

Novos plantios de vinhedos esbarram na baixa produtividade e na má qualidade das uvas produzidas, devido à ação de uma série de fatores complexos. Dentre esses, as viroses constituem um importante obstáculo para o desenvolvimento e a produção altamente rentável na viticultura. Diante das limitações dos métodos tradicionais de obtenção de plantas matrizes isentas de viroses, é fundamental o desenvolvimento e aprimoramento de tecnologias mais eficientes, com protocolos práticos e aplicáveis. Diante disso, o objetivo proposto é avaliar diferentes métodos de crioterapia, para erradicação de viroses em genótipos de videira com interesse agrônômico.

Orientadora: Aike Anneliese Kretzschmar

Coorientadores: João Peterson Pereira Gardin

Murilo Dalla Costa

Renato Luis Vieira

Lages, 2015

ANO
2015

JEAN CARLOS BETTONI | PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E ESTUDOS PRELIMINARES DE
TÉCNICAS DE CRIOTERAPIA PARA OBTENÇÃO DE PLANTAS DE VIDEIRA LIVRES DE
VIROSES



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E
ESTUDOS PRELIMINARES DE
TÉCNICAS DE CRIOTERAPIA PARA
OBTENÇÃO DE PLANTAS DE
VIDEIRA LIVRES DE VIROSES**

JEAN CARLOS BETTONI

LAGES, 2015

JEAN CARLOS BETTONI

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E ESTUDOS PRELIMINARES DE
TÉCNICAS DE CRIOTERAPIA PARA OBTENÇÃO DE
PLANTAS DE VIDEIRA LIVRES DE VIROSES**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre no curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Orientador: Dra. Aike Anneliese kretzschmar

Coorientador: Dr. João Peterson Pereira Gardin
Dr. Murilo Dalla Costa
Dr. Renato Luis Vieira

**LAGES - SC
2015**

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Renata Weingartner Rosa (Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC)

B564p

Bettoni, Jean Carlos

Propagação *in vitro* e estudos preliminares de técnicas de crioterapia para obtenção de plantas de videira livres de viroses / Jean Carlos Bettoni. - Lages, 2015.
263 p. : il. ; 21 cm

Orientadora: Aike Anneliese Kretzschmar
Coorientador: João Peterson Pereira Gardin
Coorientador: Murilo Dalla Costa
Coorientador: Renato Luis Vieira
Bibliografia: p. 252-263

Dissertação (mestrado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2015.

1. *Vitis*. 2. Encapsulamento-desidratação. 3. Vitrificação. 4. Meio de cultura. 5. Micropropagação.
I. Bettoni, Jean Carlos. II. Kretzschmar, Aike

JEAN CARLOS BETTONI

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E ESTUDOS PRELIMINARES DE
TÉCNICAS DE CRIOTERAPIA PARA OBTENÇÃO DE
PLANTAS DE VIDEIRA LIVRES DE VIROSES**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina.

Banca Examinadora:

Orientador: _____
Prof. Dra. Aike Anneliese Kretzschmar
UDESC, Lages-SC

Membro: _____
Dr. João Peterson Pereira Gardin
EPAGRI, Videira - SC

Membro: _____
Dr. Murilo Dalla Costa
EPAGRI, Lages - SC

Membro (Suplente): _____
Prof. Dr. Leo Rufato
UDESC, Lages - SC

Lages, 19 de fevereiro de 2015

Em especial aos meus pais, Carlos e Ivanir, e a minha noiva, Juliana, pelo apoio, compreensão e amor transmitido que foi fundamental para concluir essa etapa - dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado 'o dom da vida' e por sempre estar guiando meu caminho.

Aos meus pais, Carlos e Ivanir, pelo carinho, apoio, amor, sentimentos transmitidos em todos os momentos da minha vida, sempre alimentando um espírito de luta e honestidade.

A minha noiva, Juliana, que nunca mediu esforços para que eu alcançasse meus objetivos e acima de tudo pela compreensão e amor, em todos os momentos desta caminhada.

A toda minha família, em especial aos meus avós, Nelci, Antonio, Maria e Leonilo (*in memoriam*) que sempre me acolheram e transmitiram sentimentos de amor, carinho e principalmente por me 'darem' os melhores pais que alguém poderia ter.

A professora. Aike Anneliese Kretschmar, pela amizade, comprometimento e pelo aceite da orientação e incentivos para que este trabalho pudesse ser realizado dentro do período específico.

Ao Dr. Murilo Dalla Costa, pela amizade, comprometimento, carinho, estímulo, pelos momentos que passamos juntos nessa caminhada e pela excelente orientação.

Aos funcionários do laboratório de Biotecnologia da EPAGRI de Lages - SC, em especial a Maria Aparecida Cordova, João Frederico e Gilberto, pela amizade, compromisso e transmissão de conhecimentos.

Ao Dr. João Peterson Gardin e ao Dr. Renato Luis Vieira pela amizade, confiança e co-orientação.

A Dra. Simone Silmara Werner pelo auxílio nas análises estatísticas e transmissão de conhecimentos.

Ao Dr. Qiaochun Wang, do College of Horticulture – Northwest A&F University- China e, ao Dr. Giorgio Gambino, do Instituto de Virologia de Plantas da Itália, pelo compromisso científico e pelas informações que auxiliaram na execução do trabalho.

Aos colegas de Pós-Graduação, em especial ao amigo Gentil Carneiro Gabardo, pelos momentos que passamos juntos no decorrer do curso e da vida profissional.

Ao prof. José Luiz Petri pela amizade, confiança, compromisso e orientações na disciplina de docência.

A UDESC, pelo ensino gratuito e de qualidade e a CAPES pelo concessão de bolsa de estudo.

A todos que em algum momento apoiaram ou incentivaram, mas que ficaram ausentes neste agradecimento.

"O futuro pertence a aqueles que acreditam na beleza de seus sonhos"

Eleanor Roosevelt

RESUMO

Novos plantios de vinhedos esbarram na baixa produtividade e na má qualidade das uvas produzidas, devido à ação de fatores complexos que ainda não estão bem esclarecidos. Dentre esses, as viroses constituem um importante obstáculo para o desenvolvimento e a produção altamente rentável na viticultura. Por meio de técnicas *in vitro* é possível produzir e multiplicar plantas matrizes de videira de alta qualidade fitossanitária. A crioterapia, baseada em métodos de criopreservação, torna-se uma ferramenta promissora para obtenção de alta frequência de plantas regenerantes livres de viroses, em curto espaço de tempo. O trabalho propõe o desenvolvimento de um protocolo eficaz para recuperação de plantas de videira virosadas através de métodos de crioterapia. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia da EPAGRI, Estação Experimental de Lages. A seleção de genótipos foi por meio da presença de diferentes espécies virais (GLRAV-1; GLRAV-3; GFKV; GFLV e GVA), através do teste sorológico ELISA. O estudo foi dividido em dois capítulos complementares, com informações que seguem a ordem cronológica. O capítulo I tem por objetivo avaliar o estabelecimento e multiplicação *in vitro* e a aclimatização *ex vitro* de genótipos de videira, por meio de segmentos nodais cultivados em cinco formulações de meios de cultura sem adição de reguladores de crescimento. Esse capítulo, além da seleção da melhor formulação salina que será utilizada no capítulo II para as cultivares de videira, é apresentada uma revisão atualizada dos temas abordados no trabalho, com informações disponíveis até o presente. No segundo capítulo, diferentes métodos de crioterapia investigados para *Vitis* foram aplicados, com o objetivo de

definir um protocolo padrão para a erradicação de viroses em genótipos potenciais. A propagação *in vitro* do porta-enxerto IAC 571-6 e das cultivares Poloskei Muskotaly e Bordô por meio de segmentos nodais proporcionam elevadas taxas de regeneração e enraizamento, sugerindo que não há necessidade de utilização de reguladores de crescimento que promovam o enraizamento ou de fase específica para o enraizamento. Elevados percentuais de sobrevivências foram obtidas na aclimatização do porta-enxerto IAC 571-6 e das cvs. Poloskei Muskotaly e Bordô. Considerando todas as variáveis analisadas, a formulação que proporcionou o melhor crescimento e desenvolvimento da parte aérea e radicular e melhor multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de videira IAC 571-6 e da cv. copa Poloskei Muskotaly foi a composição Roubelakis e, para a cv. Bordô foram às formulações Roubelakis e Zlenko. Os resultados dos experimentos de crioterapia para as cultivares em questão reafirmam a especificidade das respostas dos genótipos aos procedimentos criogênicos. Taxas entre 6 % a 10 % de regenerantes foram atingidas para o porta-enxerto IAC 571-6 por meio das metodologias de encapsulamento-desidratação e vitrificação, respectivamente. Propágulos regenerantes após o congelamento em nitrogênio líquido são anômalos e após pequeno crescimento da plântula apresentam oxidação dos tecidos e não possuem evolução de crescimento. Os danos oxidativos observados nos protocolos investigados podem ter inviabilizado os tecidos criopreservados, mesmo que parte dos tecidos expostos em nitrogênio líquido aparente viabilidade, ocorre baixa ou nula regeneração de tecidos. A compreensão do grau de sensibilidade de materiais para soluções vitrificantes é o primeiro passo para otimização dos protocolos de vitrificação, no presente estudo a desidratação por 15 minutos em solução ½ PVS2 seguido de 30 minutos em PVS2 apresentou os melhores resultados para o porta-enxerto IAC 571-6.

Palavras-chave: *Vitis*; encapsulamento-desidratação; vitrificação; meio de cultura; micropropagação.

ABSTRACT

New plantings of vineyards bump in low productivity and poor quality of the grapes produced, due to the action of complex factors that are not well understood. Among these, the viruses are a major barrier to the development and highly profitable production in viticulture. By *in vitro* techniques it is possible to produce plants and multiply matrices of high quality vine plant. Cryotherapy, based cryopreservation methods, it is a promising tool for obtaining high frequency regenerating plants free of viruses in a short time. The paper proposes the development of a protocol for efficient recovery viruses vine plants through cryotherapy methods. The experiments were conducted in Biotechnology EPAGRI Laboratory, Experimental Station of Lages. The selection of genotypes was through the presence of different viral species (GLRaV-1, GLRaV-3, GFKV; GFLV and GVA) by serological ELISA test. The study is divided into two complementary chapters with information that follows the chronological order. The first aims to assess the establishment and multiplication *in vitro* and *ex vitro* acclimatization of grape genotypes through nodal segments cultivated in five formulations of culture media without added growth regulators. In Chapter I, in addition to selecting the best saline formulation that will be used in Chapter II for the grape varieties, is apresenterntada an updated review of the topics covered at work, with information available to the present. In the second chapter, cryotherapy different methods investigated for *vitis* were applied, with the objective of defining a standard protocol for the eradication of viruses in potential genotypes. *In vitro* propagation of the rootstock IAC 571-6 and cultivars Poloskei Muskotaly and Bordô through nodal segments provide high rates of regeneration and rooting, suggesting no need to use growth regulators that promote rooting or specific phase for

rooting. Percentage of high survival were obtained in the acclimatization of IAC 571-6 rootstock and cvs. Poloskei Muskotaly and Bordô. Considering all variables, the formulation that provided the best growth and development of root and shoot better and in vitro multiplication of IAC 571-6 vine rootstock and cv. Poloskei Muskotaly was Roubelakis composition and for the cv. Bordô were to Roubelakis and Zlenko formulations. The results of cryotherapy experiments to cultivars in question reaffirm the specificity of genotypic responses to cryogenic procedures. Rates between 6% and 10% were achieved for regenerating rootstock IAC 571-6 through encapsulation methodologies, dehydration and vitrification, respectively. Propagules regenerating after freezing in liquid nitrogen are anomalous and after small seedling growth from corrosion of tissues and lack of evolution crespimento. Oxidative damage observed in the investigated protocols may be unfeasible cryopreserved tissues, even if part of the exposed tissues are viable in apparent liquid nitrogen is low or no regeneration of tissues. Understanding the degree of sensitivity of materials to vitrificantes solutions is the first step towards optimization of vitrification protocols in this study dehydration for 15 minutes in ½ PVS2 solution followed by 30 minutes PVS2 showed the best results for the rootstock IAC 571-6.

Keywords: *Vitis*, encapsulation-dehydration; vitrification; culture médium; micropropagation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	61
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	65
2.1 VITICULTURA CATARINENSE E A SITUAÇÃO ATUAL	65
2.2 MOLÉSTIAS VIRAIS	67
2.3 CRIOTERAPIA	72
2.3.1 Crioterapia por vitrificação.....	78
2.3.2 Crioterapia por encapsulamento-desidratação	81
2.3.3 Crioterapia por encapsulamento-vitrificação.....	84
2.3.4 Condições gerais para os métodos de crioterapia	86
2.4 REFERÊNCIAS	87
3 CAPÍTULO I - ARTIGO I: PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE CULTIVARES DE VIDEIRA COM POTENCIAL PARA O SUL DO BRASIL	103
3.1 RESUMO	103
3.2 ABSTRACT	104
3.3 INTRODUÇÃO	104
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	106
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	109
3.6 CONCLUSÃO	122
3.7 REFERÊNCIAS	123
3.8 ANEXOS.....	130
4 CAPÍTULO I – ARTIGO II: MEIOS DE CULTURA LIVRES DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NA MICROPROPAGAÇÃO DE VIDEIRA CULTIVAR BORDÔ	171
4.1 RESUMO	171
4.2 ABSTRACT	172
4.3 INTRODUÇÃO	172
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	174

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	176
4.6 CONCLUSÃO	185
4.7 REFERÊNCIAS	186
4.8 ANEXOS.....	192
5 CAPÍTULO II – ARTIGO I: ESTUDOS PRELIMINARES COM TÉCNICAS DE CRIOTERAPIA PARA OBTENÇÃO DE PLANTAS DE Videira Livres DE VIROSES.....	213
5.1 RESUMO	213
5.2 ABSTRACT	214
5.3 INTRODUÇÃO	215
5.4 MATERIAL E MÉTODOS	218
5.4.1 Detecções das cargas virais pelo teste sorológico ELISA.....	219
5.4.1.1 Fonte de antígeno	219
5.4.1.2 Detecção do GLRaV-1; GLRaV-3 e GFLV	219
5.4.1.3 Detecção do GVA	220
5.4.1.4 Detecção do GFkV	221
5.4.1.5 Identificação das amostras virosadas	222
5.4.2 Formação das mudas para retirada de esplantes....	222
5.4.2.1 Estabelecimento <i>in vitro</i> das plantas matrizes	222
5.4.3 Crioterapia.....	223
5.4.3.1 Experimento 1 – Método de encapsulamento- desidratação.....	223
5.4.3.2 Experimento 2 – Método de vitrificação.....	224
5.4.3.3 Experimento 3 – Métodos de encapsulamento- desidratação e vitrificação.....	225
5.4.3.4 Experimento 4 – Métodos de encapsulamento- desidratação, vitrificação e encapsulamento-vitrificação.....	226
5.4.3.5 Experimento 5 – Método de vitrificação.....	228
5.4.3.6 Experimento 6 – Método de vitrificação.....	228
5.4.4 Avaliação da sobrevivência e regeneração.....	230
5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	230
5.5.1 Diagnose através do teste sorológico ELISA.....	230
5.5.2 Aplicações dos experimentos de crioterapia	233

5.5.2.1 Experimento 1 – Método de encapsulamento-desidratação	233
5.5.2.2 Experimento 2 – Método de vitrificação.....	235
5.5.2.3 Experimento 3 – Métodos de encapsulamento-desidratação e vitrificação.....	238
5.5.2.4 Experimento 4 – Métodos de encapsulamento-desidratação, vitrificação e encapsulamento-vitrificação.....	240
5.5.2.5 Experimento 5 – Método de vitrificação.....	242
5.5.2.6 Experimento 6 – Método de vitrificação.....	245
5.5.3 Síntese dos resultados.....	247
5.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	249
5.7 REFERÊNCIAS	252

3 CAPÍTULO I – ARTIGO I: PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE CULTIVARES DE Videira COM POTENCIAL PARA O SUL DO BRASIL

3.1 RESUMO

A micropropagação é uma ferramenta biotecnológica importante para a obtenção e manutenção de plantas matrizes de videira de alta qualidade fitossanitária. O objetivo do trabalho foi avaliar o estabelecimento e a multiplicação *in vitro* e a aclimatização *ex vitro* de genótipos de videira com potencial para o Sul do Brasil. Segmentos nodais de videira foram cultivados em cinco formulações de meios de cultura sem adição de reguladores de crescimento. Foram avaliados o número de folhas e de raízes, comprimento da maior raiz e da parte aérea, taxa de replicação, índice relativo de clorofila, biomassa seca da parte aérea, radicular e total, porcentagem de plantas regeneradas e enraizadas, de plantas cultivadas *in vitro* e após aclimatização. A propagação *in vitro* do porta-enxerto IAC 571-6 e da cv. Poloskei Muskotaly, por meio de segmentos nodais proporcionou elevadas taxas de regeneração e enraizamento. Elevadas taxas de sobrevivência foram obtidas na aclimatização de IAC 571-6 e de Poloskei Muskotaly. Considerando-se todas as variáveis analisadas, o meio de cultura descrito por Roubelakis-Angelakis e Zivanovitch (1991) proporcionou os melhores índices de crescimento e desenvolvimento da parte aérea e radicular e taxa de multiplicação *in vitro* das cultivares de videira IAC 571-6 e Poloskei Muskotaly.

Palavras-chave: IAC 571-6, Poloskei Muskotaly, cultivo *in vitro*, *Vitis*.

IN VITRO PROPAGATION OF GRAPEVINE CULTIVARS WITH POTENTIAL FOR THE SOUTH OF BRAZIL

3.2 ABSTRACT

The micropropagation is an important biotechnological tool for obtaining and maintaining stock plants of high quality plant vine. The objective was to evaluate the establishment and multiplication in vitro and ex vitro acclimatization of grape genotypes with potential for southern Brazil. Vine nodal segments were cultured on five formulations of culture media without added growth regulators. We evaluated the number of leaves and roots, length of roots and shoots, replication rate, relative chlorophyll index, percentage of regenerated and rooted plants, dry biomass of shoot, root and total plants grown in vitro and after acclimatization. In vitro propagation of IAC 571-6 rootstock and cv. Poloskei Muskotaly through nodal segments provided high rates of regeneration and rooting. High survival rates were obtained in the acclimatization of IAC 571-6 and Pölöskei Muskotaly. Considering all the variables analyzed, the culture medium described by Roubelakis-Angelakis and Zivanovits (1991) showed the best growth rates and development of shoot and root and multiplication rate in vitro grape varieties IAC 571-6 and Poloskei Muskotaly.

Keywords: IAC 571-6, Poloskei Muskotaly, *in vitro* culture, *Vitis*.

4 CAPÍTULO I – ARTIGO II: MEIOS DE CULTURA LIVRES DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NA MICROPROPAGAÇÃO DE VIDEIRA CULTIVAR BORDÔ

4.1 RESUMO

A micropropagação é uma ferramenta biotecnológica importante para a obtenção e manutenção de plantas matrizes de videira de alta qualidade fitossanitária. O objetivo do trabalho foi avaliar o estabelecimento e a multiplicação *in vitro* e a aclimatização *ex vitro* da videira cv. Bordô em diferentes meios de cultura. Segmentos nodais foram cultivados em cinco formulações de meios de cultura sem adição de reguladores de crescimento. Foram avaliados o número de folhas e de raízes, comprimento da maior raiz e da parte aérea, taxa de replicação, índice relativo de clorofila, biomassa seca da parte aérea, radicular e total, porcentagem de plantas regeneradas e enraizadas, de plantas cultivadas *in vitro* e após aclimatização. A propagação *in vitro* da cv. Bordô através de segmentos nodais proporcionou elevadas taxas de regeneração e enraizamento. Elevadas taxas de sobrevivência foram obtidas na aclimatização da cv. Bordô. Considerando todas as variáveis analisadas, as formulações salinas Roubelakis e ZL proporcionaram o melhor crescimento e desenvolvimento da parte aérea e radicular e taxa de multiplicação *in vitro* da cultivar de videira Bordô.

Palavras-chave: Bordô, Cultivo *in vitro*, Vitis, multiplicação, aclimatização

FREE CULTURE MEDIA GROWTH REGULATORS ON THE VINE MICROPROPAGATION CULTIVATE BORDÔ

4.2 ABSTRACT

The micropropagation is an important biotechnological tool for obtaining and maintaining stock plants of high quality plant vine. The objective was to evaluate the establishment and multiplication in vitro and ex vitro acclimatization of grape cv. Bordô in different culture media. Nodal segments were cultured on five formulations of culture media without added growth regulators. We evaluated the number of leaves and roots, length of roots and shoots, replication rate, relative chlorophyll index, percentage of regenerated and rooted plants, dry biomass of shoot, root and total plants grown in vitro and after acclimatization. In vitro propagation of cv. Bordô through nodal segments provided high rates of regeneration and rooting. High survival rates were obtained in the acclimatization of cv. Bordô. The variables analyzed, the salt formulations Roubelakis and ZL provided the best growth and development of shoots and roots and in vitro multiplication rate of cultivar vine Bordô.

Keywords: Bordô, *in vitro* culture, *Vitis*, culture media.

5 CAPÍTULO II – ARTIGO I

ESTUDOS PRELIMINARES COM TÉCNICAS DE CRIOTERAPIA PARA OBTENÇÃO DE PLANTAS DE Videira Livres de Viroses

5.1 RESUMO

Por meio de técnicas de cultura de tecidos *in vitro* é possível produzir e multiplicar plantas matrizes de videira de alta qualidade fitossanitária. A crioterapia, baseada em métodos de criopreservação, torna-se uma ferramenta promissora para obtenção de alta frequência de plantas regenerantes livres de viroses, em curto espaço de tempo. O presente estudo tem por objetivo avaliar diferentes métodos de crioterapia para recuperação de materiais virosados de cultivares de videira com potencial de interesse agrônomico. Os resultados dos experimentos para as cultivares Poloskei Muskotaly, Bordô e IAC 571-6 reafirmam a especificidade das respostas dos genótipos aos procedimentos criogênicos. Taxas entre 6 % a 10 % de regenerantes foram atingidas para o porta-enxerto IAC 571-6, por meio das metodologias de encapsulamento-desidratação e vitrificação. Propágulos que regeneraram após o congelamento em nitrogênio líquido apresentaram brotações anômalas, que após pequeno crescimento da plântula foi observada uma constante oxidação dos tecidos, que mais tarde evoluíram por todo o material e não houve evolução de crescimento. Os danos oxidativos observados nos protocolos investigados podem ter inviabilizado os tecidos criopreservados, mesmo que parte dos tecidos expostos em nitrogênio líquido aparente estarem viáveis ocorre baixa ou nula regeneração de tecidos. A compreensão do grau de sensibilidade de materiais para soluções vitrificantes é o primeiro passo para otimização dos protocolos de vitrificação e, no presente estudo a desidratação

por 15 minutos em solução ½ PVS2 seguido de 30 minutos em PVS2 apresentou os melhores resultados para o porta-enxerto IAC 571-6.

Palavras-chave: *Vitis*, encapsulamento-desidratação, encapsulamento-vitrificação, vitrificação.

PRELIMINARY STUDIES WITH CRYOTHERAPY TECHNIQUES TO ACHIEVE GRAPEVINE PLANT FREE VIRUSES

5.2 ABSTRACT

By *in vitro* techniques it is possible to produce plants and multiply matrices of high quality grapevine plant. Cryotherapy, based cryopreservation methods, it is a promising tool for obtaining high frequency regenerating plants free of viruses in a short time. This study aims to evaluate different methods of cryotherapy for recovering of viruses materials with potential agronomic interest. The results of the experiments for cultivars Poloskei Muskotaly, Bordô and IAC 571-6 reaffirm the specificity of genotypic responses to cryogenic procedures. Rates between 6% and 10% were achieved for regenerating rootstock IAC 571-6 through encapsulation methodologies, dehydration and vitrification. Propagules that have regenerated after freezing in liquid nitrogen showed abnormal shoots, which after small seedling growth was observed a constant oxidation of the tissues, which later evolved throughout the material and there was no evolution of crespimento. Oxidative damage observed in the investigated protocols may be unfeasible cryopreserved tissues, even if part of the exposed tissues are viable in apparent liquid nitrogen is low or no regeneration of tissues. Understanding the degree of sensitivity of materials to vitrificantes solutions is the first step towards optimization of vitrification protocols in this

study dehydration for 15 minutes in ½ PVS2 solution followed by 30 minutes PVS2 showed the best results for the rootstock IAC 571-6.

Keywords: *Vitis*, encapsulation-dehydration, encapsulation-vitrification, vitrification.