

101

Circular
Técnica

Online

Petrolina, PE
Dezembro, 2012

Autor

Juliana Martins Ribeiro

Bióloga, D.Sc. em Produção Vegetal, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, juliana.ribeiro@embrapa.br.

Natoniel Franklin de Melo

Biólogo, D.Sc. em Ciências Biológicas, pesquisador da Embrapa Semiárido, natoniel.melo@embrapa.br.

Francisco Pinheiro Araújo

Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Fitotecnia, analista da Embrapa Semiárido Petrolina, PE, pinheiro.de-araujo@embrapa.br.

Ângela Katiussia Nascimento dos Santos Coelho

Assistente da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, angela.coelho@embrapa.br.

Maria do Socorro Evangelista Coelho

Bióloga, doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, UEFS, msecoelho@yahoo.com.br.

Márcio dos Santos Teixeira Pinto

Biólogo, bolsista, DCR FACEPE/CNPq, marciostp@yahoo.com.br.

Micropropagação de Goiabeira, Maracujazeiro, Bananeira e Videira

Introdução

A micropropagação é uma técnica de propagação massal de plantas em condições de laboratório, em meio nutritivo específico, sob condições assépticas e ambiente controlado. Apresenta uma série de vantagens quanto ao produto final, das quais podem ser destacadas: a) multiplicação de plantas em larga escala e em tempo reduzido; b) obtenção de plantas completamente livres de doenças e pragas; c) elevada precisão no estabelecimento de cronogramas de produção e comercialização; e d) qualidade do produto no que se refere à homogeneidade e vigor das plantas obtidas (GUERRA et al., 1999; RIBEIRO et al., 2010a; TEIXEIRA et al., 2006, 2008).

A obtenção de plantas pela técnica de micropropagação pode ser realizada por meio de três rotas morfogenéticas, sendo elas: a proliferação de gemas; a organogênese, subdividida em adventícia direta e indireta; e a embriogênese somática, que também pode ocorrer de forma direta ou indireta (CHAWLA, 2004).

A proliferação de gemas baseia-se na multiplicação por meio da proliferação e crescimento de meristemas pré-existentes na planta, utilizando-se explantes como, por exemplo, ápices meristemáticos e caulinares, gemas axilares e segmentos nodais. De um lado, a cultura de meristemas consiste no estabelecimento in vitro do tecido meristemático apical sem os primórdios foliares. Por outro lado, a cultura de ápices caulinares consiste no estabelecimento in vitro a partir de brotações apicais maiores do que aquelas utilizadas para iniciar a cultura de meristema, tendo alguns primórdios foliares. Já a cultura de segmentos nodais consiste no cultivo de gemas laterais isoladas ou segmentos de caule com uma ou múltiplas gemas (CHAWLA, 2004).

A organogênese consiste na formação de órgãos a partir de tecidos não meristemáticos, como segmentos de folhas, raízes e segmentos internodais. A organogênese pode ocorrer de forma direta, na qual há a emergência de órgãos adventícios diretamente do explante, a partir de gemas adventícias; ou indireta, onde novas gemas e eixos caulinares são induzidos e formados a partir de tecidos não organizados, denominados calos, originados de explantes de diferentes origens (CHAWLA, 2004, LEMOS, 2010).

A embriogênese somática consiste na regeneração de embriões a partir de células somáticas. É o processo pelo qual novos indivíduos se originam a partir de células simples, caracterizando-se por não serem produtos da fusão de gametas e que não apresentam conexões vasculares com os tecidos maternos. A embriogênese somática pode ocorrer de forma direta, onde os embriões somáticos se originam diretamente de tecidos de matrizes, sem o estabelecimento de estádios intermediários de calos; ou de forma indireta, na qual os embriões somáticos se formam a partir de calos que apresentam células em diferentes estádios de diferenciação. Em ambos os padrões, o embrião somático segue a mesma sequência de desenvolvimento do embrião zigótico, ou seja, a passagem pelos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (CHAWLA, 2004; ZIMMERMANN, 2010).

Explantos específicos de plantas vasculares, como ápices, gemas, entre outros podem ser cultivados in vitro e têm capacidade de formar plantas idênticas à planta matriz (totipotencialidade) por meio da micropropagação. De maneira geral, a formação de plantas pela técnica citada envolve quatro fases, sendo elas: 1) o estabelecimento in vitro da cultura; 2) multiplicação; 3) alongamento e enraizamento e 4) aclimatização (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010; GUERRA; NODARI, 2006; RIBEIRO et al., 2010a).

O estabelecimento da cultura envolve a seleção e o cultivo da planta matriz doadora de explantes em condições adequadas ou controladas. Caso haja a necessidade de se cultivar a planta matriz em condições controladas, fotoperíodo e temperatura deverão ser monitorados, podendo haver a necessidade da aplicação de reguladores vegetais para a alteração da sua condição fisiológica. Essa fase também envolve o estabelecimento da cultura asséptica in vitro, quando se objetiva altos índices de sobrevivência e o rápido crescimento dos explantes. Nesse sentido, torna-se necessário monitorar e controlar as reações de oxidação que ocorrem tanto pela liberação de compostos fenólicos presentes no explante como resposta ao ferimento provocado pela excisão de um órgão ou tecido, quanto pela síntese desses compostos por parte do explante. A incubação das culturas na ausência da luz por alguns dias e a adição de antioxidantes ao meio nutritivo podem inibir os processos oxidativos (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010; GUERRA; NODARI, 2006).

A fase de multiplicação fundamenta-se na divisão e diferenciação celulares, com o objetivo de se obter plantas completas por meio das diferentes rotas morfogenéticas. De maneira geral, ocorre o desenvolvimento de gemas axilares pré-existentes ou a indução de gemas adventícias. O meio nutritivo deve conter reguladores vegetais específicos em concentrações que promovam a formação de brotações. Geralmente são utilizados reguladores vegetais da classe das citocininas, responsáveis principalmente pela divisão celular. Nessa fase deve ser realizada a determinação do intervalo entre os subcultivos, o que é necessário para a renovação dos nutrientes do meio nutritivo, bem como a verificação da taxa de multiplicação, ou seja, o número de gemas ou de eixos caulinares que podem ser obtidos a partir de cada inóculo (explante) nos subcultivos, de modo a otimizar protocolos

que promovam um maior número de plantas por explante (CHAWLA, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2004).

A fase de alongamento e enraizamento tem como objetivo alongar o caule, induzir a formação das raízes e preparar as plantas para a aclimatização. O meio nutritivo deve conter reguladores vegetais específicos em concentrações que promovam o alongamento dos eixos caulinares e a formação de raízes. Geralmente são utilizados reguladores vegetais da classe das giberelinas e das auxinas, que induzem o alongamento dos eixos caulinares e a formação de raízes, respectivamente, bem como a adição de carvão ativado, que favorece a iniciação e o desenvolvimento radicular. Algumas espécies não passam pela fase de alongamento, necessitando apenas de reguladores vegetais para a indução de raízes. Reduções nas concentrações dos sais e das fontes de carboidratos do meio de cultura podem trazer benefícios à iniciação radicular, bem como facilitar o processo de aclimatização (CHAWLA, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Na fase de aclimatização ocorre a transição da condição heterotrófica para autotrófica, sendo o principal objetivo a diminuição das perdas que ocorrem principalmente pela desidratação dos tecidos da planta micropropagada. A aclimatização é um procedimento necessário para a passagem das plantas cultivadas in vitro para as condições de campo, com o objetivo de adaptá-las gradualmente para a transição do ambiente de laboratório para as condições naturais. É um procedimento que varia de acordo com a espécie que está sendo micropropagada e, de maneira geral, envolve a transferência das culturas para ambiente com luz natural, abertura dos frascos contendo as culturas a sombra, lavagem das plantas para a eliminação do ágar residual, transferência das plantas para substrato estéril, transferência das plantas em substrato estéril para câmara de nebulização com controle de iluminação e umidade, e transferência para um telado (GUERRA; NODARI, 2006; RIBEIRO et al., 2010b).

A seguir serão descritos protocolos para a micropropagação de goiabeira (RIBEIRO et al., 2010b), bananeira, videira (MENEZES et al., 2007) e maracujazeiro (ARAÚJO et al., 2008), desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Semiárido, de maneira a auxiliar a instalação de experimentos que envolvam as espécies em questão.

Protocolos de Micropropagação

Em todas as etapas, para todas as espécies, após o preparo dos meios nutritivos, o pH deverá ser aferido para $5,8 \pm 1$ e os mesmos deverão ser esterilizados por autoclavagem ($121\text{ }^{\circ}\text{C}$, $1,0\text{ kgf.cm}^2$ por 20 minutos). Os explantes deverão ser inoculados nos meios nutritivos com a utilização de utensílios estéreis e no interior da capela de fluxo laminar (ambiente asséptico). Após sua inoculação no meio nutritivo, as culturas deverão ser mantidas em sala de crescimento, com condições de iluminação e temperatura controladas (fotoperíodo de 16 horas, temperatura entre $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ e intensidade luminosa de $40\text{ }\mu\text{mol m}^2$).

Goiabeira (*Psidium guajava* L.)

Cultivar: Paluma.

Estabelecimento da cultura in vitro

Sementes de goiaba deverão ser extraídas dos frutos, esfregadas em calcário para a retirada do excesso da polpa e lavadas em água corrente. No interior da capela de fluxo laminar, as sementes deverão ser desinfestadas durante 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, adicionada de uma gota de Tween 20 para cada 10 mL da solução, e enxaguadas por três vezes de 5 minutos em água destilada autoclavada. Em seguida, as sementes deverão ser inoculadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (Tabela 1), adicionado de vitaminas MS (Tabela 2), 10 g L^{-1} de sacarose (1/3 da concentração normal do meio). Trinta dias após o cultivo em sala de crescimento, as plantas formadas poderão ser transferidas para o meio de multiplicação (Figura 1a).

Multiplicação

No interior da capela de fluxo laminar, segmentos nodais (compostos de uma a duas gemas por explante, com aproximadamente 1 cm) obtidos das plantas na etapa anterior deverão ser transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL do meio WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) (Tabela 1), adicionado de $4,0\text{ mg L}^{-1}$ de benzilaminopurina (BAP) e vitaminas MS (Tabela 2). Trinta dias após o cultivo em sala de crescimento, as plantas formadas poderão ser

transferidas para o meio de enraizamento (Figura 1 a). Para a goiabeira, cultivar Paluma, não há necessidade das plantas passarem pela fase de alongamento.

Enraizamento

No interior da capela de fluxo laminar, brotos (compostos de uma a duas gemas por explante, com aproximadamente 1 cm) multiplicados na etapa anterior deverão ser transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de meio WPM (Tabela 1) sem reguladores vegetais, adicionado de vitaminas MS (Tabela 2). Trinta dias após o cultivo em sala de crescimento, as plantas formadas poderão ser aclimatizadas (Figura 1b).

Aclimatização

As plântulas obtidas na etapa anterior deverão ser retiradas dos frascos nos quais estavam sendo cultivadas in vitro, lavadas em água corrente para a retirada do excesso de ágar das raízes, transferidas para sacos plásticos de polietileno preto ($10 \times 8\text{ cm}$) contendo substrato comercial e mantidas em telado. Trinta dias após a aclimatização, as plantas poderão ser transferidas para o campo (Figura 1c).

Tabela 1. Formulação para preparo de meios nutritivos MS, WPM e GALZY.

Componente	Fórmula	MS	WPM	GALZY
Macronutrientes				
Nitrato de amônio	NH_4NO_3	1.650	400	320
Nitrato de potássio	KNO_3	1.900	-	125
Cloreto de cálcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	96	0,025
Sulfato de magnésio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	370	125
Fosfato de potássio	KH_2PO_4	170	170	125
Sódio EDTA	Na_2EDTA	37,25	37,25	-
Nitrato de cálcio	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	556	500
Sulfato de potássio	K_2SO_4	-	990	-
Micronutrientes				
Sulfato de ferro	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,85	27,85	22
Sulfato de manganês	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22,3	22,3	0,61
Sulfato de zinco	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	8,6	0,05
Ácido bórico	H_3BO_3	6,2	6,2	0,025
Molibdato de sódio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,025
Cloreto de cobalto	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	-	-
Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,025
Iodeto de potássio	KI	0,83	-	-
Cloreto de níquel	$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	-	0,025
Sulfato de berílio	$\text{BeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	-	0,05
Outros				
Ágar	-	7.000	7.000	7.000
Sacarose	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	30.000	30.000	30.000

Fonte: Murashige e Skoog (1962); Galzy (1964) e Lloyd e Mccown (1980).

Tabela 2. Formulação para preparo de vitaminas MS, WPM e GALZY.

Vitaminas		MS	WPM	GALZY
Componente	Fórmula	Concentração (mg L ⁻¹)		
Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	0,5	0,5	0,001
Cloridrato de piridoxina	C ₆ H ₁₂ ClNO ₂	0,5	0,5	0,001
Cloridrato de tiamina	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS	0,1	1000	0,001
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	2	2	0,1
Mio-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	100	-	0,1
Biotina	C ₁₀ H ₁₆ O ₃ N ₂ S	-	-	0,00001
Pantotenato de cálcio	C ₁₈ H ₃₂ CaN ₂ O ₁₀	-	-	0,001

Fonte: Murashige e Skoog (1962); Galzy (1964) e Lloyd e Mccown (1980).



Fotos: Juliana Martins Ribeiro.

Figura 1. Etapas da micropropagação da goiabeira: a) multiplicação in vitro de plantas germinadas de sementes; b) formação de raízes em brotações induzidas in vitro, e c) plantas aclimatizadas em sacos plásticos contendo substrato comercial.

Maracujazeiro (*Passiflora cincinnata* Mast.)

Acessos: CPEF2216, CPET0321, CPEA0423, CCEA0526, CPIB0549, CPIB0451 e CPIB0453 do Banco de Germoplasma de Maracujá da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

Estabelecimento da Cultura in vitro

Segmentos nodais compostos de uma a duas gemas por explante, com aproximadamente 1 cm, devem ser coletados após a terceira gema axilar em relação ao ápice e colocados em recipiente com água destilada, durante o transporte para o laboratório (Figura 2 a).

No interior da capela de fluxo laminar, os explantes devem ser desinfestados com imersão em etanol 70% por 1 minuto, seguido de imersão em cloridrato de kasugamicina 0,3% por 20 minutos e solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 0,5%

por 20 minutos. Em seguida, lavados por três vezes com água destilada esterilizada. Depois, os explantes com aproximadamente 1 cm de comprimento, sem folhas (Figura 2b) devem ser inoculados individualmente em tubo de ensaio, contendo aproximadamente 10 mL de meio WPM (Tabela 1) e vitaminas MS (Tabela 2). Após inoculação, as culturas devem ser mantidas em sala de crescimento por 30 dias.

Multiplicação e Enraizamento

No interior da capela de fluxo laminar, segmentos nodais (compostos de uma a duas gemas por explante, com aproximadamente 1 cm) obtidos na etapa anterior deverão ser transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de meio WPM (Tabela 1) adicionado de vitaminas MS (Tabela 2), 2,0 mgL⁻¹ de cinetina (CIN) e 0,1 mgL⁻¹ de ácido indolacético (AIA), responsáveis pela indução de brotos e raízes, respectivamente (Figura 2c). Nessa fase, devem ser realizados de quatro a cinco subcultivos em intervalos de 60 dias. A cada subcultivo, os segmentos nodais devem ser transferidos para novo meio de multiplicação e enraizamento com a mesma composição.

A multiplicação e o enraizamento são realizados em paralelo, em virtude das características de desenvolvimento da cultura. Para o maracujazeiro, não há necessidade das plantas passarem pela fase de alongamento.

Aclimatização

Plantas a serem aclimatizadas devem apresentar altura média entre 10 cm e 15 cm de comprimento, com seis folhas, aproximadamente. As plantas devem ser lavadas para retirar o excesso de meio de cultura, levadas para uma estufa de aclimatização e transplantadas para substrato autoclavado contendo uma mistura de solo + areia + vermiculita na proporção de (1:1:1). As plantas devem permanecer por 2 meses em estufa de aclimatização sob nebulização, recebendo adubação com solução nutritiva contendo meio MS líquido (sem adição de ágar). Após 60 dias, finalizada a etapa de aclimatização, as plantas podem ser transferidas para viveiro, até atingirem tamanho ideal para plantio em campo (Figura 2d).

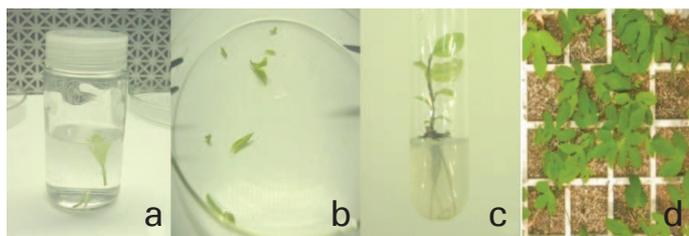


Figura 2. Etapas da micropropagação do maracujazeiro: a) segmentos nodais colocados em água destilada para transporte do campo até o laboratório; b) retirada das folhas para a inoculação em meio de multiplicação e enraizamento; c) plantas em meio de multiplicação e enraizamento, d) plantas aclimatizadas em bandejas de isopor.

Bananeira (*Musa spp.*)

Cultivar: Maçã.

Estabelecimento da Cultura *in vitro*

As plantas matrizes adultas das quais serão extraídos os rizomas deverão apresentar aspecto sadio e serem livres de pragas e doenças. Após a seleção e coleta, realiza-se a pré-limpeza, quando os rizomas deverão ser lavados em água corrente e retirado o excesso de raízes e folhas.

Com o auxílio de facas limpas, os rizomas deverão ser reduzidos a um tamanho aproximado de 4 cm de comprimento por 3 cm de diâmetro e colocados em recipiente com água. A partir desse momento até a aclimatização, o manuseio da cultura deve ser realizado em ambiente asséptico e com material e meio de cultura esterilizados. Os explantes deverão ser transferidos para a câmara de fluxo laminar para a realização do processo de limpeza e retirada de excesso de tecido, onde deverão ser imersos em etanol a 92,8° INPM e, em seguida, flambados para a sua desinfestação.

Com auxílio de pinça e bisturi, os explantes deverão ser reduzidos até aproximadamente 1,0 cm de comprimento por 0,5 cm de diâmetro (Figura 3a) e, logo após, inoculados em frascos de cultivo contendo aproximadamente 10 mL de meio MS (Tabela 1), acrescido de 2,0 mgL⁻¹ de glicina, 2,0 mgL⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e 0,3 mgL⁻¹ de ácido indolacético (AIA) (Figura 3b). Após inoculação, as culturas deverão ser mantidas em sala de crescimento por 10 dias. Por causa das oxidações fenólicas que podem ocorrer a cada 10 dias, os explantes deverão

ser transferidos para um novo tubo contendo meio de cultura com a mesma composição, devendo este processo ser mantido durante 30 dias.

Multiplicação

Nesta etapa, deverão ser utilizados potes plásticos autoclaváveis, contendo 40 mL de meio MS (Tabela 1), acrescido de 2,0 mgL⁻¹ de glicina e 2,0 mgL⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) (Figura 3c). Essa fase é composta por até sete subcultivos, cada um com duração média de 30 dias, mantidos em sala de crescimento. No primeiro subcultivo, os explantes deverão ser retirados e realizado um pequeno corte longitudinal, objetivando a quebra da dominância apical. A partir do segundo subcultivo, o processo de multiplicação deverá ser realizado por meio de repicagem das gemas laterais, sendo inoculadas até dez gemas por pote.

Para a bananeira, não há necessidade das plantas passarem pela fase de alongamento.

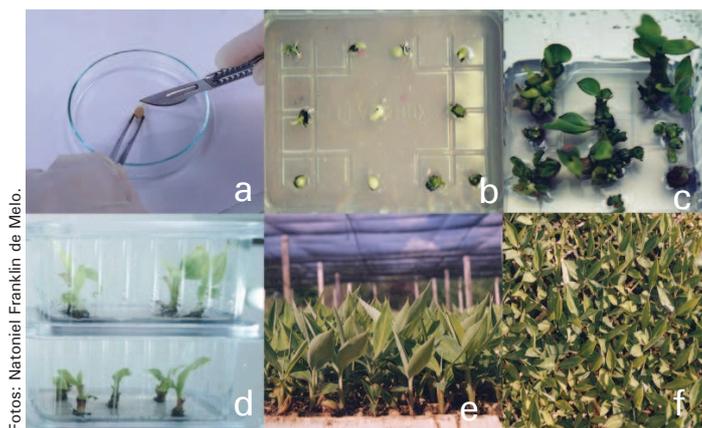
Enraizamento

As brotações que atingirem 1,5-2,0 cm de comprimento devem ser separadas e transferidas para potes plásticos autoclaváveis contendo 20 mL de meio MS (Tabela 1), acrescidos de 2,0 mgL⁻¹ de glicina, 1,0 mgL⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) e 2 % sacarose, sendo mantidas em sala de crescimento durante 3-4 semanas, aproximadamente (Figura 3d).

Aclimatização

Após o enraizamento *in vitro*, as brotações deverão ser retiradas dos potes, lavadas em água corrente e, em seguida, transferidas para o viveiro com tela de sombreamento entre 50% e 70%.

As brotações podem ser plantadas em calhas de telhas de fibrocimento onduladas, tubetes de plástico com fundo perfurado ou bandeja de isopor contendo substrato composto de vermiculita e areia na proporção 2:1 (v/v) (Figura 3e). A irrigação deve ser realizada diariamente por 60 dias, até que as plantas atinjam o tamanho para plantio em campo (Figura 3f).



Fotos: Nataniel Franklin de Melo.

Figura 3. Etapas da micropropagação de bananeira: a) redução dos explantes para o estabelecimento da cultura in vitro; b) estabelecimento da cultura in vitro; c) brotações formadas em meio de multiplicação; d) brotos de bananeira em meio nutritivo com reguladores vegetais responsáveis pela indução de raízes; e) aclimatização em bandeja de isopor, e f) plantas prontas para plantio no campo.

Videira (*Vitis* spp.)

Cultivares: Red Globe, Superior Seedless, Crimson Seedless, Thompson Seedless, IAC-313, IAC-572, IAC-766, SO4, Harmony, Paulsen 1104, Cabernet Sauvignon e híbridos.

Iniciação da Cultura

O material vegetativo do qual serão extraídos os explantes, poderá ser proveniente de viveiro, casa de vegetação ou campo. Os explantes deverão ser coletados após a terceira gema axilar em relação ao ápice, colocados em recipiente com água destilada e, posteriormente, levados para o laboratório.

Os explantes deverão ser desinfestados com imersão em etanol 70% (v/v) por 1 minuto e, em seguida, imersos em solução de hipoclorito de sódio comercial 20% (v/v) durante 20 minutos, seguido por três lavagens em água destilada estéril. Posteriormente, os explantes com aproximadamente 1 cm de comprimento e sem folhas deverão ser inoculados individualmente em tubo de ensaio, contendo aproximadamente 10 mL de meio Galzy (GALZY, 1964) (Tabela 1), acrescido de 2, mgL⁻¹ de glicina, e 0,1 mgL⁻¹ ácido indolacético (AIA). Após a inoculação, os tubos deverão ser mantidos em sala de crescimento por aproximadamente 30 dias.

Multiplicação e Enraizamento

Trinta dias depois da iniciação da cultura, as plantas obtidas deverão ser repicadas (deve-se deixar de uma a duas gemas por explante, com aproximadamente 1 cm de comprimento) e, após a repicagem, os explantes deverão ser inoculados em frascos de cultura autoclaváveis contendo meio Galzy (Tabela 1), acrescido de 0,1 mgL ácido indolacético (AIA). Após a inoculação, as culturas deverão ser mantidas em sala de crescimento por até 60 dias (Figuras 4a e 4b). Nessa etapa da micropropagação, deverão ser realizados até 8 subcultivos em intervalos de 45 dias.

A cada subcultivo, os segmentos nodais deverão ser transferidos para novo meio de multiplicação e enraizamento com a mesma composição. A indução de brotações para esta espécie é realizada simultaneamente à etapa de enraizamento. Para videira, não há necessidade das plantas passarem pela fase de alongamento.

Aclimatização

Plantas provenientes da etapa anterior deverão ser retiradas do frasco e suas folhas cortadas, de modo a preservar apenas as do ápice. As raízes deverão ser lavadas em água corrente para a retirada do meio de cultura e plantadas em potes plásticos, com fundo perfurado, contendo substrato composto de areia e vermiculita na proporção 1:1 (v:v).

A videira, quando cultivada sob condições in vitro, apresenta sensibilidade às condições do ambiente, como temperatura e umidade, por isso, deve ser protegida, para evitar desidratação e ressecamento, utilizando-se recipientes plásticos individuais transparentes com tampa por um período de 5 a 10 dias, a uma temperatura variando de 23 °C a 27 °C (Figura 4c).

A irrigação deverá ser realizada manualmente com o auxílio de uma pisseta, sempre que necessário. Após a retirada do recipiente de cobertura da câmara úmida, as plantas deverão ser mantidas à temperatura variando de 23 °C a 27 °C durante 10 dias sendo, em seguida, levadas à estufa de aclimatização sob nebulização, onde permanecerão por um período de 20 a 30 dias. Após esse

período, as mesmas deverão ser transplantadas para sacos plásticos contendo solo (Figura 4d) e, aproximadamente 15 a 20 dias após o transplante, as plantas já podem ser transferidas para o telado até atingirem tamanho para plantio em campo.

Foto: Nataniel Franklin de Melo e Ângela Katiussia N. S. Coelho.



Figura 4. Etapas da micropropagação da videira: a) multiplicação e enraizamento *in vitro*; b) aclimatização em recipientes plásticos com cobertura, e d) plantas aclimatizadas em sacos plásticos.

Referências

- ARAÚJO, F. P. de; SILVA, N. da; QUEIROZ, M. A. de. Divergência genética entre acessos de *Passiflora cincinnata* Mast. com base em descritores morfoagronômicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 723-730, set. 2008.
- BARRUETO CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: BARRUETO CID, L. P. (Ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. p. 15-49.
- CHAWLA, H. S. **Introduction to plant biotechnology**. 2nd. ed. Enfield: Science Publishers, 2004. 538 p.
- GALZY, R. Technique de thermothérapie des viroses de la vigne. **Annals des Épiphyties**, Paris, v. 15, n. 3, p. 245-256, 1964.
- GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A. R.; NODARI, R. O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 34, n. 9, p. 1.557- 1.563, 1999.
- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Introdução ao conceito de biotecnologia**: apostila de biotecnologia 1: cultura de tecidos vegetal. Florianópolis: LFDGV, 2006. 41 p.
- LEMO, E. E. P. Organogênese. BARRUETO CID, L. P. (Ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. p. 103-127.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. **Proceedings International Plant Propagator Society**, Carlisle, n. 30, p. 421-427, 1980.
- MENEZES, E. F. de; YANO-MELO, A. M.; RIBEIRO, J. M.; MELO, N. F. de. Avaliação da multiplicação *in vitro* de diferentes cultivares de videira (*Vitis vinifera* L.). In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMI-ÁRIDO, 2., 2007, Petrolina. **Anais...** Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2007. p. 273-277. (Embrapa Semi-Árido. Documentos, 205).
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- RIBEIRO, J. M.; BASTOS, D. C.; OLIVEIRA, E. A. G.; PINTO, M. S. T. **Produção de mudas micropropagadas de videira, mangueira e goiabeira**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010a. 33 p. (Embrapa Semiárido. Documentos, 232). Disponível em: <http://www.cpatna.embrapa.br:8080/public_eletronica/downloads/SDC232.pdf> Acesso em: 11 dez. 2012.
- RIBEIRO, J. M.; CASTRO, J. M. da C. e; RESENDE, G. M. de; BASTOS, D. C.; NALI, L. R. **Micropropagação e aclimatização de goiabeira Paluma**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010b. 27 p. il. (Embrapa Semiárido. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 80). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/29168/1/Juliana.pdf>> . Acesso em: 22 out. 2012.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.
- TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, M. T. Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv Smooth cayenne) behavior. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v. 86, n. 3, p. 375-378, 2006.
- TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, M. T. Utilização de hipoclorito de sódio na esterilização de meio de cultura para multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus pellita* L. **Ciência Florestal**, Santa Maria, RS, v. 18, n. 2, p. 185-191, 2008.
- ZIMMERMANN, M. J. Embriogênese somática. In: BARRUETO CID, L. P. (Ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. p. 67-101.

Circular Técnica, 101

Esta publicação está disponibilizada no endereço: www.cpatna.embrapa.br
Exemplares da mesma podem ser adquiridos na:
Embrapa Semiárido
BR 428, km 152, Zona Rural
Caixa Postal 23 56302-970 Petrolina, PE
Fone: (87) 3866-3600 **Fax:** (87) 3866-3815
cpatsa.sac@embrapa.br

1ª edição (2012): formato digital

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAÍS RICO E PAÍS SEM POBREZA

Comitê de publicações

Presidente: Maria Auxiliadora Coelho de Lima.
Secretário-Executivo: Anderson Ramos de Oliveira
Membros: Ana Valéria Vieira de Souza, Andréa Amaral Alves, Gislene Feitosa Brito Gama, Juliana Martins Ribeiro, José Maria Pinto, Magna Soelma Bezerra de Moura, Patrícia Coelho de Souza Leão, Sidinei Anuniação Silva, Vanderlise Giongo, Welson Lima Simões.

Expediente

Supervisão editorial: Sidinei Anuniação Silva.
Revisão de texto: Sidinei Anuniação Silva.
Tratamento das ilustrações: Bruno Willian Araújo.
Editoração eletrônica: Bruno Willian Araújo.