

Universidade de Évora

Regeneração de *Vitis vinifera* L. e estudo do stress osmótico induzido por sorbitol, em culturas *in vitro* de videira.

Alexandre Marnoto de Oliveira Campos

95944

Mestrado em Melhoramento de Plantas
Évora, 1999

ÍNDICE

RESUMO.....	5
1. INTRODUÇÃO GERAL	7
1.1. APLICAÇÃO DA CULTURA <i>IN VITRO</i> NO MELHORAMENTO DE PLANTAS	8
1.2. O MELHORAMENTO NAS ESPÉCIES PERENES.....	9
1.3. O STRESS HÍDRICO E O MELHORAMENTO DE PLANTAS.....	10
1.3.1. O stress hídrico no género <i>Vitis</i>	12
2. MICROPROPAGAÇÃO	15
2.1. INTRODUÇÃO	15
2.2. FASES DA MICROPROPAGAÇÃO	16
2.3. MÉTODOS DE MICROPROPAGAÇÃO.....	18
2.4. FACTORES QUE INFLUENCIAM A MICROPROPAGAÇÃO	20
2.5. A MICROPROPAGAÇÃO NO GÉNERO <i>Vitis</i>	21
2.6. METODOLOGIA	23
2.6.1. Cultura da videira por estacaria	23
2.6.2. Preparação dos meios de cultura <i>in vitro</i>	23
2.6.3. Micropropagação	24
2.7. RESULTADOS	25
2.8. DISCUSSÃO.....	29
3. CULTURA DE CALLI E ORGANOGÉNESE	31
3.1. INDUÇÃO E CULTURA DE CALLI.....	31
3.1.1. Introdução	31
3.1.2. A produção de <i>calli</i> no género <i>Vitis</i>	32
3.1.3. Metodologia	34
3.1.4. Resultados	35
3.1.5. Discussão	38
3.2. ORGANOGÉNESE EXPERIMENTAL.....	40



3.2.1.	Introdução	40
3.2.2.	Organogénese no género <i>Vitis</i>	42
3.2.3.	Metodologia	43
3.2.4.	Resultados	43
3.2.5.	Discussão	46
4.	CARACTERIZAÇÃO DE <i>VITIS VINIFERA</i> CV BAGA, RELATIVAMENTE AO STRESS OSMÓTICO.....	47
4.1.	INTRODUÇÃO	47
4.2.	METODOLOGIA	48
4.2.1.	Ensaios de Stress osmótico	48
4.2.2.	Análise do crescimento da videira.....	49
4.2.3.	Determinação de proteínas totais solúveis	49
4.2.4.	Determinação do teor em clorofilas	50
4.2.5.	Eficiência fotossintética	50
4.2.6.	Análise de elementos inorgânicos nos tecidos	51
4.2.7.	Análise estatística.....	52
4.3.	RESULTADOS DO STRESS OSMÓTICO NO GENÓTIPO BAGA.....	53
4.3.1.	Análise do crescimento da videira.....	53
4.3.2.	Análise de proteínas totais solúveis	57
4.3.3.	Análise do teor em clorofilas	57
4.3.4.	Análise da eficiência fotossintética.....	58
4.3.5.	Análise da acumulação de elementos inorgânicos nos tecidos.....	59
4.3.6.	Discussão	62
5.	DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS	65
6.	BIBLIOGRAFIA.....	67

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer às seguintes pessoas e instituições, o apoio precioso que recebi para a realização deste trabalho:

- Prof. Doutor Gustavo Caldeira, por ter aceite a orientação do trabalho e pelos comentários construtivos ao longo da elaboração do trabalho e na elaboração do relatório final;
- Prof.^a Doutora Conceição Santos, pela ajuda que me deu no laboratório, pela disponibilidade que sempre manifestou para a discussão dos problemas que surgiram e pela amizade;
- Armando, pela ajuda nas questões de controlo de pragas em estufa, ajuda no laboratório e pela amizade;
- Sr.^a Maria José, pela disponibilidade constante do material de trabalho, e pela amizade;
- Licenciadas Etelvina, Brígida, Alexandra, Paula, Helena Azevedo e Gina, pela companhia e pelas sugestões durante a realização do trabalho;
- Susana Santos, pela amizade e ajuda no laboratório;
- Eng.^o Cesar da Estação Vitivinícola da Bairrada, pelo tempo despendido na discussão de problemas relativos ao trabalho;
- Estação Vitivinícola da Bairrada, pela cedência do material de propagação;

Agradeço ainda à minha família, o terem proporcionado a realização deste mestrado.

ABREVIATURAS

2.4-D - Ácido-2,4-diclorofenoxiacético

½ MS - meio de Murashige & Skoog (1962) (citado por Collin & Edwards, 1998)
com metade da concentração em macro e micronutrientes

A – Taxa de fixação do CO₂

BAP - 6-Benzilaminopurina

E – Taxa de transpiração

IBA - Ácido Indol-3-Butírico

MS – meio de Murashige & Skoog (1962) (citado por Collin & Edwards, 1998)

NAA – Ácido-1-Naftil Acético

NN - meio de Nitsch & Nitsch (1969) (citado por Collin & Edwards, 1998)

NOA – Ácido-2-Naftil Oxiacético

RG – meio de Rose Galzy (1969) (citado por Galzy *et al.*, 1990)

WUE – Eficiência do Uso da Água

Ψ_{π} - Potencial Osmótico

Ψ_P – Pressão de Turgescência

RESUMO

Este trabalho desenvolveu-se em duas partes. A primeira parte consistiu em definir metodologias de micropropagação, cultura de *calli* e organogénese experimental em duas castas de videira - Baga e Maria Gomes - características da região da Bairrada. A segunda parte consistiu no estudo do comportamento da casta Baga, relativamente ao stress osmótico induzido pelo osmótico sorbitol, em microrrebentos de videira em cultura *in vitro*.

O estudo da micropropagação através da cultura de gomos axilares, permitiu seleccionar o meio MA1 (meio MS com 4.4 μM de BAP) para o desenvolvimento dos gomos axilares, e os meios MA2 (0.4 macro MS, 1 micro MS, vit. RG) e MR2 (1/2 MS com 0.1 μM de IBA) para o enraizamento dos microrrebentos e alongamento das plântulas. A aclimação das plântulas destas duas castas foi sempre bem sucedida, com a metodologia adoptada.

A indução e cultura de tecido caloso foram obtidas, utilizando como explantes primários folhas jovens de microrrebentos de videira, e os meios MC1 (1/2 MS com 1 μM de 2,4-D) e MC6 (1/2 MS com 0.44 μM de BAP e 0.45 μM de 2,4-D). A indução e cultura de tecido caloso foram ainda obtidas, através da cultura de segmentos de caule e pecíolo no meio MC9 (1/2 MS com 1.6 μM de BAP e 8.5 μM de IAA). O meio MC9 possibilitou as taxas de crescimento de *calli* mais elevadas.

A organogénese experimental em folhas jovens de microrrebentos de videira, deu origem à formação de folhas adventícias nos segmentos de pecíolo não se verificando, com a metodologia utilizada, o desenvolvimento de rebentos adventícios. Este tipo de desenvolvimento só foi possível na casta Maria Gomes embora com percentagens relativamente baixas, 20% no meio MO1 (meio NN com 8.8 μM de BAP) e 6.25% no meio MO3 (meio NN com 8.8 μM de BAP e 0.1 μM de NAA).

O estudo do efeito do stress osmótico no crescimento de microrrebentos de videira cv. Baga, realizou-se utilizando como tratamentos as concentrações 0.1 M, 0.2 M e 0.4 M de sorbitol. O aumento deste osmótico induziu uma redução da percentagem de enraizamento e da taxa de crescimento no genótipo Baga. Os tratamentos mais severos (0.2 M e 0.4 M de sorbitol), conduziram a uma elevada necrose dos tecidos dos microrrebentos, caracterizada por uma diminuição significativa de proteínas totais solúveis nas porções aéreas, diminuição significativa do teor em clorofilas nas folhas e diminuição significativa na

acumulação dos elementos P, B, Ca, Fe, Mn, Mg e K nas porções aéreas. Este tipo de estudo é importante para a caracterização de genótipos tolerantes ao stress hídrico.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Portugal é um país com uma longa tradição na cultura da vinha e produção de vinho, sendo a actividade altamente prestigiada em todo o mundo. O melhoramento da videira passa, não apenas pelo melhoramento das características enológicas, mas também pelo conhecimento das características fisiológicas e tolerâncias a factores bióticos e abióticos, que são aspectos muito importantes a considerar na escolha da casta a cultivar em determinada região ou zona com características próprias (solo, clima, etc.). As metodologias de micropropagação da videira podem, quando são adoptadas metodologias simples e sensíveis, dar um grande contributo na caracterização aos factores referidos, e assim fornecer informação importante sobre o germoplasma português de *Vitis vinifera* L. e por, conseguinte, de grande importância para a viticultura portuguesa.

Este trabalho descreve uma série de etapas na cultura de tecidos em *Vitis vinifera* L., bem como estudos desencadeados *in vitro*, que permitem avaliar a potencialidade da cultura de tecidos no melhoramento da videira.

Uma via de estudo consistiu em verificar se a cultura de tecidos, através da micropropagação, permite realizar estudos de stress osmótico na videira, para serem usados, posteriormente, na diferenciação de genótipos relativamente à tolerância ao stress.

Outra via de estudo consistiu em criar bases para o desenvolvimento de metodologias de selecção de linhas celulares resistentes ao stress osmótico, aproveitando a variação somaclonal induzida em culturas de *calli* e regeneração adventícia. Para tal, procedeu-se à obtenção de culturas estáveis de *calli* e estudo da organogénese a partir de folhas.

Considera-se neste trabalho o stress hídrico, simulado através do decréscimo do potencial osmótico nos meios de cultura *in vitro*, como factor ambiental limitante do desenvolvimento da videira, bem como para o estabelecimento de sistemas de cultura que permitam o estudo do comportamento das células da videira na presença deste tipo de stress.

Este trabalho, a exemplo dos trabalhos realizados por Bavaresco *et al.* (1993) sobre a pesquisa de genótipos tolerantes a baixos níveis de ferro, e Soulie *et al.* (1993) sobre a selecção de plantas resistentes à Eutipose, mostra que a

caracterização efectuada *in vitro* é extensível a diversas castas, outros tipos de stresses e factores ambientais, possibilitando uma caracterização geral de cada casta.

O presente trabalho contém três capítulos. O capítulo inicial apresenta o estudo da micropropagação das castas Baga e Maria Gomes, o segundo capítulo descreve a produção de tecido caloso e o estudo da organogénese a partir de folhas nos génotipos Baga e Maria Gomes. O terceiro capítulo descreve os ensaios de stress osmótico desenvolvidos na casta Baga.

1.1. APLICAÇÃO DA CULTURA *IN VITRO* NO MELHORAMENTO DE PLANTAS

O melhoramento genético de plantas tem-se centrado em características como a qualidade e produtividade da planta, e resistências aos factores bióticos (e.g. doenças provocadas por organismos patogénicos) e abióticos (e.g. seca, salinidade, frio). Estas características são abordadas tanto no melhoramento convencional como no melhoramento utilizando as novas tecnologias - biotecnologia vegetal. O melhoramento utilizando as novas tecnologias diferencia-se do melhoramento convencional, pelos processos utilizados que conduzem à alteração ou modificação do genoma da planta, bem como na abordagem molecular que faz do problema existente e da forma de o ultrapassar.

As estratégias a definir no melhoramento utilizando a biotecnologia vegetal, dependem das possibilidades proporcionadas pelo material vegetal com que se trabalha. Destacam-se a micropropagação, regeneração adventícia (organogénese e embriogénese somática) e regeneração de protoplastos como principais factores que condicionam a aplicação da biotecnologia vegetal no melhoramento de plantas.

Citam-se a seguir algumas metodologias, mais usadas na biotecnologia vegetal que possibilitam o melhoramento das espécies ou cultivares:

- eliminação de vírus em determinados génotipos através da cultura *in vitro* de meristemas caulinares (Duran-Vila *et al.*, 1988);
- introdução de genes e produção de plantas transgénicas, via infecção dos tecidos vegetais por estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* (Gasser & Fraley, 1992) e *Agrobacterium rhizogenes* (Nakano *et al.*, 1994), via electroporação de protoplastos, via bombardeamento de partículas em tecidos vegetais (Gasser & Fraley, 1992), *etc*, necessitando-se, no entanto, de metodologias bem definidas de regeneração dos tecidos e protoplastos (Scorza, 1991);

- hibridação somática (ultrapassando-se assim a incompatibilidade sexual entre as espécies em causa) via fusão de protoplastos mediada por substâncias químicas (polietilenoglicol e Ca^{2+}) ou electrofusão de protoplastos (Hamill & Cocking, 1988), implicando esta técnica a regeneração dos protoplastos;
- criação de variação somaclonal e protoclonal, para a selecção de somaclones com determinadas características (tolerância a factores ambientais físicos e químicos como o frio, secura, salinidade, compostos tóxicos) (Boucharmont, 1994). Implica a necessidade de regeneração adventícia dos tecidos em cultura (Boucharmont, 1994);
- cultura de haploides (cultura de anteras, micrósporos, óvulos, etc.);
- caracterização, selecção e multiplicação de clones com características importantes (tolerância a factores bióticos e abióticos) (Barlass *et al.*, 1986).

1.2. O MELHORAMENTO NAS ESPÉCIES PERENES

Um dos aspectos que diferenciam as espécies lenhosas e as espécies herbáceas, que vai condicionar as metodologias de melhoramento convencional baseadas no cruzamento de genótipos e gerações de selecção, é a duração do período de geração (Scorza, 1991). Nas plantas herbáceas, o período de geração é anual ou bianual, o que possibilita a utilização de metodologias de melhoramento convencional, conseguindo-se assim, num período relativamente curto, a obtenção de novas cultivares. Nas espécies perenes, o período necessário para que a planta comece a produzir semente dura vários anos. Por exemplo, o período de juvenilidade para a Amoreira é de 1 ano e de 15 anos para *Carya illinoensis* Koch (Nogueira americana) (Sherman & Lynere, 1983; citado por Scorza, 1991). O tempo necessário para a obtenção de uma nova cultivar estará assim muito prolongado. No pessegueiro, espécie com um período de geração relativamente curto (3-4 anos), tem sido necessário um período de 20 anos entre a comercialização da cultivar, e a sua obtenção (Scorza, 1991).

Outro aspecto, que também condiciona o melhoramento via cruzamento-selecção nas espécies perenes, é a necessidade de existirem grandes espaços onde se possa proceder à cultura das populações segregantes para a selecção de genótipos (Scorza, 1991). Os elevados custos restringem o número de sementes que podem crescer, reduzindo as hipóteses de encontrar a combinação de genes que produz a cultivar desejada (Scorza, 1991).

Desta forma, o melhoramento das espécies lenhosas perenes tem-se baseado na selecção e multiplicação vegetativa de genótipos importantes, ou

cruzamento de genótipos com selecção-multiplicação vegetativa de genótipos com características importantes. As populações melhoradas caracterizam-se por serem homogéneas e heterozigóticas (Guedes-Pinto, 1997).

As novas tecnologias de melhoramento são especialmente propícias ao melhoramento das espécies perenes, de propagação essencialmente vegetativa (Baribault *et al.*, 1989), uma vez que as alterações genéticas promovidas são directamente introduzidas num genótipo importante. A multiplicação vegetativa desse genótipo assegurará a expressão da nova característica na cultivar (Baribault *et al.*, 1989). Nas espécies de propagação sexual, a nova característica só será fixada numa nova cultivar, após a utilização de procedimentos convencionais que permitam alcançar o estado de homozigotia.

A videira (*Vitis vinifera* L.) é uma espécie perene com um ciclo de geração de 3-6 anos podendo, no entanto, o período ser encurtado para 1-2 anos mediante metodologias de culturas hidropónicas muito bem definidas (Antero-Martins, com. Pessoal). A multiplicação da espécie é essencialmente vegetativa, onde existe uma grande tendência para a preservação dos genótipos com maior valor económico. Desta forma, faz todo o sentido explorar as novas tecnologias no melhoramento da espécie.

1.3. O STRESS HÍDRICO E O MELHORAMENTO DE PLANTAS

O sistema solo→planta→atmosfera é caracterizado por um gradiente de potencial hídrico decrescente entre o solo→planta→atmosfera, no qual a diferença de potencial hídrico funciona como força motora para o fluxo de água desde o solo, através da planta até à atmosfera. O fluxo de água permite manter a turgescência dos tecidos, permite um estado metabólico funcional e a fotossíntese, resultando no crescimento da planta.

Seijo *et al.* (1997) consideraram o crescimento da planta como o resultado da divisão celular e alongamento das células através do fluxo de água. A força motora que permite o fluxo de água e turgescência das células será o gradiente de potencial hídrico entre os tecidos e o meio ambiente (Seijo *et al.*, 1997).

Uma situação de défice de água no solo tende a atenuar ou inverter o gradiente de potencial hídrico no sistema solo→planta→atmosfera, causando a perda de turgescência das células (diminuição da Ψ_p) (Schultz & Matthews, 1993) e alterações no metabolismo da planta, resultando por exemplo na produção e acumulação de compostos tóxicos altamente reactivos como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), radicais super óxido (O_2^-) e radicais hidroxilo (OH^*)

(Irigoyen *et al.*, 1992). Kumar e Singh (1998) referem que a perda de água diminui o potencial hídrico das folhas, conduzindo à diminuição da turgescência, condutância estomática e fotossíntese, isto é, reduz o crescimento e produtividade da planta.

Através desta análise do déficit hídrico no desenvolvimento das plantas, são de referir as seguintes acções desenvolvidas pelas plantas para ultrapassar, resistir ao stress:

- aumento da resistência estomática, de forma a reduzir a perda de água nos tecidos (Good & Zaplachinski, 1994);
- diminuição da condutividade hidráulica no xilema, de forma a reduzir o fluxo de água na planta (Lovisolo & Schubert, 1998);
- aumento da eficiência do uso da água (WUE) (Martin & Ruiz-Torres, 1992);
- redução do potencial hídrico nas células por ajustamento osmótico, de forma a manter a turgescência dos tecidos (Good & Zaplachinski, 1994; Büssis & Heineke, 1998);
- redução do stress oxidativo nos tecidos (Irigoyen *et al.*, 1992).

Lovisolo e Schubert (1998) referem a diminuição da condutividade do sistema de passagem do fluxo da água, ao longo do sistema solo→planta→atmosfera, como um aspecto comum nos mecanismos de resposta das plantas ao stress hídrico. A resistência estomática é uma componente chave na resistência ao fluxo de água, (Meinzer *et al.*, 1996; citado por Lovisolo & Schubert, 1998) no entanto, um aumento da resistência em outros segmentos do sistema, como sejam as raízes e caule, pode ser compreendido como uma resposta da planta ao stress hídrico (Lovisolo & Schubert, 1998).

Premachandra *et al.* (1995) referem o ião potássio, os açúcares, a prolina e a glicina betaina como componentes importantes no ajustamento osmótico. O aumento da concentração destas moléculas e iões nas células vai permitir baixar o potencial hídrico dos tecidos, mantendo-se o gradiente de potencial hídrico no sistema solo→planta→atmosfera, em condições de secura. Rhodes e Hanson (1993) (citado por Premachandra *et al.*, 1995) sugerem que a glicina betaina confere osmoprotecção por estabilizar a estrutura nativa das proteínas. As funções propostas para a prolina são diversas e o seu papel permanece ainda incerto, podendo comportar-se como osmótico, estabilizador das membranas em condições de déficit hídrico e de molécula compatível com o metabolismo celular, quando está presente em concentrações elevadas no citoplasma (Büssis & Heineke, 1998).

A eficiência do uso da água (WUE) é definida pela razão A/E, em que A é a taxa de fixação do CO₂ (CO₂ μmol m⁻² s⁻¹) e E a taxa de transpiração (Martin & Ruiz-Torres, 1992). Em condições de stress hídrico, ambos os parâmetros diminuem em resultado do aumento da resistência estomática (ou diminuição da condutância estomática para o CO₂ e H₂O) (Martin & Ruiz-Torres, 1992). Martin e Ruiz-Torres (1995) referem ainda a eficiência de carboxilação (actividade do Ciclo de Calvin) como uma componente da limitação de A em condições de défice hídrico. As plantas com WUE mais elevada em condições de stress hídrico, apresentam maior capacidade em manter o crescimento vegetativo e produzir fruto em condições de secura (During, 1987).

Os efeitos do stress hídrico na fisiologia da folha são mediados pela produção e acumulação de compostos tóxicos altamente reactivos tais como o peróxido de hidrogénio (H₂O₂), radicais super óxido (O₂⁻) e radicais hidroxilo (OH⁻). Estes radicais são susceptíveis de causar danos nos lípidos (peroxidação de ácidos gordos insaturados das membranas), proteínas (desnaturação de enzimas), hidratos de carbono (quebra de polissacáridos) e ácidos nucleicos (Monk *et al.*, 1989; citado por Irigoyen *et al.*, 1992).

Os programas de melhoramento ao stress hídrico (défice hídrico) desenvolvem-se a partir da identificação das características fisiológicas responsáveis pela resistência ao factor ambiental, e transferência dessas características para cultivares de valor económico (Kumar & Singh, 1998). O sucesso destes programas depende dos métodos utilizados como critério de selecção. São necessários métodos rápidos e simples para se poder avaliar o maior número possível de génotipos (Kumar & Singh, 1998). Kumar e Singh (1998) utilizaram os parâmetros ajustamento osmótico, arrefecimento transpiracional, condutância estomática e a perda de água em folhas excisadas, para diferenciar génotipos de *Brassica* tolerantes ao défice hídrico.

Outra via de trabalho consiste em identificar a base genética responsável pela tolerância ao défice hídrico, permitindo assim um melhoramento mais direccionado e eficiente (Lilley *et al.*, 1996).

1.3.1. O stress hídrico no género *Vitis*

Na videira (*Vitis vinifera* L.) tem-se verificado que a altura do ano (época de cultura) em que se faz sentir o stress hídrico, bem como a intensidade do stress, são factores condicionantes do desenvolvimento vegetativo das videiras e do rendimento das culturas. O stress hídrico precoce, após a floração e antes da maturação do fruto, é considerado o mais problemático por provocar efeitos

negativos mais intensos na produtividade.

Poni *et al.* (1993) verificaram que o stress hídrico antes do início da maturação do fruto conduziu a uma acentuada diminuição do crescimento dos rebentos e dos frutos, à limitação da fixação do CO₂ e condutância estomática, relativamente ao stress hídrico que ocorreu durante a maturação do fruto.

Em geral, o stress hídrico que ocorre antes do início da maturação do fruto tende a provocar uma redução no tamanho da uva, quando comparado com os efeitos do stress hídrico durante a maturação do fruto (Smart, 1974; Hardie & Considine, 1976; Matthews & Anderson, 1988; citado por Poni *et al.*, 1993), os quais tendem apenas a alterar o momento da maturação completa do fruto (Hardie & Considine, 1976; Hardie, 1988; citado por Poni *et al.*, 1993).

Matthews *et al.* (1987) verificaram que as diferenças no estado hídrico não tiveram efeitos nos maiores indicadores fenológicos, isto é, época de abrolhamento, floração, maturação e colheita. Os défices hídricos no início da época (início do ano de produção), diminuíram o período de alongamento dos ramos e produção de nós, diminuíram as taxas de crescimento dos ramos e produção de nós e aceleraram o processo de desenvolvimento da periderme nos ramos do ano. A taxa de crescimento do fruto foi inibida pelos défices hídricos precoces e tardios. A produtividade diminuiu mais com os défices precoces, antes da maturação.

Reynolds e Naylor (1994) verificaram uma diminuição da transpiração e condutância estomática, com o aumento da duração do stress hídrico em *Vitis vinifera* L.. Verificaram ainda uma diminuição do comprimento dos ramos, diminuição do tamanho das folhas e do peso dos frutos.

Schultz e Matthews (1993) referiram um ajustamento osmótico em folhas de videira em condições de défice hídrico, mantendo-se assim a turgescência das células igual ou superior ao controlo. No entanto, o stress inibiu por completo o crescimento foliar. Estes autores referiram ainda uma diminuição da extensibilidade das paredes celulares, factor que contribuiu para a inibição da expansão foliar causada por défices hídricos.

During (1987) analisou a superioridade da cultivar "Riesling" relativamente à cultivar "Silvaner", no que diz respeito à tolerância à secura, em resultado dos valores mais baixos para a condutância estomática que conduziram a uma menor perda de água e aumento da razão A/E, na cultivar "Riesling" . During (1987) sugere a determinação dos parâmetros A/E, coeficiente de correlação

entre g^1 (a $A_{\max.}^2$) e $A_{\max.}$ em condições de stress hídrico, e a representação de $A_{\max.}$ versus g (a $A_{\max.}$), nos programas de melhoramento para seleccionar cultivares tolerantes à secura.

Em Portugal, as situações de défice hídrico na agricultura registam-se fundamentalmente no Sul (Alentejo e Algarve) e em Trás-os-Montes e Alto Douro, que são regiões caracterizadas por um clima mediterrânico seco. A cultura da vinha é uma actividade de grande valor económico para estas regiões. O conhecimento da existência de genótipos de *Vitis vinifera* L. mais tolerantes às condições de falta de água, e a sua cultura em regiões sujeitas a épocas com carências hídricas, possibilitará uma maior rentabilidade das culturas.

A micropropagação e cultura de tecidos surgem como potenciais vias de trabalho para a caracterização de genótipos tolerantes a este tipo de stress, se forem utilizadas metodologias sensíveis e correlacionadas com os níveis de tolerância existentes. O trabalho que se apresenta de seguida, reflecte uma abordagem inicial a este tipo de estudos.

¹ Condutância estomática para a água ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

² Valor máximo de A durante o dia, para concentrações normais de CO_2

2. MICROPORAGAÇÃO

2.1. INTRODUÇÃO

A micropropagação é um processo de multiplicação de plantas no qual são utilizadas metodologias de cultura *in vitro* de tecidos vegetais. Relativamente aos processos convencionais de propagação, como por exemplo a propagação por estacas das espécies lenhosas, a micropropagação apresenta as seguintes vantagens:

- obtenção de taxas de multiplicação mais elevadas (Collin & Edwards, 1998; George, 1993);
- produção de clones em espécies difíceis de propagar pelos métodos convencionais (George, 1993);
- possibilidade de produção durante todo o ano, eliminando-se a influência das estações do ano sobre o material vegetativo (Collin & Edwards, 1998; George, 1993);
- produção de plantas livres de bactérias, fungos e outros microorganismos (Collin & Edwards, 1998; George, 1993);
- possibilidade de produzir plantas livres de vírus (Collin & Edwards, 1998; George, 1993);
- necessidade de espaços pequenos para propagar um elevado número de plantas (George, 1993).

As desvantagens associadas à micropropagação são as seguintes:

- necessidade de infra-estruturas caras e mão de obra especializada (Collin & Edwards, 1998; George, 1993);
- necessidade de um período de aclimação às condições de campo (Collin & Edwards, 1998; George, 1993);
- aumento da probabilidade de se produzirem plantas com características indesejáveis e com alterações genéticas (George, 1993);
- necessidade de uma fase de investigação por vezes bastante morosa, para apuramento das técnicas (Collin & Edwards, 1998).

Todas as vantagens e inconvenientes enumerados estão fortemente

dependentes do método de micropropagação utilizado, isto é, para determinado objectivo da micropropagação, terá de se adoptar determinada metodologia que acarretará vantagens e inconvenientes.

2.2. FASES DA MICROPROPAGAÇÃO

Durante o processo de micropropagação podem distinguir-se as seguintes fases (Hartmann *et al.*, 1997):

- 1- estabelecimento da cultura asséptica;
- 2- multiplicação de microrrebentos;
- 3- enraizamento dos microrrebentos;
- 4- aclimação das plantas.

O objectivo da fase de estabelecimento da cultura asséptica consiste em obter culturas *in vitro* dos explantes primários*, sem contaminações e com crescimento (George, 1993; Hartmann *et al.*, 1997). Esta fase compreende a selecção da planta mãe, obtenção de explantes, desinfecção do material vegetal e cultura *in vitro*.

Os explantes utilizados para iniciar a micropropagação diferem consoante o método que se quer adoptar. Assim, utilizam-se normalmente segmentos nodais com um ou mais nós (isto é, um ou mais gomos axilares), ápices e meristemas caulinares para a regeneração directa, e órgãos tais como folhas, segmentos de caule, ápices fragmentados, escamas de bolbos, cotilédones, hipocótilos, gametófito feminino, anteras e pólen para a regeneração adventícia (George, 1993; Hartmann *et al.*, 1997).

A fase de multiplicação tem como fim aumentar o número de microrrebentos produzidos durante a 1ª fase da micropropagação. Normalmente processa-se com a indução de novas proliferações axilares, a partir de microrrebentos axilares isolados das massas proliferativas da cultura anterior e cultivados *in vitro* (George, 1993). Em alternativa, esta fase pode ser realizada pela subcultura *in vitro* de segmentos nodais (com um ou mais nós) dos rebentos obtidos durante a cultura anterior (George, 1993). A multiplicação pode ainda ser obtida via indução de microrrebentos adventícios, a partir de explantes primários

* Adoptou-se o termo explante como tradução do termo inglês "explant" para definir os tecidos que promovem as culturas *in vitro*. Em consequência o explante primário será aquele que iniciará a cultura *in vitro* a partir do material *ex vitro* (planta mãe).

e secundários, ou produção de embriões somáticos, a partir da cultura de explantes ou subcultura de embriões somáticos primários (George, 1993).

O enraizamento *in vitro* dos microrrebentos tem como fim a formação de raízes e desenvolvimento do material vegetativo, de maneira a tornar mais eficaz a fase seguinte de aclimação das plantas às condições de campo. O enraizamento pode ser obtido *in vitro* ou *ex vitro* (Collin & Edwards, 1998; Hartmann *et al.*, 1997). No enraizamento *in vitro*, os microrrebentos são subcultivados num meio de indução de raízes ou, em alternativa, os microrrebentos são transferidos para um meio de indução de raízes, por alguns dias, e depois subcultivados num meio que promova o crescimento das raízes (Hartmann *et al.*, 1997). No enraizamento *ex vitro*, as bases dos microrrebentos são mergulhadas numa solução com auxinas (*e.g.* IBA), os microrrebentos são depois plantados em substrato de propagação convencional, em ambiente com elevada humidade (fase de enraizamento e aclimação simultâneas) (Collin & Edwards, 1998; Hartmann *et al.*, 1997). Para além do enraizamento, esta fase origina alterações morfológicas e fisiológicas nos microrrebentos, que se tornam fundamentais para uma melhor eficácia da aclimação das plântulas. As alterações traduzem-se, normalmente, num maior desenvolvimento foliar, crescimento da parte aérea, diminuição do estado vitrificado e inibição do crescimento dos rebentos axilares. Esta fase é ainda crucial na retenção de infecções pelo que é sempre aconselhável pulverizar os rebentos com fungicidas.

É referido na literatura que as raízes produzidas *in vitro* são muito pouco funcionais, acabando por morrer e serem substituídas por novas raízes na fase de aclimação (Collin & Edwards, 1998; Hartmann *et al.*, 1997). Assim sendo, a metodologia de enraizamento *ex vitro* pode, em certos casos, tornar-se mais eficaz.

A aclimação é a última fase do processo de micropropagação, e tem como objectivo transferir as plântulas enraizadas para as condições de campo. Esta transferência torna-se, no entanto, difícil devido às características das plântulas produzidas *in vitro* (Collin & Edwards, 1998). A cultura *in vitro* forma plântulas com características de vitrificação, isto é, com uma cutícula muito fina (Collin & Edwards, 1998; Fila *et al.*, 1998), com tecidos suculentos (Collin & Edwards, 1998) e funcionamento deficiente do sistema radicular e dos estomas (Fila *et al.*, 1998; George, 1993; Hartmann *et al.*, 1997), em consequência dá-se uma perda muito acentuada da água dos tecidos em ambientes pouco húmidos (George, 1993). A aclimação processa-se então, com a transferência das plântulas, ou microrrebentos previamente mergulhados em soluções com auxinas, para um substrato de propagação convencional, num ambiente de humidade bastante elevada (aproximadamente 100%). A adaptação dá-se com a

redução gradual da humidade e aumento da exposição ao ambiente natural (Hartmann *et al.*, 1997).

Fila *et al.* (1998) referem a elevada concentração de açúcares no meio, a baixa intensidade luminosa e uma razão baixa de CO₂ nos frascos de cultura *in vitro*, como factores responsáveis pela inibição da fotossíntese. A aclimação exige um esforço adicional da planta, no sentido de aumentar a eficiência da fotossíntese e adoptar um comportamento totalmente autotrófico (George, 1993; Hartmann *et al.*, 1997).

Os meios de cultura associados à micropropagação diferem, sobretudo, na composição e concentração dos fitorreguladores. Assim, nas fases 1 e 2 da micropropagação, as culturas de rebentos axilares e de segmentos nodais são realizadas em meios com elevadas concentrações de citocininas, com a finalidade de se eliminar a dominância apical dos gomos. Para o enraizamento e desenvolvimento das plântulas, os meios são caracterizados por uma diminuição da concentração das citocininas e aumento das auxinas, podendo-se verificar ainda a diminuição da concentração dos sais. As concentrações dos fitorreguladores e a razão entre auxinas e citocininas nos diversos meios utilizados na micropropagação, diferem em função da espécie com que se está a trabalhar.

2.3. MÉTODOS DE MICROPROPAGAÇÃO

Os métodos normalmente usados na micropropagação que se referirão de seguida, estão associados às fases 1 e 2 da micropropagação. Podem-se considerar duas classes, os métodos que utilizam os meristemas existentes no explante – cultura de microrrebentos axilares e cultura de gomos axilares -, e os métodos que se baseiam na indução de novos centros meristemáticos morfogénicos - regeneração adventícia via organogénese ou embriogénese somática.

A propagação por rebentos axilares é iniciada a partir de ápices caulinares, gomos axilares ou meristemas da planta mãe. A fase de multiplicação baseia-se na indução de proliferações axilares a partir dos rebentos axilares individuais isolados da cultura proliferativa anterior (George, 1993). Este é o método de micropropagação mais usado. Uma característica dos meios de cultura utilizados neste método é a utilização de citocininas para eliminar a dominância dos meristemas apicais. Por vezes neste tipo de cultura podem surgir microrrebentos de origem adventícia sobretudo no *callus* que se forma na base do tufo vegetativo, em resultado da composição do meio em fitorreguladores. Quando se

pretende obter plantas geneticamente iguais, terá de se evitar a regeneração adventícia, uma vez que este tipo de crescimento é susceptível de provocar modificações genéticas nas plantas regeneradas. Pelo contrário, os rebentos de origem axilar são normalmente geneticamente idênticos à planta inicial (George, 1993).

A cultura de nós (ou gomos axilares) é o método mais simples de propagação *in vitro*. Normalmente inicia-se a partir dos ápices caulinares, gomos axilares ou segmentos de caule com um ou mais gomos. Os rebentos que se obtêm funcionarão como fonte de gomos axilares para as sucessivas subculturas e multiplicação de microrrebentos. Este método é normalmente utilizado evitando-se a ramificação axilar que se observa na cultura de microrrebentos (George, 1993). Desta forma, este tipo de cultura não exige reguladores de crescimento para muitas espécies. Este método apresenta taxas mais baixas de multiplicação que a cultura de microrrebentos mas é, no entanto, o método mais seguro para a produção de plantas geneticamente idênticas (George, 1993).

A regeneração adventícia por organogénese ou embriogénese pode ser directa, quando o explante é directamente induzido a formar centros meristemáticos regenerativos ou indirecta, quando o explante dá origem a um *callus* que por sua vez produzirá centros meristemáticos regenerativos.

A organogénese directa pode ser iniciada em explantes de órgãos tais como folhas, caules, pétalas, raízes, escamas de bolbos, embriões de semente ou tecidos juvenis (provenientes de plântulas de semente). Este método de micropropagação inicia-se com a cultura de explantes e formação de rebentos adventícios, podendo a fase de multiplicação ser realizada por cultura de rebentos, gomos axilares ou novamente por cultura de explantes e indução de rebentos adventícios. Este método aumenta a probabilidade de alterações genéticas nas plantas regeneradas (George, 1993).

A micropropagação por organogénese indirecta implica uma fase inicial de cultura do explante e indução de *calli* com potencial organogénico, consistindo a fase de multiplicação na subcultura dos *calli* e indução de rebentos adventícios (George, 1993).

A micropropagação por embriogénese somática directa compreende uma fase inicial de cultura de explantes e as fases de indução e germinação de embriões somáticos. A fase de multiplicação pode ser feita por cultura de embriões primários e indução de embriões secundários. Na micropropagação por embriogénese somática indirecta, há uma fase inicial de cultura do explante e produção de *calli* com competência embriogénica, seguindo-se a indução de embriões somáticos a partir dos *calli* bem como a sua germinação e formação de

plântulas. A multiplicação do *callus* embriogénico e dos tecidos de embriões somáticos faz deste método o mais produtivo de todos. A propagação por embriogénese indirecta acarreta no entanto, os riscos das plantas regeneradas diferirem geneticamente umas das outras e da planta mãe. A embriogénese directa é iniciada principalmente a partir de explantes associados ou derivados do gametófito feminino.

2.4. FACTORES QUE INFLUENCIAM A MICROPROPAGAÇÃO

Podem-se enumerar os seguintes factores que vão ter efeito nas várias fases da micropropagação:

- a) genótipo da planta mãe;
- b) estado fisiológico da planta mãe;
- c) tipo de explante;
- d) composição em fitorreguladores;
- e) condições de cultura e composição dos meios de cultura.

Nos estudos de micropropagação das espécies vegetais ensaiam-se, normalmente, diversos métodos e meios de cultura, precisamente porque o genótipo a estudar pode não funcionar com as metodologias de micropropagação definidas para outras espécies (Péros *et al.*, 1998). O genótipo é um factor crítico nos métodos de propagação por organogénese e embriogénese somática.

Os estudos de micropropagação demonstram que os explantes obtidos de plantas num estado activo de crescimento, sem sintomas de carências nutritivas e sem sintomas de doenças causadas por organismos, são os que dão melhores resultados (Yu & Meredith, 1986). Por outro lado, verifica-se que são os tecidos juvenis aqueles que permitem uma micropropagação mais eficiente, sobretudo quando se estão a utilizar os métodos de organogénese e embriogénese (Stamp *et al.*, 1990).

Apesar de nos métodos de micropropagação por cultura de microrrebentos e gomos axilares a escolha do explante ser relativamente fácil e não implicar grandes problemas para o estabelecimento da técnica, baseando-se na cultura de ápices caulinares, segmentos de caule com um ou mais gomos axilares (George, 1993), os métodos de micropropagação por organogénese e embriogénese podem-se tornar muito complicados de estabelecer devido à

escolha menos adequada de explantes. Nestes dois últimos métodos, procuram-se sobretudo tecidos vegetais muito jovens. A organogénese pode ser iniciada em tecidos de folha, caule, raízes, pétalas (George, 1993). A embriogénese directa é iniciada principalmente a partir de explantes associados ou derivados do gametófito feminino. Os óvulos, embriões nucelares, tecidos nucelares e embriões zigóticos imaturos são particularmente eficazes em promover a embriogénese directa (George, 1993). A embriogénese adventícia pode ser obtida em explantes de hipocótilo e cotilédones (George, 1993). A cultura de anteras também pode promover a embriogénese (directa ou indirecta) (George, 1993).

Quando se trata da micropropagação utilizando os métodos de cultura de microrrebentos e cultura de gomos axilares, a 1ª e 2ª fases requerem geralmente uma concentração elevada de citocininas nos meios (normalmente a BAP) para promover a indução de rebentos, bem como uma concentração elevada de auxinas (normalmente o IBA) nos meios de enraizamento. Estas concentrações terão, no entanto, de ser estudadas para cada espécie e, dentro da mesma espécie, para certos genótipos de forma a otimizar o processo de micropropagação. Na regeneração adventícia por organogénese e embriogénese são utilizadas auxinas e citocininas nos meios de cultura. Porém, as suas concentrações e tipos de auxinas e citocininas utilizadas diferem significativamente de espécie para espécie, tomando-se difícil fazer generalizações. É no entanto prática corrente, utilizarem-se citocininas em concentrações muito elevadas durante a indução da organogénese (Stamp *et al.*, 1990) e o uso da auxina sintética 2,4-D para iniciar tecido caloso com competência embriogénica (Torregrosa *et al.*, 1995). Em muitas espécies, esta fase está associada a elevadas concentrações de sacarose e/ou culturas em meio líquido.

Por vezes, certo tipo de condições como por exemplo a passagem de uma situação de luminosidade para escuro e diminuição da concentração dos sais do meio de cultura para metade, poderão ter efeitos positivos na micropropagação, especialmente nos métodos de regeneração adventícia. Estes procedimentos tendem a diminuir a oxidação dos compostos fenólicos pelos tecidos, diminuindo assim o grau de toxicidade destas reacções (Collin & Edwards, 1998).

2.5. A MICROPROPAGAÇÃO NO GÉNERO *Vitis*

Os estudos de micropropagação no género *Vitis* têm demonstrado a relativa facilidade de utilização desta técnica de propagação neste género. A micropropagação de *Vitis* sp. é normalmente iniciada por cultura de gomos

axilares (Jona & Webb, 1978; Péros *et al.*, 1998), ápices caulinares (Chée & Pool, 1985; Fanizza *et al.*, 1984; Goussard, 1981; Yu & Meredith, 1986) e meristemas (Duran-Vila *et al.*, 1988; Rajasekaran & Mullins, 1981); a multiplicação *in vitro* é facilmente obtida por cultura de microrrebentos (Duran-Vila *et al.*, 1988; Rajasekaran & Mullins, 1981) e gomos axilares (Bavaresco *et al.*, 1993; Péros *et al.*, 1998; Soulie *et al.*, 1993; Stamp *et al.*, 1990; Torregrosa & Bouquet, 1995). Os meios de cultura utilizados nestas fases e nestes métodos são bastante semelhantes e têm como principal factor indutor a concentração da citocinina BAP. Chée e Pool (1985) descrevem os efeitos da BAP durante a cultura de microrrebentos da videira híbrida "Remaily Seedless" do seguinte modo: 5 μM de BAP induz a proliferação máxima de rebentos axilares, 2.5 μM de BAP dá origem a rebentos axilares individualizados e 1 μM de BAP promove o alongamento dos entrenós dos explantes, ou seja, o aumento da concentração de BAP até 5 μM conduz a uma diminuição do alongamento dos rebentos axilares, aumento do número de rebentos axilares por rebento inicial e crescimento indiferenciado dos microrrebentos (formação de tufos vegetativos). A composição salina do meio MS (Murashige & Skoog, 1962; citado por Collin & Edwards, 1998) é bastante utilizada na cultura dos microrrebentos e gomos axilares nas fases de estabelecimento da cultura asséptica e multiplicação (Bavaresco *et al.*, 1993; Chée & Pool, 1982; Chée & Pool, 1985; Chée & Pool 1988; Duran-Vila *et al.*, 1988; Goussard, 1981; Lewandowski, 1991; Rajasekaran & Mullins, 1981; Roubelakis-Angelakis & Zivanovitch, 1991; Torregrosa *et al.*, 1995; Yu & Meredith, 1986). A composição em vitaminas é normalmente também a do meio MS (Bavaresco *et al.*, 1993; Chée & Pool, 1982; Chée & Pool, 1985; Chée & Pool 1988; Duran-Vila *et al.*, 1988; Goussard, 1981; Lewandowski, 1991; Rajasekaran & Mullins, 1981; Roubelakis-Angelakis & Zivanovitch, 1991; Torregrosa *et al.*, 1995; Yu & Meredith, 1986) verificando-se no entanto algumas alterações consoante os autores. O pH do meio varia entre 5.7 e 5.8, as culturas realizam-se com um fotoperíodo de 14-16h de luz e uma temperatura que varia entre 21-27 °C.

O enraizamento tem sido obtido utilizando microrrebentos com 10-25 mm (Rajasekaran & Mullins, 1981). Se bem que tenha sido descrito o enraizamento nos meios sem reguladores de crescimento (Duran-Vila *et al.*, 1988; Jona & Webb, 1978), o IBA em concentrações de 0.1 μM a 5 μM tem sido bastante efectivo em promover a indução de raízes (Lewandowski, 1991; Rajasekaran & Mullins, 1981; Roubelakis-Angelakis & Zivanovitch, 1991; Torregrosa & Bouquet, 1995). Os meios de cultura para o enraizamento apresentam normalmente uma composição em sais de MS ou $\frac{1}{2}$ MS e vitaminas de MS (Duran-Vila *et al.*, 1988; Jona & Webb, 1978; Roubelakis-Angelakis & Zivanovitch, 1991; Soulie *et al.*, 1993;

Torregrosa & Bouquet, 1995). As culturas são realizadas com pH entre 5.7 e 5.8, fotoperíodo de 14-16h de luz e temperatura entre 21-27 °C.

Este estudo em particular teve como objectivo estabelecer uma metodologia de micropropagação estável de *Vitis vinifera* L. cv. Baga e Maria Gomes.

2.6. METODOLOGIA

2.6.1. Cultura da videira por estacaria

A videira foi propagada em estufa (Fotografia 1f) nas seguintes condições: humidade relativa (HR) de 40-50%, temperatura de 22°C e fotoperíodo de 16h de luz/8h de escuro com uma intensidade luminosa máxima de 134 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Estacas de videira com 3 nós foram plantadas em vasos de 5 litros (4 estacas por vaso) contendo um substrato de turfa e perlite na proporção 3:2, previamente autoclavado. A rega com água fez-se regularmente de maneira a manter o substrato permanentemente humedecido, para assegurar uma melhor recuperação às podas nos primeiros tempos da cultura. Realizou-se quinzenalmente uma fertilização com 300 ml de solução de Hoagland (Salisbury & Ross, 1992) por vaso. A fertilização foi posteriormente realizada por fertilizantes comerciais.

Realizaram-se os seguintes tratamentos com fungicidas e insecticidas nas culturas: os fungicidas Derosal (0.75 g/l) e Previcur (1 ml/l) no substrato antes da plantação das estacas e pulverização no início da plantação, e tratamentos preventivos com os fungicidas Milraz (2.5 g/l) e Derosal (0.75 g/l).

Estas videiras foram utilizadas na obtenção de explantes para os estudos subsequentes.

2.6.2. Preparação dos meios de cultura *in vitro*

Os meios de cultura foram preparados a partir de soluções stock de macronutrientes, micronutrientes, reguladores de crescimento e vitaminas, pipetando-se o volume necessário para se atingir a concentração final no meio. Todas as soluções stock foram armazenadas no frigorífico (4°C), excepto as vitaminas que foram armazenadas no congelador. O pH foi regulado e o volume aferido, antes da adição do agar e sacarose. A autoclavagem decorreu durante

20 min. a 121°C. O material de vidro utilizado para as culturas *in vitro*, consistiu em placas de petri para a indução de tecido caloso e em frascos de diferentes dimensões para a micropropagação e cultura de *calli*.

2.6.3. Micropropagação

A micropropagação iniciou-se com a obtenção de rebentos de videira com pelo menos 10 nós (Fotografia 1f), a partir de videiras propagadas por estacaria e mantidas em estufa. Procedeu-se ao isolamento de nós, lavagem em água corrente durante 10 min. e desinfecção em álcool a 70% durante 1 min., seguido de uma solução diluída (20% V/V) de lixívia comercial, durante 20 min.. Seguiu-se a lavagem dos nós em água destilada estéril e sua cultura *in vitro* em meio MA1 e MA2 (Tabela 1.1). Os gomos axilares foram cultivados durante 4 semanas, numa sala de cultura de tecidos com temperatura a 21-22°C, fotoperíodo de 16h luz/8h escuro e intensidade luminosa de 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O alongamento *in vitro* de rebentos (1ª sub, 2ª sub e subs.), realizou-se também a partir da cultura de nós, nos meios MA1, MA2 e MR2 (tabela 1.1), nas mesmas condições das culturas iniciais. Para o cálculo das percentagens de alongamento utilizou-se um n igual ou superior a 30 por situação experimental.

O enraizamento *in vitro* iniciou-se em rebentos (de dimensões superiores a 15 mm) provenientes da cultura inicial e da 1ª subcultura em meio MA1. Utilizaram-se os meios MR1, MR1', MR2, MR3 e MR4 (tabela 1.1). As culturas prolongaram-se até à 5ª semana, nas mesmas condições que as culturas de gomos axilares. Para o cálculo das percentagens de enraizamento utilizou-se um n igual a 10 por situação experimental.

A aclimação realizou-se a partir do material enraizado *in vitro* em meio MR2, que foi transferido para vasos contendo turfa e perlite (1:1 V/V) e mantido num sistema de câmara húmida. A humidade relativa foi mantida bastante elevada (aproximadamente 100%) durante as duas primeiras semanas de aclimação, reduzindo-se depois, progressivamente, a frequência de aspersão das plantas com água destilada e aumentando o contacto com a atmosfera da estufa (temperatura de 22°C, fotoperíodo de 16h luz/8h escuro, HR de 40-50% e intensidade luminosa máxima de 134 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Tabela 1.1: Composição dos meios utilizados para a micropropagação da videira. (vit.) vitaminas, (cit.) citocinina.

	sais	vit.	fonte de carbono (g/l)	agar (g/l)	cit. (mg/l)	auxina (mg/l)	pH
MA1	MS	MS	30 sacarose	8	1.0 BAP		5.7-5.8
MA2	0.4 Macro MS 1 Micro MS	RG	30 sacarose	8			5.7-5.8
MR1 Jona & Webb (1978)	MS	MS	30 sacarose	8	0.2 BAP		5.7-5.8
MR1' Jona & Webb (1978)	MS	MS	30 sacarose	8			5.7-5.8
MR2 Novak & Juvova (1982/83)	½ MS	MS	30 sacarose	8		0.02 IBA	5.7-5.8
MR3	½ MS	MS	30 sacarose	8	0.2 BAP	0.5 NAA	5.7-5.8
MR4	½ MS	MS	30 sacarose	8	0.5 cinetina	0.5 NAA	5.7-5.8

2.7. RESULTADOS

Os meios para a cultura e alongamento dos gomos axilares *in vitro* mostraram ser eficazes, como mostra a tabela 1.2, variando as percentagens de alongamento entre 84.5%-90% na casta Baga e 75.5%-92% na casta Maria Gomes (MG). Notou-se uma ligeira diferença de comportamentos nas duas castas tendo a MG, de um modo geral, uma percentagem de alongamento dos gomos axilares mais reduzida. Verificou-se ainda uma diferença no tipo de crescimento manifestado por ambas as castas, relativamente ao meio MA1 por um lado, e aos meios MA2 e MR2 por outro. O meio MA1 induziu um rápido desenvolvimento do gomo axilar mas não permitiu um acentuado alongamento nem o enraizamento. Os rebentos originados nestes meios apresentaram folhas com morfologias muito diferentes, caules grossos e curtos bem como rebentos axilares (Fotografia 1b), produzindo-se tufos vegetativos (Fotografia 1d). Os meios MA2 e MR2, para além de induzirem o crescimento dos rebentos, permitiram o enraizamento dos mesmos produzindo plântulas com uma morfologia semelhante ao característico da videira, isto é, com folhas com morfologias idênticas, caules alongados e sem rebentos axilares (Fotografias 1a e 1c). Em qualquer dos meios testados, não se verificou a formação de *calli* basal

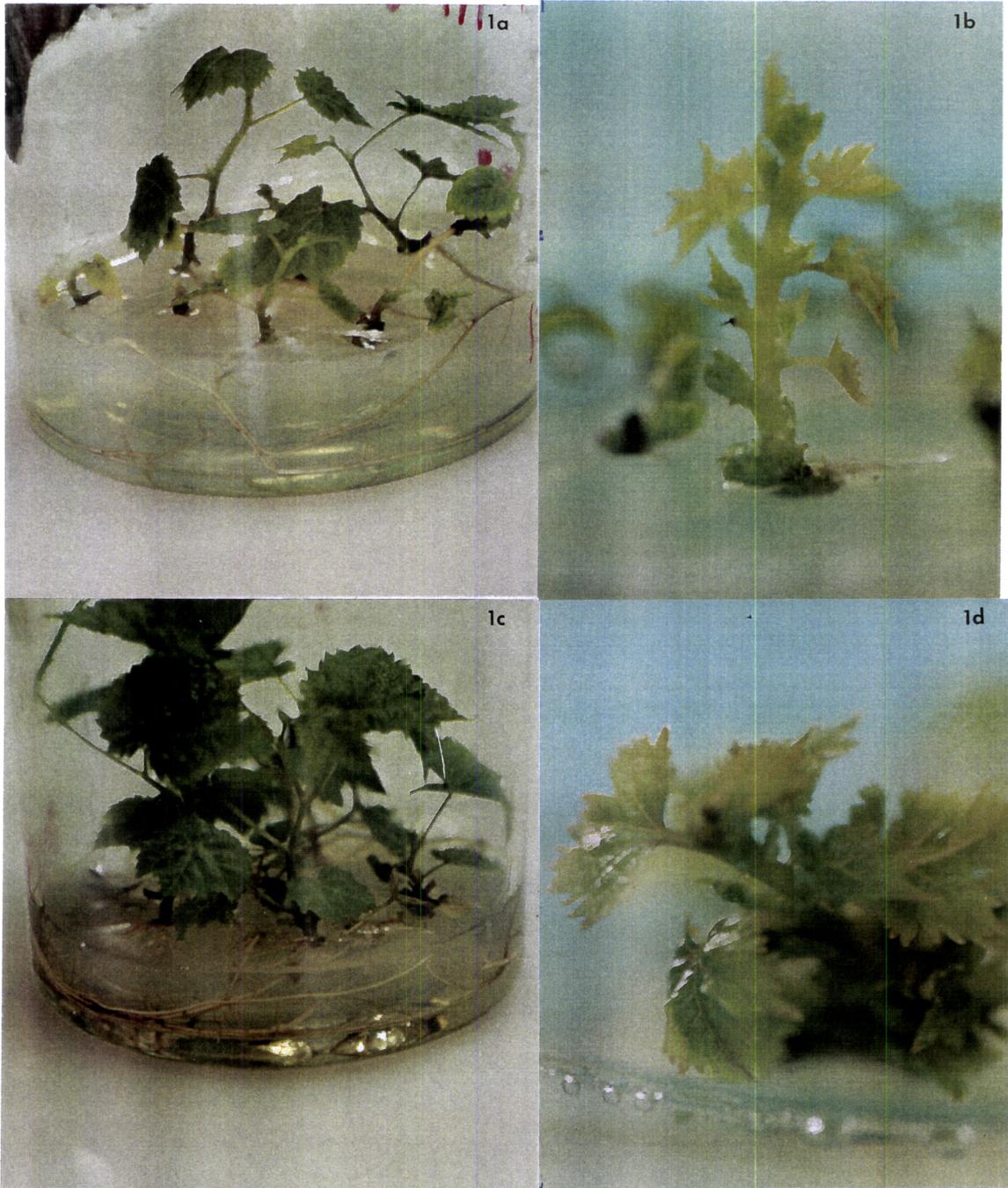
nos rebentos, nem a indução de rebentos adventícios.

Tabela 1.2: Percentagens de alongamento e enraizamento de rebentos, a partir da cultura *in vitro* de nós singulares de videira, em diferentes meios de propagação. (% along.) percentagem de nós que formaram rebentos, (% enr.) percentagem de nós que enraizaram, (–) não ensaiado, (CI) cultura inicial, (1ª sub) 1ª subcultura, (2ª sub) 2ª subcultura, (sub) subcultura. Utilizou-se um $n \geq 30$ por situação experimental.

tipo de cult.	meios	MG		Baga	
		% along.	% enr.	% along.	% enr.
CI	MA1	92	0	90.9	0
1ª sub	MA1	75.5	0	84.5	0
2ª sub	MA1	78.2	0	87.1	0
CI	MA2	87.2	100	87.1	71.7
Sub	MA2	90	100	100	100
CI	MR2	–	–	–	–
Sub	MR2	83	97	75	76

Durante o enraizamento *in vitro*, os meios mais eficazes foram o MR2, MR3 e MR4 (Tabela 1.3), com percentagens a variar entre 73.7% (MR2), 80% (MR3) e 75% (MR4) para a casta MG e 60.3% (MR2), 100% (MR3 e MR4) na casta Baga. É de realçar as diferentes respostas causadas pelos diferentes meios, isto é, os meios MR3 e MR4, com percentagens mais elevadas de enraizamento, conduziram à proliferação de raízes adventícias e tecido caloso basal nas plântulas, o meio MR2 produziu poucas raízes adventícias e de grandes dimensões, não havendo produção de *calli* basal.

A aclimação realizada nas plântulas enraizadas no meio MR2 (Fotografia 1e), atingiu percentagens de 100% em Baga e MG, o que reflecte a facilidade com que as plântulas destas castas micropropagadas se adaptam ao exterior.



Fotografias 1a-1d: (1a) MG, sub em meio MA2, (1b) MG, 1ª sub. em meio MA1; (1c) MG, sub em meio MR2, (1d) Baga, 2ª sub. em meio MA1.



Fotografias 1e-1f: (1e) MG com 2 meses de aclimação; (1f) Baga propagada por estaca.

Tabela 1.3: Percentagens de enraizamento *in vitro* de rebentos de videira provenientes de cultura inicial e 1ª subcultura em meio MA1, em função de diferentes meios de indução. (% enr.) percentagem de rebentos que enraizaram. Utilizou-se um $n \geq 10$ por situação experimental.

	MG	Baga
meios	% enr.	% enr.
MR1	0	50
MR1'	0	14.3
MR2	73.7	60.3
MR3	80.0	100
MR4	75	100

2.8. DISCUSSÃO

Os resultados da micropropagação demonstram que as castas em estudo são facilmente estabelecidas *in vitro* através da cultura de gomos axilares. Estes trabalhos confirmam outros trabalhos com castas estrangeiras (Chee & Pool, 1985; Harris & Stevenson, 1982; Li & Eaton, 1984; Péros *et al.*, 1998; Roubelakis-Angelakis & Zivanovitch, 1991), e com castas portuguesas (e.g. Tinta Roriz e Tinto Cão) da Região Demarcada do Douro (Pinto-Sintra *et al.*, 1997).

Os meios mais eficazes para a cultura dos gomos axilares foram o MA2 e MR2, uma vez que permitiram, na mesma cultura, o alongamento de porções aéreas e enraizamento. O sistema de aclimação descrito é igualmente funcional, não trazendo problemas ao processo geral de micropropagação da videira. Até ao momento não foram detectadas diferenças morfológicas relativamente às plantas mãe mantidas *ex vitro*.

Pode-se assim afirmar que a micropropagação descrita neste trabalho, segue os propósitos fundamentais do protocolo de micropropagação pretendido, uma vez que permite a produção de um elevado número de plantas geneticamente idênticas, de boa qualidade e com as mesmas características varietais da planta mãe (Hartmann *et al.*, 1997).

A cultura de gomos axilares no meio MA1 deu origem ao crescimento de rebentos axilares (1ª e 2ª subculturas) e formação de tufo vegetativos, principalmente durante a 2ª subcultura. No caso destas castas portuguesas, a concentração 4.4 μM de BAP parece interferir no alongamento dos rebentos, sendo assim aconselhado reduzir esta concentração, ou não adicionar

fitorreguladores como sucede no meio MA2. A influência das citocininas no alongamento e proliferação de rebentos foi ainda confirmada para cv. "Chenin Blanc" em que a baixa concentração de BAP estimulou o alongamento de explantes, enquanto concentrações mais elevadas (22 μ M) inibiram (Goussard, 1981). Resultados semelhantes foram ainda descritos para outras lenhosas (Jones, 1977; citado por Goussard, 1981). Estes resultados não se estendem a todas as castas de *Vitis*. Por exemplo, Pool e Powel (1975) ensaiaram diferentes concentrações de citocininas no alongamento de rebentos da cultivar "Concord", tendo verificado o máximo de expansão média na concentração 14.2 μ M de BAP, e o mínimo na ausência de citocininas. Os efeitos estimulantes da BAP na proliferação de rebentos estão de acordo com os dados de outras espécies (Goussard, 1981). Os resultados deste estudo mostram que é suficiente a aplicação desta citocinina para ocorrer a proliferação de rebentos em elevada percentagem nas duas castas portuguesas.

O genótipo não teve grande influência na micropropagação, considerando-se os meios MA2 e MR2 adequados para a propagação *in vitro* de ambas as castas, com ambos os genótipos a terem elevadas percentagens de alongamento dos gomos axilares, embora a casta Baga tenha tido valores relativamente superiores durante as subculturas.

Neste capítulo, descreve-se um protocolo simples de regeneração e aclimação de plantas de duas castas da Bairrada (Maria Gomes e Baga), através da micropropagação *in vitro*.

3. CULTURA DE *CALLI* E ORGANOGÉNESE

3.1. INDUÇÃO E CULTURA DE *CALLI*

3.1.1. Introdução

O *callus* é uma massa celular, formada quando as células vegetais se multiplicam numa forma desorganizada. Nas plantas este tipo de tecido surge por cortes ou ferimentos nos caules (George, 1993), como forma de cicatrização.

O *callus* é também produzido *in vitro* por cultura de tecidos vegetais - explantes- em meio de cultura contendo uma concentração específica de reguladores de crescimento. Para que se induza o crescimento de tecido caloso a partir de um explante, tem de haver um estímulo e o aparecimento de zonas com actividade meristemática (George, 1993), o que significa uma transformação a nível celular no explante traduzida geralmente por uma desdiferenciação celular (George, 1993). O tecido caloso evolui depois para uma estrutura heterogénea, consistindo, normalmente, numa zona central indivisível de células parenquimatosas, e numa zona periférica com actividade meristemática. Na realidade a estrutura de um *callus* é relativamente complexa, com uma variação morfológica, fisiológica e genética (Hartmann *et al.*, 1997). O crescimento segue um padrão tipicamente logarítmico, onde se distinguem uma fase inicial de crescimento lento, uma 2ª fase de crescimento rápido, uma fase de diminuição gradual da divisão celular e uma última fase onde há a diferenciação em células parenquimatosas e tecidos vasculares (Hartmann *et al.*, 1997).

Certos tipos de *calli* adquirem competência organogénica e embriogénica.

A indução e cultura de *calli* está fundamentalmente dependente dos seguintes factores:

- a) genótipo da planta mãe;
- b) tipo de explante;
- c) razão entre auxinas e citocininas no meio (Hartmann *et al.*, 1997).

Se bem que a maioria dos tecidos vegetais seja susceptível de induzir tecido caloso (e.g. caules, raízes, folhas, órgãos de armazenamento ou sementes), os tecidos mais jovens (sinónimo de uma maior proporção de células

em actividade mitótica) são os mais utilizados uma vez que respondem melhor à produção de *calli* mas, principalmente, porque são aqueles com maior competência embriogénica e organogénica (George, 1993). Todavia, as áreas meristemáticas das partes mais velhas das plantas, como o câmbio intercalar, podem dar origem ao tecido caloso (George, 1993). Tem-se verificado que a concentração óptima de auxinas e citocininas no meio de cultura varia de espécie para espécie e dentro da mesma espécie a resposta entre os diferentes génotipos a novas concentrações de fitorreguladores pode ser diversa (Campos *et al.*, 1998). Este factor é extremamente importante no sucesso da produção de *calli*. É de realçar que o estado fisiológico da planta que funciona como fonte de explantes - planta mãe - deverá estar numa fase activa de crescimento e sem sintomas de carências, para uma melhor resposta dos explantes (Hartmann *et al.*, 1997).

Outros factores tais como as condições de cultura (e.g. pH, luz, temperatura) e composição do meio (concentração de macro e micronutrientes, concentração e tipo de fonte de carbono, composição em vitaminas, pH, *etc*) podem ainda revelar-se importantes na cultura de *calli* em determinados génotipos.

Os *calli* produzidos *in vitro* são uma fonte de material relativamente uniforme, podendo ser utilizados em diversos fins tais como a regeneração de plantas, isolamento de protoplastos ou selecção de linhas celulares resistentes (Collin & Edwards, 1998). Para tal é necessário que os *calli* sejam mantidos *in vitro* sem perda de vigor (Collin & Edwards, 1998). Durante as subculturas pode dar-se o caso do meio de cultura utilizado para a indução de tecido caloso não continuar a permitir o crescimento com a mesma eficiência. Quando tal acontece, normalmente é necessário fazer um ajustamento na concentração de auxinas e citocininas no meio, bem como a utilização das porções de tecido mais claras e friáveis para a subcultura (Collin & Edwards, 1998).

3.1.2. A produção de *calli* no género *Vitis*

No género *Vitis* a produção de tecido caloso é muitas vezes descrita nos estudos de embriogénese somática e organogénese, o que demonstra bem a importância de haver uma alteração a nível celular (desdiferenciação) nos tecidos dos explantes, para se adquirir competência embriogénica e organogénica.

A embriogénese somática a partir de anteras, óvulos, folhas, ovários imaturos, ocorre normalmente em várias fases que se distinguem pela alteração do meio de cultura ou das condições de cultura. No entanto, verifica-se

normalmente uma indução inicial de *calli* a partir do explante (embriogénese somática indirecta). Este tecido caloso acaba por adquirir competência embriogénica e é estimulado a produzir embriões adventícios. Os meios usados para a indução deste tipo de tecido caloso diferem em muitos aspectos, podendo ser sólidos (Harst, 1995; Mozsár & Süle, 1994; Nakano *et al.*, 1997; Stamp & Meredith, 1988; Torregrosa *et al.*, 1995) ou líquidos (Lebrun *et al.*, 1985; Krul & Worley, 1977; Stamp & Meredith, 1988; Srinivasan & Mullins, 1980), com uma composição MS (Krul & Worley, 1977; Mozsár & Süle, 1994) ou ½ MS (Nakano *et al.*, 1997; Torregrosa *et al.*, 1995). Outro meio de cultura ainda referido é o NN (Harst, 1995; Lebrun *et al.*, 1985; Stamp & Meredith, 1988; Srinivasan & Mullins, 1980). Relativamente à combinação de fitorreguladores utilizados nestes meios de cultura, há uma variação no tipo e concentração de auxinas e citocininas. Surgem normalmente o 2,4-D (Krul & Worley, 1977; Lebrun *et al.*, 1985; Mozsár & Süle, 1994; Nakano *et al.*, 1997; Srinivasan & Mullins, 1980; Torregrosa *et al.*, 1995) que pode ser substituído pelo NOA (Harst, 1995; Stamp & Meredith, 1988; Srinivasan & Mullins, 1980) e uma citocinina que é normalmente a BAP (Krul & Worley, 1977; Lebrun *et al.*, 1985; Mozsár & Süle, 1994; Stamp & Meredith, 1988; Srinivasan & Mullins, 1980; Torregrosa *et al.*, 1995). A auxina apresenta-se numa concentração superior à citocinina, podendo por exemplo o 2,4-D variar entre 4.5 µM e 10 µM (Krul & Worley, 1977; Lebrun *et al.*, 1985; Mozsár & Süle, 1994; Nakano *et al.*, 1997; Srinivasan & Mullins, 1980; Torregrosa *et al.*, 1985) e a BAP entre 0.4 µM e 1.1 µM (Krul & Worley, 1977; Lebrun *et al.*, 1985; Mozsár & Süle, 1994; Stamp & Meredith, 1988; Srinivasan & Mullins, 1980; Torregrosa *et al.*, 1995). As culturas são realizadas com um pH entre 5.7-5.8.

Existe algum consenso no que diz respeito ao fotoperíodo usado, utilizando-se frequentemente condições de obscuridade (Harst, 1995; Krul & Worley, 1977; Lebrun *et al.*, 1985; Mozsár & Süle, 1994; Nakano *et al.*, 1997; Torregrosa *et al.*, 1995) e temperatura entre 21°C e 27°C.

Para além dos estudos de embriogénese somática, os estudos de organogénese indirecta referem também uma fase inicial de formação de tecido caloso, que é depois induzido a formar rebentos adventícios. Hirabayashi *et al.* (1976) obtiveram *calli* a partir de culturas de anteras em meio MS ou NN, suplementado com NAA (10 µM) e BAP (1 µM), no escuro e a 28°C. Estes *calli* foram estudados relativamente à capacidade de formação de rebentos adventícios. Rajasekaran e Mullins (1981), em estudos de organogénese em entrenós, utilizaram o meio NN líquido suplementado com 2,4-D (5 µM), NOA (5 µM) e BAP (1 µM) para produzir tecido caloso de crescimento rápido e activo.

Hawker *et al.* (1973) produziram *calli* a partir de frutos imaturos (aproximadamente 5 mm de diâmetro), em meio sólido de Hawker *et al.* (1973), a

26°C e no escuro.

Feucht *et al.* (1996) promoveram a cultura de *calli* a partir de explantes de pecíolo e entrenós, em meio ½ MS sólido suplementado com IAA (8.5 µM) e BAP (1.6 µM), fotoperíodo de 16h.

Neste capítulo descreve-se a indução e cultura de tecido caloso nas cultivares de *Vitis vinifera* L., Maria Gomes (MG) e Baga. Os meios e condições de cultura testados, foram baseados na informação existente e já referida para o género *Vitis*. O objectivo consistiu em obter culturas estáveis de *calli* nas duas cultivares tendo-se, para tal, ensaiado variados meios e condições de cultura.

3.1.3. Metodologia

A cultura de tecidos para a produção de tecido caloso realizou-se a partir de material colhido em estacas mantidas em estufa nas seguintes condições: temperatura de 22 °C, fotoperíodo com 16h de luz e intensidade luminosa máxima de 134 µmol m⁻² s⁻¹.

Recorreu-se ao corte de ramos nas estacas, tendo estes no mínimo 10 nós. Estes ramos destacados foram, posteriormente, utilizados como fonte de explantes de pecíolo, entrenós e gavinhas. Procedeu-se à lavagem de fragmentos destes ramos em água corrente durante 10 min. e desinfecção em álcool a 70% durante 1 min., seguido de uma solução diluída (20% V/V) de lixívia comercial, durante 20 min.. Seguiu-se a lavagem dos fragmentos em água destilada estéril e ao plaqueamento de explantes *in vitro*. As condições de cultura foram iguais às descritas para a micropropagação (temperatura de 21-22°C e intensidade luminosa de 80 µmol m⁻² s⁻¹ nas culturas com fotoperíodo de 16h luz/8h escuro).

As culturas e subculturas foram realizadas nos meios MS3, MC1, MC2, MC3, MC6, MC7, MC8 e MC9 (tabela 2.1). O tecido foliar utilizado para a indução de *calli* foi obtido a partir de rebentos resultantes de culturas mensais de gomos axilares em meio MA1. O período das culturas e subculturas foi de 5 semanas. As subculturas dos *calli* formados, basearam-se na transferência dos tecidos menos fenolizados para meio fresco.

Para a determinação das percentagens de indução de tecido caloso, utilizou-se um *n* igual ou superior a 30 para cada situação experimental. Para a determinação das taxas de crescimento (T.C.), utilizou-se um *n* igual a 12 ou 15 para cada situação experimental. A análise estatística do crescimento realizou-se como descrito no ponto 4.2.7. As taxas de crescimento de tecido caloso foram

determinadas segundo a fórmula:

$$TC. \left(g \text{ p.f./dia} \right) = \frac{p.f._{t_1} - p.f._{t_0}}{t_1 - t_0}$$

Tabela 2.1: Composição dos meios de cultura e condições de cultura para a indução de tecido caloso. (vit.) vitaminas, (cit.) citocinina, (fotop.) fotoperíodo, (h.c.) hidrolizado de caseína, (esc) escuro.

	sais	vit.	fonte de carbono (g/l)	agar (g/l)	cit. (mg/l)	auxina (mg/l)	pH	fotop. Luz/esc.
MS3	½ MS	MS	0.2 h.c. 30 sacarose	8	0.2 cinetina	0.55 2,4-D	5.7-5.8	0h/24h
MC1	½ MS	MS	30 sacarose	8		0.2 2,4-D	5.7-5.8	0h/24h
MC2 Hawker <i>et al.</i> (1973)	Hawker <i>et al.</i> (1973)	Hawker <i>et al.</i> (1973)	0.2 h.c. 30 sacarose	8	0.2 cinetina	0.1 NAA	5.7-5.8	0h/24h
MC3 Rajasekaran & Mullins (1981)	NN	NN	30 sacarose	8		1.0 2,4-D	5.7-5.8	0h/24h
MC6 Krul & Worley (1977)	½ MS	MS	30 sacarose	8	0.1 BAP	1.0 2,4-D	5.7-5.8	0h/24h
MC7 Stamp & Meredith (1988)	NN	NN	30 sacarose	8	0.2 BAP	1.0 NAA	5.7-5.8	0h/24h
MC8 Staudt <i>et al.</i> (1972)	MS	MS	30 sacarose	8	0.5 cinetina	1.0 NAA	5.7-5.8	0h/24h
MC9 Feucht <i>et al.</i> (1996)	½ MS	MS	30 sacarose	8	0.36 BAP	1.5 IAA	5.7-5.8	16h/8h

3.1.4. Resultados

Este estudo decorreu em duas fases: a 1ª fase consistiu em determinar a percentagem de indução do tecido caloso em diversos tipos de explantes de videira, utilizando meios de cultura referidos na literatura para o género *Vitis*, e seleccionar os meios que apresentaram percentagens mais elevadas de indução

de tecido caloso e que possibilitaram a subcultura de *calli* nos genótipos em estudo. A 2ª fase consistiu em caracterizar o crescimento (determinando taxas de crescimento) e o aspecto (cor e friabilidade) dos *calli* em subcultura.

Os resultados da tabela 2.2 mostram que os meios que apresentaram percentagens mais elevadas de indução foram os seguintes: MC1, MC3, MC6, MS3, MC8 e MC9, sendo os meios MC2 e MC7 os mais fracos.

Tabela 2.2: Percentagens de indução de tecido caloso nas cultivares Baga e Maria Gomes, em diferentes meios de cultura e explantes. (---) não ensaiado. Utilizou-se um $n \geq 30$ por situação experimental.

meios	folhas		caule e pecíolo		gavinhas	
	% em MG	% em Baga	% em MG	% em Baga	% em MG	% em Baga
MS3	81	63	70	57	69	68
MC1	94	96	80	57	62	91
MC2	0	0	0	21	15	19
MC3	89	68	21	70	26	35
MC6	98	98	70	73	29	100
MC7	20	0	---	---	0	0
MC8	93	59	62	88	92	87
MC9	---	---	81	92	---	32

Nos meios MC2 e MC7 o tecido caloso formado foi muito reduzido, tornando-se difícil o seu isolamento em quantidade suficiente para permitir a subcultura. Deste modo os meios foram rejeitados, não se procedendo a um estudo de subcultura.

Os meios MC3 e MS3 embora apresentassem taxas elevadas de indução, a subcultura dos *calli* conduziu a uma fenolização total dos tecidos e perda de crescimento, não se utilizando assim estes meios para a cultura de *calli*.

Os meios MC1 e MC6 apresentaram ambos percentagens elevadas de indução e, embora se tenha verificado uma resposta positiva em todos os tipos de explantes, as folhas jovens apresentaram menor fenolização dos tecidos, sendo ainda possível a recuperação de tecidos fenolizados e re-início do seu crescimento (Fotografias 2a e 2b). Deste modo, os meios MC1 e MC6 foram seleccionados para a cultura de *calli*.

Os meios MC8 e MC9 foram aqueles que, para além de apresentarem percentagens elevadas de indução, produziram maiores massas de tecido caloso. Foram também os meios que melhor definiram as diferenças de comportamento entre as duas castas. Os *calli* da casta Baga caracterizaram-se por um menor crescimento e produção intensa de antocianinas (coloração avermelhada) no meio MC9 e fenolização com perda total de crescimento no meio MC8. Os *calli* da casta Maria Gomes apresentaram um crescimento lento no meio MC8 não se verificando no entanto fenolização dos tecidos. No meio MC9 as subculturas desta casta produziram continuamente *calli* amarelo-acastanhado, muito claro (Fotografia 2c). Dada a melhor resposta dos explantes de caule, pecíolos e gavinhas, estes tecidos foram seleccionados para iniciar a cultura de *calli* nos meios MC8 e MC9.

Tabela 2.3: Taxas de crescimento de *calli*, em função dos génotipos Baga e Maria Gomes e do meio de cultura. Valor médio \pm desvio padrão, (---) não ensaiado. Utilizou-se um n igual a 12 ou 15 por situação experimental.

Meios de cultura	Baga (g pf/dia)	MG (g pf/dia)
MC9	0.042 \pm 0.0205	0.0613 \pm 0.0205
MC8	---	0.0154 \pm 6.5693 $\times 10^{-3}$
MC6	0.0118 \pm 8.6604 $\times 10^{-3}$	0.0177 \pm 0.0212
MC1	6.7043 $\times 10^{-3}$ \pm 5.3581 $\times 10^{-3}$	---

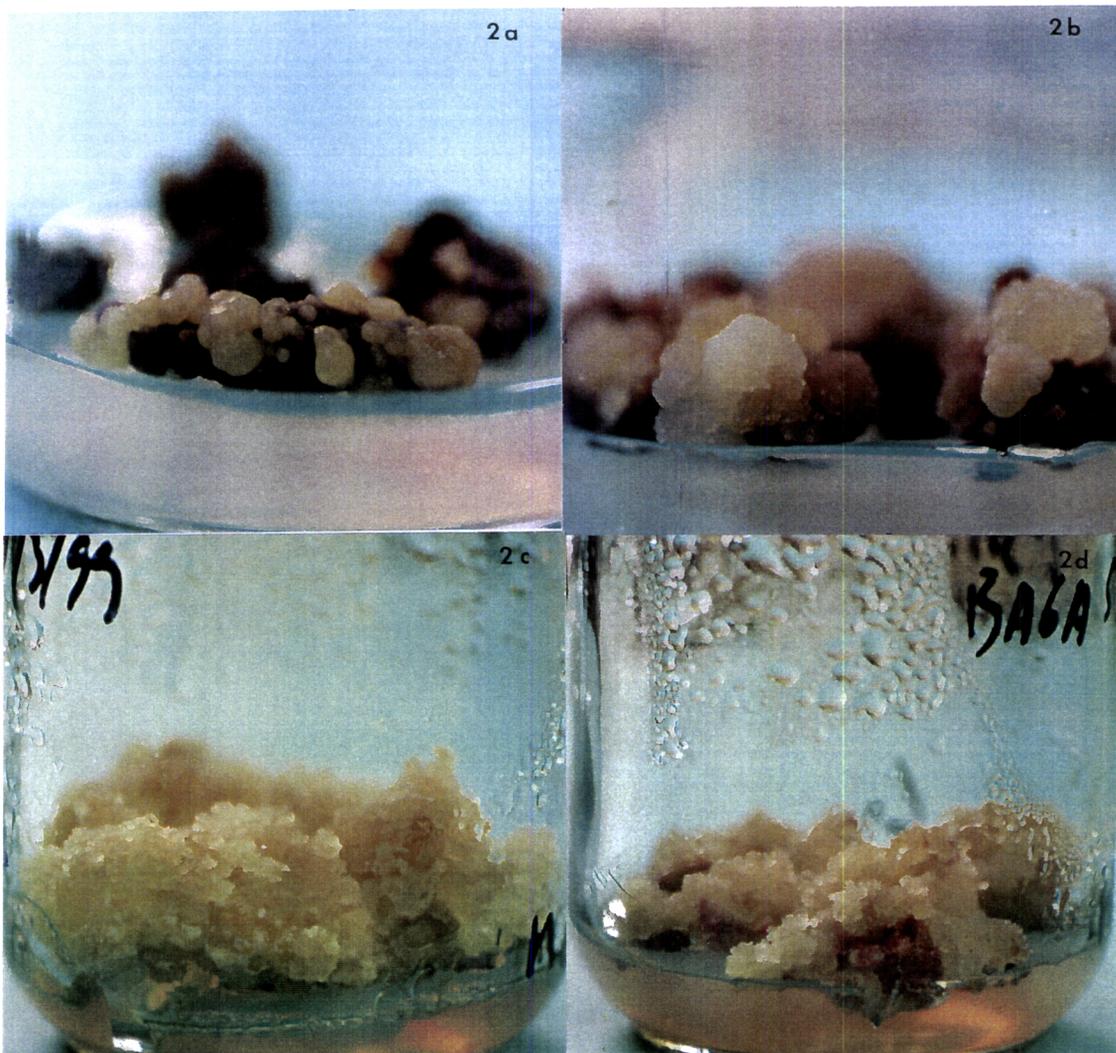
Os resultados da análise do crescimento do tecido caloso registados na tabela 2.3, mostram que o meio que permitiu uma produção mais intensa de *calli* foi o meio MC9, não se verificando diferenças significativas nos dois génotipos. Os *calli* produzidos neste meio apresentaram ao fim de 5 subculturas, uma aparência saudável castanha amarelada, sem zonas de fenolização. Verificou-se que a situação inicial de indução de tecido caloso no génotipo Baga, caracterizada por uma produção intensa de antocianinas e crescimento reduzido, pode ser revertida com as sucessivas subculturas (Fotografia 2d). O meio MC1 produziu um tipo de *calli* amarelo e pouco friável, bastante consistente no génotipo Baga possibilitando, no entanto, um crescimento muito lento dos *calli*. As taxas de crescimento verificadas no meio MC6 não foram significativamente diferentes para os génotipos em estudo, há no entanto a considerar o tipo de *calli* produzido em cada génotipo. O tecido caloso do génotipo Baga identificou-se pela elevada consistência e coloração amarela acastanhada, o tecido caloso do génotipo MG caracterizou-se pela fraca consistência e coloração amarela forte. Verificou-se no entanto, para o génotipo MG no meio MC1, a produção de um outro tipo de *calli* com um crescimento muito mais rápido, implicando o elevado

desvio padrão registado. O tecido identificou-se pela elevada consistência e coloração amarela esbranquiçada. O meio MC8 possibilitou um crescimento de tecido caloso semelhante ao crescimento verificado no meio MC6 para o genótipo MG, estes *calli* caracterizaram-se pela elevada friabilidade, fraca consistência e coloração branca.

3.1.5. Discussão

A indução de tecido caloso nas duas castas em estudo foi possível, utilizando diferentes meios salinos: ½ MS (meios MS3, MC1, MC6, MC9), MS (MC8) e o meio NN (MC3). Nestes meios, a maior produção deve-se ao ½ MS presente nos meios MC1, MC6 e MC9. Estes meios foram já utilizados com sucesso para outras castas de videira (Nakano *et al.*, 1997; Torregrosa *et al.*, 1995). O meio MC2 utilizado por Hawker *et al.* (1973) e o meio MC7 utilizado por Stamp e Meredith (1988) para a organogénese em entrenós, não permitiram a produção de *calli* nas castas Baga e Maria Gomes, o que mais uma vez reforça a importância do factor genótipo. De salientar ainda que o meio NN com 4.5 µM de 2,4-D não foi adequado para a manutenção das culturas.

Para além da composição salina, a combinação de fitorreguladores foi determinante. A adição de cinetina e 2,4-D parece não ser aconselhada para a manutenção do material, tendo contudo o 2,4-D um efeito positivo quando adicionado juntamente com 0.44 µM de BAP (meio MC6), ou isolado (MC1). É bem conhecida a capacidade da auxina sintética 2,4-D em induzir tecido caloso com capacidade embriogénica. Krul e Worley (1977) utilizaram um meio semelhante ao MC6 para induzir embriogénese somática em folhas de *Vitis vinifera* L., pelo que se revelou de grande interesse manter culturas das castas em estudo nos meios MC1 e MC6. Os meios MC3 (Rajasekaran & Mullins, 1981), MC7 (Stamp & Meredith, 1988) e MC6 (Krul & Worley, 1977), foram utilizados em processos de organogénese (Rajasekaran & Mullins, 1981) e embriogénese somática indirectas (Krul & Worley, 1977; Stamp & Meredith, 1988), sendo muito provavelmente pouco propícios em induzir grandes massas celulares.



Fotografias 2a-2d: Tecido caloso em meio MC6 com origem a partir de folhas jovens, genótipo MG (2a), tecido caloso em meio MC6 com origem a partir de folhas jovens, genótipo Baga (2b), tecido caloso em meio MC9 com origem a partir de segmentos de caule, genótipo MG (2c) e genótipo Baga (2d).

Os meios MC8 e MC9 apresentaram elevadas percentagens de indução de tecido caloso, embora com discrepâncias ao nível das castas e tipo de explante. O desenvolvimento da cor vermelha observada na casta Baga quando em cultura no meio MC9, pode ser indicativo de uma situação de stress. Do e Cormier (1990) estudaram a acumulação de antocianinas em *Vitis vinifera* L. cv. "Gamay Freaux" sob stress osmótico, mas situações semelhantes podem ocorrer em células *in vitro* sob stress nutritivo ou outros factores (Sharmain, 1998; com. Pessoal).

Feucht *et al.* (1996) utilizaram o tecido caloso produzido no meio MC9 para estudos de acumulação de flavenóides durante reacções de defesa a doenças. Foi nos meios MC8 e MC9 que o factor genótipo mais condicionou os resultados, com os *calli* da casta Baga a fenolizarem e a não sobreviverem no meio MC8, enquanto os *calli* da casta Maria Gomes apresentaram ao longo das subculturas um crescimento lento. No meio MC9 o factor genótipo destacou-se sobretudo durante as primeiras subculturas dos *calli*, ocorrendo produção intensa de antocianinas e diminuição de crescimento nos *calli* de Baga, e subculturas estáveis dos *calli* da casta Maria Gomes.

Relativamente ao factor explante, os meios MC1 e MC6 revelaram-se adequados na indução e proliferação de tecido caloso a partir de folhas jovens de videira, o meio MC9 resultou bem para a produção de tecido caloso a partir de caules e pecíolos.

Deste trabalho conclui-se que a indução de tecido caloso nas duas castas portuguesas é possível, enquadrando-se em algumas metodologias abordadas para outras castas. Uma vez obtido tecido caloso, proceder-se-á ao estudo da organogénese nas castas Maria Gomes e Baga.

3.2. ORGANOGÉNESE EXPERIMENTAL

3.2.1. Introdução

A organogénese é um processo em que as células e tecidos são induzidos a desenvolver alterações que culminam na produção de uma estrutura unipolar – primórdio radicular ou caulinar – cujo sistema vascular está ligado ao tecido

parental (Thorpe, 1993). Pelo contrário, a embriogénese somática conduz à produção de uma estrutura bipolar contendo um eixo caulinar/radicular, com um sistema vascular independente do tecido parental (Thorpe, 1993).

A organogénese e a embriogénese somática são duas vias de desenvolvimento “*de novo*” que constituem o processo geral de morfogénese. Os tecidos com capacidade organogénica e embriogénica são designados por morfogénicos (Thorpe, 1993).

Existem pelo menos duas vias para a organogénese *in vitro*, a organogénese indirecta em que o explante primário é induzido a formar *calli* antes de se dar o processo de organogénese, e a organogénese directa onde não existe qualquer fase de formação de *calli* antes do processo de organogénese (Thorpe, 1993). A organogénese (directa e indirecta), pode ser obtida a partir de explantes tais como segmentos de raízes, segmentos de folhas, segmentos de inflorescências, cotilédones e hipocótilos (Thorpe, 1993).

Thorpe (1993) define a actividade localizada de divisão celular, que resulta num centro meristemático ou meristemóide*, como uma característica histológica da organogénese.

Os tecidos utilizados como explantes para a organogénese apresentam um conjunto de células competentes, isto é, células que apresentam capacidade morfogénica ou que a adquirem em resposta a um estímulo apropriado (George, 1993). Este conjunto é, no entanto, baixo relativamente ao conjunto celular do explante (George, 1993).

A eficiência da organogénese passa então pelo aumento do conjunto de células competentes. Esta característica pode variar em função do tipo de explante e com as condições de cultura.

Smith e Krikorian (1988) (citado por George, 1993) afirmaram que a morfogénese dá-se a partir de células que já estão “comprometidas” com determinada via de desenvolvimento – células permissivas -, e por células que atingem o estado morfogénico por acção de reguladores de crescimento endógenos e exógenos – células indutivas -. Geralmente as células permissivas necessitam apenas de pequenas alterações no ambiente para iniciarem um processo morfogénico.

* Meristemóides são definidos como massas esféricas de pequenas células meristemáticas que dão origem a órgãos e explantes em cultura (George, 1993).

3.2.2. Organogénese no género *Vitis*

A organogénese de rebentos descrita no género *Vitis* é, normalmente, iniciada a partir de tecidos de caule (Rajasekaran & Mullins, 1981), fragmentos de ápices (Barlass & Skene, 1978) e folhas jovens (Colby *et al.*, 1991; Martinelli *et al.*, 1996). A maioria destes explantes são obtidos de culturas *in vitro*. Os estudos histológicos realizados por Colby *et al.* (1991) mostram que este tipo de organogénese de rebentos é de origem directa. No entanto, em alguns trabalhos realizados verifica-se a formação de tecido caloso juntamente com o aparecimento dos rebentos adventícios (Martinelli *et al.*, 1996).

As culturas de tecidos foliares para a organogénese são normalmente realizados em meio MS (Colby *et al.*, 1991; Martinelli *et al.*, 1996) e em meio NN (Péros *et al.*, 1998; Stamp *et al.*, 1990) sólidos. O fitorregulador mais importante e que faz parte de todos os meios é a citocinina BAP que varia entre 8.8-10 μM (Colby *et al.*, 1991; Martinelli *et al.*, 1996; Péros *et al.*, 1998; Stamp *et al.*, 1990), podendo ainda surgir o NAA como auxina, cujas concentrações se situam entre 0.16-0.53 μM (Martinelli *et al.*, 1996; Péros *et al.*, 1998). As culturas realizam-se normalmente com um fotoperíodo de 15-16 h de luz, pH entre 5.7-5.8 e temperatura entre 20-25 °C. As folhas cultivadas são normalmente obtidas a partir de culturas nodais em meios com uma concentração de BAP geralmente de 8.8 μM (Colby *et al.*, 1991; Martinelli *et al.*, 1996; Péros *et al.*, 1998; Stamp *et al.*, 1990). São folhas jovens e apresentam um comprimento que varia entre 1-20 mm e contêm uma porção de pecíolo inferior a 0.5 mm. As culturas são feitas quer com a superfície abaxial, quer com a superfície adaxial em contacto com o meio.

Barlass e Skene (1978) promoveram a proliferação de rebentos adventícios a partir de fragmentos de ápices com 1 mm de comprimento e 2-3 primórdios foliares. Este tipo de crescimento foi desencadeado em culturas em meio MS suplementado com 8.8 μM de BAP. Os estudos histológicos realizados por Colby *et al.* (1991) evidenciam a natureza adventícia e origem directa dos rebentos formados.

O trabalho de organogénese que se descreve de seguida, reflecte uma abordagem relativamente simples da complexidade do processo, mas é um trabalho importante que permite definir soluções mais concretas para melhorar a metodologia de obtenção de rebentos adventícios para génotipos antigos como são os da Baga e Maria Gomes. O trabalho de organogénese desenvolvido baseia-se nas metodologias e meios de cultura referidos.

3.2.3. Metodologia

Para o estudo da organogênese procedeu-se à cultura de gomos axilares em meio MA1 durante 4 semanas. Os gomos axilares foram obtidos de plântulas a crescer em meio MA2, como descrito no capítulo de micropropagação. Após este período as folhas foram isoladas dos rebentos e plaqueadas em meios de indução de organogênese (tabela 2.4). As condições de cultura, luminosidade e temperatura, foram iguais às descritas no capítulo da micropropagação.

Ao fim de 4 semanas de cultura registou-se o número de folhas que produziram tecidos adventícios e calcularam-se as percentagens de organogênese. Para cada situação experimental utilizou-se um *n* igual ou superior a 40.

Tabela 2.4: Composição dos meios de cultura e condições de cultura na indução de organogênese em folhas jovens de videira. (vit) vitaminas, (cit.) citocinina, (fotop.) fotoperíodo, (esc.) escuro.

	sais	vit.	fonte de carbono (g/l)	agar (g/l)	cit. (mg/l)	auxina (mg/l)	pH	fotop. Luz/esc.
MO1	NN	NN	30 sacarose	8	2.0 BAP		5.7-5.8	16h/8h
MO2	MS	MS	30 sacarose	8	0.2 BAP		5.7-5.8	16h/8h
MO3	NN	NN	30 sacarose	8	2.0 BAP	0.0186 NAA	5.7-5.8	16h/8h
MO4	MS	MS	30 sacarose	8	2.0 BAP	0.0186 NAA	5.7-5.8	16h/8h

3.2.4. Resultados

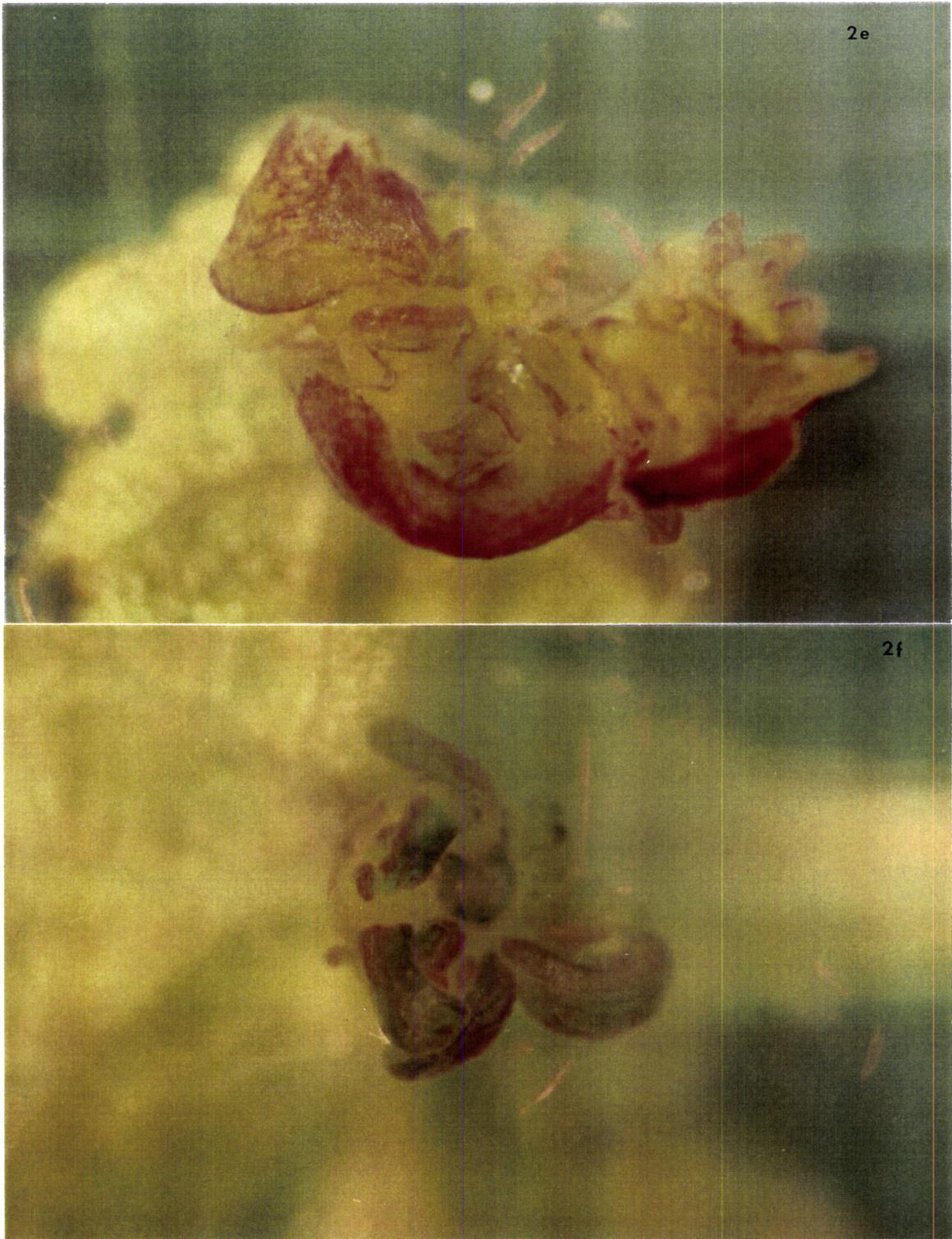
Os resultados da organogênese experimental apresentados na tabela 2.5, mostram que o processo apenas foi possível para a casta Maria Gomes nos meios MO1 e MO3, sendo MO1 o meio mais eficaz com uma percentagem de organogênese de 20%. A organogênese verificada no genótipo MG ao fim de 1 mês de cultura, caracterizou-se pela formação de folhas adventícias* no pecíolo das folhas plaqueadas, na zona de corte (Fotografias 2e e 2f). A análise da

* O desenvolvimento foliar adventício é descrito por Colby *et al.* (1991) como sendo tecidos que surgem directamente da região organogénica, apresentando uma origem e morfologia diferentes das verdadeiras folhas com origem nos meristemas caulinares adventícios.

percentagem de explantes que fenolizaram durante a cultura, permitiu verificar que este factor pode influenciar negativamente o processo de organogénese descrita neste trabalho. A percentagem de explantes fenolizados foi, para a casta MG, de 33% no meio MO1 e 24% no meio MO3.

Tabela 2.5: Percentagens de organogénese directa em folhas de videira. Os resultados são definidos em função do genótipo (Baga e Maria Gomes) e do meio de cultura utilizado. Utilizou-se um $n \geq 40$ por situação experimental.

Genótipo	Meios de cultura	% de explantes fenolizados	% de org. em folhas
MG	MO1	33	20
	MO2	49	1.2
	MO3	24	6.25
	MO4	38	1.1
Baga	MO1	15	0
	MO2	25	0
	MO3	10	0
	MO4	25	0



Fotografias 2e e 2f: (2e) formação de folhas adventícias em MG no meio MO3, (2f) formação de folhas adventícias em MG no meio MO1.

3.2.5. Discussão

Contrariamente à indução de tecido caloso, onde os meios NN não apresentaram bons resultados na indução e manutenção de tecido caloso (MC3 e MC7), este meio revelou-se melhor que o MS na indução de folhas adventícias, em folhas jovens da casta Maria Gomes.

A metodologia apresentada para a indução de organogénese em folhas de *Vitis vinifera* L., possibilitou o desenvolvimento de folhas adventícias apenas no genótipo Maria Gomes, embora com uma percentagem bastante baixa. Estes resultados demonstram bem o efeito do genótipo no sucesso das metodologias usadas.

A indução de rebentos adventícios não foi possível, nem após a transferência dos pecíolos que apresentaram desenvolvimento de folhas adventícias, para o meio MS sem reguladores de crescimento (resultados não apresentados). Colby *et al.* (1991) referem a formação de folhas adventícias em *Vitis vinifera* L., como um acontecimento normal durante o desenvolvimento de rebentos adventícios.

A organogénese em folhas de videira tem sido registada nas zonas de corte das porções de pecíolo e nervuras principais (Colby *et al.*, 1991; Martinelli *et al.*, 1996).

Neste trabalho, verifica-se a influência do genótipo no processo de organogénese. Péros *et al.* (1998) e Martinelli *et al.* (1996) verificaram uma grande variação nas percentagens de organogénese a partir de folhas, em diversos genótipos do género *Vitis*.

A eficiência da organogénese experimental em folhas de videira, está dependente da utilização dos tecidos com maior competência regenerativa. A utilização de folhas mais jovens (1ª, 2ª e 3ª folha a partir do ápice caulinar, ou folhas com 3-4 mm de comprimento) (Martinelli *et al.*, 1996; Péros *et al.*, 1998) e a utilização de culturas nodais com uma concentração de BAP superior a 4.4 µM, como fonte de material para a organogénese experimental, são aspectos a ter em conta para aumentar a eficiência do processo.

4. CARACTERIZAÇÃO DE *Vitis vinifera* CV BAGA, RELATIVAMENTE AO STRESS OSMÓTICO

4.1. INTRODUÇÃO

Os estudos sobre o stress hídrico são, normalmente, desenvolvidos com base na redução da rega em sistemas de cultura de plantas em substrato sólido (Christine *et al.*, 1996; Good & Zaplachinski, 1994; Irigoyen & Sánchez-Díaz, 1992; Poni *et al.*, 1993; Ramanjulu & Sudhakar, 1997; Schultz & Matthews, 1993; Vartanian *et al.*, 1987), ou com base no decréscimo do potencial osmótico do meio de cultura em sistemas de hidroponia (Büssis *et al.*, 1998; Büssis & Heineke, 1998; Pahlich & Grieb, 1983) ou culturas *in vitro* (Bhaskaran *et al.*, 1985; Iraki *et al.*, 1989; Leva & Muleo, 1993).

Os compostos utilizados na criação de um decréscimo de potencial osmótico nos meios de cultura (em sistemas de hidroponia e cultura *in vitro*), de forma a induzir uma situação de déficit de água semelhante às situações que se registam no campo, têm como característica não serem absorvidas, ou serem-no em quantidades diminutas, pelas plantas ou tecidos em cultura. Os compostos mais utilizados são o polietilenoglicol (PEG) (Büssis & Heineke, 1998; Bhaskaran *et al.*, 1985; Iraki *et al.*, 1989), manitol (Leva & Muleo, 1993) e sorbitol (Leva & Muleo, 1993). O sorbitol e manitol são vulgarmente utilizados como osmóticos para o isolamento de protoplastos e estudos de stress osmótico (Flores & Galston, 1984).

As metodologias de cultura *in vitro* têm especial importância na realização de trabalhos de fisiologia celular utilizando culturas de *calli* (Leva & Muleo, 1993; Bhaskaran *et al.*, 1985) e células em suspensão (Iraki *et al.*, 1989), bem como trabalhos de caracterização de génotipos, através da micropropagação (Campos *et al.*, 1999) ou culturas de *calli*, em espécies de propagação convencional difícil e trabalhosa, como é o caso das espécies lenhosas.

O potencial das culturas *in vitro* para a realização de estudos de fisiologia celular, é claramente evidenciado no trabalho de Iraki *et al.* (1989). Estes autores verificaram que as células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) adaptadas a crescer sob condições de stress osmótico severo (428 mM de NaCl) ou 30% de polietilenoglicol 8000, apresentaram um crescimento caracterizado por uma fraca expansão celular, com as células a atingirem dimensões máximas de 1/5 a 1/8 das dimensões das células não adaptadas às condições de stress. Este reduzido

volume das células verificou-se independentemente da manutenção da pressão de turgescência das células, cujos valores registados chegaram a ser superiores aos verificados nas células não adaptadas. Iraki *et al.* (1989) atribuíram estes acontecimentos a alterações físicas e bioquímicas das paredes celulares, diminuindo assim a sua capacidade de extensão.

Handa *et al.* (1986), ao imporem potenciais osmóticos baixos nas culturas de células em suspensão, verificaram existir uma relação positiva entre a adaptação das células de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv VFNT-Cherry) aos baixos potenciais osmóticos do meio de cultura, e a acumulação da prolina.

O trabalho que se descreve de seguida, tem como objectivo caracterizar o comportamento da casta Baga em relação ao stress osmótico induzido por sorbitol, em cultura *in vitro* de microrrebentos de videira. Discute-se ainda a utilização deste tipo de metodologia na caracterização de genótipos quanto à tolerância ao stress osmótico.

4.2. METODOLOGIA

4.2.1. Ensaio de Stress osmótico

Para o estudo do stress osmótico em *Vitis vinifera* L., foi criado um gradiente de potencial osmótico no meio de cultura *in vitro* de microrrebentos de videira. Realizaram-se ensaios constituídos por três tratamentos correspondentes às concentrações 0.1 M, 0.2 M e 0.4 M de sorbitol, e um controlo (ausência de sorbitol).

O meio de cultura utilizado foi o MR2 (ver capítulo 2 - micropropagação), ao qual se adicionou a quantidade necessária de sorbitol para criar as concentrações desejadas, antes da autoclavagem. Para iniciar os ensaios foram utilizados os rebentos com dimensões similares e sempre superiores a 15 mm, provenientes da 1ª subcultura de gomos axilares em meio MA1 (ver capítulo 2). As condições de cultura foram idênticas às descritas no capítulo da micropropagação (capítulo 2).

Os ensaios tiveram uma duração total de 6 semanas, durante este período analisou-se o crescimento da videira nos diversos tratamentos, bem como os parâmetros - eficiência fotossintética, teor em clorofilas e acumulação de iões nas plântulas. De seguida descrevem-se os procedimentos das diferentes análises efectuadas.

4.2.2. Análise do crescimento da videira

Os pesos frescos do material vegetal foram determinados nas plântulas controlo e tratamentos ao fim da 3ª e 6ª semana de cultura. Para cada plântula separou-se o material vegetal em folhas, caule e raízes, registando-se o respectivo peso fresco.

Os pesos secos foram determinados no material anteriormente utilizado para registo dos pesos frescos. Os tecidos frescos (folhas, caule e raízes) foram colocados numa estufa a 60°C durante 1 semana, registando-se depois o peso seco.

O conteúdo hídrico do material vegetal (C.H.) e a taxa relativa de crescimento (R.G.R.) foram determinados para cada tipo de tecido (folhas, caule e raízes), pelas seguintes equações:

$$\text{CH (\% p.f.)} = \frac{\text{p.f.} - \text{p.s.}}{\text{p.f.}} \times 100$$

$$\text{R.G.R. (g / dia)} = \frac{\ln \overline{\text{p.s.}}_{t_2} - \ln \overline{\text{p.s.}}_{t_1}}{t_2 - t_1}$$

Utilizou-se para a análise estatística, um n igual a 10 para os tratamentos e controlo, à excepção da análise das raízes, cujo n variou entre 8 e 3.

4.2.3. Determinação de proteínas totais solúveis

Procedeu-se à homogeneização de porções aéreas e raízes de pesos frescos conhecidos, de plântulas controlo e tratamentos, em tampão fosfato 0.2 M, pH 8.0. Centrifugou-se o homogeneizado a 15000 g durante 20 min.. O sobrenadante foi utilizado para a determinação de proteínas segundo o método de Coomassie blue, utilizando-se para tal o Micro Protein Kit Catalog nº 610-A da Sigma.

As absorvâncias a 595 nm das soluções de proteínas e padrões, foram determinadas num espectrofotómetro Beckman DV 68. A concentração de proteína foi determinada segundo a fórmula referida no Micro Protein Kit Catalog nº 610-A da Sigma:

$$\text{Proteína (mg / dl)} = \frac{A_{\text{sol.proteína}}}{A_{\text{padrão}}} \times \text{concentração do padrão}$$

O teor de proteínas nos tecidos foi determinado pela seguinte fórmula:

$$\text{Proteína (mg/g p.f.)} = \frac{\text{proteína (mg/ml)} \times \text{vol. extrato}}{\text{p.f.}}$$

utilizou-se para a análise estatística, um n igual a 4 para os tratamentos e controlo.

4.2.4. Determinação do teor em clorofilas

A extracção e quantificação de clorofilas baseou-se no método de Arnon (1949). Para cada amostra foi utilizado o material vegetal (folhas) de duas plântulas, registou-se o peso fresco e macerou-se o material em 10 cm³ de acetona a 80%. A centrifugação do macerado decorreu a 2500 g durante 5 min.. As leituras de Abs. a 663 nm (A_{663}) e 645 nm (A_{645}) foram feitas num espectrofotómetro Beckman DV 68. As concentrações de clorofila a (cl_a), clorofila b (cl_b) e clorofila total (cl_t) foram determinadas utilizando as seguintes fórmulas:

$$cl_a \text{ (mg / g p.f.f.)} = \frac{(0.0127 \times A_{663} - 0.00269 \times A_{645}) \times \text{vol. extrato}}{\text{p.f.f.}}$$

$$cl_b \text{ (mg / g p.f.f.)} = \frac{(0.029 \times A_{645} - 0.00468 \times A_{663}) \times \text{vol. extrato}}{\text{p.f.f.}}$$

$$cl_t \text{ (mg / gp .f.f.)} = cl_a + cl_b$$

Para a análise estatística, utilizou-se um n igual a 3 ou 4 para os tratamentos e controlo.

4.2.5. Eficiência fotossintética

A eficiência fotossintética foi medida em folhas verdes das plântulas controlo e no tratamento com 0.1 M de sorbitol ao fim de 6 semanas de cultura, utilizando o aparelho PEA (Photossintetic Efficiency Analyser, Hansatech USA). As plântulas foram destacadas dos frascos de cultura e colocadas num recipiente

plântulas foram destacadas dos frascos de cultura e colocadas num recipiente com as raízes mergulhadas em água destilada. Procedeu-se à adaptação das folhas ao escuro (20 min.) utilizando o sistema de molas do aparelho, seguindo-se a emissão de um feixe de luz saturante e registo dos valores fornecidos pelo aparelho. O PEA foi programado para funcionar nas seguintes condições: duração do feixe de luz de 5 s e intensidade luminosa a 90% da intensidade máxima.

4.2.6. Análise de elementos inorgânicos nos tecidos

A análise de elementos inorgânicos (Fe, Mn, B, Mo, Cu, Mg, Ca, K, P) na videira foi realizada para as porções aéreas e raízes das plântulas controlo e tratamentos com 0.1 M e 0.4 M de sorbitol. Utilizou-se para cada amostra os tecidos de 2 a 3 plântulas, variando assim os pesos frescos das porções aéreas entre 0.5-2 g e os pesos frescos das raízes entre 0.1-0.9 g, por amostra. Quantidades conhecidas de tecido fresco de cada amostra foram colocadas em cadinhos de porcelana, e posteriormente na estufa a 60°C. Ao fim de 1 semana registaram-se os pesos secos e colocaram-se os cadinhos numa mufla para a obtenção das cinzas. A temperatura da mufla foi aumentada gradualmente até estabilizar a 535°C. Ao fim de 3 dias registaram-se os pesos de cinzas.

A preparação das soluções para a quantificação dos elementos realizou-se do seguinte modo:

- colocaram-se os cadinhos sobre uma placa de aquecimento e adicionaram-se algumas gotas de água;
- adicionou-se 1.5 ml de HCL 1:1 (V/V) e deixou-se ferver,
- repetiu-se o passo anterior;
- adicionou-se 5 ml de HCL a 5% (W/V) e aqueceu-se durante um curto período;
- filtrou-se a solução através de papel de filtro Whatman nº 1, para um kitasato pequeno com o auxílio de uma bomba de vácuo;
- transferiu-se o filtrado para um balão volumétrico de 50 ml;
- adicionou-se 22.5 ml de HCL a 10% (W/V) (usou-se parte deste volume para lavar o cadinho, filtrou-se e transferiu-se igualmente para o balão volumétrico);
- fez-se o volume de 50 ml com água (a concentração final de HCL é cerca

A quantificação dos elementos potássio, cálcio, magnésio, manganésio, fósforo, ferro, boro, cobre e molibdénio foi feita por “Inductively Coupled Plasma Spectroscopy” (Jobin Ivon modelo JY70 Plus, com nebulizador Meinhard C001), utilizando curvas padrão entre 0 e 100 ppm para o sódio, potássio, cálcio e magnésio e entre 0 e 20 ppm para os restantes elementos. A análise decorreu a 1000 W, com um fluxo de Argon de $12 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$ e um caudal de amostra de $1 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$.

O limite de detecção (LD expresso em mg dm^{-3}) nestas condições para os elementos acima referidos são: B ($\lambda=249.7 \text{ nm}$, LD=0.001), Cu ($\lambda=324.7 \text{ nm}$, LD=0.005), K ($\lambda=766.5 \text{ nm}$, LD=0.06), Fe ($\lambda=238.2 \text{ nm}$, LD=0.005), Mg ($\lambda=279.5 \text{ nm}$, LD=0.0002), Mn ($\lambda=257.6 \text{ nm}$, LD=0.0014), Mo ($\lambda=202.0 \text{ nm}$, LD=0.01), Ca ($\lambda=396.2 \text{ nm}$, LD=0.1) e P ($\lambda=213.6 \text{ nm}$, LD=0.05).

Os tratamentos e controlo foram representados por 4 amostras ($n=4$), para a análise estatística.

4.2.7. Análise estatística

Para a análise dos resultados procedeu-se ao tratamento dos dados seguindo-se a seguinte sequência de cálculos (Zar, 1996):

1 - Teste da igualdade de variâncias (teste F ou teste F_{\max})

2 -a) Análise de Variâncias:

- ANOVA com 1 Factor como método paramétrico
- Teste de Kruskal-Wallis como método não paramétrico

2 -b) Teste para a comparação entre duas médias:

- teste t-student como método paramétrico
- teste Mann-Whitney como método não paramétrico

3 - Comparações Múltiplas:

- aplicação do teste de Scheffé como método paramétrico
- aplicação do teste de comparação múltipla não paramétrico, referido por Zar (1996).

Sempre que os testes para verificar a igualdade de variâncias foram

significativos, aplicaram-se métodos não paramétricos para a análise dos dados. Para todos os testes realizados considerou-se α igual a 0.05.

4.3. RESULTADOS DO STRESS OSMÓTICO NO GENÓTIPO BAGA

4.3.1. Análise do crescimento da videira

A análise do crescimento realizou-se sobre os parâmetros comprimento das porções aéreas, percentagem de enraizamento e peso fresco, peso seco e conteúdo hídrico, em folhas, caules e raízes. Os resultados foram analisados como referido no ponto 4.2.7. para o controlo e os diferentes tratamentos (0.1 M, 0.2 M e 0.4 M), relativamente a um dado parâmetro e um tempo específico (3^a e 6^a semana).

Os resultados apresentados nos gráficos 3.1a-3.1f e 3.2a-3.2e mostram uma variação significativa ao fim de 6 semanas para os parâmetros comprimento da porção aérea, peso fresco de folhas e caules, peso seco de folhas e conteúdos hídricos de folhas e caules. Os parâmetros que permitiram uma análise significativa ao fim de 3 semanas de stress osmótico foram o peso fresco de folhas e os conteúdos hídricos de folhas e caules.

Verificou-se uma diminuição nos parâmetros, peso fresco de folhas, peso fresco de caules, peso seco de folhas e comprimento da porção aérea, entre o controlo e os tratamentos 0.2 M e 0.4 M de sorbitol.

A análise dos conteúdos hídricos em folhas e caules, permitiu verificar um decréscimo do teor em água nos tecidos entre os tratamentos mais severos (0.2 M e 0.4 M de sorbitol) e o controlo, não levando o tratamento 0.1 M a uma variação significativa do C.H. (gráficos 3.2c e 3.2e).

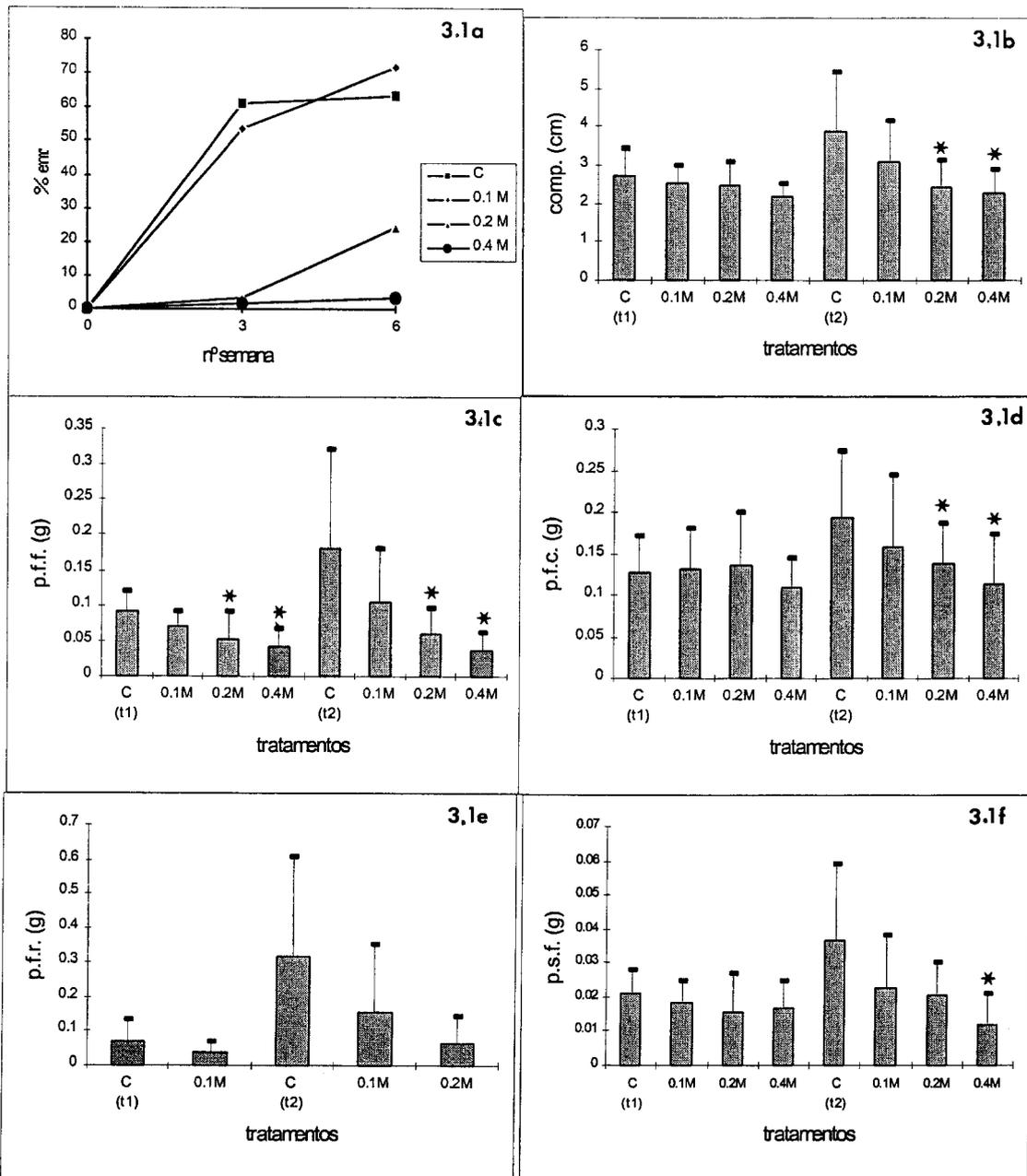
Desta análise verifica-se que o stress osmótico é responsável por uma inibição do crescimento da videira, que se traduz por uma inibição da percentagem de enraizamento (gráfico 3.1a) e inibição do desenvolvimento das porções aéreas das plântulas de videira (gráficos 3.1b, 3.1c, 3.1d, 3.1f). As fotografias 3a-3d evidenciam bem as diferenças de crescimento das plântulas, com o aumento da concentração de sorbitol no meio de cultura.

A análise da taxa relativa de crescimento em função do aumento da concentração de sorbitol no meio de cultura, permitiu verificar uma variação linear mas negativa do crescimento das raízes, porções aéreas e plântulas com o aumento da concentração de sorbitol (tabela 3.1). Esta relação linear só foi

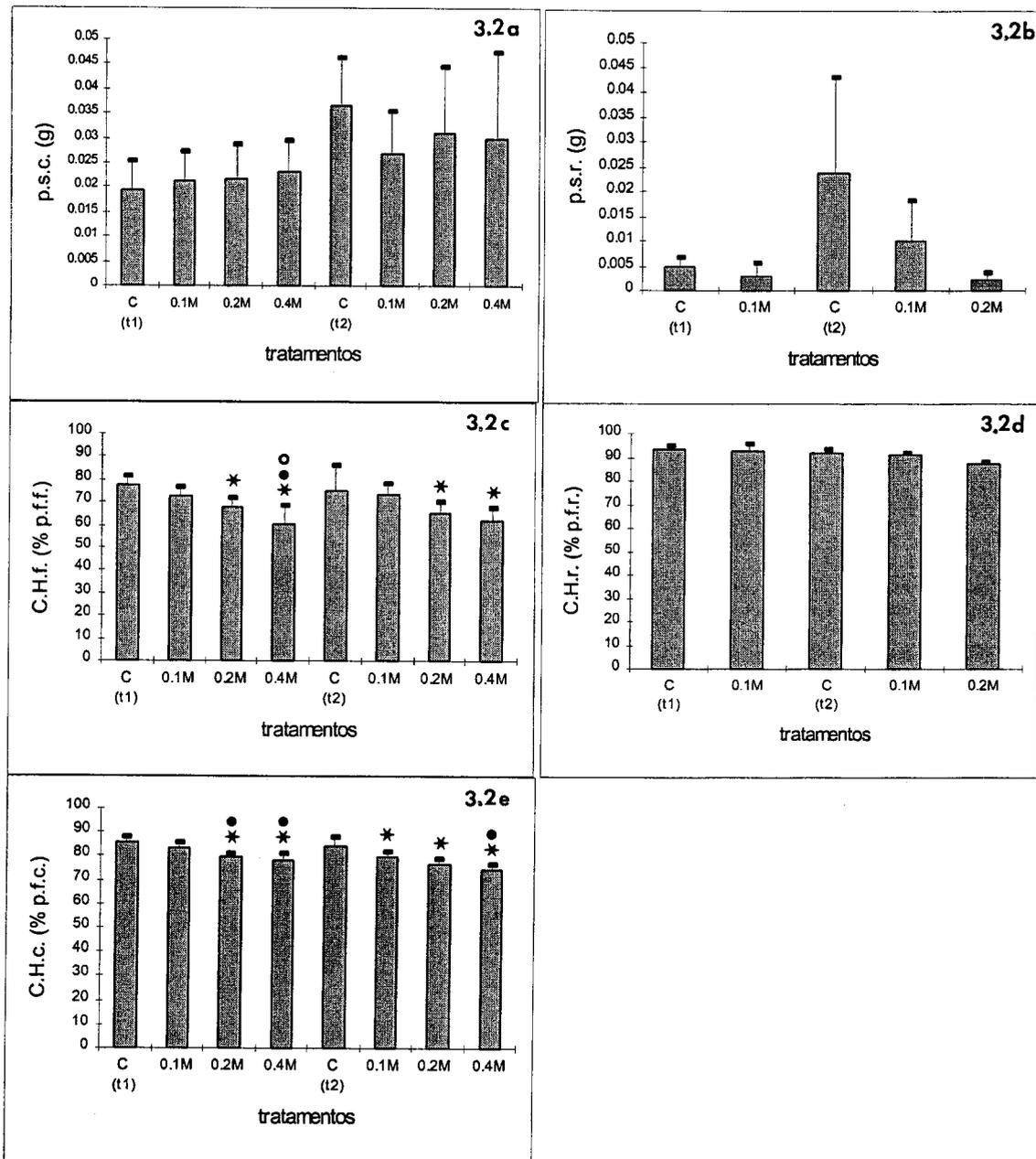
aumento da concentração de sorbitol (tabela 3.1). Esta relação linear só foi observada para as taxas de crescimento calculadas entre o início da cultura e a 6ª semana (T_0 - T_2 da tabela 3.1), bem como entre a 3ª e 6ª semana (T_1 - T_2 da tabela 3.1).

Tabela 3.1: Taxas relativas de crescimento (R.G.R) em culturas de microrrebentos de videira, sujeitas a stress osmótico induzido por sorbitol nas concentrações 0.1 M, 0.2 M e 0.4M. Regressão linear entre as taxas relativas de crescimento e a concentração de sorbitol. (T_0) tempo inicial, (T_1) após 3 semanas de crescimento, (T_2) após 6 semanas de crescimento, (r) raízes, (pa) porções aéreas, (p) plântula, (A) ordenada na origem, (B) declive da recta, (r) coeficiente de correlação.

	T_0 - T_1			T_1 - T_2			T_0 - T_2		
	R.G.R.r	R.G.R.pa	R.G.R.p	R.G.R.r	R.G.R.pa	R.G.R.p	R.G.R.r	R.G.R.pa	R.G.R.p
C	0.0747	0.023	0.0284	0.0762	0.0285	0.0366	0.0755	0.0258	0.0325
0.1 M	0.0490	0.022	0.0253	0.0611	0.0108	0.0164	0.0551	0.0164	0.0208
0.2 M	0	0.0189	0.0189	0.0353	0.0176	0.0157	0.0177	0.0173	0.0183
0.4 M	0	0.0225	0.0225	0	0.0022	0.0022	0	0.0124	0.0124
A		0.0219	0.0264	0.0778	0.0245	0.0132	0.0709	0.0230	0.029
B		-0.0016	-0.0152	-0.2035	-0.0555	-0.0771	-0.1932	-0.0288	-0.0457
r		0.148	0.64	0.99	0.85	0.93	0.96	0.87	0.92



Gráficos 3.1a-3.1f: Percentagem de enraizamento (3.1a), comprimento (3.1b), pesos frescos de folhas (3.1c), caules (3.1d) e raízes (3.1e), pesos secos de folhas (3.1f), de microrrebentos da casta Baga sujeitos a stress osmótico. (t1) após 3 semanas de cultura, (t2) após 6 semanas de cultura, (0.1 M) tratamento com 0.1 M de sorbitol, (0.2 M) tratamento com 0.2 M de sorbitol, (0.4 M) tratamento com 0.4 M de sorbitol, (*) análise significativa em relação ao controle.

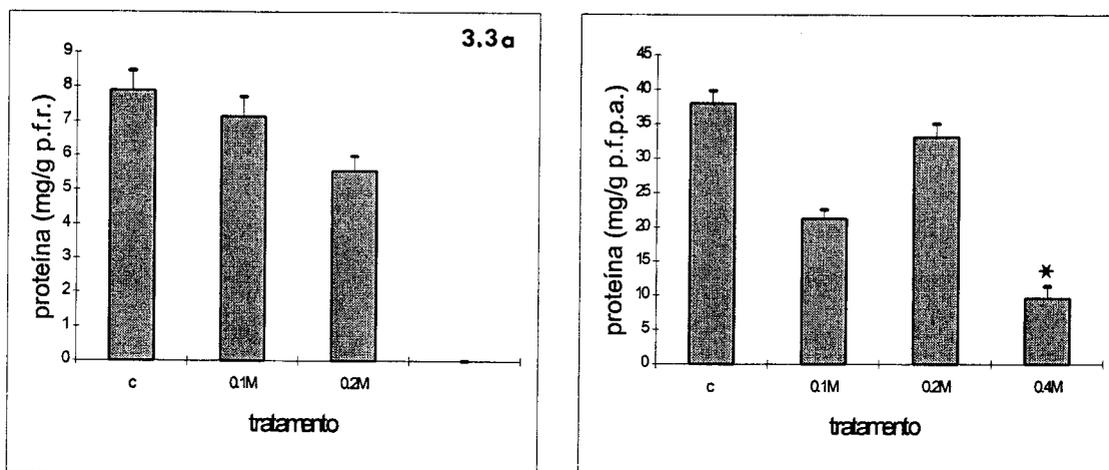


Gráficos 3.2a-3.2e: Pesos secos de caules (3.2a), pesos secos de raízes (3.2b), conteúdos hídricos de folhas (3.2c), raízes (3.2d) e caules (3.2e) de microrrebentos da casta Baga sujeitos a stress osmótico. (t1) após 3 semanas de cultura, (t2) após 6 semanas de cultura, (0.1 M) tratamento com 0.1 M de sorbitol, (0.2 M) tratamento com 0.2 M de sorbitol, (0.4 M) tratamento com 0.4 M de sorbitol, (*) análise significativa em relação ao controlo, (•) análise significativa em relação ao tratamento com 0.1 M de sorbitol, (◦) análise significativa em relação ao tratamento com 0.2 M de sorbitol.

4.3.2. Análise de proteínas totais solúveis

Os resultados da análise de proteínas totais solúveis, em porções aéreas e raízes de microrrebentos de videira sujeitos a stress osmótico (gráficos 3.3a e 3.3b), indicam uma diminuição significativa entre o material sujeito a 0.4 M de sorbitol e o controlo, apenas para as porções aéreas.

Estes resultados são indicativo de uma inibição da síntese proteica e catabolismo das proteínas nos tecidos, em resultado do stress aplicado.



Gráficos 3.3a e 3.3b: Teor em proteínas totais solúveis, em raízes (3.3a) e porções aéreas (3.3b) de microrrebentos sujeitos a stress osmótico induzido por sorbitol (0.1 M, 0.2 M e 0.4 M). (*) análise significativa em relação ao controlo (c).

4.3.3. Análise do teor em clorofilas

Os resultados da análise do teor em clorofilas nas folhas de videira (gráfico 3.4) evidenciam um decréscimo no teor em clb e clt com a intensidade do stress imposto (decréscimo do potencial osmótico do meio de cultura).

Os valores muito baixos registados nos tecidos dos rebentos cultivados no meio com 0.2 M e 0.4 M de sorbitol, reflectem a elevada degradação das moléculas e o estado geral bastante necrosado dos tecidos (Fotografias 3c e 3d).

A variação significativa entre o controlo e os diferentes tratamentos relativamente à concentração de clorofila total nos tecidos, mostra que este parâmetro é o mais discriminativo das diferenças existentes nos vários

tratamentos impostos.

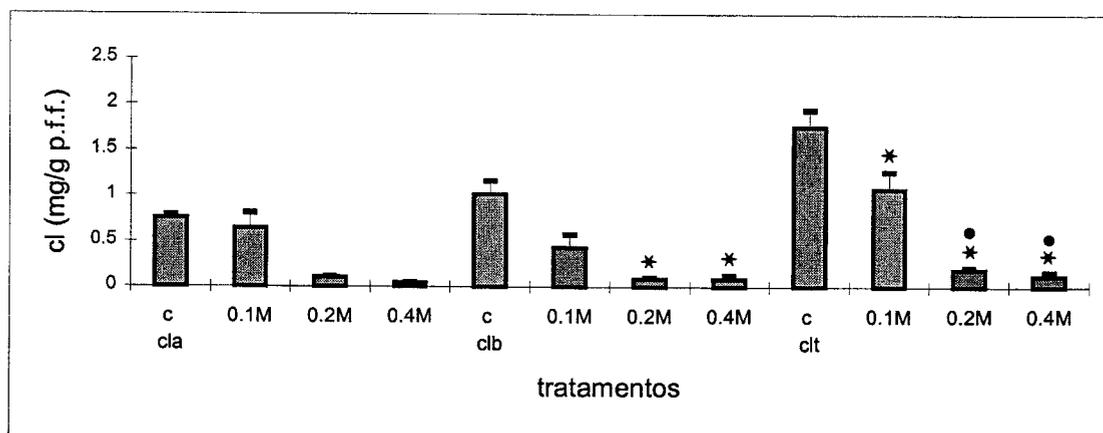


Gráfico 3.4 : Variação do teor em clorofila a (cla), clorofila b (clb) e clorofila total (clt), em folhas de microrrebentos de videira em cultura *in vitro* sob condições de stress osmótico imposto por diferentes concentrações de sorbitol (0.1M, 0.2M e 0.4M). (*) análise significativa em relação ao controlo, (•) análise significativa em relação ao tratamento com 0.1 M de sorbitol.

4.3.4. Análise da eficiência fotossintética

A análise da eficiência fotossintética realizou-se apenas para as plântulas controlo e o tratamento com 0.1 M de sorbitol, devido ao estado necrosado dos tecidos das plântulas dos tratamentos mais severos (Fotografias 3c e 3d).

As plântulas a crescer com 0.1 M de sorbitol no meio de cultura apresentaram uma diminuição significativa dos parâmetros Fm e FV/Fm (Tabela 3.2). Estes resultados são indicativo de uma diminuição da eficiência fotossintética nas videiras a crescer no meio com 0.1 M de sorbitol.

Tabela 3.2: Análise da eficiência fotossintética, em plântulas controlo (c) e plântulas a crescer com 0.1 M de sorbitol (0.1 M) no meio de cultura, ao fim de 6 semanas de cultura *in vitro*. (F0) fluorescência inicial, (Fm) fluorescência máxima, (FV) diferença entre F0 e Fm, (TM) tempo a que ocorre a fluorescência máxima. (*) análise significativa.

	F0	Fm	FV	TM	FV/Fm
C	656.8 ± 24.5906	3656.2 ± 86.9005	2999.4 ± 68.2554	455.2 ± 100.2781	0.82 ± 0.004
0.1 M	641.6 ± 86.1992	3287.2 ± 432.7548	2645.6 ± 346.8750 *	517.6 ± 12.2188	0.8042 ± 0.002 *

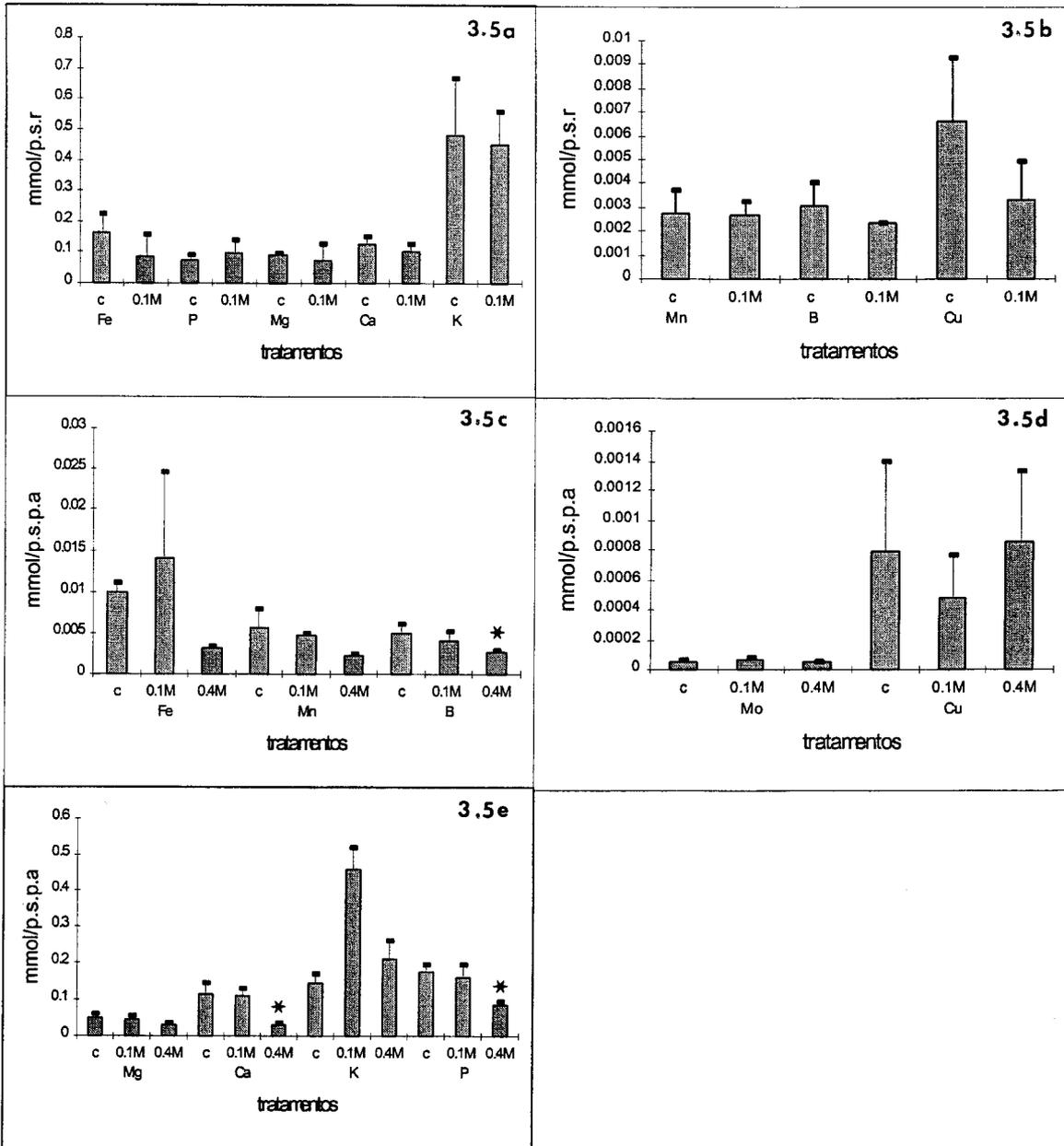
4.3.5. Análise da acumulação de elementos inorgânicos nos tecidos

Analisando os gráficos 3.5a-3.5e que mostram a variação na acumulação dos elementos ferro, manganésio, boro, molibdénio, cobre, cálcio, potássio, magnésio e fósforo nos tecidos em função do stress aplicado na videira, verifica-se uma diminuição da acumulação de P, B e Ca entre o controlo e o tratamento a 0.4 M de sorbitol, nas porções aéreas.

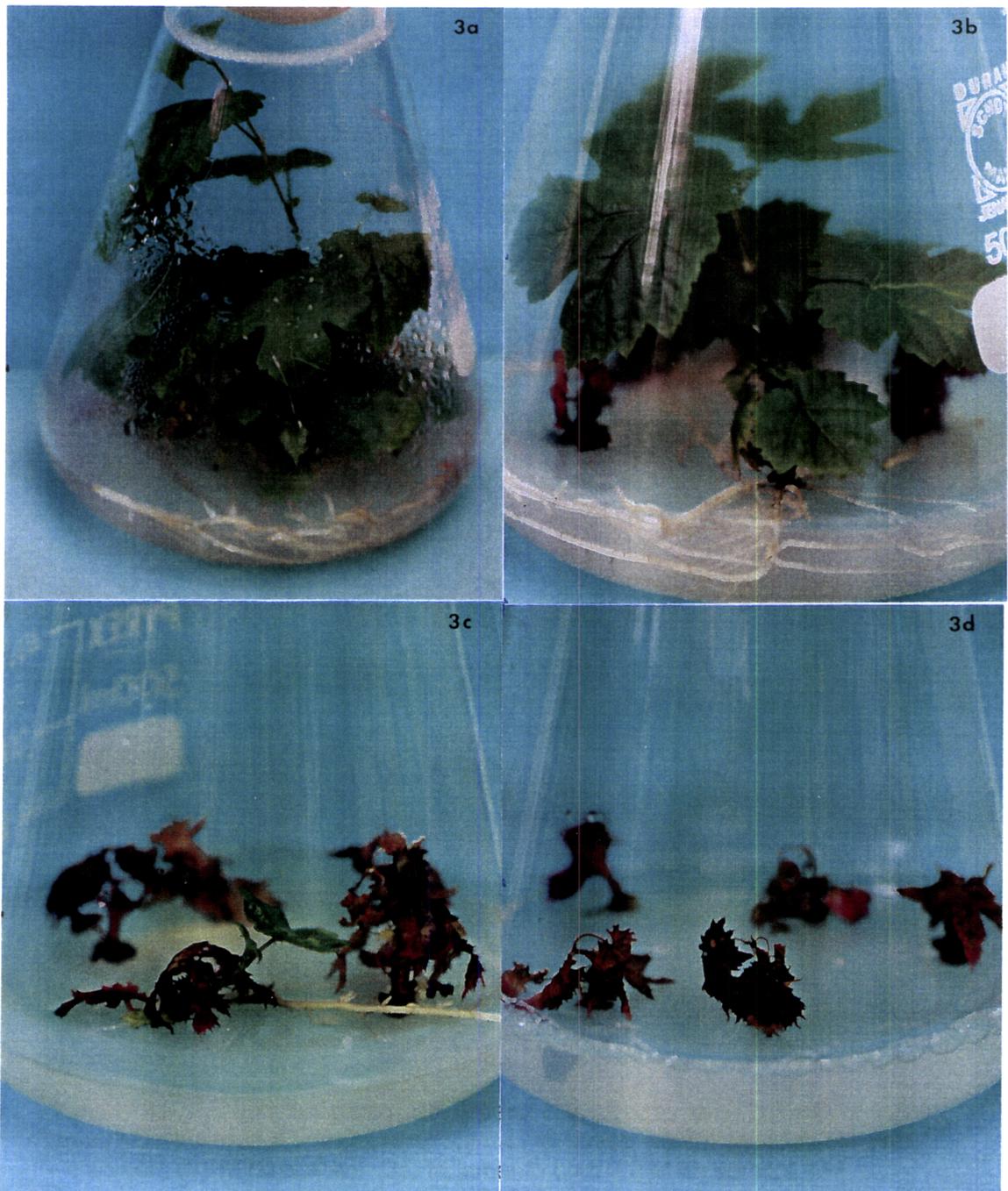
A análise de variâncias indicou ainda uma variação significativa nos elementos Fe, Mn, Mg e K com o stress aplicado, nas porções aéreas.

Nas raízes não se registaram variações significativas na acumulação dos diferentes elementos, com o stress aplicado.

Estas variações estão concordantes com as cloroses que surgem no tratamento menos severo (0.1 M) e com os fortes sintomas de stress nos tratamentos mais severos.



Gráficos 3.5a-3.5e: Acumulação dos elementos (Mg) magnésio, (Ca) cálcio, (K) potássio, (P) fósforo, (Cu) cobre, (Mo) molibdénio, (B) boro, (Mn) manganésio e (Fe) ferro, nas raízes e porções aéreas de microrrebentos de videira sujeitos a stress osmótico. (c) controlo, (0.1 M) tratamento com 0.1 M de sorbitol, (0.2 M) tratamento com 0.2 M de sorbitol, (0.4 M) tratamento com 0.4 M de sorbitol. (*) análise significativa em relação ao controlo.



Fotografias 3a-3d: caracterização da videira cv. Baga, em cultura *in vitro* de microrrebentos durante 6 semanas e sujeitas a stress osmótico. (3a) controlo, (3b) tratamento com 0.1 M de sorbitol, (3c) tratamento com 0.2 M de sorbitol, (3d) tratamento com 0.4 M de sorbitol.

4.3.6. Discussão

Muitos trabalhos foram já efectuados para estudar o efeito de osmóticos no crescimento de células e protoplastos (Leva & Muleo, 1993; Binzel *et al.*, 1985) contudo, não se conhecem estudos do efeito de osmóticos (e.g sorbitol e manitol) em rebentos de videira *in vitro*, nem qual a sua relação com estudos similares *ex-vitro*. Dada a natureza das culturas *in vitro*, culturas de 6 semanas bastaram para demonstrar os efeitos da exposição de rebentos da cv. Baga ao sorbitol, torna esta metodologia vantajosa sobre os estudos *ex-vitro*.

Os dados obtidos indicam que o sorbitol teve um efeito ao nível morfológico e bioquímico nos rebentos. Com efeito, o decréscimo do potencial osmótico (Ψ_{π}) levou a um decréscimo no crescimento das porções aéreas e das raízes, bem como um decréscimo no conteúdo hídrico em folhas e caules, para concentrações iguais ou acima de 0.2 M.

Como resposta ao stress osmótico, o crescimento e fotossíntese dos microrrebentos decresceu, verificando-se uma incapacidade dos microrrebentos sujeitos a stress de 0.2 M e 0.4 M de sorbitol em recuperar o conteúdo hídrico. O conteúdo hídrico é um parâmetro usado na bibliografia para medir o "status" hídrico de uma planta, reflectindo o estado metabólico dos tecidos (Ramanjulu & Sudhakar, 1997). A resposta das espécies a condições de baixo Ψ_{π} depende da sua capacidade de tolerância, incluindo o abaixamento do Ψ_{π} pelo ajustamento osmótico, prevenindo assim perturbações no metabolismo celular.

A redução do teor em clorofilas e proteínas totais solúveis nos tecidos, em função do stress aplicado, é indicativo de um metabolismo celular oxidativo, característico das plantas em situação de stress.

A redução de clorofilas pode funcionar como parâmetro indicativo da degradação dos cloroplastos, nomeadamente dos fotossistemas PSII e PSI com o stress osmótico. Ashraf e Karim (1991) referiram a diferente capacidade de síntese de clorofilas, entre diferentes cultivares, em resposta a stress hídrico.

O stress moderado (0.1 M de sorbitol), reduziu significativamente o parâmetro F_m e a razão FV/F_m , indicando desequilíbrios na fotossíntese que podem ser atribuídos à redução da concentração de clorofilas mas também ao decréscimo de alguns elementos essenciais à fotossíntese, O Ca é essencial para a estabilização das membranas, o P é essencial para a formação de ATP durante a cadeia de fosforilação, o Mg é um constituinte da molécula de clorofila, o Mn intervém na fotólise da água e o Fe é constituinte de proteínas

ferrosulfurosas e de ferredoxina.

Todas as plantas em stress osmótico desenvolveram uma forte coloração avermelhada. Embora esta coloração não tenha sido identificada, atribuiu-se esta coloração à produção de antocianinas. Do e Cormier (1990) descreveram o aumento da concentração destes pigmentos em células de videira cv. Gamay Freaux *in vitro* a crescer em stress osmótico induzido por sacarose. A acumulação de antocianinas é condicionada por factores genéticos e ambientais (e.g. reguladores de crescimento, luz, disponibilidade em H₂O) (Do & Cormier, 1990), a sua ocorrência é frequente em culturas *in vitro*.

A inibição do enraizamento por baixos potenciais osmóticos induzidos, por exemplo por NaCl e PEG já foram discutidos para o girassol (Santos, 1997).

Santos (1997) verificou que rebentos de girassol, desenvolvidos a partir de *calli*, tolerantes a 200 mM de NaCl, necessitavam de ser transferidos para meio com elevado potencial osmótico para enraizarem. Também na videira o abaixamento do Ψ_x do meio inibiu o enraizamento de rebentos.

O efeito do stress hídrico e osmótico na acumulação de nutrientes tem sido estudado sobretudo em estudos *ex vitro* (Erdei & Taleisnik, 1993) embora haja algumas referências a estudos *in vitro* (Santos-Díaz & Ochoa-Alejo, 1994). Os microrrebentos sujeitos a stress severo (0.4 M de sorbitol) sofreram uma redução do conteúdo de Mg, Ca, K, P, Fe, Mn e B nas porções aéreas. A deficiência de Mg, P, Fe e Mn pode justificar o decréscimo da eficiência fotossintética, já que todos eles intervêm no transporte de electrões durante o processo de fotofosforilação, o Mg é também um constituinte da clorofila.

O decréscimo dos níveis de Ca com o stress de 0.4 M podem ter conduzido a uma desestabilização das membranas. O Ca é apontado como mensageiro secundário, intimamente ligado á proteína calmodulina que intervém na activação de outras proteínas (Fosket, 1994).

O K funciona como regulador osmótico e é um cofactor de enzimas (por exemplo na síntese proteica e glicólise) e é um transportador de cargas positivas (Hans & Schopfer, 1995). Verificou-se o decréscimo deste elemento em videiras sujeitas a stress osmótico, o que apoia os dados encontrados para outras espécies em stress hídrico (Jones *et al.*, 1980) e em stress osmótico e salino (Erdei & Taleisnik, 1993). O decréscimo da concentração de K pode levar a um desequilíbrio no estado de turgidez da planta, assim como a deficiências na actividade das enzimas que o requerem como cofactor. Este decréscimo

acentuado de K só se verificou para o stress de 0.4 M que levou à morte das plantas. Rebentos sujeitos a 0.1 M não sofreram variação no conteúdo do ião.

Estudos com plantas sujeitas a stress osmótico e hídrico mostraram que dentro de níveis moderados pode haver o aumento de solutos como K^+ ou Na^+ , ou solutos orgânicos (Jones *et al.*, 1980; Santos-Díaz & Ochoa-Alejo, 1994) para ajustamento osmótico. Neste trabalho não se fez o estudo de acumulação de açúcares e ácidos orgânicos. Para o stress moderado o K não sofreu qualquer aumento significativo, o que pode significar que a plântula usou outros solutos para o ajustamento osmótico.

Estes resultados mostram que as concentrações de 0.2 M e 0.4 M de sorbitol podem ser consideradas severas, sendo o stress 0.1 M moderado. À semelhança de outros resultados em *Vitis vinifera* L. em que foram estudadas respostas em rebentos *in vitro* à Eutipose (Soulie *et al.*, 1993) e à *Plasmopara viticola* (Barlass *et al.*, 1986), este trabalho mostra que se podem realizar estudos de stress osmótico em videira *in vitro*, abrindo assim perspectivas para usar esta metodologia na classificação de genótipos de videira a stress osmótico, ou ainda à selecção *in vitro* de linhas resistentes.

5. DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

A micropropagação descrita neste trabalho, permite a manutenção da cultura de plântulas em laboratório por longos períodos, com uma possibilidade de indução de alterações genéticas relativamente ao material inicial, bastante reduzida. Este tipo de cultura é de grande importância, uma vez que possibilita a existência constante de material para o desenvolvimento de estudos *in vitro* (cultura de tecido caloso, cultura de células em suspensão, regeneração adventícia, etc.) direccionados para o melhoramento da videira.

O estudo realizado para a produção de tecido caloso resultou na obtenção de *calli* com características de crescimento muito diferentes. Esta diversidade obtida pode ser útil para se atingirem determinados objectivos como a regeneração adventícia via organogénese e embriogénese somática. Os meios MC1 e MC6, que deram os melhores resultados na indução e manutenção de tecido caloso em folhas jovens, são referidos na bibliografia em trabalhos de embriogénese somática (Krul & Worley, 1977).

O meio MC9 deu melhores resultados na indução e manutenção de tecido caloso a partir de pecíolos e caules. As culturas estáveis verificadas no meio MC9, são particularmente importantes para o desenvolvimento de estudos de fisiologia celular (Handa *et al.*, 1986; Iraki, *et al.*, 1989) e caracterização de génotipos de videira a diversos tipos de stresses (frio, *secura*, salinidade, compostos tóxicos, etc.). Este tipo de cultura assegurará, muito provavelmente, a reproducibilidade dos resultados e uma elevada sensibilidade nos métodos de análise.

A regeneração de plantas através da organogénese e embriogénese somática, é um processo especialmente importante para a aplicação das metodologias de transformação genética e criação de variabilidade genética (variação somaclonal), no melhoramento de plantas. No género *Vitis*, a organogénese em segmentos de caule e em tecidos foliares, tem sido verificada para diversos génotipos, sendo este factor o principal responsável pela recalcitrância em algumas cultivares. Relativamente ao estudo apresentado, é necessário proceder-se a uma optimização da metodologia para ambos os génotipos utilizados (Baga e Maria Gomes). Será no entanto interessante verificar, no âmbito do estudo da *Vitis vinifera* L. relativamente ao stress osmótico, a importância da variação somaclonal obtida durante o processo de

organogénese experimental, na obtenção de génotipos tolerantes ao stress osmótico.

Os ensaios de stress osmótico induzido por sorbitol, em microrrebentos de videira cv. Baga, foram estudados quanto ao crescimento e senescência dos tecidos. Verificou-se que o stress aplicado foi moderado para uma concentração baixa de sorbitol (0.1 M), induzindo uma redução do crescimento dos rebentos e diminuição da eficiência fotossintética. O stress aplicado numa concentração de sorbitol igual ou superior a 0.2 M, foi considerado severo, por induzir uma inibição do crescimento dos microrrebentos, bem como uma acentuada necrose dos tecidos, avaliada pelos baixos teores de proteínas solúveis, o baixo teor em clorofilas e a reduzida acumulação dos elementos P, B, Ca, Fe, Mn e K.

Considera-se o estudo do crescimento da videira, em gradientes de potencial osmótico induzidos em sistemas de micropropagação, importantes para avaliar o comportamento e tolerância dos génotipos a este tipo de stress. No entanto, este tipo de trabalho necessita de ser complementado com informação relativa a outros parâmetros associados à tolerância ao stress hídrico, como a capacidade de ajustamento osmótico (Büssis & Heineke, 1998), resistência estomática (Good & Zaplachinski, 1994), eficiência do uso da água (WUE) (Martin & Ruíz-Torrez, 1992), para se obter uma avaliação mais precisa, mais correcta, da tolerância associada ao génotipo.

Os trabalhos de cultura de tecidos para a identificação de génotipos tolerantes a factores abióticos como o défice hídrico não substituem, no entanto, os estudos desenvolvidos *ex vitro* e em condições de campo, uma vez que muitos parâmetros não poderão ser avaliados *in vitro* (e.g. resistência estomática, eficiência do uso da água), e porque é fundamental ter em consideração os níveis de tolerância associados a determinadas épocas do ano de produção, consideradas mais sensíveis para a produtividade (Poni *et al.*, 1993; Matthews *et al.*, 1987)

6. BIBLIOGRAFIA

- Arnon, D. T.** (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polynoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, 24 : 1-15.
- Ashraf, M. & Karim, F.** (1991). Screening of some cultivars/lines of blackgram (*Vigna mungo* (L.) Hepper) for resistance to water stress. *Trop. Agric. (Trinidad)*, 68 : 57-62.
- Baribault, T. J.; Skene, K. G. M. & Scott, N. S.** (1989). Genetic transformation of grapevine cells. *Plant Cell Reports*, 8 : 137-140.
- Barlass, M. & Skene, K. G. M.** (1978). *in vitro* propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices. *Vitis*, 17 : 335-340.
- Barlass, M.; Miller, R. M. & Antchiff, A. J.** (1986). Development of methods for screening grapevines for resistance to infection by downy mildew. I dual culture *in vitro*. *Am. J. Enol. Vitic.*, 37: 61-66.
- Bavaresco, L., Fregoni, M. & Gambi, E.** (1993). *In vitro* method to screen grapevine genotypes for tolerance to lime induced chlorosis. *Vitis*, 32 : 145-148.
- Bhaskaran, S; Smith, R. H. & Newton, R. J.** (1985). Physiological changes in cultured sorghum cells in response to induced water stress. *Plant Physiol.*, 79 : 266-269.
- Binzel, M.; Hasegawa, P. M.; Handa, A. K. & Bressan, R. A.** (1985). Adaptation of tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol.*, 79 : 118-125.
- Boucharmont, J.** (1994). Application of somaclonal variation and *in vitro* selection to plant improvement. *Acta Horticulturae*, 355: 213-218.
- Büssis, D. & Heineke, D.** (1998). Acclimation of potato plants to polyethylene glycol-induced water deficit. II contents and subcellular distribution of organic solutes. *J. Exp. Bot.*, 49 : 1361-1370.
- Büssis, D.; Kauder, F. & Heineke, D.** (1998). Acclimation of potato plants to polyethylene glycol – induced water deficit. I. Photosynthesis and metabolism. *J. Exp. Bot.*, 49 : 1349-1360.
- Campos, A.; Santos, C & Caldeira, G.** (1999). Caracterização de *Vitis vinifera* L.

var. Baga, relativamente ao stress osmótico induzido em culturas *in vitro*. 2º Workshop de Biotecnologia de Plantas. Universidade do Algarve.

Campos, A.; Santos, S.; Abrunhosa, L.; Costa, A.; Santos, C. & Caldeira, G. (1998). *in vitro* micropropagation and protoplast isolation of Portuguese cultivars of grapevine. XI Congresso Nacional de Bioquímica.

Chée, R. & Pool, R. M. (1982). The effect of growth substances and photoperiod on the development of shoot apices of *Vitis* cultured *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 16 : 17-27.

Chée, R. & Pool, R. M. (1985). *in vitro* propagation of *Vitis*: the effects of organic substances on shoot multiplication. *Vitis*, 24 : 106-118.

Chée, R. & Pool, R. M. (1988). Sucrose and NAA influence on growth of subcultured shoots and *in vitro* production of roots in *Vitis*. *HortScience*, 23 : 776.

Christine, G; Bournoville, R. & Bonnemain, J-L. (1996). Water deficit induced changes in concentrations in proline and some other amino acids in the phloem sap of alfalfa. *Plant Physiol.*, 111 : 109-113.

Colby, S. M.; Juncosa, A. M.; Stamp, J. A. & Meredith, C. P. (1991). Developmental anatomy of direct shoot organogenesis from leaf petioles of *Vitis vinifera* (Vitaceae). *Amer. J. Bot.*, 78 : 260-269.

Collin, H. A. & Edwards, S. (1998). *Plant cell culture*. Bios Scientific publishers.

Do, C. B. & Cormier, F. (1990). Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. *Plant Cell Reports*, 9 . 143-146.

Duran-Vila, N.; Juárez, J. & Arregui, J. M. (1988). Production of viroid-free grapevines by shoot tip culture. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 39 : 217-220.

During, H. (1987). Stomatal responses to alterations of soil and air humidity in grapevines. *Vitis*, 26 : 9-18.

Erdei, L. & Taleisnik, E. (1993). Changes in water relation parameters under osmotic and salt stresses in maize and sorghum. *Physiologia Plantarum*, 89 : 381-387.

Fanizza, G.; Tanzarella, O. A. & Carrozzo, G. (1984). Influence of *Vitis* source on *in vitro* shoot apex culture. *Ann. Appl. Biol.*, 104 : 577-578.

Feucht, W.; Treuter, D. & Christ, E. (1996). Flavanols in grapevine: *in vitro* accumulation and defence reactions in shoots. *Vitis*, 35 : 113-118.

- Fila, G.; Ghashghaie, J.; Hoarav, J. & Cornic, G. (1998).** Photosynthesis, leaf conductance and water relations of *in vitro* cultured grapevine rootstock in relation to acclimatisation. *Physiologia Plantarum*, 102 : 411-418.
- Flores, H & Galston, A. W. (1984).** Osmotic stress induced polyamine accumulation in cereal. *Plant Physiol.*, 75 : 102-109.
- Fosket, D. E. (1994).** *Plant growth and development : a molecular approach.* Academic press.
- Galzy, J.; Valérie, H & daniel, C. (1990).** Influence of the growth and nutrition of grapevine microcuttings. *J. Exp. Bot.*, 41 (224) : 295-301.
- Gasser, C. S. & Fraley, R. T. (1992).** Transgenic crops. *Scientific American*, 266 (6) : 34-39..
- George, E. F. (1993).** *Plant propagation by tissue culture : part 1, the technology (2^a ed).* Exegetics limited.
- Good, A. G. & Zaplachinski, S. T. (1994).** The effects of drought stress on free amino acid accumulation and protein synthesis in *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum*, 90 : 9-14.
- Goussard, P. G. (1981).** Effects of cytokinins on elongation, proliferation and total mass of shoots derived from shoot apices of grapevine cultured *in vitro*. *Vitis*, 20 : 228-234.
- Goussard, P.G. (1982).** Morphological responses of shoot apices of grapevine cultured *in vitro*. Effects of cytokinins in routine subculturing. *Vitis*, 21 : 293-298.
- Guedes-Pinto, H. (1997).** Apontamentos de Genética de Base. Mestrado em Melhoramento de Plantas, universidade de Évora.
- Hall, D. O. & Rao, K. K. (1994).** *Photosynthesis. Studies in Biology (5^a ed.).* cambridge University press.
- Hamill, J. D. & Cocking, E. C. (1988).** Somatic hybridization of plants and its use in agriculture. *In: Plant Cell Biotechnology, NATO ASI, Series H: cell biology vol. 18; Pais, M. S. S.; Mavituna, F. and Novais, J. M. (eds.). Springer-verlag Berlin Heidelberg. pp 21-41.*
- Handa, S.; Handa, A. V.; Hasegawa, P. M. & Bressan, R. A. (1986).** Proline accumulation and the adaptation of cultured plant cells to water stress. *Plant Physiol.*, 80 : 938-945.
- Hans, M & Schopfer, M. (1995).** *Plant Physiology.* Springer-Verlag, Berlin.

- Harris, R. E. & Stevenson, J. H. (1982).** *in vitro* propagation of *Vitis*. *Vitis*, 21 : 22-32.
- Harst, M. (1995).** Development of a regeneration protocol for high frequency somatic embryogenesis from explants of grapevines (*Vitis* spp.). *Vitis*, 34 : 27-29.
- Hartmann, H. T.; Kester, D. E.; Davies, F. T. & Geneve, R. L. (1997).** Plant propagation: principles and practices, (6^a ed.). Prentice Hall.
- Hawker, J. S.; Downton, W. J. S.; Wiskich, D. & Mullins, M. G. (1973).** *Callus* and cell culture from grape berries. *HortScience*, 8 : 398-399.
- Hirabayashi, T.; Kozaki, I. & Akihama, T. (1976).** *in vitro* differentiation of shoots from anther *callus* in *Vitis*. *HortScience*, 11 : 511-512.
- Iraki, N. M.; Bressan, R. A.; Hasegawa, P. M. & Carpita, N. C. (1989).** Alteration of the physical and chemical structure of the primary cell wall of growth-limited plant cells adapted to osmotic stress. *Plant Physiol.*, 91 : 39-47.
- Irigoyen, J. J.; Emerich, D. W. & Sánchez-Díaz, M. (1992).** Alfalfa leaf senescence induced by drought stress: photosynthesis, hydrogen peroxide metabolism, lipid peroxidation and ethylene evolution. *Physiologia Plantarum*, 84 : 67-72.
- Jona, R. & Webb, K. J. (1978).** *Callus* and axillary bud culture of *Vitis vinifera* "Sylvaner Riesling". *Scientia Horticulturae*, 9 : 55-60.
- Jones, M.; Osmond, C. & Turner, N. (1980).** Accumulation of solutes in leaves of sorghum and sunflower in response to water deficit. *Aust. J. Plant Physiol.*, 7 : 193-205.
- Krul, W. R. & Worley, J. F. (1977).** Formation of adventitious embryos in *callus* cultures of Seyval, a french hybrid grape. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 102 : 360-363.
- Kumar, A. & Singh, D. P. (1998).** Use of physiological indices as a screening technique for drought tolerance in oilseed *Brassica* species. *Annals of Botany*, 81 : 413-420.
- Lebrun, L.; Rajasekaran, K. & Mullins, M. G. (1985).** Selection *in vitro* for NaCl-tolerance in *Vitis rupestris* Scheele. *Annals of Botany*, 56 : 733-739.
- Leva, A. R. & Muleo, R. (1993).** Effects of media osmotic agents on the growth and morfogenesis of actinidia deliciosa cv "Hayward" *callus*. *in vitro* Cell. Dev. Biol., 29P : 59-64.
- Lewandowski, V. T. (1991).** Rooting and acclimatization of micropropagated *Vitis*

labruscana "Delaware". HortScience, 26 : 586-589.

Li, Jia-Rui & Eaton, G. W. (1984). Growth and rooting of grape shoot *apices in vitro*. HortScience, 19 : 64-66.

Lilley, J. M.; Ludlow, M. M.; McCouch, S. R. & O'Toole, J. C. (1996). Locating QTL for osmotic adjustment and dehydration tolerance in rice. J. Exp. Bot., 47 : 1427-1436.

Lovisolo, C. & Schubert, A. (1998). Effects of water stress on vessel size and xylem hydraulic conductivity in *Vitis vinifera* L.. J. Exp. Bot, 49 : 693-700.

Martin, B & Ruiz-Torres, N. A. (1992). Effects of water-deficit stress on photosynthesis, its components and component limitations, and on water use efficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant physiol., 100 : 733-739.

Martinelli, L.; poletti, V.; Bragagna, P. & Poznanski, E. (1996). A study on organogenic potencial in the *vitis* genus. Vitis, 35 : 159-161.

Mathews, M. A.; Andreson, M. M. & Schultz, H. R. (1987). Phenologic and growth responses to early and late season water deficits in Cabernet Franc. Vitis, 26 : 147-160.

Možsár, J. & Süle, S. (1994). A rapid method for somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured anthers of *Vitis riparia*. Vitis, 33 : 245-246.

Nakano, M.; Hoshino, Y. & Mii, M. (1994). Regeneration of transgenic plants of grapevine (*Vitis vinifera* L.) via *Agrobacterium rhizogenes* - mediated transformation of embryogenic *calli*. J. Exp. Bot., 45 (274) : 649-656.

Nakano, M.; Sakakibara, T.; Watanabe, Y. & Mii, M. (1997). Establishment of embryogenic cultures in several cultivars of *Vitis vinifera* and *V. x labruscana*. Vitis, 36 : 141-145.

Péros, J.; Torregrosa, L. & Berger, G. (1998). Variability among *Vitis vinifera* cultivars in micropropagation, organogenesis and antibiotic sensitivity. J. Exp. Bot., 49 (319) : 171-179.

Phalich, E & Grieb, B. (1983). Turgor pressure and proline accumulation in water stressed plants. Angew. Botanik, 57 : 292-299.

Pinto-Sintra, A. L.; Pais, M. S. & Guedes-Pinto (1997). Expressão da β -Glucuronidase em explantes de *Vitis vinifera* L. co-cultivados com diferentes estirpes de *Agrobacterium tumefaciens*. II Reunião Nacional da IAPTC.

Poni, S.; Lakso, A. N.; Turner, J. R. & Melious, R. E. (1993). The effects of pre-

and post- veraison water stress on growth and physiology of potted Pinot Noir grapevines at varying crop levels. *Vitis*, 32 : 207-214.

Pool, R. M. & Powel, L. B. (1975). The influence of cytokinins on *in vitro* shoot development on concord grape. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 100 (2) : 200-202.

Premachandra, G. S.; Hahn, D. T.; Rhodes, D. & Joly, R. J. (1995). Leaf water relations and water solute accumulation in two grain sorghum lines exhibiting contrasting drought tolerance. *J. Exp. Bot.*, 46 : 1833-1844.

Rajasekaran, K. & Mulins, M. G. (1981). Organogenesis in internode explants of grapevine. *Vitis*, 20 : 218-227.

Ramanjulu, S & Sudhakar, C. (1997). Drought tolerance is partly related to amino acid accumulation and ammonia assimilation: a comparative study in two mulberry genotypes differing in drought sensitivity. *J. Plant Physiol.*, 150 : 345-350.

Reynolds, A. G. & Naylor, A. P. (1994). "Pinot Noir" and "Riesling" grapevines respond to water stress duration and soil water-holding capacity. *HortScience*, 29 : 1505-1510.

Roubelakis, K. A. & Zivanovitch, S. B. (1991). A new culture medium for *in vitro* rhizogenesis of grapevine (*Vitis* spp.) genotypes. *HortScience*, 26 : 1551-1553.

Salisbury, F. B. & Ross, C. W. (1992). *Plant Physiology*, (4^a ed.). Wadsworth.

Santos, M. C. L. V. (1997). Estudo de alguns mecanismos de regulação osmótica e da expressão da glutamina sintetase em células de *Helianthus annuus* L. sujeitas a stress salino: selecção de células tolerantes a NaCl. Tese de Doutoramento. Universidade de Aveiro.

Santos-Díaz, M. S. & Ochoa-Alejo, N. (1994). Effect of water stress on growth, osmotic potential and solute accumulation in cell cultures from chilli pepper (a mesophyte) and creosote bush (a xerophyte). *Plant Science*, 96 : 21-29.

Schultz, H. R. & Mathews, H. (1993). Growth, osmotic adjustment, and cell-wall mechanics of expanding grape leaves during water deficits. *Crop Science*, 33 : 287-294.

Scorza, R. (1991). Gene transfer for the genetic improvement of perennial fruit and nut crops. *HortScience*, 26 : 1033-1035.

Seijo, j. g.; Ramos, A. L. & Santo, S. (1997). Effects of osmotic stress on cell division of shoot meristem. *Cytologia*, 62 : 151-156.

Soulie, O.; Roustan, J. P. & Fallot, J. (1993). Early *in vitro* selection of eutypine-tolerant plantlets. Application to screening of *Vitis vinifera* cv. Ugni blanc somaclones. *Vitis*, 32 : 243-244.

Srinivasan, C. & Mullins, M. G. (1980). High-frequency somatic embryo production from unfertilised ovules of grapes. *Scientia Horticulturae*, 13 : 245-252.

Stamp, J. A. & Meredith, C. P. (1988). Somatic embryogenesis from leaves and anthers of grapevine. *Scientia Horticulturae*, 35 : 235-250.

Stamp, J. A.; Colby, S. M. & Meredith, C. P. (1990). Improved shoot organogenesis from leaves of grape. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 115 : 1038-1042.

Staudt, G.; Borner, H-G. & Becker, H. (1972). Studies on *callus* growth of di- and tetraploid grapes *in vitro*. *Vitis*, 11 : 1-9.

Thorpe, T. A. (1993). *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis: physiological and biochemical aspects. *In: Morphogenesis in plants*. Eds. Roubelakis-Angelakis, K. A. & Van, K. T. T. Plenum Press, New York.

Torregrosa, L. & Bouquet, A. (1995). *in vitro* propagation of *Vitis* × *muscadinia* hybrids by microcuttings on axillary budding. *Vitis*, 34 : 237-238.

Torregrosa, L.; Torres-vials, M. & Bouquet, A. (1995). Somatic embryogenesis from leaves of *Vitis Muscadinia* hybrids. *Vitis*, 34 : 239-240.

Vartanian, N.; Damerval, C. & Vienne, D. (1987). Drought induced changes in protein patterns of *Brassica napus* var. *oleifera* roots. *Plant Physiol.*, 84 : 989-992.

Yu, D. & Meredith, C. P. (1986). The influence of explant origin on tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine. *J. Amer. Hort. Sci.*, 111 : 972-975.

Zar, J. H. (1996). *Biostatistical analysis* (3^a ed.). Prentice Hall International Editions.

