos introduzidos (exóticos). Porém, RUIZ-LOZANO e AZCÓN (2000) mostraram que muitas vezes os isolados de condições diferentes das quais se deseja aplicá-los são mais eficientes, e outros mostram que a eficiência independe das condições de origem (FELDMAN, 1994). Geralmente, a inoculação com fungos selecionados pode ser necessária em solos que sofreram distúrbio (erosão, mineração, salinidade e metais pesados), com deficiência em fósforo na qual a população nativa de FMA seja baixa ou ineficiente em promover aumento na absorção e consequente crescimento (ABBOTT e ROBSON, 1994).

No Vale do Submédio São Francisco, tanto para as variedades de mesa como vinificação, são utilizados porta-enxertos que apresentam tolerância a patógenos do solo, à deficiência nutricional, facilidade de enraizamento e compatibilidade com a variedade produtora. Os principais porta-enxertos utilizados no Vale do São Francisco (LEÃO *et al.*, 2009) são o ‘IAC-313’, ‘IAC-572’ e ‘IAC-766’, porém, existem outros como ‘Salt Creek’, ‘Dodge Ridge’, ‘Courdec 1613’, ‘Harmony’, ‘420-A’ e ‘Paulsen 1103’.

Nesse contexto, um dos entraves enfrentados para expansão de áreas com a cultura da uva é a obtenção de mudas sadias e certificadas. MELO (2010, dados não publicados) verificou que de 479 plantas avaliadas, entre porta-enxertos e copa, aproximadamente 78% apresentavam vírus, principalmente o vírus do enrolamento da folha (*Grapevine leafroll-associated virus 3-GLRaV-3*). Nesse sentido, a propagação de mudas pela técnica de cultivo *in vitro* apresenta-se como uma alternativa para produção de plantas com excelentes qualidades fitossanitárias, em larga escala, e em menor tempo, além de garantir a propagação de plantas de alta produtividade adaptadas ao clima tropical. Por outro lado, apesar das vantagens oferecidas pela micropropagação, as plantas produzidas são isentas de microrganismos, principalmente os benéficos como os FMA, podendo diminuir a sobrevivência ou o desenvolvimento de plantas dependentes da micorrização. Segundo MATSUOKA *et al.* (2002) a videira é considerada fortemente dependente da associação micorrízica. Da mesma forma, AGUÍN *et al.* (2004) atribuem o benefício da inoculação de FMA na aclimatização de mudas micropropagadas de videira ao aumento do número de raízes laterais primárias e secundárias promovidos pelo associação com os fungos.

Aliada a tecnologia da micropropagação, a aplicação de FMA na aclimatização vem sendo utilizada com grande sucesso para diversas culturas, como o abacate, banana, morango, maçã, goiaba e outras (YANO-MELO *et al.*, 1999; ESTRADA-LUNA *et al.*, 2000; LOCATELLI e LOVATO, 2002, TRINDADE *et al.*, 2003), entre outros). Esses trabalhos demonstram que a utilização de FMA na aclimatização aumenta a taxa de sobrevivência, o crescimento e a absorção de água e nutrientes do solo, propiciando ainda maior vigor e tolerância ao transplântio para o campo, sendo tal fato de extrema importância para o estabelecimento de mudas de videira.

Em videira, *Glomus fasciculatum* foi uma das espécies predominantes no levantamento realizado por NAPPI *et al.* (1980-81), sendo a colonização radicular e a densidade de esporos maior em áreas com cobertura morta. POSSINGHAM e GROOT OBBINK (1971) fizeram uma ampla avaliação da colonização e eficiência simbiótica em diferentes cultivares e espécies de videira na Austrália. Posteriormente, a eficiência dos FMA em aumentar o crescimento e a absorção de fósforo foi demonstrada para algumas cultivares, como ‘Silvaner’ e ‘Aris’ (GEBBING *et al.*, 1977), bem como as características ultraestruturais da associação (BONFANTE-FASOLO, 1978).

Recentemente, NIKOLAOU *et al.* (2002) constataram que mudas de videira (variedade ‘Victoria’) enxertadas sobre os porta-enxertos ‘3309C’ ou ‘110R’ e micorrizadas, tiveram maior concentração de N, P, K e Ca, além de outros benefícios como o aumento no número de nós. Os autores constataram que a colonização micorrízica variava em decorrência do porta-enxerto utilizado. Além das vantagens no crescimento e aquisição de nutrientes, NIKOLAOU *et al.* (2003a) verificaram que em videiras enxertadas em diferentes porta-enxertos inoculados com *Glomus mosseae*, tiveram maior tolerância ao estresse hídrico, mediado pelo aumento na área foliar e concentração de P. Esse aumento na tolerância ao estresse é atribuído, em parte, ao aumento na concentração de citocinina (NIKOLAOU *et al.*, 2003b). Em estudo realizado por KRISHNA *et al.* (2006), foi pesquisado o efeito da inoculação de FMA (*Acaulospora laevis*, *A. scorbiculata*, *Entrophospora colombiana*, *Gigaspora gigantea*, *Glomus manihotis*, *Scutellospora heterogramma*) e um mix comercial (contendo *Glomus moessae*, *G. manihotis* e *Gigaspora gigantea*) em plantas micropropagadas de videira. Observou-se, para todos os parâmetros avaliados, resposta positiva com os inóculos de FMA. A taxa de sobrevivência *ex vitro*, por exemplo, dobrou com a presença deste inoculantes.

Desta forma, este trabalho objetivou caracterizar citogeneticamente duas variedades e um híbrido intraespecífico apirênico de videira, bem como estudar o cultivo *in vitro*, e a associação micorrízica no estabelecimento *ex vitro* de mudas micropropagadas, buscando selecionar isolados eficientes em promover o crescimento e absorção de nutrientes.

REVISÃO DE LITERATURA

1. A Viticultura no Semiárido

A expansão dos cultivos no mundo, em regra, deve-se ao desenvolvimento de variedades adaptadas aos diferentes ambientes, na medida da diversidade genética das espécies. A viticultura expandiu-se de zonas temperadas para regiões de clima quente, com base em cultivares tradicionais das regiões de origem. O desenvolvimento de modernas tecnologias de manejo viabilizou tecnicamente a produção de uva em escala comercial em regiões tropicais (CAMARGO, 2008). Aliado a isso, devido às condições ambientais do trópico semiárido, pode-se fazer o planejamento da produção da uva durante todo ano, garantindo oferta permanente de uvas de boa qualidade, e com grandes possibilidades de ocupar o espaço em períodos de desabastecimento no mercado internacional, quando os preços são particularmente mais atrativos (LEÃO, 2001).

Existem mais de trinta espécies de videiras, entre as quais se destacam as europeias (*Vitis vinifera* L.), americanas (*Vitis labrusca* e *Vitis bourquina*) e híbridas. As espécies europeias são as mais cultivadas no mundo. Preferem os climas secos, com baixa umidade relativa do ar e muita insolação, e são as que apresentam variedades de melhor qualidade para a produção de vinhos. As espécies americanas são mais rústicas e resistentes a doenças, sendo as predominantes no Brasil. As híbridas são provenientes de cruzamentos interespecíficos (diferentes espécies) e intraespecíficos (mesma espécie). Há variedades sem sementes, especiais para a produção de passas de boa qualidade. As híbridas cultivadas no Brasil foram desenvolvidas inicialmente no Instituto Agrônomo de Campinas – IAC, a partir de apirênicas americanas (uvas sem sementes). As variedades cultivadas no Brasil pertencem às espécies *Vitis vinifera* e *V. labrusca*. No Semiárido brasileiro, predominam as variedades ‘Itália’ e suas mutações ‘Benitaka’ e ‘Brasil’, ‘Red Globe’ (uvas de mesa com sementes), ‘Sugraone’ ou ‘Festival’, ‘Crimson Seedless’ e ‘Thompson Seedless’ (uvas de mesa sem sementes) sendo estas, as mais importantes uvas sem sementes cultivadas no Vale do São Francisco. Dentre as uvas para a elaboração de vinhos finos, destacam-se as variedades ‘Cabernet Sauvignon’, ‘Syrah’, ‘Chenin Blanc’,

‘Sauvignon Blanc’ e ‘Moscato Canelli’, todas pertencentes à espécie *V. vinifera* (CARNEIRO *et al.*, 2007; LEÃO *et al.*, 2009).

Muitas pesquisas foram e ainda são realizadas no Vale do São Francisco com o objetivo de implantar, avaliar e selecionar cultivares de uva adaptadas as condições do semiárido, visando disponibilizar maior diversificação ao produtor (CAMARGO *et al.*, 1997; ALBUQUERQUE, 1999; LEÃO, 2003).

Segundo LEÃO *et al.* (2009), as uvas de mesa são utilizadas *in natura* ou com finalidade decorativa. Para o consumo *in natura*, as frutas devem possuir características peculiares como: cachos atraentes e com sabor agradável, resistência ao transporte e manuseio, além de boa conservação pós-colheita, pois a aparência é um dos principais aspectos para uma cultivar de uva de mesa. Deve apresentar também uma polpa firme e de consistência crocante, com película e engajo resistentes, e longa vida de prateleira. A ausência de sementes é uma característica apreciada pelos consumidores, podendo incluir desde a ausência completa de sementes (paternocarpia), como ocorre com a variedade ‘Black Corinto’, até traços de sementes de tamanhos variados (estenoespermocarpia), como acontece na variedade ‘Thompson Seedless’ e nas demais variedades comerciais de uvas sem sementes. São exportados, anualmente, cerca de 60 mil toneladas de uva, quantidade que pode render cerca de 140 milhões de reais. As uvas vão a destinos como Holanda (e países vizinhos), Reino Unido e Estados Unidos (COUTO, 2011).

2. Resgate de Embriões e Melhoramento Genético

A cultura de embriões é utilizada em diversas estratégias, destacando-se, dentre elas, o emprego para recuperação de híbridos raros, em testes de viabilidade de sementes, ou como fonte de explante, por possuir tecidos de elevada totipotência (GIACOMETTI, 1990; VILLALOBOS e THORPE, 1991; HU e FERREIRA, 1999).

As diversas técnicas da cultura de tecidos são aplicadas de diferentes formas no desenvolvimento de cultivares superiores de plantas. São utilizadas não necessariamente

no desenvolvimento direto de tais cultivares, mas em uma ou outra etapa do melhoramento, oferecendo, em muitos casos soluções únicas. A técnica da cultura de embriões é empregada visando a introgressão gênica através de cruzamentos entre indivíduos de espécies distantes, havendo inúmeros exemplos de introgressão de genes de importância agrônômica de um acesso silvestre para uma cultivar comercial (FERREIRA *et al.*;1998). Alguns exemplos de trabalhos envolvendo a introgressão gênica podem ser citados, como ARAGÃO *et al.* (2002), no qual foi feito o cultivo de embriões de tomates *in vitro* visando a introgressão de genes em híbridos interespecíficos. ANGRA *et al.* (1999) estudaram o trigo com o objetivo de obter, por meio do cultivo de embriões, progênes viáveis de retrocruzamentos a partir de híbridos intergenéricos. Também, CARDOSO (2007) realizou cruzamentos entre trigo e espécies afins, visando a introgressão de resistência à ferrugem da folha. CUNHA *et al.* (2010) definiram a amplitude existente da diversidade genética do germoplasma de duas subespécies de *Vitis* presentes em Portugal.

Apesar de recente, o emprego da cultura de tecidos em *Vitis* sp., pelo resgate de embriões nas hibridações entre genótipos apirênicos, pode ser considerado como a mais significativa contribuição para o melhoramento da videira (MULLINS, 1990). A partenocarpia e a estenoespermocarpia, são os dois sistemas existentes em todo mundo com determinação genética para apirenia. São consideradas apirênicas as espécies de plantas capazes de produzir frutos com ausência completa de sementes, contendo traços de sementes ou um número muito reduzido. Quando há ausência total de sementes, não ocorrendo fecundação e, sendo o fruto desenvolvido exclusivamente de tecidos maternos, denomina-se como partenocarpia. Já quando há fecundação do fruto e, em seguida, ocorre o aborto do embrião imaturo, devido à ausência ou má formação do endosperma, originando frutos maduros com sementes traços poucos desenvolvidas, macias e imperceptíveis ao consumidor, temos o sistema estenoespermocárpico (STOUT, 1936; VAROQUAUX *et al.*, 2000).

Devido à necessidade de ampliação da variabilidade genética por meio de cruzamentos visando à seleção de indivíduos apirênicos superiores, abandonaram-se a paternocarpia e começou-se a utilizar a estenoespermocarpia em praticamente todos os programas de melhoramento que buscam obter cultivares de uva apirênicas (AMARAL *et al.*, 1999). Vale resaltar que, em alguns casos, embora o cruzamento sexual entre espécies diferentes seja possível, ocorrendo à fusão dos gametas e a formação do embrião, não é

raro o abortamento desse embrião, pela má formação do endosperma como barreira pós-zigótica. Nesse caso, a técnica de resgate de embriões em meio de cultura permite que estes embriões se desenvolvam normalmente, o que possibilita a obtenção de híbridos interespecíficos, intraespecíficos, intergenéricos e, em alguns casos, até mesmo entre espécies de famílias distintas, facilitando, sobremaneira, a busca do melhorista por genes de interesse (CANÇADO *et al.*, 2009).

POMMER *et al.* (1995) estudaram dezoito genótipos de uvas (*Vitis vinifera* L.) apirênicas, com épocas de maturação, tamanho de semente-traço e época de colheita diferentes. Utilizando a técnica de resgate de embriões, buscaram verificar se o embrião abortava à medida que amadurecia e quais percentagens de embriões permaneciam em estádios mais avançados. Nesse caso, foi concluído que genótipos de maturação tardia apresentavam menor percentagem de embriões resgatados e germinados e, conseqüentemente, menos plântulas transplantáveis, quando comparadas com genótipos com maturações precoce e média. A melhor época para o resgate dos embriões foi entre seis a dez semanas após o florescimento, e quanto maior forem as relações entre peso de semente-traço/comprimento, maiores serão os números de embriões e maior germinação e plântulas transplantáveis. AMARAL *et al.*, (2001), pesquisando a influência do estágio de desenvolvimento de embriões na obtenção de plantas em cruzamentos entre genitores apirênicos de videira, verificaram que o estágio globular foi encontrado com maior frequência apesar de apresentar menor capacidade de regenerar plantas. Embriões no estágio torpedo apresentaram melhor resposta para tal função. No geral, constatou-se que o estágio de desenvolvimento do embrião influencia na obtenção de plantas, e que o resgate de embriões sendo feito em estádios mais avançados de desenvolvimentos leva a uma maior capacidade de regeneração de plantas.

O desenvolvimento de novas variedades de uvas adaptadas para as condições subtropicais e tropicais tem sido uma grande meta para os programas de melhoramento de uvas no Brasil (RITSCHER *et al.*, 2010). Recentemente, com os resultados dos atuais programas de melhoramento, MAIA *et al.* (2011) realizaram estudo quanto as características agrônômicas, fenológica, área de adaptação e manejo, de cinco novas cultivares de uvas para mesa ('Dona Zilá', 'Tardia de Caxiais', 'BRS Clara', 'BRS Morena' e 'BRS Linda'), sendo todas elas viníferas, apirênicas e adaptadas as condições do Brasil, sendo lançadas pelo programa de melhoramento de uva da Embrapa Uva e Vinho.

3. Aplicações da Citogenética para o Melhoramento de Plantas

Os recursos genéticos vegetais são definidos como a fração da biodiversidade de valor real ou com potencial de uso e que representa uma fonte imensurável de variabilidade genética. Compreendem as variedades tradicionais, melhoradas, as linhas avançadas e as espécies nativas. Representam um reservatório natural de genes que podem ser utilizados para produção de novas variedades que respondam as necessidades de produtores e consumidores. São importantes por promoverem segurança ao meio ambiente, ao evitar que alterações nas condições bióticas e abióticas possam causar danos irreparáveis aos ecossistemas (GIACOMETTI, 1993; FRALEIGH, 2006; FERRAZ, 2008).

Uma coleção de germoplasma é valorizada à medida que esta vai sendo caracterizada. A ausência de atividades de caracterização mais detalhada, associada à falta de conservação apropriada, impede o conhecimento mais profundo dos acessos, restringindo seu aproveitamento para fins de pesquisa. A caracterização e avaliação proporcionam um melhor conhecimento do germoplasma disponível, sendo essencial para seu uso mais intenso em etapas subsequentes, e quando bem conduzidas, apresentam vantagens como: a) identificação dos acessos em duplicatas, b) o estabelecimento de coleções nucleares com o mínimo de redundância da diversidade genética reunida em uma espécie cultivada e nas espécies silvestres a elas relacionadas, c) permitem a identificação dos modos de reprodução predominantes em acessos, bem como a ocorrência de variabilidade intrínseca em acessos individuais (FRANKEL e BROW, 1984; VALLS, 1988). Exemplos de trabalhos envolvendo o estudo citogenético de material vegetal, como, por exemplo, a análise cariotípica das espécies da família *Asteraceae* (ILNICKI *et al.*, 2011), o emprego da citometria de fluxo para determinar o nível de ploidia foliar em variedades de *Vitis vinifera* L. de plantas derivadas de embriões somáticos e obtidos através da cultura de anteras (LEAL *et al.*, 2006), assim como a avaliação da estabilidade meiótica e da variabilidade do pólen de doze linhagens avançadas de pimenta (POZZOBON *et al.*, 2011). A caracterização citogenética envolve a contagem do número de cromossomos, a determinação do nível de ploidia e número básico de cromossomos, a avaliação do comportamento meiótico e da fertilidade do pólen, e a determinação da afinidade genômica entre acessos e híbridos interespecíficos, devendo ser vista como uma

atividade básica e um pré-requisito nas caracterizações de coleções de germoplasma (PAGLIARINI e POZZOBON, 2004).

A observação de cromossomos mitóticos, tanto para análise do ciclo mitótico quanto para o estudo do cariótipo, é geralmente feita pelas técnicas de coloração convencional. Essas técnicas coram os cromossomos por igual, isto é, indistintamente, sem nenhuma preferência por determinado tipo de cromatina, composição do DNA ou de proteínas. São chamadas de convencionais para serem distinguidas das técnicas de coloração diferencial, desenvolvidas a partir do final dos anos 60. Nessas últimas, são incluídas as técnicas de bandeamento cromossômico que coram principalmente, ou exclusivamente, um determinado tipo de cromatina, permitindo observar detalhes que não seriam visíveis com a coloração convencional (GUERRA *et al.*, 2002). Segundo SCHWEIZER (1976), enquanto nos estudos citogenéticos convencionais as características do complemento cromossômico são definidas a partir do número cromossômico, constrições primárias e secundárias, quanto a morfologia e posição dos centrômeros; nas técnicas de coloração diferencial localizam-se sequências ricas em bases específicas, ou bandas cromossômicas, com a utilização de corantes fluorescentes como o 4',-6-diamidino-2-fenilindol, evidenciando regiões heterocromáticas ricas em adenina e timina, ou utilizando cromomicina A3 que evidencia regiões ricas em guanina e citocina. Segundo PIEROZZI (2007), o emprego de técnicas mais específicas, como a do bandeamento C proporciona um melhor detalhamento do genoma, permitindo a diferenciação longitudinal dos cromossomos através da localização e visualização seletiva de segmentos heterocromáticos de DNA, que estão presentes em ambos os homólogos do par de cromossomos, mantendo-se condensados durante todo ciclo de divisão celular, em oposição aos segmentos eucromáticos que possuem um ciclo de condensação-descondensação. Durante a metáfase mitótica, os segmentos heterocromáticos (marcadores cromossômicos naturais), ficam mascarados pelo grau máximo de compactação que os cromossomos assumem nessa fase, tornando-se visíveis apenas após o bandeamento-C.

Exemplos de trabalhos envolvendo as técnicas citogenéticas podem ser citados. Em videira, PINTO-MAGLIO *et al.* (2010) analisaram cromossomos mitóticos de sete espécies de *Vitis*, utilizando a coloração com Giemsa, e para a análise da heterocromatina constitutiva, os corantes fluorescentes CMA3 e DAPI. Neste estudo, foram observados $2n=38$ cromossomos nas espécies de *Euvitis* e $2n=40$ para *Vitis rotundifolia* var. Reagle.

Em cacau e cupuaçu, DANTAS *et al.* (2010) estudaram o cariótipo utilizando o bandeamento–C e a hibridização *in situ* fluorescente. Foi encontrado $2n=20$ e simetria cariotípica para ambas as espécies, observando-se bandas CMA3+/DAPI- na região do braço longo de um único par cromossômico. BRASILEIRO-VIDAL (2003) caracterizou citogeneticamente oito acessos de trigo, utilizando a hibridização *in situ* fluorescente e a hibridização genômica *in situ*. MELO *et al.* (2003) realizaram análise cariotípica de diversas espécies do gênero *Passiflora*, sendo as espécies distribuídas cariologicamente em quatro grupos com a base na análise numérica e morfológica.

4. Aspectos Gerais dos Fungos Micorrízicos Arbusculares

A capacidade das plantas de estabelecer relações compatíveis com certos grupos de fungos do solo é um fenômeno generalizado na natureza, conhecido como micorrizas. Embora tenha surgido há mais de 400 milhões de anos, quando as plantas iniciaram o processo de colonização do habitat terrestre, essa associação só foi reconhecida e tratada cientificamente no século XIX, quando foram publicados os primeiros relatos detalhados da associação entre células radiculares e micélio fúngico (SIQUEIRA, 1986). Micorriza é uma associação mutualística não patogênica entre certos fungos do solo e as raízes da planta. Esta, através da fotossíntese, disponibiliza energia e carbono para a sobrevivência e multiplicação dos fungos, enquanto estes absorvem nutrientes minerais e água do solo, transferindo-os para o sistema radicular do vegetal, estabelecendo assim uma associação simbiótica mutualística (CHU, 2005). Dos sete tipos de micorrizas conhecidos, as micorrizas arbusculares (FMAs), formados por fungos da Ordem *Glomales*, são os mais comuns no ecossistema terrestre (de ocorrência generalizada) e sendo mais disseminados nos trópicos; formam associação simbiótica com espécies de Briófitas, Pteridófitas, Gimnospermas e Angiospermas (SIQUEIRA *et al.*, 2002; CAVALCANTE *et al.*, 2008-2009).

Nos fungos micorrízicos, o processo de colonização propriamente dito, tem início na superfície da raiz, com a penetração resultante da combinação de pressão mecânica e

degradação enzimática parcial da parede celular vegetal. A colonização intrarradicular é limitada aos tecidos externos à endoderme, e se dá pelo crescimento inter e intracelular das hifas. O crescimento intracelular inicial é caracterizado pela formação de enovelamentos de hifas transcelulares e pela invaginação da membrana plasmática vegetal, de modo que não existe comprometimento da integridade das células hospedeiras (SIQUEIRA *et al.*, 2002). Em algumas células corticais, hifas intracelulares se diferenciam em arbúsculos. Durante esse processo, a parede celular fúngica se torna amorfa, desaparecendo as cadeias de quitina cristalinas. Adicionalmente ocorre intensa síntese de membrana plasmática, fragmentação do vacúolo, aumento do volume do citoplasma, decréscimo no número de aminoplastos, movimentação do núcleo, rearranjo do citoesqueleto e aumento da atividade de transcrição gênica, alterações observáveis durante o desenvolvimento dos arbúsculos (BONFANTE e PEROTTO, 1995). Segundo BRUDETT (1991), há duas hipóteses para explicar a origem dos FMA. Na primeira, foi sugerido que o estabelecimento da simbiose ocorreu entre uma alga semi-aquática e um microsimbionte ancestral aquático que pertence aos atuais Chromistas. Já na segunda, sugere que os FMA teriam como origem um Zigomiceto saprofítico, terrestre e não aquático. Esta última hipótese tem um maior sentido, pelo fato dos fungos micorrízicos serem habitantes naturais do solo. A ocorrência generalizada dos fungos micorrízicos é observada nos mais variados ecossistemas, como florestas tropicais e temperadas, desertos, dunas, pradarias e sistemas agrícolas, havendo também evidências fósseis que comprovam a presença dessas associações nos mais variados hospedeiros.

Por outro lado, a prática de inoculação de fungos micorrízicos arbusculares, segundo MIRANDA (2005), é mais indicada na produção de mudas em viveiro, sendo necessária, pois utiliza-se de forma frequente, subsolo ou solo esterilizado, processo que elimina patógenos e fungos micorrízicos nativos. O crescimento das mudas de espécies arbustivas arbóreas e frutíferas tropicais, quando inoculadas com micorrizas, ocorre mais rápido, apresentando maior tolerância ao estresse do transplante com maior sobrevivência no campo, além de aumentar a eficiência do uso de corretivos e fertilizantes adicionados nos substratos. Os FMA também contribuem significativamente para a absorção de nutrientes do solo, no aumento da biomassa vegetal, e conferem à planta maior resistência a estresse e patógenos (BONFANTE e GENRE, 2010). SMITH *et al.* (2010), demonstraram a importância da associação dos fungos micorrízicos arbusculares para diversas plantas submetidas a estresses, como deficiência de nutrientes e estresse hídrico, discutindo como

os FMA podem influenciar a estrutura, a deposição de carbono, e as interações com a microbiota do solo e populações animais.

Alguns exemplos de estudos com FMA podem ser citados. Em videira, por exemplo, SCHELLENBAUM *et al.* (1991) observaram a influência de fungos micorrízicos no desenvolvimento de raízes de videiras micropropagadas. Ainda com videira, LEMOS (2008) chegou à conclusão que para o porta-enxerto 'Harmony', uma melhor eficiência simbiótica é conseguida com o fungo micorrízico *Glomus etunicatum*. Em mandioca, NASCIMENTO *et al.* (2011), constataram uma melhor resposta de *Glomus etunicatum* para o desenvolvimento da variedade estudada. Em sorgo, ALIZADEH e PARSAEIMEHR (2011), concluíram que o tratamento com micorrizas aumentou significativamente a biomassa da cultura estudada, por incremento de características das raízes como, comprimento, proporcionada pela colonização radicular.

Devido a importância dos fungos micorrízicos, SOUZA *et al.* (2007), recomendam a necessidade do fortalecimento de bancos de germoplasma como fundamental e estratégico para o avanço de pesquisas na área microbiológica no Brasil, em especial para o estudo dos glomeromicetos, que estão relacionados à produção agrícola, e que podem ser utilizados para a otimização de recursos não reutilizáveis, como fontes de fósforo, essenciais para o agronegócio do país.

Em todos esses casos, as características que levam um FMA a ser eficiente dependem de uma ampla faixa de condições ambientais, principalmente de disponibilidade de P no solo. Essas características podem ser exemplificadas como a capacidade de colonizar rápida e extensivamente as raízes e de competir com outros FMA e microrganismos pelos sítios de infecção e absorção de nutrientes; de formar um extenso e ramificado micélio extrarradicular; de absorver nutrientes mais rápida e mais eficientemente que as plantas; de transferir eficientemente os nutrientes absorvidos para a planta; de promover benefícios não nutricionais à planta, como agregação e estabilização do solo, modificações fisiológicas, e alívio de estresses. Vale salientar que para uma avaliação direta de eficiência simbiótica de um fungo micorrízico, seria necessário avaliar mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na absorção e no funcionamento da simbiose (SAGGIN JR e SILVA, 2005).

5. Utilização de Fungos Micorrízicos Arbusculares na Etapa de Aclimatização de Mudanças Micropropagadas

A propagação *in vitro* de plantas, chamada também micropropagação, é uma técnica para multiplicar plantas dentro de tubos de ensaios ou similares de vidro (por isso o termo *in vitro*), sob condições adequadas de assepsia, nutrição e fatores ambientais como luz, temperatura, oxigênio e dióxido de carbono (CID, 2012). Entre as vantagens da micropropagação está a total exclusão de microrganismos patogênicos (GRANGER *et al.*, 1983). Entretanto, surge como desvantagem, a eliminação daqueles que são benéficos, e que podem auxiliar no estabelecimento e crescimento após o transplante. Na aclimatização, as plantas micropropagadas passam de uma situação onde os fatores responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento são controlados, para uma situação de ambiente natural e autotrófico. Essas condições ambientais podem causar estresses, além de favorecer o ataque de microrganismos e de pragas. As plantas provenientes da cultura *in vitro* são sensíveis e tenras, pois não desenvolvem eficientemente a cutícula e o movimento dos estômatos, resultando em perda de água por evapotranspiração, e sua parte celular não apresenta rigidez suficiente para sustentação. As folhas são delgadas e suaves, fotossinteticamente inativas, deixando a planta em franco heterotrofismo. Os estômatos não operam eficientemente, provocando, assim, estresses nas primeiras horas após saírem dos frascos de vidro. A habilidade de fazer ajustes por meio de mudanças no seu padrão de crescimento, devido ao ambiente externo, é que vai determinar o sucesso na obtenção de plantas micropropagadas. Geralmente, um maior controle nas condições ambientais, como a utilização de um substrato adequado, manutenção de umidade relativa alta, sombreamento das plantas, controle fitossanitário e nutrição adequada são suficientes para a sobrevivência e o desenvolvimento das plantas micropropagadas, que estão sendo aclimatizadas (FACHINELLO *et al.*, 2005).

Por outro lado, a absorção de nutrientes proporcionados pelos fungos micorrízicos arbusculares é muito importante para as plantas perenes, como a maioria das espécies frutíferas, pois estas apresentam poucas raízes adventícias, sendo a superfície de absorção reduzida devido ao grande diâmetro do sistema radicular BAYLIS (1975). Ainda com relação às raízes, SCHELLEBAUM *et al.* (1991) afirmam que os fungos micorrízicos arbusculares exercem influência na morfogênese e na arquitetura do sistema radicular das

plantas de videira micropropagadas, garantindo um melhor desenvolvimento e formação da raiz após o transplante.

Há três etapas na produção de plantas micropropagadas em que podem ser feita a introdução de fungos micorrízicos: a) na fase *in vitro*; b) durante a aclimatização (*post-vitro*) e, c) após a aclimatização (LOVATO *et al.*, 1996).

SINGH *et al.* (2012) estudaram os efeitos de quatro espécies de fungos micorrízicos arbusculares em romãs micropropagadas, sendo estes inóculos introduzidos na etapa *post-vitro*, com o objetivo de obter um melhor crescimento e uma maior taxa de sobrevivência na etapa de aclimatização. Os efeitos dos FMA, sobre o crescimento, estado fisiológico e atributos bioquímicos, quando comparados com o controle, foram superiores, sendo *Glomus mosseae* e *G. manihotis* sugeridos como os melhores isolados a serem utilizados no transplante destas plantas. ANZANELLO *et al.* (2011) realizaram estudos com a finalidade de avaliar o comportamento de dois fungos micorrízicos sobre o crescimento vegetativo de três porta-enxertos de videira ('SO4', 'Paulsen 1103' e '043-43'), sendo estes procedentes de plantas micropropagadas e inoculados na etapa de aclimatização. Os FMA (*Scutellopora heterogama* e *Glomus etunicatum*), quando comparados ao controle, tiveram um melhor resultado para o crescimento vegetativo e nutrição dos três porta-enxertos. Há correlação da combinação específica entre isolado fúngico e variedade, e os benefícios proporcionados pela simbiose: *Glomus etunicatum*, beneficiando o porta-enxerto '043-43'; *Glomus etunicatum* e *Scutellopora heterogama*, os porta-enxertos 'SO4' e 'Paulsen 1103'. Durante a etapa de aclimatização e estabelecimento de dois porta-enxertos de cerejeira, AKA-KAÇAR *et al.* (2010), avaliaram o efeito da micorrização na absorção de nutrientes e produção de biomassa num total de cinco inóculos de FMA e um "mix" destes, cujos resultados confirmaram os efeitos positivos dos inóculos sobre os parâmetros analisados. Entretanto, CARNIEL (2004), estudando o uso de FMA para o desenvolvimento de dois porta-enxertos de videira ('Paulsen 1103' e '043-43'), verificou que estas variedades não sofreram influência dos inóculos e que a alta sobrevivência das plantas de videira deveu-se ao protocolo eficiente e aos cuidados tomados durante o processo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. & Gazey, C. 1994. Selection of inoculant vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Pp.461-481. In: Norris, J.R.; Read, D. & Varma, A.K. (eds.). **Techniques for Mycorrhizal Research. Methods in Microbiology**. Great Britain: Academic Press.

AGUÍN, O.; MANSILLA, J. P.; VILARIÑO, A.; SAINZ, M. J. Effects of mycorrhizal inoculation on root morphology and nursery production of three grapevine rootstocks. **American Journal Enology and Viticulture**, Reedley, v. 55, n. 1, p. 108-111, 2004.

AKA-KAÇAR, Y.; AKPINAR, C.; AGAR, A.; YALÇIN-MENDY, Y.; SERÇE, S.; ORTA, Y. The effect of mycorrhiza in nutrient uptake and biomass of cherry rootstocks during acclimatization. **Romanian Biotechnological Letters**, Romênia, v. 15, n. 3, p. 5246-5252, 2010.

ALBUQUERQUE, T.C.S. de. Avaliação de genótipos de uva no semi-árido brasileiro. In: QUEIRÓZ, M.A de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R., (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. (on-line). Versão 1.0. Petrolina, PE: Embrapa Semi-Árido/Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,1999. Disponível via World Wide Web <<http://www.cpatsa.embrapa.br>>.

ALIZADEH, O.; PARSAEIMEHR, A. A study on the inoculated root of *Sorghum vulgare* by mycorrhiza under the water stress condition. **Elba Bioflux**, 2011, v. 3, p. 83-88, 2011.

AMARAL, A. L.; CAMARGO, U. A.; OLIVEIRA, P. R. D. Uvas sem sementes: uso da biotecnologia na busca de novas cultivares apirênicas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 10, p. 108-112, 1999. Encarte especial 108.

AMARAL, A. L.; OLIVEIRA, P. R. D.; CZERMAINSKI, A. B. C.; CAMARGO, U. A. Estádios de desenvolvimento de embriões na obtenção de plantas em cruzamentos entre genitores apirenos de videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 647-651, 2001.

ANGRA, D. C.; BARBOSA, M. M.; PRESTES, A. M.; MORAES-FERNANDES, M. I. B. de. Cultivo de embriões em retrocruzamentos entre *Triticum aestivum* Thell. e *Agropyron elongatum* Host & Beauv. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 209-215, 1999.

ANZANELLO, R.; SOUZA, P. V. D.; CASAMALI, B. Fungos micorrizicos arbusculares (FMA) em porta-enxertos micropropagados de videira. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 2, p. 409-415, 2011.

ARAGÃO, F. A. S.; RIBEIRO, C. S. da C.; CASALI, V. W. D.; GIORDANO, L. de B. Cultivo de embriões de tomate in vitro visando a introgressão de genes de *Lycopersicon peruvianum* em *L. esculentum*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 20, n. 4, p. 605-610, 2002.

BAYLIS, G. T. S. The magnolioid mycorrhiza and mycotrophy in root systems derived from it. In: SANDERS, F. E.; MOSSE, B.; TINKER, P. B. (Ed.). **Endomycorrhizas**. London: Academic Press, 1975. p. 373-389.

BONFANTE-FASOLO, P. Some ultrastructural features of the vesicular-arbuscular mycorrhiza in the grapevine. **Vitis**, Geneva, v. 17, n. 4, p. 386-395, 1978.

BONFANTE, P.; PEROTTO, S. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. **New Phytologist**, Oxford, v. 130, p. 3-21, 1995.

BONFANTE, P.; GENRE, A. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. **Nature Communications**, New York, v. 1, n. 48, 2010.

BORTOLETI, K. C. A.; BENKO-ISEPPON, A. M.; MELO, N. F.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C. Chromatin differentiation between *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek and *V. unguiculata* (L.) Walp. (Fabaceae). **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 298, p. 689–693, 2012.

BRASILEIRO-VIDAL, A. C. **Caracterização cromossômicas de híbridos intergenéricos de trigo (*Triticum aestivum* x *Thinopyrum ponticum*) com diferentes combinações**. 2003. 136 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

BRUNDETT, M. Mycorrhizas in natural ecosystems. **Advanced Ecological Research**, London, v. 21, p. 171-313, 1991.

CAIN, D. W.; EMERSHAD, R. L.; TARAIOLO, R.E. In ovulo embryo culture and seedling development of seed and seedless grape (*Vitis vinifera* L.). **Vitis**, Geneva, v. 22, n. 1, p.9-14, 1983.

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. 7p. (EMBRAPA-CNPUV. Circular técnica, 26).

CAMARGO, U. A. Melhoramento genético: variedades de uvas sem sementes para o Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 12. 2008. Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008. p.185.

CANÇADO, G. M. A.; RIBEIRO, A. P.; FREITAS, G. F.; SÁ, M. E. L.; SILVA, H. E. S.; PASQUAL, M.; VAL, A. D. B.; NUNES, C. F. Cultivo de plantas in vitro e suas aplicações. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 253, p. 64-74, 2009.

CARNEIRO, W. M.A.; COELHO, M. C. do S. G. A viticultura no Nordeste brasileiro: características e perspectiva da atividade para a região. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 45., 2007, Londrina. **Conhecimento para a agricultura do futuro: anais**. Londrina: SOBER: IAPAR: UEL, 2007. 1 CD-ROM .

CARDOSO, M. B. **Análises citogenéticas em linhagens sintéticas de *Triticum aestivum* L. em Thell. (*T. durum* L. x *Aegilopes tauschii* Coss) e seus cruzamentos com**

cultivares de trigo, visando a introgressão de resistência à ferrugem da folha. 2007. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências) – UERGS, Porto Alegre.

CARNIEL, E. **Uso de fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento de porta-enxertos de videira e no controle biológico de *Fusarium oxysporum f. sp. herbemontis*.** 2004. 84 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - UFRGS, Porto Alegre.

CAVALCANTE, U. M. T.; GOTO, B. T.; MAIA, L. C. Aspecto da simbiose micorrízica arbuscular. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 5/ 6, p. 180-208, 2008/2009.

CHU, E. Y. Micorrizas. In: DUARTE, M. De L. R. (Ed.). **Cultivo de pimenteira-do-reino na Região Norte.** Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2005. (Embrapa Amazônia Oriental. Sistemas de produção, 1). Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/PimenteiradoReino/paginas/micorrizas.htm>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

CID, L. P. B. **A propagação in vitro de plantas: o que é isso?.** Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br>>. Acesso em: 9 out. 2012.

CUNHA, J.; SANTOS, M. T.; VELOSO, M.; CARNEIRO, L.; EIRAS-DIAS, J.; FEVEREIRO, P. The portuguese vitis vinifera l. germplasm: genetic relations between wild and cultivated vines o germoplasma português de vitis vinifera L.: relações genéticas entre videiras selvagens e castas cultivadas. **Ciência e Técnica e Vitivinícola**, Dois Portos, v. 25, n. 1, p. 25–37, 2010.

COUTO, A. **Dificuldade na exportação fez Itep abrir escritório em Roterdã.** Folha de Pernambuco, 19 de setembro de 2011. Disponível em: <http://www.sppe.org.br/> > Acesso em: 06 de out. de 2011.

DANTAS, L. G.; GUERRA, M. Chromatin differentiation between *Theobroma cacao* L. and *T. grandiflorum* Schum. **Genetics and Molecular Biology**. Ribeirão Preto, v. 33, n. 1. p. 94-98, 2010.

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

EMERSHAD, R. L.; RAMMING, D. W.; SERPE, M. D. In ovulo embryo development and plant formation from stenospermic genotypes of *Vitis vinifera* L. **American Journal of Botany**, Bronx, v.76, n. 3, p. 397-402, 1989.

ESTRADA-LUNA, A. A.; DAVIES JÚNIOR, F. T.; EGILLA, J. N. Mycorrhizal fungi enhancement of growth and gas exchange of micropropagated guava plantlets (*Psidium guajava* L.) during *ex vitro* acclimatization and plant establishment. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 10, p. 1-8, 2000.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 221 p.

FALISTOCCO, E.; PASSERI, V.; MARCONI, G. Investigations of 5S rDNA of *Vitis vinifera* L.: sequence analysis and physical mapping. **Genome**, Ottawa, v. 50, p. 927-938, 2007.

FELDMANN, F.; IDCZAK, E. Inoculum production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for use in tropical nurseries. In: NORRIS, J. R.; READ, D.; VARMA, A. K. (Ed.). **Techniques for mycorrhizal research methods in microbiology**. San Diego: Academic Press, 1994. p. 799-817.

FERRAZ, J. M. G. A insustentabilidade da revolução verde. **Informativo Meio Ambiente e Agricultura**, v. 7, n. 26, abr./jun. 2008. Disponível em: <<http://www.cnpma.embrapa.br>>. Acesso em: 13 abr. 2011.

FERREIRA, A. G.; HU, C.Y. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1. p. 371-393.

FRALEIGH, B. Global overview of group genetic resources. In: RUANE, J.; SONNINO, A. (Ed.). **The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources**. Rome: FAO, 2006. p. 21-32.

FRANKEL, O. H.; BROWN, A. H. D. Plant genetic resources today – a critical appraisal. In: HOLDEN, J. H.W.; WILLIAMS, J. T. (Ed.). **Crop genetic resource: conservation and evaluation**. London: Gorge Allen & Unwin, 1984. p. 249-257.

GEBBING, H.; SCHWAB, A.; ALLEWELDT, G. Mycorrhiza of vines. **Vitis**, v. 16, p. 279-285, 1977.

GIACOMETTI, D.C. Impacto atual da cultura de tecidos em plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicação da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1990. p.19-25.

GIACOMETTI, D. C. Recursos genéticos de fruteiras nativas do Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FRUTEIRAS NATIVAS, 1992, Cruz das Almas. **Anais...** Cruz das Almas: EMBRAPA–CNPMF, 1993. p. 13-27.

GRANGER, R. L.; PLANCHETTE, C.; FORTIN, J. A. Effect of a vesicular-arbuscular (VA) endomycorrhizal fungus (*Glomus epigaeum*) on the growth and leaf mineral content of two apple clones propagated in vitro. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 63, p. 551-555, 1983.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. de. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 131 p.

HU C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.M.; ed. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa- SPIEmbrapa-CNPH, v. 1, p.371-393, 1999.

ILNICKI, T.; SZELANG, Z. Chromosome numbers in *Hieracium* and *Pilosella* (Asteraceae) from Central and Southeastern Europe. **Acta Biologica Cracoviensia**, v. 53, n. 1, p. 102-110, 2011.

JACKSON, R. S. **Wine science: principles and applications**. 3ed. Academic Press. p. 776. 2008.

LEAL, F.; LOUREIRO, J.; RODRIGUEZ, E.; PAIS, M. S.; SANTOS, C.; PINTO-CARNIDE, O. Nuclear DNA content of *Vitis vinifera* cultivars and ploidy level analyses of somatic embryo-derived plants obtained from anther culture. **Plant Cell Reports**, New York, v. 25, p. 978-985, 2006.

LEÃO, P. C. de S. Principais cultivares de uvas finas de mesa. In: LEÃO, P. C. de S. (Ed.). **Uva de mesa: produção e aspectos técnicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. cap. 5, p. 26-33. (Frutas do Brasil, 13).

LEÃO, P. C. de S.; SILVA, E. E. G da. Brotação e fertilidade de gemas em uvas sem sementes no Vale do São Francisco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n.3, p.375-378, 2003.

LEÃO, P. C. de S.; SOARES, J. M.; RODRIGUES, B. L. Principais cultivares. In: SOARES, J. M.; LEÃO, P. C. de S (Eds). **A vitivicultura no Semiárido Brasileiro**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Petrolina: Embrapa Semiárido, 2009. 756p.

LEÃO, P. C. de S.; SILVA, D. J.; BASSOI, L. H. Uva. In: SANTOS-SEREJO, J. A. dos.; DANTAS, J. L. L.; SAMPAIO, C. V.; COELHO, Y. da S. (Ed). **Fruticultura tropical: espécies regionais e exóticas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. p. 477-509.

LEMOS, I. B. **Simbiose micorrízica arbuscular em porta-enxertos de videira** (*Vitis* spp.). 2008. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

LOCATELLI, L. M.; LOVATO, P. E. Inoculação micorrízica e aclimatização de dois porta-enxertos de macieira micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 2, p. 177-184, 2002.

LOVATO, P. E.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; TROUVELOT, A.; GIANINAZZI, S. The state of art of mycorrhizas and micropropagation. **Advances in Horticultural Science**, Firenze, v. 10, p. 46-52, 1996.

MAIA, J. D. G.; CAMARGO, U.A.; RITSCHER, P. **Cultivares: uvas de mesa**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2011. 19p (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 74).

MARTINS, F. P. **Aspecto da viticultura brasileira** (2005) Disponível em: <<http://www.todafruta.com.br>>. Acesso em: 30 ago. 2011.

MATSUOKA, M., SAGGIN JÚNIOR, O. J.; LOUREIRO, M. F. Fungos micorrízicos arbusculares em agrossistemas de videiras na região de Primavera do Leste-MT. **Revista de Agricultura Tropical**, Cuiabá, v. 1, p. 113-134, 2002.

MELLO, L. M. R. **Atuação do Brasil no mercado vitivinícola mundial: panorama 2011**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2012. 3 p (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 116).

MELO, N. F de. **Caracterização citogenética de espécies silvestres e cultivadas de maracujazeiro** (*Passiflora* spp.). 2002. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

MELO, N. F.; GUERRA, M. Variability of the 5S DNAr Sites in Passifloraceae L. Species with Distinct Base Chromosome numbers. **Annals of Botany**, London, v. 92, p. 309-316, 2003.

MIRANDA, J. C. C.; VILELA, L.; MIRANDA, L. N. Dinâmica e contribuição da micorríza arbuscular em sistemas de produção com rotação de culturas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 10, p. 1005-1014, 2005.

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

NAPPI, P.; JODICE, R.; KOFLER, A. Micorrize vescicolo-arbuscolari in vigneti dell'alto adige sottoposti a differenti tecniche di cavarazione del suolo. **Allionia**, Torino, v. 24, p. 27-42, 1980/1981.

NASCIMENTO, J. M. L.; RESENDE, P. X.; VIEIRA JÚNIOR, A. M.; SILVA, A. F.; QUEIROZ, M. A. A.; YANO-MELO, A. M. Desenvolvimento vegetativo de *manihot esculenta* cranz. Em resposta à adubação fosfatada e inoculação micorrízica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 14.; FEIRA BRASILEIRA DA MANDIOCA, 1., 2011, Maceió. **Mandioca: fonte de alimento e energia: anais**. Maceió: ABAM: SBM, 2011. 1 CD-ROM.

NEWSHAM, K. K.; FITTER, A. R.; WATKINSON, A. R. Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 10, n. 10, p. 407-411, 1995.

NIKOLAOU, N.; KARAGIANNIDIS, N.; KOUNDOURAS, S & FYSARAKIS, I. Effect of different P sources in soil on increasing growth and mineral uptake of mycorrhizal *Vitis vinifera* L. (cv. Victoria) vines. **Journal International Sciences Vigne Vin**, v. 36, n.4, p. 195-204, 2002.

NIKOLAOU, N.; ANGELOPOULOS, K.; KARAGIANNIDIS, N. A. Effects of drought stress on mycorrhizal and non-mycorrhizal cabernet sauvignon grapevine, grafted onto various rootstocks. **Experimental Agriculture**, London, v. 39, n. 3, p. 241-252, 2003a.

NIKOLAOU, N.; KOUKOURIKOU, M.; ANGELOPOULOS, K. & KARAGIANNIDIS, N. Cytokinin content and water relations of 'Cabernet Sauvignon' grapevine exposed to

drought stress. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, West Sussex, v. 78, n. 1, p. 113-118, 2003b.

ORTOLANI, F. A.; MATAQUEIRO, M. F.; MORO, J. R. Caracterização citogenética em *Schlumbergera truncata* (Haworth) Moran e *Schlumbergera* × *buckleyi* (T. Moore) Tjaden (Cactaceae). **Acta Botânica Brasílica**, Brasília, DF, v. 21, n. 2, p. 361-367, 2007.

PAGLIARINI, M. S.; POZZOBON, M. T. Meiose em vegetais: um enfoque para a caracterização de germoplasma. In: CURSO DE CITOGENÉTICA APLICADA A RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 2., 2004, Brasília, DF. **Curso...** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. p. 24-40. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 154).

PEÑALOZA, A. P. S. **II Curso de Citogenética Aplicada a Recursos Genéticos Vegetais**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília – DF. 8 a 12 de novembro de 2004.

PIEROZZI, N. I. Caracterização dos cromossomos mitóticos de espécies diploides de café por técnicas convencionais e de bandeamento-C e NOR. **O Agrônomo**, Campinas, v. 59, n. 1, 2007.

PINTO-MAGLIO, C. A. F.; POMMER, C. V.; PIEROZZI, N. I. Giemsa staining and fluorescent chromosome banding in some *Vitis* L. species. **Caryologia**, Firenze, v. 63, n. 4, p. 339-348, 2010.

POMMER, C. V.; RAMMING, D. W.; EMERSHAD, R. L. Influência do genótipo, época de maturação, tamanho da semente-traço e época da cultura sobre o desenvolvimento da embrião no óvulo e a formação da planta da videira. **Bragantia**, Campinas, v. 54, n. 2, p. 237-249, 1995.

POSSINGHAM, J. V.; GROOT-OBBINK, J. Endotrophic mycorrhiza and the nutrition of grape vines. **Vitis**, Geneva, v. 10, p. 120-130, 1971.

POZZOBON, M. T.; SOUZA, K. R. R. de.; CARVALHO, S. I. C.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Meiose e viabilidade polínica em linhagens avançadas de pimenta. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 29, n. 2, p. 212-216, 2011.

RITSCHHEL, P.; SEBBEN, S. de S.; CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G. **Embrapa Uva e Vinho: novas cultivares brasileiras de uva**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010. 64p.

RUIZ-LOZANO, J. M.; AZCÓN, R. Symbiotic efficiency and infectivity of autochthonous arbuscular mycorrhizal *Glomus* sp. from saline soils and *Glomus deserticola* under salinity. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 10, p. 137-143, 2000.

RUIZ, V. S. Avances em viticultura em el mundo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, p. 131-143, 2011. Número especial.

SAGGIN JÚNIOR, O. J.; SIQUEIRA, J. O. Micorrizas arbusculares em cafeeiro. In: SIQUEIRA, J. O. (Ed.) **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras: UFLA, 1996. p. 203-254.

SAGGIN JR, O. J.; LOVATO, P. E. Aplicação de micorrizas Arbusculares na produção de mudas e plantas micropropagadas. Pp. 725-773. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E. & CARVALHO, J. G. (Eds). **Interrelação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Lavras: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo e Universidade Federal de Lavras/DCS, 1999.

SAGGIN JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. da. Micorriza arbuscular: papel, funcionamento e aplicação da simbiose. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. (Ed.). **Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Seropédica: Embrapa Agroecologia, 2005. cap.5. p. 101-149.

SCHELLEMBBAUM, L.; BERTA, G.; RAVOLANIRINA, F.; TISSERANT, B.; GIANINAZI, S.; FITTER, A. H. Influence of endomycorrhizal infection on root morphology in a micropropagated woody plant species (*Vitis vinifera* L.). **Annals of Botany**, London, v. 68, p. 135-141, 1991.

SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with Cromomicin and DAPI. **Chromosoma**, Berlin, v. 58, p. 307-354, 1976.

SIEVERDING, E. **Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems**. Eschborn: GTZ, 1991. 371 p.

SILVA, P. C. G.; CORREIA, R. C.; SOARES, J. M. Histórico e importância socioeconômica. In: SOARES, J. M.; LEÃO, P. C. de S. **A viticultura no Semiárido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2009. p. 21-34.

SMITH, S. E.; FACELLI, E.; POPE, S.; ANDREW-SMITH, F. Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. **Plant Soil**, The Hague, v. 326, p. 3–20, 2010.

SINGH, N. V.; SINGH, S. K.; SINGH, A. K.; MESHAM, D. T.; SUROSHE, S. S.; MISHRA, D. C. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) induced hardening of micropropagated pomegranate (*Punica granatum* L.) plantlets. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 136, p. 122–127, 2012.

SIQUEIRA, J. O. Micorrizas: formas e função. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 1., 1986, Lavras. **Anais...** Lavras: FAEPE, 1986. p. 5-32.

SIQUEIRA, J. O. Micorrizas arbusculares. In: ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília, DF: Embrapa-SPI, 1994. p.154-194.

SIQUEIRA, J. O.; LAMBAIS, M. R.; STÜRMER, S. L. Fungos micorrízicos arbusculares. **Biociência**, Brasília, DF, v. 25, p. 12-21, 2002.

- SOUZA, F.A.; SILVA, I. C. L.; BERBARA, R.L. L. Fungos micorrízicos arbusculares: Muito mais diversos do que se imaginava. In: MOREIRA, F., ed. **Biodiversidade em ecossistemas tropicais**. Lavras, UFLA, 2007. p. 501-556.
- SPIEGEL-ROY, P.; SAHAR, N.; BARON, J. LAVI, U. In vitro culture and plant formation from grape cultivars with abortive ovules and seeds. **Journal of American Society of Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 110, p. 109-112, 1985.
- STOUT, A. B. **Seedlessness in grapes**. New York: Agricultural Experiment Station, 1936. 68 p. (Technical Bullentin, 238).
- SYLVIA, D. M. Mycorrhizal symbiosies. In: SYLVIA, D. M.; FUHRMANN, J. J.; HARTEL, P. G.; ZUBERER, D. A. (Ed.). **Principles and applications of soil microbiology**. New Jersey : Prentice Hall, 1998. cap. 18, p. 408-425.
- TRINDADE, A.V.; LINS, G. M. L.; MAIA, I. C. S. Substratos e fungo micorrízico arbuscular em mudas micropropagadas de bananeira na fase de aclimação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 137-142, 2003.
- VALLS, J. F. M. Caracterização morfológica, reprodutiva e bioquímica de germoplasma vegetal. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1., 1988, Jaboticabal. **Resumos...** Jaboticabal: UNESP, 1988. p. 106-125.
- VAROQUAUX, F.; BLANVILLAIN, R.; DELSENY, M.; GALLOIS, P. Less is better: new approaches for seedless fruit production. **Trends and Biotechnology**, Amsterdam, v. 18, n. 6, p. 233-242, 2002.
- VILLA-LOBOS, A., V.M., THORPE, T.A. Micropropagacion: conceptos, metodologia y resultados. In: ROCA, W.M., MROGINSKI, L.A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones**. Cali, Colombia : CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), 1991, p.127-141.
- YAMAMOTO, M.; TAKADA, N.; YAMAMOTO, T.; TERAOKAMI, S.; SHIGETA, N.; KUBO, T.; TOMINAGA, S. Fluorescent Staining and Fluorescence in situ Hybridization of rDNA of Chromosomes in Pear (*Pyrus* spp.). **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokyo, v. 81, n. 1, p. 35-40, 2012.
- YANO-MELO, A. M.; SAGGIN JÚNIOR., O. J.; LIMA FILHO, J. M.; MELO, N. F.; MAIA, L. C. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the acclimatation of micropropagated banana plantlets. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 9, p. 119-123, 1999.

CAPÍTULO 1

Resgate de embriões e avaliação do desenvolvimento *in vitro* de híbridos intraespecíficos de videira sem sementes ('Superior x Thompson')

RESUMO

A produção de frutas para exportação é uma atividade economicamente significativa em Petrolina-PE/Juazeiro-BA, eixo do Vale do Rio São Francisco. A necessidade de novos materiais genéticos mais adaptados ao clima tropical e às exigências do mercado consumidor tem levado ao desenvolvimento de novas cultivares de uva finas apirênicas. Nesse caso, a utilização da técnica de resgate de embriões tem produzido resultados satisfatórios para a obtenção desses materiais, principalmente nas condições do semiárido brasileiro. O presente estudo teve por objetivo avaliar o desenvolvimento *in vitro* de híbridos intraespecíficos de videira (*Vitis vinifera* L.), provenientes do resgate de embriões imaturos resultantes do cruzamento das variedades ‘Superior Seedless’ e ‘Thompson Seedless’. Para o estabelecimento e desenvolvimento da cultura foi utilizado o meio nutritivo proposto por Galzy (1964) suplementado com 30g/L de sacarose, 0,1g/L de mio-inositol, 0,002 g/L de glicina, 0,1mg/L de ácido indolacético (AIA) e 6,5g/L de ágar, com pH ajustado para 5,7. O experimento foi avaliado após 90 dias em sala de crescimento. As variáveis mensuradas foram: número de nós, número de folhas, altura das plantas (cm), número de raízes e comprimento (cm) do sistema radicular e entrenós. O período de 60 dias de cultivo das sementes-traço de híbridos de videira ‘Thompson Seedless’ x ‘Superior Seedless’ resultou em um maior número de embriões produzidos (aproximadamente 50%), bem como em estádios de desenvolvimento melhor caracterizados e com maiores valores de germinação (47,3%). Os três híbridos de videira avaliados na micropropagação apresentaram valores médios dos parâmetros mensurados muito similares, mesmo tendo sido originados a partir de embriões de diferentes estádios de desenvolvimento.

Palavras-chaves: *Vitis vinifera*, uva sem sementes, cultivo *in vitro* de embriões.

ABSTRACT

The production of fruit for export is an economically significant activity in Petrolina-PE/Juazeiro-BA, São Francisco Valley. The need for new genetic material more suited to the tropical climate and the demands of the consumer market, has led to the development of new varieties of seedless grapevines. In this case, the use of the embryo rescue technique has produced satisfactory results for obtaining these materials, especially under semiarid Brazilian condition. The present study aimed to evaluate the *in vitro* development of intraespecific hybrids of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from the rescue of immature embryos resulting from the crossing of varieties 'Superior Seedless' and 'Thompson Seedless'. For the establishment and development of the culture was used for Galzy proposed nutrient medium (1964) supplemented with 30g/L sucrose, 0.1 g/L myo-inositol, 0.002 g/L glycine, 0.1 mg/L of acid indoleacetic acid (IAA) and 6.5 g/L agar, pH adjusted to 5.7. The experiment was evaluated after 90 days in a growth chamber. The variables measured were: number of nodes, number of leaves, plant height (cm), root number and length (cm) of roots and internodes. The period of 60 days after inoculation of seed trait from hybrid 'Thompson Seedless' x 'Superior Seedless' resulted in an increased number of embryos produced (approximately 50%), as well as both developmental stages and better characterized embryos with higher germination values (47.3%). The three grapevine hybrids evaluated in micropropagation showed average values of the parameters measured very similar, even having originated from embryos of different development stages.

Keywords: *Vitis vinifera*, seedless grapes, *in vitro* embryos.

INTRODUÇÃO

A cultura da videira apresenta especial importância econômica e social no Submédio do Vale do São Francisco, na medida em que envolve um grande volume anual de negócios voltados para os mercados interno e externo, destacando-se entre as culturas irrigadas da região, como a que apresenta o maior coeficiente de geração de empregos diretos e indiretos (SILVA *et al.*, 2011).

A viticultura na região possui especificidade em virtude da adaptação e do comportamento diferenciado nessas condições climáticas. Os processos fisiológicos das plantas são acelerados, a propagação é muito rápida e em cerca de um ano e meio, após o plantio, inicia-se a primeira safra. Considerando que o ciclo de produção oscila em torno de 120 dias, pode-se obter até duas safras e meia por ano, mediante o manejo da irrigação e a realização de podas programadas. Essa região é a única no Brasil que exporta uva sem semente. As variedades apirênicas representam um quarto do total das uvas finas de mesa exportadas pelo Vale. À medida que cresce sua preferência entre os consumidores, ocorre a expansão das áreas de cultivo que, no Polo de Irrigação de Petrolina-PE/Juazeiro-BA, chegaram a cerca de 2.500 ha irrigados com tendência de expansão (ARAÚJO E ARAÚJO, 2006.; ABANORTE, 2012).

Devido a tais tendências, é prioritário o desenvolvimento de novas variedades de uvas finas, principalmente apirênicas, adaptadas às diferentes regiões, e que apresentem elevada fertilidade natural, qualidade compatível com as exigências do mercado e que sejam menos exigentes em mão de obra especializada em práticas como o raleio de bagas (CAMARGO *et al.*, 2010).

A contribuição da biotecnologia para a cultura da videira no Vale do São Francisco encontra-se principalmente na eliminação de vírus, na seleção, manutenção e multiplicação de plantas com caracteres desejáveis, e na obtenção de novas variedades sem sementes (MELO, 2004). Nesse caso, o aprimoramento e uso rotineiro da técnica de resgate de embriões são decisivos para o aumento da eficiência do programa de melhoramento genético da videira, viabilizando a obtenção de grande número de plantas apirênicas por ciclo de cruzamento. A técnica de resgate de embriões imaturos proporciona ganhos genéticos importantes para o caráter apirenia, com a redução do tamanho da semente traço,

decorrente de cruzamentos entre genitores sem sementes (HU e FERREIRA, 1998; CAMARGO, 2003). As vantagens decorrentes do uso dessa técnica foi avaliada por GONÇALVES *et al.* (2007) nas condições ambientais do semiárido brasileiro, quantificando a eficiência na regeneração de plantas por cruzamento controlado quando se aplica a técnica de resgate de embriões.

O presente estudo teve por objetivo avaliar o desenvolvimento *in vitro* de híbridos intraespecíficos de videira (*Vitis vinifera* L.) provenientes do cruzamento das variedades ‘Superior Seedless’ e ‘Thompson Seedless’, visando gerar novos genótipos para o programa de melhoramento genético da videira.

MATERIAL E MÉTODOS

Os híbridos de videira utilizados no presente trabalho foram provenientes do cruzamento entre as variedades ‘Thompson Seedless’ e ‘Superior Seedless’, realizado em plantas cultivadas no Campo Experimental de Bebedouro da Embrapa Semiárido, de acordo com os procedimentos propostos por POMMER (2003). Oito semanas após os cruzamentos, 152 sementes-traço foram retiradas dos frutos obtidos, sendo inoculadas em meio de cultura de GALZY (1964) sob condições assépticas. Após 30 dias de cultivo, foi realizado o isolamento dos embriões imaturos em 76 sementes-traço, sendo os embriões das outras 76 sementes isolados após 60 dias de cultivo. Nesse caso, os embriões foram classificados de acordo com seu estágio de desenvolvimento e inoculados em novos meios de cultura, utilizando-se a formulação de GALZY (1964) (Tabela 1). Um terceiro grupo de sementes-traço foi cultivado por 180 dias no meio de cultura inicial, como tratamento adicional.

Para a análise da micropropagação, foram avaliados três híbridos, provenientes de plântulas com 60 dias de cultivo, e obtidas a partir de embriões de cada estágio de desenvolvimento (globular, cordiforme e torpedo), sendo utilizados segmentos nodais com aproximadamente 1 cm de comprimento, contendo uma gema axilar. As plântulas foram micropropagadas e inoculadas em 15 ml de meio de meio de cultura, utilizando-se tubos de ensaio como recipientes, sendo os mesmos fechados com tampas de papel alumínio e vedados com filme plástico PVC. Foi utilizada a formulação de sais inorgânicos e vitaminas proposta por GALZY (1964), suplementada com 30g/L de sacarose, 0,1g/L de mio-inositol, 0,002 g/L de glicina, 0,1mg/L de ácido indolacético (AIA) e 6,5 g/L de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem, sob pressão de 1 atm e temperatura de 121°C, por 20 minutos. O material foi cultivado durante 90 dias em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h, temperatura entre 23±27 °C e radiação fotossintética ativa de 40 $\mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

O delineamento experimental utilizado foi em inteiramente casualizado (DIC) com três tratamentos (três híbridos de videira) em vinte cinco repetições. As variáveis mensuradas foram: número de nós, número de folhas, número de raízes, altura das plantas (cm), comprimento do sistema radicular (cm) e comprimento dos entrenós (cm). As medições foram feitas com o auxílio de um paquímetro digital. A análise da variância foi

realizada utilizando-se o programa SisVar (FERREIRA, 2000), sendo as médias comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos em relação ao resgate de embriões imaturos. Das 76 sementes-traços abertas com 60 dias de cultivo foram resgatados 38 embriões, o que corresponde a 50% do total de sementes inoculadas. Desses 38 embriões, 36 germinaram, valor correspondente a 47,3% do total de sementes-traço inoculadas. Por outro lado, das 76 sementes-traços cultivadas por 30 dias, foram obtidos 25 embriões (35,9% do total) dos quais 15 embriões germinaram, resultando num percentual de 19,7% de desenvolvimento de plântulas híbridas. No controle adicional ocorreu germinação em 3% das sementes-traço, 120 dias após a inoculação.

Estudando o resgate de embriões imaturos de algumas variedades de videira, VALDEZ (2005) relatou que não houve redução do número de embriões resgatados, mesmo quando as sementes-traço foram cultivadas por um longo período de tempo. Também TIAN *et al.* (2008), ao utilizarem a técnica de resgate de embriões imaturos como ferramenta para a introgressão de genes em variedades de videira, obtiveram resultados satisfatórios, conseguido 26,7% de embriões resgatados na variedade ‘Emerald Seedless’, com uma percentagem de plântulas desenvolvidas de 19,6% após 60 dias de cultivo. Por outro lado, os resultados obtidos por YANG *et al.* (2007), ao realizarem estudo do resgate de embriões em cruzamento de variedades diplóides e tetraplóides de videira, determinaram ser entre 35-45 dias o melhor período para remoção dos embriões das sementes-traço. No presente estudo, observa-se que o período de 60 dias de cultivo das sementes-traço resultou em um maior número de embriões produzidos, bem como em estádios de desenvolvimento melhor caracterizados e com maiores valores de germinação.

Nos dois períodos de avaliação, a análise do tipo de embriões resgatados em relação ao sucesso da germinação, demonstra uma alta correlação com o estágio de desenvolvimento globular, cordiforme e torpedado. Os embriões resgatados aos 30 dias em estágio indefinido não germinaram, provavelmente devido ao pouco tempo para o desenvolvimento no período avaliado. Vários trabalhos tem demonstrado a importância de determinar o melhor período para o isolamento de embriões imaturos provenientes de cruzamentos em videira. Em estudo realizado por BHARATHY *et al.* (2005), utilizando a técnica de resgate de embriões para a variedade de videira ‘Flame Seedless’, foram obtidos (100%) de embriões, porém com uma capacidade inferior (< 20%) de gerar plântulas.

RAMMING *et al.* (2000), por sua vez obtiveram 20 plântulas a partir de 44 embriões resgatados do cruzamento interespecífico entre *V. vinifera* e *V. rotundifolia*. SINHG *et al.* (2011) obtiveram, após 28 dias de cultivo, uma taxa de germinação de 12,67%. Em pesquisa realizada nas variedades de uva ‘Centennial Seedless’ e ‘Thompson Seedless’ por TANG *et al.* (2009), utilizando meios de cultura suplementado com benzilaminopurina, verificaram 11,9% de embriões desenvolvidos para a variedade ‘Thompson Seedless’. No nosso caso, os valores obtidos ficaram em torno de 50% de plântulas germinadas, demonstrando a boa eficiência da metodologia utilizada, com a utilização de 0,1 mg/L de ácido indolacético.

Tabela 1. Efeito do número de dias de cultivo *in vitro* de sementes-traço, sobre o desenvolvimento e germinação de embriões imaturos de híbridos de videira ‘Superior x Thompson’.

Número de dias após a inoculação	Número de sementes-traço inoculadas	Número de embriões resgatados (%)				Número de embriões germinados (%)			
30	76	25 (32,9%)				15 (19,7%)			
		G	C	T	I	G	C	T	I
		14	00	03	08	12	00	03	00
		(18,42%)	(0,00%)	(3,95%)	(10,53%)	(15,78%)	(0,00%)	(4,11%)	(0,00%)
		38 (50,0%)				36 (47,3%)			
60	76	G	C	T	I	G	C	T	I
		15	12	04	07	15	12	04	05
		(19,73%)	(15,78%)	(5,26%)	(9,21%)	(19,73%)	(15,78%)	(5,26%)	(6,57%)

G (globular); C (cordiforme); T (torpedo); I (indefinido)

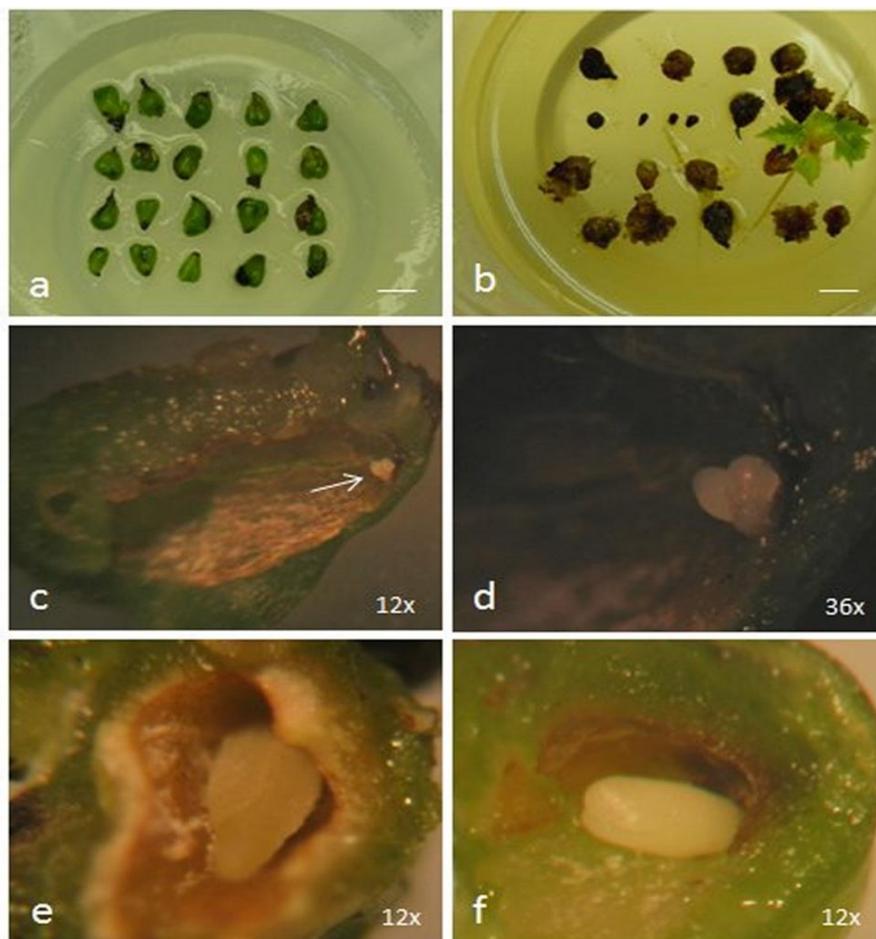


Figura 1. Cultivo *in vitro* de sementes-traço do híbrido de videira ‘Superior Seedless x ‘Thompson Seedless’. a) Sementes-traço 30 dias após a inoculação. b) Germinação *in vitro* de sementes-traço 120 dias após a inoculação; c) Semente-traço contendo embrião no estágio de desenvolvimento cordiforme (seta); d) Detalhe de embrião no estágio cordiforme; e) Detalhe de embrião em estágio de desenvolvimento indefinido; f) Semente-traço contendo embrião no estágio de desenvolvimento torpedo. Escalas em “a” e “b” correspondem a 2 cm com ampliações correspondentes em “c”, “d”, “e” e “f”.

A Tabela 2 apresenta os dados para o número médio de nós, folhas, altura, número de raízes, comprimento do sistema radicular e dos entrenós de três híbridos de videira ‘Superior x Thompson’, obtidos de embriões em diferentes estádios de desenvolvimento, após 90 dias de cultivo *in vitro*.

Tabela 2. Avaliação da micropropagação de três híbridos de videira ('Superior Seedless' x 'Thompson Seedless') obtidos de plântulas provenientes do resgate de embriões imaturos em diferentes estádios de desenvolvimento, após 90 dias de cultivo *in vitro*.

Híbridos	Número de nós	Número de folhas	Altura (cm)	Número de raízes	Comprimento das raízes (cm)	Comprimento dos entrenós (cm)
Híbrido 1 (globular)	7,72 a	8,72 a	7,37 a	1,36 a	3,65 b	3,79 a
Híbrido 2 (cordiforme)	7,68 a	8,64 a	6,29 b	1,32 a	4,58 a	3,43 b
Híbrido 3 (torpedo)	7,40 b	8,20 b	7,35 a	1,40 a	3,47 b	3,75 a

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

Observa-se que os três híbridos avaliados apresentam valores médios das variáveis mensuradas muito similares, mesmo tendo sido originados a partir de embriões de diferentes estádios de desenvolvimento. Nesse caso, as plantas oriundas dos híbridos 1 e 3 apresentaram valores ligeiramente superiores ao híbrido 2 para altura e comprimento dos entrenós. De uma maneira geral, em materiais genéticos mais próximos e sob as mesmas condições de cultivo, observa-se uma maior uniformidade na resposta de crescimento *in vitro*, como os resultados obtidos por MENEZES *et al.* (2007). Nesse caso, as variedades de videira sem sementes apresentaram valores similares para todas as variáveis analisadas.

CONCLUSÕES

1. O período de 60 dias de cultivo das sementes-traço de híbridos de videira ‘Superior Seedless’ x ‘Thompson Seedless’ resulta em um maior número de embriões produzidos, bem como em estádios de desenvolvimento melhor caracterizados e com maiores valores de germinação.
2. Os três híbridos de videira avaliados na micropropagação apresentam valores médios das variáveis mensuradas muito similares, mesmo tendo sido originados a partir de embriões de diferentes estádios de desenvolvimento.

REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABANORTE. **Vale do São Francisco é o maior exportador de frutas do país.** Disponível em: <http://www.abanorte.com.br/noticias>. Acesso em: 16 de dezembro de 2012.

ARAÚJO, E. P.; ARAÚJO, J. L. P. Análise do custo de produção e rentabilidade do cultivo da uva fina de mesa produzida na região do Submédio São Francisco. In: SIMPÓSIO DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, 13. 2006, Bauru. Empreendedorismo e sustentabilidade nos sistemas produtivos: **Anais...** Bauru: UNESP: Faculdade de Engenharia, 2006.

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

CAMARGO, U. A. Tecnologia vitícola: novas variedades. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 10., 2003, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. p. 127128.

CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G.; RITSCHER, P. **Embrapa Uva e Vinho: novas cultivares brasileiras de uva.** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010. 64 p.

GALZY, R. Technique de thermothérapie des virus de la vigne. **Annales des Epiphyties**, Paris, v. 15, p. 245256, 1964.

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

GONÇALVES, N. P. S.; BORGES, R. M. E. B.; GOMES, A. P. de O.; ALVES, E. O. dos S.; LEÃO, P. C. de S. Detrminação da eficiência na obtenção de híbridos de videira através da polinização controlada. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMIÁRIDO, 2., 2007, Petrolina. **Anais...** Petrolina: EMBRAPA SEMIÁRIDO, 2007. 1 CDROM.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília, df: EMBRAPASPI: EMBRAPACNPH, 1998. p. 371393.

MELO, N. F. de. Contribuição da biotecnologia no desenvolvimento da viticultura no Vale do São Francisco. In: SEMINÁRIO NOVAS PERSPECTIVAS PARA O CULTIVO DA UVA SEM SEMENTES NO VALE DO SÃO FRANCISCO, 2004, Petrolina. **Palestras...** Petrolina: Embrapa SemiÁrido, 2004. p. 91-95.

MENEZES, E. F.; YANOMELO, A. M.; RIBEIRO, J. M.; MELO, N. F. Avaliação da multiplicação *in vitro* de diferentes cultivares de videira (*Vitis vinifera* L.). In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMIÁRIDO, 2., 2007, Petrolina. **Anais...** Petrolina: Embrapa SemiÁrido, 2007. 1 CDROM.

POMMER, C. V. (Ed). **Uva**: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado. Porto Alegre, Cinco Continentes, 2003. 778 p. il.

RAMMING, D. W.; EMERSHAD, R. L.; TARAILO, R. A Stenospermocarpic, Seedless *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* Hybrid Developed by Embryo Rescue. **HortScience**, v. 35, n. 4, p. 732–734, 2000.

SILVA, P. C. G. da; COELHO, R. C. Caracterização social e econômica da cultura da videira. In: LEÃO, P. C. de S. **Cultivo da videira**. 2. ed. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. (Embrapa Semiárido. Sistemas de Produção, 1). Disponível em: < http://sistemas.deproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira_2ed/Caracterizaca_social_da_%20videira.html>. Acesso em: 20 ago. 2011.

SINGH, N. V.; SINGH, S. K.; SINGH, A. K. Standardization of embryo rescue technique and bio-hardening of grape hybrids (*Vitis vinifera* L.) using Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) under sub-tropical conditions. **Vitis**, v.50, n. 3, p. 115-118, 2011.

TANG, D.; WANG, Y.; CAI, J.; ZHAO, R. Effects of exogenous application of plant growth regulators on the development of ovule and subsequent embryo rescue of stenospermic grape (*Vitis vinifera* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 120, p. 51–57, 2009.

TIAN, L.; WANG, Y.; NIU, L.; TANG, D. Breeding of disease-resistant seedless grapes using Chinese wild *Vitis* spp. I. In vitro embryo rescue and plant development. **Scientia Horticulturae**, v. 117, p. 136–141, 2008.

VALDEZ, J. G. Immature embryo rescue of grapevine (*Vitis vinifera* L) after an extended period of seed trace culture. **Vitis**, v. 44, n. 1, p. 17-23, 2005.

YANG, D.; LI, W.; LI, S.; YANG, X.; WU, J.; CAO, Z. In vitro embryo rescue culture of F1 progenies from crosses between diploid and tetraploid grape varieties. **Plant Growth Regulation**, v. 51, p. 63-71, 2007.

CAPÍTULO 2

Eficiência de isolados de fungos micorrízicos arbusculares na aclimatização do híbrido intraespecífico de videira ‘Superior Seedless’ x ‘Thompson Seedless’

RESUMO

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica que permite a multiplicação em larga escala de genótipos de alta qualidade produtiva. Como as plantas oriundas do cultivo *in vitro* são isentas de micro-organismos, muitas vezes é necessária à inoculação de organismos simbiotes para promover o estabelecimento e o sucesso da produção de plantas. Dentre os micro-organismos que podem beneficiar as plantas existem os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), conhecidos por aumentar a absorção de nutrientes e promover o crescimento das plantas na aclimatização, etapa considerada crítica para o estabelecimento da planta. O objetivo deste trabalho foi estudar a associação micorrízica no estabelecimento *ex vitro* das plântulas, buscando selecionar isolados eficientes em promover o crescimento e a absorção de nutrientes em híbrido apirênico de videira 'Superior x Thompson' (*V. vinifera*). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por 4 tratamentos (1- Controle não inoculado, inoculados com 2- *Gigaspora albida*, 3- *Acaulospora longula*, 4- *Claroideoglossum etunicatum*) em 5 repetições, perfazendo um total de 20 plantas aclimatizadas. Após 120 dias da inoculação foram avaliados: número de folhas, peso foliar, área foliar, altura, diâmetro do caule, matéria seca e fresca (parte aérea e radicular), colonização micorrízica, número de glomerosporos e teor nutricional. Em geral as videiras inoculadas com *G. albida* tiveram maior desenvolvimento, verificados para número de folhas, área foliar e matéria seca da raiz e da parte aérea.

Palavras-chave: micropropagação; *Vitis vinifera* L.; FMA.

ABSTRACT

The plant tissue culture is a technique that allows multiplication of large scale production of high quality genotypes. As the plants from *in vitro* cultures are free from micro-organisms, it is often necessary inoculation of organisms' symbionts to promote the establishment and success of the production plants. Among the micro-organisms that can benefit the plants are arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), known to increase the absorption of nutrients and promote plant growth during the acclimatization stage considered critical to the establishment of the plant. The objective of this work was to study the mycorrhizal association in *ex vitro* seedling establishment, trying to select isolates effective in promoting growth and nutrient uptake in apirenic hybrid grapevine 'Superior x Thompson' (*V. vinifera*). The experimental design was completely randomized, with 4 treatments (1 - Control-uninoculated, inoculated with 2 - *Gigaspora albida*, 3 - *Acaulospora longula*, 4 - *Claroideoglosum etunicatum*) in 5 replicates, making a total of 20 plants acclimatized. After 120 days of inoculation were evaluated: number of leaves, leaf weight, leaf area, height, stem diameter, fresh and dry matter (root and shoot), mycorrhizal colonization, number of glomerospores and nutritional content. In general the grapevines inoculated with *G. albida* had a higher growth, verified for leaf number, leaf area and dry weight of root and shoot.

Keywords: micropropagation; *Vitis vinifera* L.; AMF.

INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica de grande aplicação na agricultura (ANDRADE, 2002), permitindo a produção de plantas geneticamente superiores e idênticas, em larga escala, e em curto período. A técnica de micropropagação pode ser aplicada para a produção de videiras viabilizando a implantação da cultura (COLLETO *et al.*, 2008) e de novos genótipos. Porém, uma das etapas críticas da micropropagação é a aclimatização, devido à transferência das plantas das condições *in vitro* para a *ex vitro* (RIBEIRO *et al.*, 2012).

Os entraves para a sobrevivência das plantas na fase de aclimatização pode ser transposto com a utilização de fungos benéficos, como os micorrízicos arbusculares, que exercem importante papel no estabelecimento e desenvolvimento de plantas micropropagadas (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) formam simbiose com a maioria das plantas e não há especificidade hospedeira, mas combinações mais favoráveis podem existir (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). A micorrização das plantas proporciona melhoria no estado nutricional e incremento no crescimento, minimizando os efeitos adversos de estresses bióticos e abióticos (SMITH e READ, 2008).

A videira é altamente dependente da associação micorrízica (BUTTENBENDER e SOUZA, 2005), porém é importante considerar que a utilização de diferentes espécies e/ou isolados de FMA pode resultar em diferentes respostas pelos hospedeiros (COSTA *et al.*, 2001). Nessas plantas, a associação micorrízica proporciona benefícios no crescimento e absorção de nutrientes. AGOSTINE (2002) analisando o desempenho de dois porta-enxertos de videira ('Paulsen 1103' e '101-14 Milladert et De Grasset') inoculadas com isolados de FMA (*Glomus clarum*, *Gigaspora margarita* e *Scutellospora pellucida*) verificou maior crescimento destes porta-enxertos quando inoculados com *G. clarum*. Além de aumentar o desenvolvimento, MOTOSUGI *et al.* (2002) constataram que a inoculação com isolados de *Gigaspora margarita* em porta-enxertos de videira ('Glorie de Montpellier', 'Rupestris St. George' e 'Courdec 3309') incrementava a absorção de fósforo. Em estudo realizado por SCHREINER *et al.* (2008) em videira da variedade 'Pinot noir', a inoculação com *Glomus mosseae* também foi eficiente para aumentar a

absorção de fósforo. Além de aumentar a absorção de fósforo, os FMA incrementam o peso seco da parte aérea e do número de nós em videira (KARAGIANNIDIS *et al.*, 2007).

A inoculação com o isolado de *G. etunicatum* influenciou o potencial hídrico, a taxa fotossintética e a sobrevivência de plantas ‘Sauvignon Blanc’ enxertadas com o porta-enxerto ‘Richter 99’ nos estádios iniciais de crescimento (VAN ROOYEAN *et al.*, 2004). Em pesquisa realizada por KRISHINA *et al.* (2005), foi observado que videiras var. ‘Pusha Navrang’ micorrizadas apresentavam maior sobrevivência ao serem transplantadas para as condições de casa de vegetação, demonstrando melhoria no estado fisiológico e nutricional. Estudando o crescimento e a aquisição de nutrientes em genótipos de videira, OZDEMIR *et al.* (2010) obtiveram maior crescimento de plantas micorrizadas do que as não micorrizadas. Recentemente, SINGH *et al.* (2011) estudando a associação micorrízica em híbridos provenientes de hibridações das variedades de videira de ‘Pusa Urvashi’ e ‘Beauty Seedless’ (como genitores femininos) e ‘Pusa Seedless’ e ‘Perlette’ (utilizados como genitores masculinos), verificaram que as plantas inoculadas com uma mistura de FMA tinham maior taxa de sobrevivência (>80 %) do que as plantas não inoculadas.

Portanto, o presente estudo teve por objetivo estudar a associação micorrízica no estabelecimento *ex vitro*, buscando selecionar isolados eficientes em promover o crescimento e absorção de nutriente em híbrido apirênico de videira ‘Superior x Thompson’.

MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado na aclimatização foram os híbridos apirênicos de videira ‘Superior x Thompson’ produzidos a partir de cruzamentos artificiais controlados das variedades ‘Superior Seedless’ e ‘Thompson Seedless’, e obtidos por meio da técnica de resgate de embriões, sendo conservados no Banco Ativo de Germoplasma *in vitro* da Embrapa Semiárido.

Para o experimento de aclimatização foi utilizado substrato constituído de solo (Latossolo): vermiculita: areia (2:1:1 v/v) esterilizado em autoclave à 120 °C por 1h30min por três dias consecutivos. Após este procedimento o substrato foi armazenado em recipiente fechado e mantido por 15 dias em repouso. O solo apresentava as seguintes características: pH 6,4; 0,37 dS/m de Condutividade Elétrica; 2,68 g/kg de M.O; 9,9 mg/dm³ de P; 0,21, 1,2; 0,4; 0,03 e 0,05 cmolc/dm³ respectivamente de K, Ca, Mg, Na e Al.

Os isolados de FMA utilizados foram: *Acaulospora longula* Spain & Schenck, *Gigaspora albida* Schenck & Smith (Univasf 31) e de *Claroideoglo mus etunicatum* (W.N. Becker & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler (Univasf 06). Esses isolados foram multiplicados em associação com o sorgo (*Sorghum bicolor*), duas gramíneas (*Panicum* sp. e *Brachiaria* sp.) e uma leguminosa (*Lablab purpureus*), em vasos com solo (argissolo) e areia (1:1 v/v) que foram previamente esterilizados; o cultivo foi mantido em casa de vegetação por 120 dias. O número de glomerosporos por grama de solo-inóculo era de 24, 12,5 e 18 para *Acaulospora longula*, *Gigaspora albida* e *Claroideoglo mus etunicatum*, respectivamente. O solo-inóculo foi mantido em geladeira a 4 °C por 3 meses. Foram aplicados para todos os tratamentos com FMA (*A. longula*, *C. etunicatum* e *G. albida*) 16 gramas de solo-inóculo, abaixo do sistema radicular das plântulas que apresentavam duas folhas apicais. Os recipientes utilizados foram copos descartáveis de 500 mL.

O delineamento experimental foi do tipo inteiramente casualizado com quatro tratamentos (1. Não inoculado – controle; inoculado com 2. *Acaulospora longula*; 3. *Gigaspora albida*; e 4. *Claroideoglo mus etunicatum*), em 5 repetições.

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido, Petrolina-PE. Os recipientes foram cobertos com um copo transparente de 500

mL de forma a simular uma câmara úmida, permanecendo por duas semanas nesta condição. Após este período, os copos de cobertura foram retirados e as plântulas transferidas para outra área do laboratório próxima às janelas, para receberem radiação solar, com fotoperíodo de 8h diárias de luz, com temperatura de 25 ± 3 °C, permanecendo por mais duas semanas. As plantas foram transferidas para casa de vegetação com temperatura de 25 ± 3 °C, 90 % de U.R. e $250-500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de radiação fotossintética ativa. No decorrer de todo o experimento as plantas foram regadas com água destilada, e avaliadas a cada 30 dias quanto à sobrevivência, altura, diâmetro do colo e número de folhas.

Após cerca de 120 dias da inoculação inicial das plantas, além das avaliações realizadas a cada 30 dias, foram avaliadas a área foliar, matéria fresca e seca do sistema radicular e da parte aérea (sendo considerado separadamente o caule das folhas), teor nutricional, colonização micorrízica e número de glomerosporos. A avaliação da área foliar foi feita com o auxílio do aparelho de análise foliar Li 3100 (LI – Co inc. Lincoln, Neb. USA). Para o diâmetro do caule foi utilizado um paquímetro digital, e a matéria fresca e seca do sistema radicular e da parte aérea foram obtidas por pesagem em balança semianalítica. A matéria seca foi obtida após secagem em estufa a 60 °C até peso constante. A avaliação nutricional da matéria seca da parte aérea e da raiz foi feita segundo a metodologia da EMBRAPA (1999).

Para a avaliação da colonização micorrízica 0,5 g de raízes finas foram separadas, lavadas, clarificadas e coradas com azul de tripano 0,05 % (PHILLIPS e HAYMAN, 1970). A colonização micorrízica foi avaliada pela técnica de interseção dos quadrantes (GIOVANETTI e MOSSE, 1980), contando-se 100 intersectos.

Os glomerosporos foram extraídos do solo utilizando a técnica de peneiramento úmido, seguido por centrifugação em água e sacarose (GERDEMANN e NICOLSON, 1963 e JENKINS, 1964) e quantificados em estereomicroscópio com aumento de 50 x.

Para as variáveis analisadas foi realizada a análise de variância (ANAVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os dados de colonização e números de glomerosporos foram transformados em arco seno da raiz de $x/100$ e raiz de $x + 1$, respectivamente. O programa utilizado foi o STATISTICA 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de sobrevivência das plantas do híbrido apirênico de videira ‘Superior x Thompson’ foi de 100 % na aclimatização. Estes valores são similares aos obtidos por CARNIEL (2004), que obteve para o portas-enxerto ‘Paulsen 1103’ e ‘043-43’ médias de 95 e 98,89 % de sobrevivência das plantas micropropagadas e inoculadas com *Glomus clarum* e *Acaulospora* sp.

Tabela 1. Área foliar (AF), matéria fresca foliar (MFF), matéria seca foliar (MSF), matéria fresca (MFA) e seca (MSA) parte aérea, matéria fresca (MFR) e seca (MSR) radicular no híbrido apirênico de videira ‘Superior x Thompson’, após 120 dias em casa de vegetação.

Tratamentos	AF (cm ²)	MFF (g)	MSF (g)	MFA (g)	MSA (g)	MFR (g)	MSR (g)
NI	34,664 b	2,814 ab	0,134 b	3,106 a	0,094 b	1,442 a	0,504 b
GA	85,124 a	2,912 a	0,327 a	2,926 b	0,18 a	1,552 a	1,082 a
CE	47,902 b	2,694 b	0,198 b	3,098 a	0,112 b	0,596 b	0,568 b
AL	39,836 b	2,816 ab	0,144 b	3,096 a	0,114 b	1,536 a	0,514 b

NI- não inoculado; GA- *Gigaspora albida*; CE- *Claroideoglomus etunicatum*; AL- *Acaulospora longula*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5 %.

A área foliar das plantas inoculadas com *Gigaspora albida* (85,124 cm²) foi estatisticamente superior aos demais tratamentos. Plantas inoculadas com *Acaulospora longula* (39,836 cm²), *C. etunicatum* (47,902 cm²) e não inoculadas com FMA, não diferiram estatisticamente entre si. O benefício da micorrização por *G. albida* na expansão da área foliar pode ser decorrente de uma maior afinidade deste isolado com o híbrido de videira testado, visto que as médias da área foliar dos demais isolados de FMA não diferiram significativamente pelo teste aplicado das não inoculadas (Tabela 1). Registros dos efeitos benéficos da inoculação de FMA em videira também foram feitos por KRISHINA *et al.* (2005), que obtiveram valores de área foliar aproximadamente 50% maiores nas plantas micorrizadas, quando comparados aos valores obtidos em plantas não micorrizadas.

Para matéria fresca da parte aérea, as videiras inoculadas com *Acaulospora longula* (3,09 g), *C. etunicatum* (3,09 g) e não micorrizadas (3,10 g) não diferiram estatisticamente,

apresentando médias superiores às plantas inoculadas com *G. albida* (Tabela 1). Porém, para biomassa seca da parte aérea, maiores valores foram encontrados em videiras inoculadas com *G. albida* (0,18 g), seguidos por *A. longula* e *C. etunicatum* e não inoculadas com FMA, que não diferiram estatisticamente entre si.

A matéria aérea foliar das plantas micorrizadas com *G. albida* (2,912 g) foi superior ao verificado nos demais tratamentos, enquanto que plantas inoculadas com *C. etunicatum* tiveram menor média (2,694 g), diferindo significativamente dos valores de *G. albida*.

Para a variável matéria fresca radicular, os híbridos apirênicos de ‘Superior x Thompson’ inoculados com *A. longula* (1,53 g), *G. albida* (1,55 g) e não micorrizadas (1,44 g) não diferiram estatisticamente entre si, sendo os valores destes tratamentos superiores aos encontrado em plantas micorrizadas por *C. etunicatum*. Em porta-enxerto de videira ‘S04’ provindos de estacas, CANGAHUALA-INOCENTE *et al.* (2011) observaram que após cinco meses da inoculação com duas espécies de *Glomus* (*G. irregulare* e *G. mosseae*), maior desenvolvimento foi observado com plantas micorrizadas por *G. mosseae*, sugerindo que independentemente da origem das plantas (estacas ou segmentos nodais), a combinação isolado de FMA e genótipo vegetal determina o benefício que a micorrização pode proporcionar.

Por outro lado, a colonização micorrízica observada em plantas inoculadas com *C. etunicatum*, *A. longula* e *G. albida*, variou entre 12,6 e 14,4% neste experimento. Na região do Vale do São Francisco, estudos em campo demonstram que a colonização micorrízica pode variar de 4,7 a 15,9%, em videira ‘Festival Seedless’ enxertada sobre porta-enxerto ‘IAC-766’, respectivamente em cultivo convencional e orgânico (FREITAS *et al.*, 2011). Outros estudos mostram colonização com valores de até 70%, como observado em dez porta-enxerto de videira em condições de campo (SCHREINER, 2003), e de até 60% em casa de vegetação, em videiras ‘Asgari’, ‘Khalili’, ‘Keshmesh’ e ‘Shahroodi’ micorrizadas por três espécies de FMA (*Glomus mosseae*, *G. fasciculatum* e *G. intraradices*) (EFTEKHARI *et al.*, 2012). Estas diferenças indicam que a condição de cultivo (casa de vegetação ou campo), o tempo para o estabelecimento da simbiose e os genótipos de planta e fungo influenciam na colonização micorrízica. Porém, mesmo com percentuais de colonização micorrízica abaixo de 15%, foi possível obter diferenças estatísticas entre as plantas micorrizadas por *G. albida* e as não inoculadas para os parâmetros de crescimento e teor de alguns nutrientes. Nesse caso, o número estimado de

glomerosporos das espécies de FMA utilizadas, variou de 1,5 a 4,5 por grama de solo (Figura 1).

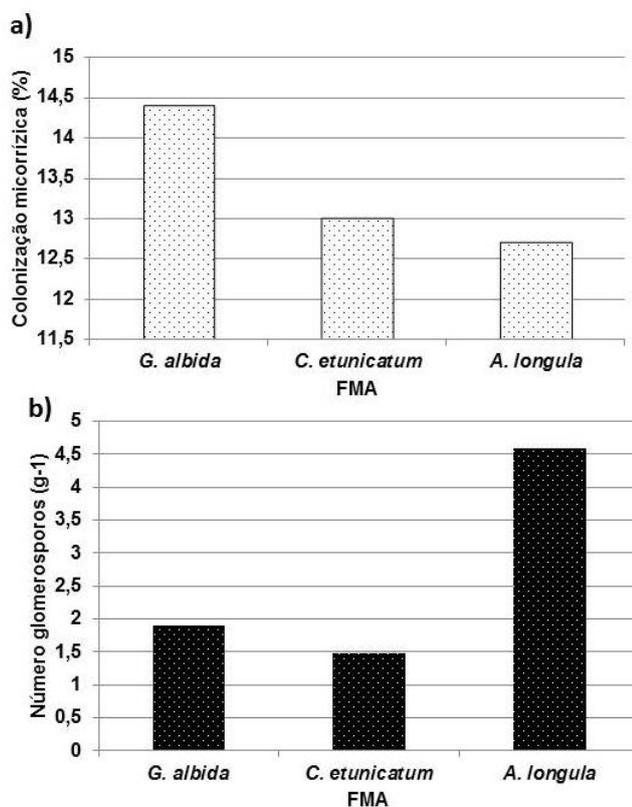


Figura 1. a) Colonização micorrízica e b) Número de glomerosporos em videira (híbrido ‘Superior x Thompson’), após 120 dias de cultivo em casa de vegetação.

Tabela 2. Número de folhas, altura e diâmetro do colo de híbridos de ‘Superior x Thompson’, inoculados ou não com fungos micorrízicos arbusculares, na fase de aclimatização após 120 dias na casa de vegetação, cujos resultados não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey 5%.

Tratamentos	Número Folhas	Altura (cm)	Diâmetro do colo (mm)
<i>Não inoculadas</i>	6,00	8,58	2,13
<i>G. albida</i>	6,80	8,00	2,32
<i>A. longula</i>	6,00	9,03	1,93
<i>C. etunicatum</i>	6,33	7,02	2,42

Quanto ao teor de nutrientes, as Tabelas 3 e 4 apresentam os resultados obtidos em cada tratamento, cujos valores são apresentados de forma separada nas folhas, caule e raízes. Foi constatada maior quantidade de vários elementos macronutrientes na parte aérea das plantas colonizadas por FMA. Nesse caso, podemos destacar o P, K, Ca e Mg, com valores de 30 a 100% superiores aos teores observados nas plantas não inoculadas. Nos

tecidos radiculares, houve aumento no teor de P e K, observando-se um aumento de quase cinco vezes no teor de K no tratamento com *C. etunicatum*, quando comparado ao tratamento não inoculado.

Em relação aos micronutrientes, foi constatada maior quantidade de alguns elementos na parte aérea das plantas colonizadas por FMA, destacando-se o Fe, com aumento de até 8 vezes, Mn e Zn, com valores de 20 a 90% superiores aos teores observados nas plantas não inoculadas. Por outro lado, observou-se uma diminuição do teor de Na nas folhas das plantas colonizadas por FMA, cujos valores foram inferiores ao observado no tratamento não inoculado. Entretanto, o teor de Na foi maior no caule das plantas colonizadas por FMA. Nas raízes das plantas colonizadas com *C. etunicatum* houve aumento no teor de Cu e Fe, quando comparadas aos demais tratamentos.

O aumento nos teores de vários elementos em plantas micorrizadas de videira tem sido relatados, como nos trabalhos de VAN ROOYEN *et al.* (2004); SCHREINER, 2007; CHENG *et al.* (2008); ANZANELLO *et al.* (2011); e OZDEMIR *et al.* (2010).

Tabela 3. Teor de macronutrientes (g Kg⁻¹) em videira (híbrido ‘Superior x Thompson’) inoculadas ou não com FMA (*Acaulospora longula*, *Claroideoglossum etunicatum* e *Gigaspora albida*), após 120 dias em casa de vegetação.

Tratamentos	N	P	K	Ca	Mg	S
Folha						
NI	na	0,69	3,73	9,30	2,60	0,50
<i>A. longula</i>	14,50	1,41	6,76	16,10	5,30	0,69
<i>C. etunicatum</i>	16,82	1,10	5,75	17,90	5,35	0,67
<i>G. albida</i>	16,53	0,92	5,24	13,15	3,65	0,53
Caule						
NI	6,38	1,04	2,73	5,00	2,20	0,44
<i>A. longula</i>	6,38	2,05	6,76	6,10	2,75	1,00
<i>C. etunicatum</i>	na	1,20	1,21	10,35	3,40	0,51
<i>G. albida</i>	5,51	1,22	2,73	6,8	2,55	0,56

	Raiz					
NI	7,38	1,05	2,73	7,6	3,35	0,56
<i>A. longula</i>	6,96	2,06	5,75	7,1	3,05	0,66
<i>C. etunicatum</i>	8,12	1,59	11,79	7,85	3,35	1,34
<i>G. albida</i>	6,96	1,39	3,23	8,3	3,30	0,63

NI – não inoculado; na – não avaliado (material insuficiente para análise)

Tabela 4. Teor de micronutrientes (mg kg⁻¹) em videira (híbrido ‘Superior x Thompson’) inoculadas ou não com FMA (*Acaulospora longula*, *Claroideoglopus etunicatum* e *Gigaspora albida*), após 120 dias em casa de vegetação.

Tratamentos	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Na
Folha						
NI	Na	4,0	90,0	90,0	5,0	1.905,39
<i>A. longula</i>	45,91	4,0	741,0	169,0	8,0	1.502,47
<i>C. etunicatum</i>	Na	3,0	481,0	171,0	7,0	1.099,55
<i>G. albida</i>	Na	5,0	120,0	114,0	7,0	998,82
Caule						
NI	48,32	2,0	346,0	102,0	16,0	696,63
<i>A. longula</i>	28,37	10,0	450,0	93,0	11,0	1.401,74
<i>C. etunicatum</i>	20,91	7,6	1.000,0	117,0	12,0	1.603,20
<i>G. albida</i>	13,46	10,0	722,0	190,0	19,0	1.502,47
Raiz						
NI	29,33	15,6	1.320,0	83,0	10,0	3.214,88
<i>A. longula</i>	31,73	10,1	1.210,0	75,0	15,0	2.106,85
<i>C. etunicatum</i>	26,44	30,0	1.900,0	84,0	10,0	3.013,42
<i>G. albida</i>	30,53	14,7	1.400,0	83,0	14,0	2.811,96

NI – não inoculado; na – não avaliado (material insuficiente para análise).

CONCLUSÃO

1. A seleção do isolado de *G. albida* é favorável para incrementar as variáveis de crescimento dos híbridos apirênicos de videira na fase de aclimatização, enquanto que a inoculação com *G. albida*, *C. etunicatum* e *A. longula* favorece o aumento no teor de nutrientes.
2. A utilização dos FMA mostra-se como uma tecnologia eficiente na melhoria da qualidade biológica das plantas durante a fase de aclimatização.
3. O Teor de P, Ca e Mg é superior nos tratamentos com FMA em relação as plantas não inoculadas nos três segmentos da planta (folha, raiz e caule).

APÊNDICE



Figura 2. Aclimatização de plantas de videira ‘Superior x Thompson’ inoculadas ou não com fungos micorrízicos arbusculares. Observe em C) da esquerda para direita, tratamentos: Controle não inoculado; inoculados com 1. *Acaulospora longula*, 2. *Gigaspora albida* e 3. *Claroideoglopus etunicatum*.



Figura 3. Plantas de videira Superior x Thompson 30 dias após aclimatização. Da esquerda para direita, tratamentos: Controle não inoculado; inoculados com 1. *Acaulospora longula*, 2. *Claroideoglopus etunicatum* e 3. *Gigaspora albida*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINE, S. **Fungos Micorrízicos arbusculares e o desenvolvimento vegetativo de porta-enxertos de videira**. 2002. 72 f. **Dissertação** (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ANDRADE, S. R. M de. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 16p.

ANZANELLO, R.; SOUZA, P. V. D.; CASAMALI, B. Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em porta-enxertos micropropagados de videira. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 2, p. 409-415, 2011.

BUTTENBENDER, D.; SOUZA, P. V. D. Respostas de porta-enxertos de videira à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares. **Agropecuária Catarinense**, v.18, n. 1, p. 87-90, 2005.

CAGAHUALA-INOCENTE, G. C.; SILVA, M. F da.; JOHSON, J. M.; MANGA, A.; TUINEN, D. V.; HENRY, C.; LOVATO, P. E.; DUMAS-GAUDOT, E. Arbuscular mycorrhizal symbiosis elicits proteome responses opposite of P-starvation in SO4 grapevine rootstock upon root colonisation with two *Glomus* species. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 21, p. 473–493, 2011.

CARNIEL, E. **Uso de fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento dos porta-enxertos de videira e no controle biológico de *Fusarium oxysporum* f. sp. herbemontis**. 2004. 84 f. **Dissertação** (Mestrado em Fitotecnia) – UFRGS, Porto Alegre.

CHENG, X.; EULISS, A.; BAUMGARTNER, K. Nitrogen capture by grapevine roots and arbuscular mycorrhizal fungi from legume cover-crop residues under low rates of mineral fertilization. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, p. 965-973, 2008.

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

COSTA, C. M. C.; MAIA, L. C.; CAVALCANTE, U.M. T.; NOGUEIRA, R. J. M. C. Influência de fungos micorrízicos arbusculares sob o crescimento de dois genótipos de aceloreira (*Malphigia emaraginata* D. C). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 839-901, 2001.

EFETEKHARI, M.; ALIZADEH, M.; EBRAHIMI, P. Evaluation of the total phenolics and quercetin content of foliage in mycorrhizal grape (*Vitis vinifera* L.) varieties and effect of postharvest drying on quercetin yield. **Industrial Crops and Products**, v. 38, p. 160–165, 2012.

EMBRAPA. 1999. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Solos/ Embrapa Informação Agropecuária/Embrapa Comunicação para transferência de Tecnologia, 370 p.

FREITAS, N. O.; YANO-MELO, A. M.; SILVA, F. S. B.; MELO, N. F.; MAIA, L. C. Soil biochemistry and microbial activity in vineyards under conventional and organic management at Northeast Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba v. 68, n. 2, p. 223-229, 2011.

GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal Endogene species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 46, p. 235-244, 1963.

GIOVANETTI, M. & MOSSE, B. An evaluation of techniques for menasuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, Oxford, v. 84: 489-500, 1980.

JENKIS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report**, v. 48, 1964.

KARAGIANNIDIS, N.; NIKOLAOU, N.; IPSILANTIS, I.; ZIOZIOU, E. Effects of different N fertilizers on the activity of *Glomus mosseae* and on grapevine nutrition and berry composition. **Mycorrhiza**, v. 18, p. 43-50, 2007.

KRISHNA, H.; SINGH, S. K.; SHARMA, R. R.; KHAWALE, R. N.; GROVER, M.; PATEL, V. B. Biochemical changes in micropropagated grape (*Vitis vinifera* L.) plantlets due to arbuscularmycorrhizal fungi (AMF) inoculation during ex vitro acclimatization. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 106, p. 554–567, 2005.

MOREIRA FMS; SIQUEIRA JO. 2006. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2.ed. atual. ampl. Lavras: UFLA. 625p.

MOTOSUGI, H.; YAMAMOTO, Y.; NARUO, T.; KITABAYASHI, H.; ISHII, T. Comparison of the growth and leaf mineral concentrations between three grapevine rootstocks and their corresponding tetraploids inoculated with an arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. **Vitis**, v. 41, n.1, p. 21-25, 2002.

OLIVEIRA, J. R. G. de.; MORAES, T. A. de L.; MELO, N. F.; YANO-MELO, A. M. Fungos micorrízicos arbusculares e rizobactérias promotoras de crescimento na aclimatização de *zingiber spectabile*. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 3, p. 687-694, 2010.

OZDEMIR, G.; AKPINAR, P.; SABIR, A.; BILIR, H.; TANGOLAR, S.; ORTAS, I. Effect of inoculation with mycorrhizal fungi on growth and nutrient uptake of grapevine genotypes (*vitis* spp.). **European Journal Hort Science**, v. 75, n. 3, p. 103–110, 2010.

PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 55, p. 158-161, 1970.

RIBEIRO, J. M.; MELO, N. F de.; ARAÚJO, F. P.; COELHO, A. K. N. S.; COLEHO, M. S. E.; TEXEIRA, M. S. **Micropropagação de goiabeira, maracujazeiro, bananeira e videira**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2012. 7p (Embrapa Semiárido. Comunicado Técnico, 101).

SCHREINER, R. P. Mycorrhizal colonization of grapevine rootstocks under field conditions. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 54, n. 3, p. 143-149, 2003.

SCHREINER, R. P. Effects of native and nonnative arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nutrient uptake of 'Pinot noir' (*Vitis vinifera* L.) in two soils with contrasting levels of phosphorus. **Applied Soil Ecology**, v. 36, p. 205-215, 2007.

SCHREINER, R. P.; PINKERTON, J. N. Ring nematodes (*Mesocriconema xenoplax*) alter root colonization and function of arbuscular mycorrhizal fungi in grape roots in a low P soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 1870–1877, 2008.

SINGH, N.V.; SINGH, S.K.; SINGH, A.K. Standardization of embryo rescue technique and bio-hardening of grape hybrids (*Vitis vinifera* L.) using Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) under sub-tropical conditions. **Journal of Grapevine Research**, Berlin, v.50, n.3, p.115-118, 2011.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 3ed. Academic Press, p. 800. 2008.

VAN ROOYEN, M.; VALENTINE, A.; ARCHER, E. Arbuscular mycorrhizal colonization modifies the water relations of young transplanted grapevines (*Vitis*). **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 25, n. 2. 2004.

CAPÍTULO 3

Análise citogenética convencional e bandeamento CMA3/DAPI em híbrido intraespecífico de videira e seus progenitores (*Vitis vinifera* L.)

RESUMO

O gênero *Vitis* apresenta espécies com dois números cromossômicos principais, destacando-se *V. vinifera* ($2n=38$) e *V. rotundifolia* ($2n=40$). A caracterização citogenética tem sido uma ferramenta importante, auxiliando programas de melhoramento genético com informações relevantes para a seleção de material genético de interesse agrícola. O presente estudo teve por objetivo caracterizar citogeneticamente, com uso da técnica convencional com Giemsa 2% e por bandeamento cromossômico com os fluorocromos CMA e DAPI, as variedades apirênicas de videira ‘Superior Seedless’ e ‘Thompson Seedless’, e o híbrido intraespecífico ‘Superior x Thompson’ (*Vitis vinifera* L.). Nas três variedades estudadas foram observados $2n=38$ cromossomos, com morfologia de submetacêntrica a metacêntrica, e tamanhos cromossômicos médios variando entre 0,69 e 0,97 μ m. O cariótipo apresentou-se como simétrico nas três variedades, com valores entre 1,28 e 1,34 de índice de relação entre os maiores e os menores cromossomos. A coloração cromossômica fluorescente permitiu a visualização de quatro blocos CMA positivos nas três variedades estudadas e nenhum bloco DAPI positivo foi visualizado.

Palavras – chaves: Corantes fluorescentes, Heterocromatina, hibridação intraespecífica, *Vitis vinifera*.

ABSTRACT

The genus *Vitis* species presents two main chromosome numbers, especially *V. vinifera* ($2n = 38$) and *V. rotundifolia* ($2n=40$). The cytogenetic characterization has been an important tool, helping breeding programs with information relevant to the selection of genetic material of agricultural interest. The present study aimed to characterize cytogenetically, using the conventional technique Giemsa 2% and by chromosome banding with DAPI and fluorochrome CMA, seedless varieties of grapevine 'Superior Seedless' and 'Thompson Seedless', and intraspecific hybrid 'Superior' x 'Thompson' (*Vitis vinifera*). In the three varieties were observed $2n = 38$ chromosomes, with the morphology from submetacentric to metacentric, chromosome average sizes ranging between 0.69 and 0.97 μm . The karyotype appeared as symmetrical into three varieties, with values between 1.28 and 1.34 index ratio between the largest and smallest chromosomes. The chromosomal differential staining allowed the visualization of four blocks CMA positive into three varieties. The chromosomal fluorescent staining allowed the visualization of four blocks CMA positive in three varieties and no block DAPI positive was visualized.

Key -words: Fluorescent dyes, Heterochromatin, intraspecific hybridization, *Vitis vinifera*.

INTRODUÇÃO

A videira (*Vitis vinifera* L.) é uma das plantas cultivadas mais importantes economicamente, apresentando diversas variedades para o consumo *in natura* e para processamento. Nesse caso, a caracterização e identificação de variedades de uva tem sido sempre uma rotina para a agricultura, bem como para os programas de pesquisa com melhoramento genético. Tradicionalmente, métodos baseados em características morfológicas foram utilizados para delimitação das espécies, resultando muitas vezes em falhas na sua diferenciação (FORNECK *et al.*;2009).

O estudo citogenético convencional e uso de fluorocromos são ferramentas importantes para o conhecimento das mais diversas espécies silvestres e cultivadas. No gênero *Vitis*, várias espécies tem sido caracterizadas citogeneticamente, como *V. latifolia* (SALUNKHE *et al.*, 1999), *V. cinerea*, *V. champinii*, *V. vinifera* e o híbrido interespecífico entre *V. rotundifolia* e *V. vinifera* (PIEROZZI e POMMER, 2005), todas com número cromossômico $2n=38$. A videira possui cromossomos pequenos, com tamanhos médios variando entre 1,09 μm e 2,37 μm (HAAS e ALLEWELDT, 2000). Morfológicamente, a maioria dos cromossomos apresenta constrições primárias em posições medianas a submedianas, sendo observada uma constrição secundária no maior par cromossômico, como relatado para a variedade ‘Thompson Seedless’ (PATIL e JADHAVI, 1985), e para as espécies *V. vinifera*, *V. rotundifolia* e o seu híbrido interespecífico (PATIL e PATIL, 1992). Trabalhos envolvendo a caracterização da heterocromatina constitutiva têm sido feitos por alguns autores, sendo relatado até cinco pares de bandas C nos braços curtos de diferentes cromossomos (YINGHCHIN *et al.*, 1988), ou entre dois ou quatro cromossomos com bandas CMA positivas em sete espécies do gênero *Vitis* (PINTO-MAGLIO *et al.*, 2010).

O presente estudo teve por objetivo obter informações sobre a variabilidade cariomorfológica em três genótipos apirênicos de videira, mediante análise citogenética com coloração convencional e com fluorocromos base específicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais estudados no presente trabalho foram as variedades apirênicas ‘Superior Seedless’, ‘Thompson Seedless’ e seu híbrido intraespecífico ‘Superior x Thompson’, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Videira da Embrapa Semiárido, localizado em Petrolina-PE.

Estacas de cada material foram enraizadas em vasos contendo substrato, para posterior coleta e tratamentos, conforme metodologia descrita por GUERRA e SOUZA (2002). Para as análises mitóticas, pontas de raízes foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína 0,002 M, durante 24 horas, a 8 °C, e fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético glacial, v/v). Para o preparo das lâminas visando coloração convencional, o material foi lavado rapidamente por duas vezes em água destilada e hidrolisado em HCl 5N, por 20 minutos. As pontas de raízes foram transferidas para lâminas, enxugadas cuidadosamente, sendo acrescida uma gota de ácido acético a 45% e preparadas pela técnica do esmagamento entre lâmina e lamínula. O material foi corado com Giemsa 2% e montado em meio Entellan. As melhores células foram capturadas com câmera digital DFX 350 da Leica, acoplada a um microscópio de fluorescência Leica DM 2000. Para a identificação do número e morfologia cromossômica, foram examinadas seis células por indivíduo. As medições cromossômicas foram realizadas com o auxílio do programa Image Tool (DONALD, 2007). Os cromossomos foram mensurados levando-se em consideração o comprimento cromossômico total (TCL), devido à dificuldade para diferenciar braços curtos e braços longos, sendo organizados na construção dos idiogramas, em ordem decrescente de tamanho (Figura 3).

Nas preparações citológicas para o bandeamento cromossômico com os fluorocromos cromomicina A3 (CMA3) e 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), pontas de raízes foram pré-tratadas e fixadas como descrito para a análise convencional, seguindo o protocolo de GUERRA e SOUZA (2002) com algumas modificações. Para o preparo das lâminas o protocolo seguido foi o de SCHWEIZER e AMBROS (1994), com pequenas modificações, onde as raízes passaram por digestão enzimática em solução contendo 2% de celulase e 20% de pectinase. Em seguida, as lâminas foram preparadas pela técnica do esmagamento, sendo coradas e posteriormente analisadas em microscópio de fluorescência

Leica DM 2000. As melhores células foram capturadas em câmera digital Leica DFX 350, com o auxílio do programa Leica QFish.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observados $2n=38$ cromossomos para os três genótipos analisados, com morfologia variando de metacêntrica a submetacêntrica, e tamanhos entre 0,69 e 0,97 μm (Figura 1).

Devido ao pequeno tamanho dos cromossomos não foi possível diferenciar a região centromérica, sendo possível observar um par de satélites em algumas células. O comprimento do complemento cromossômico haploide também foi similar para as três variedades, com valores médios de 16,71 μm para a variedade ‘Superior Seedless’, 14,82 μm para ‘Thompson Seedless’, e 15,23 μm para o híbrido intraespecífico ‘Superior x Thompson’. O cariótipo apresentou-se como simétrico nas três variedades, com valores entre 1,28 e 1,34 de índice de relação entre os maiores e menores cromossomos. A Tabela 1 apresenta uma síntese dos resultados obtidos. Vários artigos relatam a dificuldade de caracterização citogenética em espécies com cromossomos de tamanhos entre 1 e 2 μm , embora muitos desses resultados contribuam para o entendimento da evolução e no melhoramento genético, como em *Coffea canephora* (FONTES e CARVALHO, 2001), maracujá (MELO e GUERRA, 2003) e videira (PINTO-MAGLIO *et al.*, 2010).

No presente trabalho, o uso dos corantes fluorescentes CMA3 e DAPI permitiu observar quatro blocos CMA3 para as três variedades de videira analisadas. Para as variedades ‘Superior Seedless’ e ‘Thompson Seedless’, as marcações heterocromáticas com CMA3 localizaram-se nas regiões terminais de dois cromossomos e pericentromérica de outros dois. No híbrido intraespecífico foi observada a marcação de quatro blocos CMA3 (Figura 2).

Utilizando corantes base-específicos (CMA3 e DAPI), PINTO-MAGLIO *et al.* (2010) caracterizaram citogeneticamente sete espécies de videira (*V. champinii*, *V. cinerea*, *V. girdiana*, *V. labrusca*, *V. rotundifolia*, *V. rupestris* e *V. vinifera*), observando em todas, bandas CMA3 positivas. Ainda nesse estudo, foram evidenciadas de duas a quatro bandas CMA positivas entre as espécies, sendo que para *V. vinifera* variedade ‘Itália’ foram encontradas apenas três bandas CMA3 positivas, o que difere dos dados observados no nosso estudo. Nesse caso, o heteromorfismo para as bandas CMA em *V. vinifera* pode ser atribuído a um dos três fatores: a) ao pequeno tamanho do bloco rico em guanina/citosina,

o qual não pode ser visualizado; b) ao alto grau de condensação dos cromossomos analisados; ou c) a mudanças estruturais nos cromossomos, devido à pressão de seleção em novas variedades cultivadas.

De modo geral, fica evidente a importância da caracterização citogenética em videira, utilizando diversas metodologias para um melhor detalhamento das informações, com o intuito de utilizá-las em pesquisas voltadas para o melhoramento genético da cultura.

CONCLUSÕES

1. Nas três variedades de videira estudadas são observados $2n=38$ cromossomos, com morfologia de submetacêntrica a metacêntrica, e tamanhos cromossômicos médios variando entre 0,69 e 0,97 μm .
2. O cariótipo apresenta-se como simétrico nas três variedades, com valores entre 1,28 e 1,34 de índice de relação entre os maiores e menores cromossomos.
3. A coloração cromossômica com fluorocromos permite a visualização de quatro blocos CMA positivos nas três variedades estudadas, sendo dois localizados na região terminal e dois na região pericentromérica dos cromossomos.

APÊNDICE

Tabela 1. Medições do conjunto cromossômico haploide das variedades de videira ‘Superior Seedless’, ‘Thompson Seedless’ e do híbrido intraespecífico ‘Superior’ x ‘Thompson’.

Cromossomo	Variedades					
	Superior Seedless		Thompson Seedless		Superior x Thompson	
	CA (µm)	CR (%)	CA (µm)	CR (%)	CA (µm)	CR (%)
1	0,97	5,75	0,93	6,28	0,91	5,98
2	0,96	5,80	0,90	6,07	0,91	5,98
3	0,96	5,75	0,89	6,01	0,87	5,71
4	0,95	5,69	0,85	5,74	0,85	5,58
5	0,93	5,57	0,83	5,60	0,84	5,52
6	0,92	5,51	0,80	5,40	0,83	5,45
7	0,92	5,51	0,79	5,33	0,82	5,38
8	0,92	5,51	0,79	5,33	0,82	5,38
9	0,90	5,39	0,79	5,33	0,80	5,25
10	0,88	5,27	0,78	5,26	0,80	5,25
11	0,87	5,21	0,76	5,13	0,80	5,25
12	0,87	5,21	0,75	5,06	0,78	5,12
13	0,85	5,09	0,74	4,99	0,77	5,06
14	0,84	5,03	0,73	4,93	0,77	5,06
15	0,83	4,97	0,70	4,72	0,76	4,99
16	0,83	4,97	0,70	4,72	0,73	4,79
17	0,80	4,79	0,70	4,72	0,73	4,79
18	0,78	4,67	0,70	4,72	0,73	4,79
19	0,73	4,37	0,69	4,66	0,71	4,66
CCH	16,71	100,06	14,82	100	15,23	99,99

CA= comprimento absoluto; CR= comprimento relativo; CCH= Comprimento do conjunto haploide.

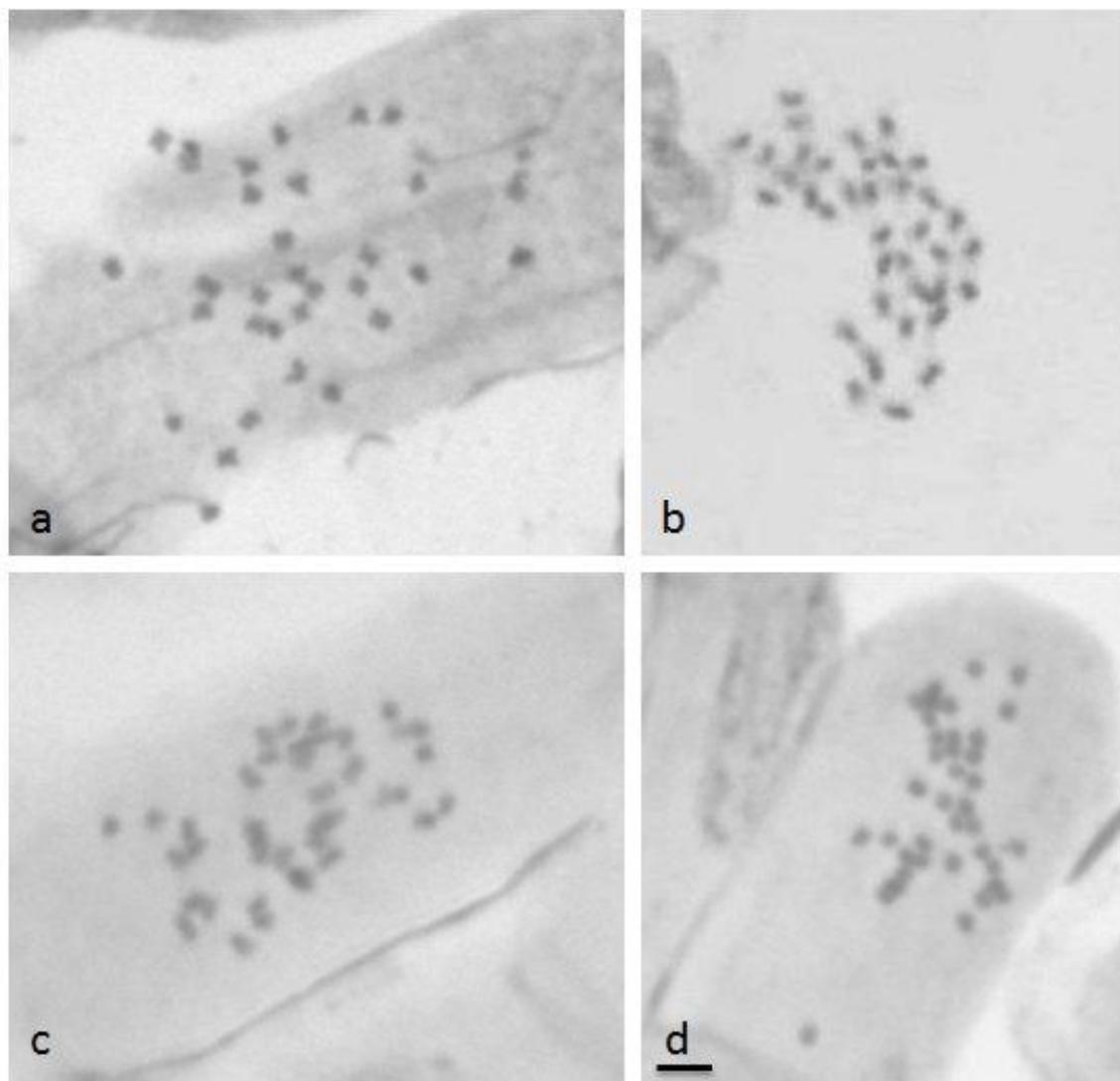


Figura 1. Cromossomos metafásicos de três variedades de *Vitis vinifera* L. com $2n=38$. “a” metáfase e “b” prometáfase em ‘Superior Seedless’, “c” metáfase em ‘Thompson Seedless’, e “d” metáfase no híbrido intraespecífico ‘Superior x Thompson’. Barra em “d” corresponde a 2 μm .

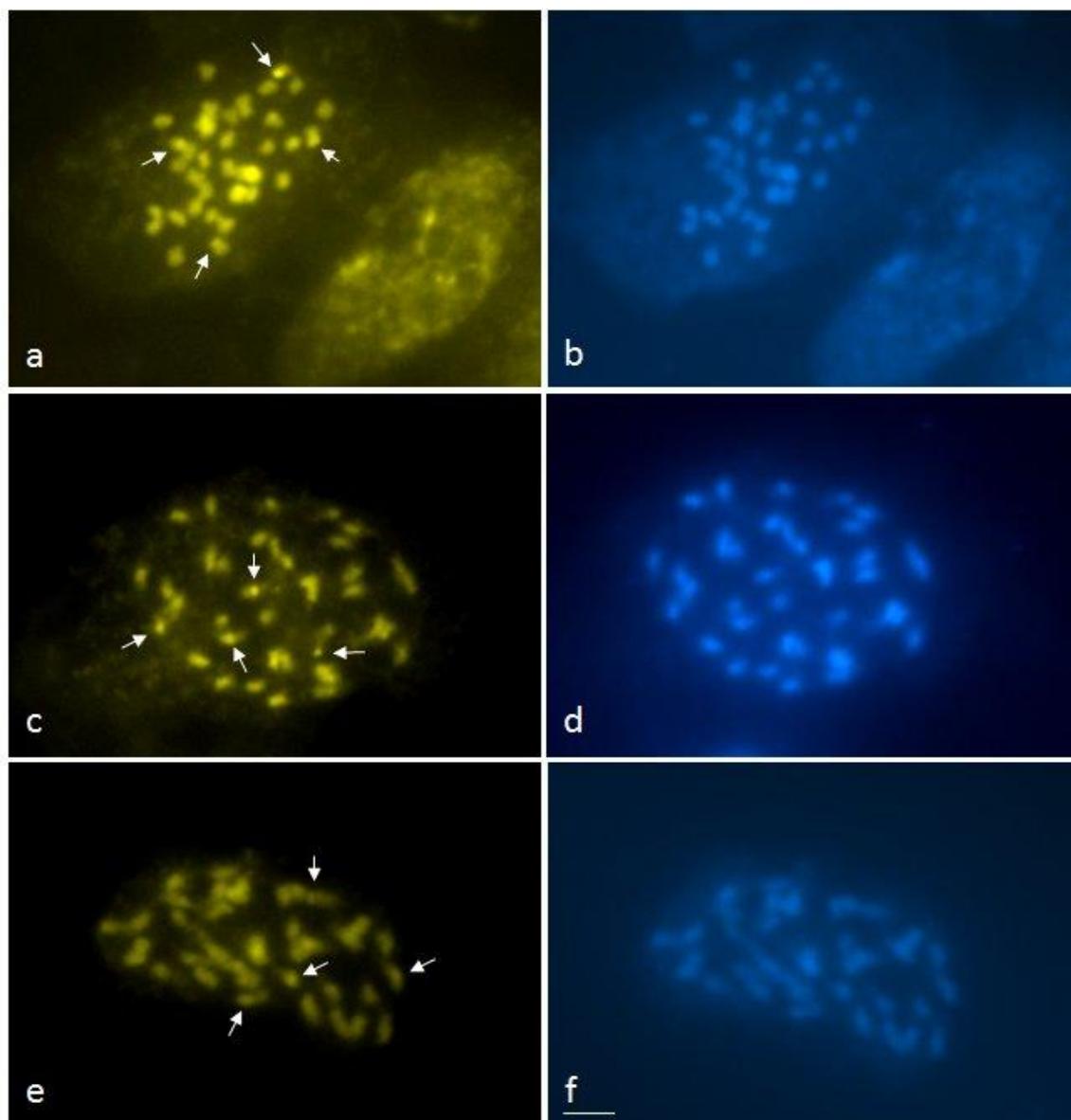


Figura 2. Cromossomos metafásicos de três variedades de *Vitis vinifera* L. corados com CMA (amarelo) e DAPI (azul). “a” e “b” ‘Superior Seedless’, “c” e “d” ‘Thompson Seedless’, “e” e “f” híbrido intraespecífico ‘Superior x Thompson’. Setas apontam para blocos CMA positivos em “a”, “c” e “e”. Barra em “f” corresponde a 2 μ m.

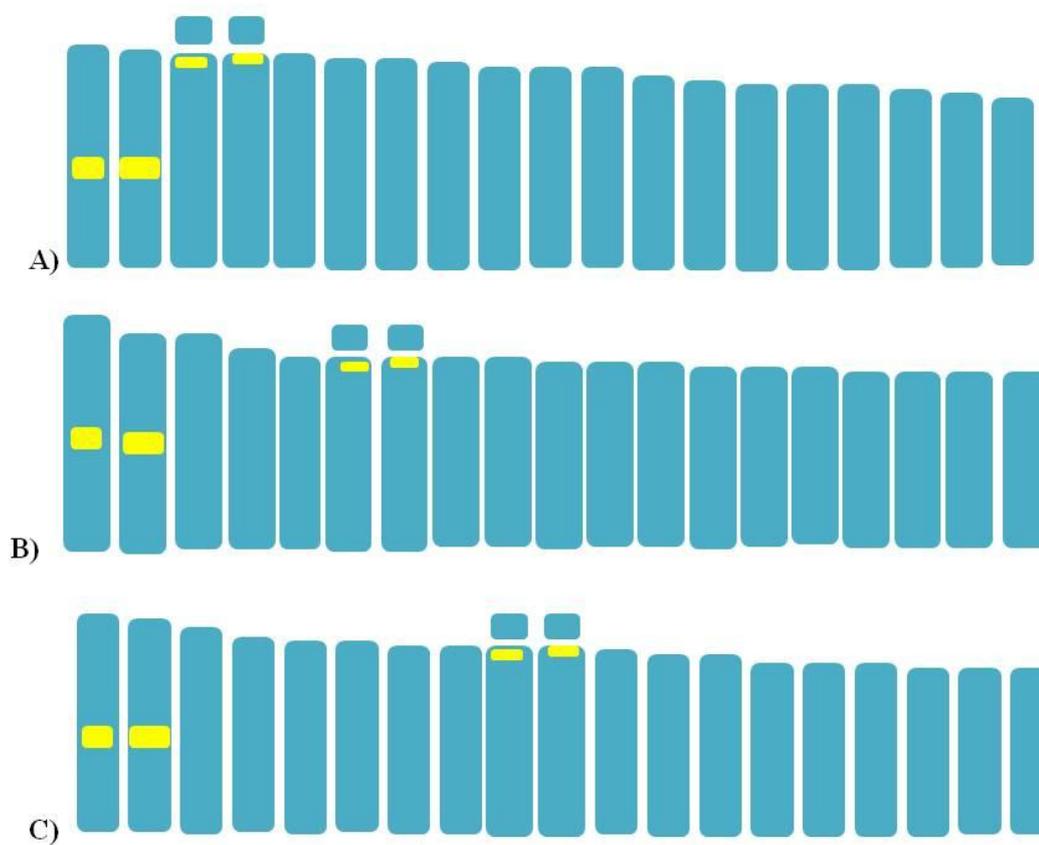


Figura 3. Idiogramas das variedades e do híbrido intraespecífico. A) ‘Superior Seedless’; B) ‘Thompson Seedless’; C) ‘Superior Seedless x Thompson Seedless’. Em amarelo bandas de CMA3+ nas regiões pericentroméricas e terminais.

REFERÊNCIAS

DONALD, C.; BRENT, D. S.; MCDAVID, W. D.; GREER, D. B. **UTHSCSA ImageTool(IT) – Version 3.0**. 2007. Disponível em: <<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/download.Html>>. Acesso em: 19 jun. 2011.

FONTES, B. P. D.; CARVALHO, C. R. Análise citogenética de *Coffea canephora*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Resumos...** Brasília, DF: Embrapa Café, 2001. p. 261-267. Disponível em: <<http://www.sapc.embrapa.br>>. Acesso em: 22 out. 2012.

FORNECK, A.; BENJAK, A.; RUHL, E. Grapevine (*Vitis* spp.): example of clonal reproduction in agricultural important plants. In: SCHON, I. ; MARTENS, K.; DIJK, P. van. (Ed.). **Lost sex: the evolutionary biology of parthenogenesis**. London: Springer, 2009. cap. 27. p. 581-589.

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 191 p.

HAAS, H. U.; ALLEWELDT, G. The karyotype of grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 528, p. 247-255, 2000.

MELO, N. F.; GUERRA, M. Variability of the 5S DNAr Sites in Passifloraceae L. Species with Distinct Base Chromosome numbers. **Annals of Botany**, London, v. 92, p. 309-316, 2003.

PATIL, V. P.; JADHAV, A. S. Karyomorphology of three varieties of *Vitis vinifera*. **Cytologia**, v. 50, n. 1, p. 83-88, 1985.

PATIL, S. G.; PATIL, V. P. Karyomorphology of *Vitis vinifera*, *V. rotundifolia* and Their Hybrid. **Cytologia**, v. 57, p. 91-95, 1992.

PIEROZZI, N. I.; POMMER, C. V. Caracterização cromossômica de espécies de *Vitis* L. pela técnica da impregnação pela prata (AgNO₃). In: 51º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 2005, Águas de Lindóia – SP. **Resumos...** Águas de Lindóia.: SBG, 2005. p. 515.

PINTO–MAGLIO, C. A. F.; POMMER, C. V.; PIEROZZI, N. I. Giemsa staining and fluorescent chromosome banding in some *Vitis L.* species. **Caryologia**, Firenze, v. 63, n. 4, p. 339-348,2010.

SCHWEIZER, D.; AMBROS, P. F. Chromosome Banding. In: GOSDEN, J. R. (Ed.). **Methods in molecular biology**. Totowa: Human Press, 1994. v. 29, 1994. p. 97-112.

YINGCHI, D.; YAOCHU, C.; WENNA, W. Studies on the karyotype and c-band in grape. **Journal of Hunan Agricultural University**, v. 3, 1988.

CONCLUSÕES GERAIS

- O período de 60 dias de cultivo das sementes-traço de híbridos de videira ‘Superior Seedless’ x ‘Thompson Seedless’ resulta em um maior número de embriões produzidos, bem como em estádios de desenvolvimento melhor caracterizados e com maiores valores de germinação.
- Os três híbridos de videira avaliados na micropropagação apresentam valores médios das variáveis mensuradas muito similares, mesmo tendo sido originados a partir de embriões de diferentes estádios de desenvolvimento.
- A seleção do isolado de *G. albida* é favorável para incrementar as variáveis de crescimento dos híbridos apirênicos de videira na fase de aclimatização, enquanto que a inoculação com *G. albida*, *C. etunicatum* e *A. longula* favorece o aumento no teor de nutrientes.
- A utilização dos FMA mostra-se como uma tecnologia eficiente na melhoria da qualidade biológica das plantas durante a fase de aclimatização.
- O Teor de P, Ca e Mg é superior nos tratamentos com FMA em relação as plantas não inoculadas nos três segmentos da planta (folha, raiz e caule).
- Nas três variedades de videira estudadas são observados $2n=38$ cromossomos, com morfologia de submetacêntrica a metacêntrica, e tamanhos cromossômicos médios variando entre 0,69 e 0,97 μm .
- O cariótipo apresenta-se como simétrico nas três variedades, com valores entre 1,28 e 1,34 de índice de relação entre os maiores e menores cromossomos.
- A coloração cromossômica com fluorocromos permite a visualização de quatro blocos CMA positivos nas três variedades estudadas, sendo dois localizados na região terminal e dois na região pericentromérica dos cromossomos.