

STEFAN LUCIUS BURKHARDT

**Avaliação de porta-enxertos de videira *in vitro*
em condições de estresse por alumínio**

FLORIANÓPOLIS

2001

STEFAN LUCIUS BURKHARDT

**Avaliação de porta-enxertos de videira *in vitro*
em condições de estresse por alumínio**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de Santa Catarina,
visando a obtenção de grau de Mestre em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Maraschin

FLORIANÓPOLIS

2001

SC00058530-1

183002

AQUISIÇÃO POR DOAÇÃO
DOADO POR _____

02 JUL. 2002

REGISTRO 0-345.029.6

DATA DO REGISTRO 3.7.002

Burkhardt, Stefan Lucius

Avaliação de porta-enxertos de videira *in vitro* em condições de estresse por alumínio / Stefan Lucius Burkhardt. Florianópolis, 2001.

75p.

Dissertação (Mestrado – Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina .

1. *Vitis*. 2. Toxicidade. 3. Seleção. 4. Propagação

**"Comportamento de Porta-enxertos de Videira *in vitro*
em Condições de Estresse por Alumínio "**

POR

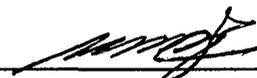
STEFAN LUCIUS BURKHARDT

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pelo Orientador e membros
da Comissão Examinadora.**

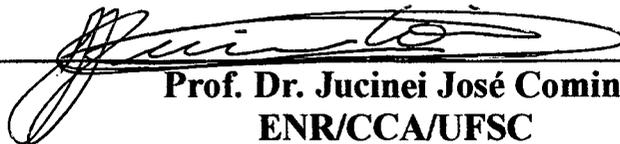
Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva
Orientador - FTT/CCA/UFSC



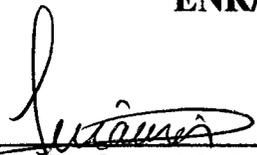
Dr. Murillo Albuquerque Regina
EPAMIG/Caldas/MG



Prof. Dr. Jucinei José Comin
ENR/CCA/UFSC



Prof. Dr. Paulo Emilio Lovato
ENR/CCA/UFSC



Prof. Dr. Artur Smânia Júnior - MIP/CCB/UFSC
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC

Florianópolis, agosto de 2001

Aos meus pais,
Lucio e Anancir,
e a minha irmã Nancy.
A vocês, todo o meu amor.

Agradecimentos:

Primeiramente a Deus, pelo equilíbrio e perseverança concedidos nos momentos mais difíceis. além de todo o amor.

Ao Prof. Aparecido Lima da Silva, não apenas pelos ensinamentos, imprescindíveis na execução dos trabalhos, mas também pela oportunidade concedida. Além da presença, amizade, companheirismo, e principalmente por aquela palavra amiga nos momentos de tribulação.

Ao Prof. Marcelo Maraschin, que contribuiu grandemente, com idéias e sugestões valiosas, as quais mudaram a execução e os andamentos do trabalho.

Ao Prof. Jucinei José Comin, pela grande colaboração científica e material.

Ao pesquisador Antônio Lourenço Guidoni que, pela atenção, disponibilidade e energia concedida, auxiliou na verificação de informações valiosas presentes no trabalho.

A toda a equipe do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, pelo auxílio nos trabalhos práticos e bela convivência.

Ao Sr. João Santana, pela paciência, ajuda e serviços prestados na secretaria da Pós-graduação.

Aos colegas de curso que contribuíram para a realização do trabalho.

A minha família pelo apoio incondicional.

A minha namorada Diane, pelo amor e incentivo.

As pessoas que mesmo indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
I – INTRODUÇÃO.....	13
II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
II.1. Alumínio e videira.....	16
II.2. Propagação da videira.....	17
II.3. Propagação <i>in vitro</i> de videira.....	18
II.4. Cultura e seleção <i>in vitro</i> de videira.....	18
II.5. Efeitos adversos da toxicidez por alumínio.....	19
II.6. Mecanismos da tolerância ao alumínio.....	20
II.6.1. Exclusão do alumínio via alteração do pH.....	21
II.6.2. Exsudação de quelantes.....	22
II.6.3. Permeabilidade seletiva da membrana plasmática.....	23
III. OBJETIVOS.....	25
III.1. Geral.....	25
III.2. Específicos.....	25
IV - MATERIAL E MÉTODOS.....	26
IV.1. Material vegetal.....	26
IV.2. Cultura <i>in vitro</i>	27
IV.3. Concentrações de alumínio.....	28
IV.4. Aplicações dos tratamentos.....	29
IV.5. Avaliação dos tratamentos.....	30
IV.6. Avaliação do pH e atividades de alumínio.....	31
IV.7. Análise estatística.....	31
V - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
V.1. Avaliação dos porta-enxertos de videira Paulsen 1103 e Gravesac a <i>in vitro</i>	32

V.1.2. Avaliação dos estômatos e aclimatização dos porta- enxertos de Paulsen 1103 e Gravesac a <i>in vitro</i>	34
V.1.3. Conclusões.....	37
V.2. Avaliação de explantes dos porta-enxertos videira Paulsen 1103 e Gravesac introduzidas <i>in vitro</i> em meio com alumínio.....	38
V.2.1. Conclusões.....	40
V.3. Avaliação do pH e atividades de Al ⁺³ no meio de cultura <i>in vitro</i>	41
V.3.1. Atividades de alumínio em meio de cultura <i>in vitro</i> para Gravesac e Paulsen 1103.....	41
V.3.2. Conclusões.....	45
V.4. Avaliação de plantas dos porta-enxertos videira Paulsen 1103 e Gravesac introduzidas <i>in vitro</i> em meio com alumínio.....	46
V.4.1. Efeito do alumínio no sistema radicular.....	46
V.4.2. Efeito do alumínio no crescimento do caule.....	51
V.4.3. Efeito do alumínio no crescimento das folhas.....	52
V.4.4. Efeito do alumínio sobre as variáveis compostas.....	54
V.4.5. Conclusões.....	58
VI - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
VIII - ANEXOS.....	73

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01** - Explantes de videira *in vitro* em meio líquido com uso de filtros de cortiça. UFSC - Fpolis/SC..... 28
- Figura 02** - Plantas *in vitro* de Paulsen 1103 aos 60 dias de cultura em meio líquido filtros de cortiça. UFSC - Fpolis/SC..... 29
- Figura 03** - Densidades estomáticas das variedades Gravesac e Paulsen 1103 *in vitro* (IV) e *ex vitro* (EV) em casa de vegetação. UFSC - Fpolis/SC..... 35
- Figura 04** - Taxas de sobrevivência das variedades Paulsen 1103 e Gravesac originárias de multiplicação *in vitro* durante a fase de aclimatização. UFSC - Fpolis/SC..... 37
- Figura 05** - Relação do peso fresco total (mg), em função das concentrações de Al (mM). Var. **Paulsen 1103** e **Gravesac**. UFSC - Fpolis/SC..... 39
- Figura 06** - Relação do peso seco total (mg), em função das concentrações de Al (mM). Var. **Paulsen 1103** e **Gravesac**. UFSC – Fpolis/SC..... 39
- Figura 07** - Atividades de Al⁺³ estimadas em cultura *in vitro* da var. **Gravesac** nas concentrações de alumínio entre 0,250mM e 1,00mM. UFSC – Fpolis/SC. 43
- Figura 08** - Atividades de Al⁺³ estimadas em cultura *in vitro* da var. **Gravesac** nas concentrações de alumínio de 1,200mM e 1,375mM. UFSC – Fpolis/SC... 44
- Figura 09** - Atividades de Al⁺³ estimadas em cultura *in vitro* da var. **Paulsen 1103** nas concentrações de alumínio entre 0,250mM e 1,00mM. UFSC – Fpolis/SC..... 45
- Figura 10** - Atividades de Al⁺³ estimadas em cultura *in vitro* da var. Paulsen 1103 nas concentrações de alumínio entre 0,250mM e 1,00mM. UFSC - Fpolis/SC.. 46
- Figura 11** - Relação de N° de Raízes Secundárias em função das concentrações de Al (mM) na var. **Gravesac in vitro**. UFSC - Fpolis/SC..... 47
- Figura 12** - Relação de N° de Raízes Totais em função das concentrações de Al (mM) na var. **Gravesac in vitro**. UFSC – Fpolis/SC..... 47
- Figura 13** - Sintomas de toxicidez de alumínio no sistema radicular de porta-enxerto de videira Paulsen 1103 *in vitro*. Grande número de raízes laterais curtas e grossas (atrofiadas) com coloração escura. Concentração de Al = 0,425mM. UFSC – Fpolis/SC..... 49

- Figura 14** - Sintomas de morte do meristema apical com emissão de uma nova raiz próxima ao ápice radicular em porta-enxerto de videira Paulsen 1103 *in vitro*. Evidenciado em (A) a nova raiz que apresenta tamanho semelhante a original. Em (B) mudança típica de coloração da nova raiz. Concentração de Al=0,425mM. UFSC - Fpolis/SC..... 49
- Figura 15** - Sintomas de morte do meristema apical com emissão de uma nova raiz em porta-enxertos de videira Paulsen 1103 *in vitro* (A). Em (B) a emissão de uma raiz secundária de maior diâmetro que a raiz principal, e sinais de lesões no sistema radicular. Concentração de Al =1,00mM. UFSC - Fpolis/SC..... 49
- Figura 16** - Sintomas de morte do meristema apical com emissão de uma nova raiz muito próxima ao ápice radicular em porta-enxertos de videira Paulsen 1103 *in vitro* (A). Em (B) e (C) detalhes da formação de novas raízes. Concentração de Al=1,00mM. UFSC - Fpolis/SC..... 50
- Figura 17**- Sintomas causados pela toxicidez por alumínio em porta-enxertos de videira Paulsen 1103 *in vitro*. (A) paralisação do crescimento apical radicular; as concentrações de alumínio são respectivamente de 0,425 mM, 0,650 mM, e 1,375 mM. (B) raízes anormais e de coloração escura (Al = 1,2 mM). UFSC - Fpolis/SC..... 50
- Figura 18** - Sintomas causados pela toxicidez por alumínio em porta-enxertos de videira Gravesac *in vitro*. (A) paralisação do crescimento apical radicular (Al=0,250mM). (B) raízes anormais e de coloração escura (Al = 0,425 mM). (C) detalhes de raízes com crescimento apical paralisado no meio de cultura (Al=0,425 mM). UFSC – Fpolis/SC..... 51
- Figura 19** - Relação do peso seco do caule (mg) em função das concentrações de Al (mM) na var. **Gravesac** *in vitro*. UFSC - Fpolis/SC..... 52
- Figura 20** - Relação do peso seco do caule (mg) em função das concentrações de Al (mM) na var. **Paulsen 1103** *in vitro*. UFSC - Fpolis/SC..... 52
- Figura 21** - Relação da Área Foliar (cm²), em função das concentrações de Al (mM) para a var. **Gravesac** *in vitro*. UFSC - Fpolis/SC..... 53
- Figura 22** - Relação da Área Foliar (cm²), em função das concentrações de Al (mM) para a var. **Paulsen 1103** *in vitro*. UFSC - Fpolis/SC..... 53
- Figura 23** - Relação do peso seco das folhas (mg) em função das concentrações de Al (mM) na var. **Gravesac** *in vitro*. UFSC – Fpolis/SC..... 55
- Figura 24** - Relação do peso seco das folhas (mg) em função das concentrações de Al (mM) na var. **Paulsen 1103** *in vitro*. UFSC - Fpolis/SC..... 55
- Figura 25** - Relação do peso seco da parte aérea (caule + folhas), em função das concentrações de Al (mM) na var. **Gravesac** *in vitro*. UFSC - Fpolis/SC... 56

Figura 26 - Relação do peso seco da parte aérea (caule + folhas), em função das concentrações de Al (mM) na var. Paulsen 1103 <i>in vitro</i> . UFSC – Fpolis/SC.....	56
Figura 27 - Relação do peso seco da parte aérea (Caule+Folhas), em função das atividades de Al ⁺³ corrigidas pelos valores de pH. Var. Gravesac <i>in vitro</i> . UFSC - Fpolis/SC.....	57
Figura 28 - Relação do peso seco da parte aérea (Caule+Folhas), em função das atividades de Al ⁺³ corrigidas pelos valores de pH. Var. Paulsen 1103 <i>in vitro</i> . UFSC - Fpolis/SC.....	57
Figura 29 - Relação peso seco raízes/peso seco total, em função das concentrações de Al (mM) para a var. Gravesac <i>in vitro</i> . UFSC - Fpolis/SC.....	58
Figura 30 - Relação peso seco raízes/peso seco total, em função das concentrações de Al (mM) para a var. Paulsen 1103 <i>in vitro</i> . UFSC - Fpolis/SC.....	58
Figura 31 - Variação do pH em função dos dias, para a variedade Gravesac . Tratamento Al=0 (testemunha). UFSC - Fpolis/SC.....	75
Figura 32 - Variação do pH em função dos dias, para a variedade Gravesac . Tratamento Al=0,250 mM. UFSC - Fpolis/SC.....	75
Figura 33 - Variação do pH em função dos dias, para a variedade Gravesac . Tratamento Al=0,425 mM. UFSC - Fpolis/SC.....	75
Figura 34 - Variação do pH em função dos dias, para a variedade Gravesac . Tratamento Al=0,650 mM. UFSC - Fpolis/SC.....	75
Figura 35 - Variação do pH em função dos dias, para a variedade Gravesac . Tratamento Al=1,0 mM. UFSC - Fpolis/SC.....	75
Figura 36 - Variação do pH em função dos dias, para a variedade Gravesac . Tratamento Al=1,2 mM. UFSC - Fpolis/SC.....	75
Figura 37 - Variação do pH em função dos dias, para a variedade Gravesac . Tratamento Al=1,375 mM. UFSC - Fpolis/SC.....	75
Figura 38 - Variação do pH em função dos dias, para a variedade Paulsen 1103 . Tratamento Al = 0 (testemunha). UFSC - Fpolis/SC.....	76
Figura 39 - Variação do pH em função dos dias, para a variedade Paulsen 1103 . Tratamento Al = 0,250 mM. UFSC - Fpolis/SC.....	76
Figura 40 - Variação do pH em função dos dias, para a variedade Paulsen 1103 . Tratamento Al = 0,425 mM. UFSC - Fpolis/SC.....	76

- Figura 41** - Variação do pH em função dos dias, para a variedade **Paulsen 1103**.
Tratamento Al = 0,650 mM. UFSC - Fpolis/SC..... 76
- Figura 42** - Variação do pH em função dos dias, para a variedade **Paulsen 1103**.
Tratamento Al = 1,0mM. UFSC - Fpolis/SC..... 76
- Figura 43** - Variação do pH em função dos dias, para a variedade **Paulsen 1103**.
Tratamento Al = 1,2mM. UFSC - Fpolis/SC..... 76
- Figura 44** - Variação do pH em função dos dias, para a variedade **Paulsen 1103**.
Tratamento Al = 1,375 mM. UFSC- Fpolis/SC..... 76

RESUMO

A vitivinicultura brasileira é uma atividade consolidada de grande importância sócio-econômica para os Estados do Rio Grande dos Sul e Santa Catarina. Nestes dois Estados, a videira está implantada em condições de solos heterogêneos, pouco profundos, pedregosos e predominantemente ácidos. Nos solos ácidos, são vários os fatores que limitam o crescimento das plantas. Entretanto, verifica-se que a toxicidade por alumínio é o fator limitante de maior importância para a produtividade das culturas.

Aliado aos problemas apresentados pelos nossos solos, as variedades de porta-enxertos recomendadas para o Brasil foram selecionadas, principalmente na Europa, para condições de solos calcários, bem diferentes das encontradas nas regiões de produção do Sul do Brasil. Assim, a busca de metodologias adequadas para a seleção de porta-enxertos de videira adaptados a nossas condições é de suma importância.

O objetivo deste trabalho foi estudar metodologias *in vitro* para a avaliação do comportamento de porta-enxertos de videira ao estresse por alumínio, visando contribuir para o processo de seleção de novos genótipos e a compreensão dos mecanismos envolvidos na tolerância.

A metodologia de avaliação proposta esta baseada em técnicas de cultivo *in vitro*, que apresentam facilidade, rapidez e confiabilidade, quando comparadas a outras metodologias utilizadas. Tal abordagem tem demonstrado ser um método viável e capaz de verificar diferenças quanto à tolerância de porta-enxertos de videira ao estresse por metais.

Foram utilizados os porta-enxertos Gravesac e Paulsen 1103, introduzidos e multiplicados *in vitro*. Verificou-se que a utilização de explantes submetidos diretamente ao meio de cultura com alumínio apresentou problemas na avaliação de toxicidade de Al^{+3} , provavelmente devido à inexistência de sistema radicular e a diferenças entre os explantes (idade, fatores fisiológicos e bioquímicos). A utilização de plantas com 30 dias de cultura *in vitro* apresentou resultados que permitiam verificar diferenças entre as variedades quanto à suscetibilidade ao alumínio. Esta metodologia foi capaz de reproduzir *in vitro*, sintomas de toxicidade por alumínio similares aos observados em casa de vegetação e a campo, provando ser uma metodologia eficaz para avaliar os efeitos do íon Al^{+3} em plantas *in vitro* de videira.

Foram observadas diferenças de respostas ao alumínio entre os porta-enxertos. Os efeitos fitotóxicos do alumínio podem ser explicados pelas atividades do íon Al^{+3} , e os mecanismos de tolerância, apresentados pelas variedades Gravesac e Paulsen 1103 *in vitro*, estão relacionados com o potencial de elevação do pH do meio de cultura e com reduções das atividades de Al^{+3} .

ABSTRACT

Brazilian viticulture is a consolidated activity of great social and economical importance for the states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina. In these two States, grapevine is cultivate in heterogeneous soils conditions, with few depth and predominantly acids. Several factors limit the plant growth in acid soils. However, was verified that the aluminum toxicity is the most important limiting factor for the cultures productivity.

Added to those soil problems, we have the fact that the recommended rootstocks varieties in Brazil, were mainly selected in Europe conditions with calcareous soils, very much different from the founded in the production places of the Brazilian South. Then, the development of adjusted methodologies for the selection of grapevine rootstocks adapted for our conditions have a great importance.

The objective of this work was the study of the *in vitro* methodologies for the evaluation of grapevine rootstocks performance with aluminum stress, seeking to contribute for the new genotypes selection process and the understanding of the invoiced tolerance mechanisms.

The evaluation methodology proposed at this work is based on *in vitro* culture techniques, that present easily, speed and reliability, when compared with another used methodologies. This technique has been demonstrate to be a viable and capable method to verify differences for the stress metais tolerance of grapevine rootstocks.

The used rootstocks were Gravesac and Paulsen 1103, introduced and multiplied *in vitro*. It was verified that the use of explants submitted directly in the culture medium with aluminum, showed problems for evaluation Al toxicity. Probably in reason to the absence of radicular system and the differences among the explants (age in days, physiologic and biochemical factors). The use of *in vitro* cultivated plants with thirty days age, presented the results that permitted to verify differences among the varieties to the aluminum susceptibility. This methodology is able to reproduce *in vitro* toxicity symptoms seems to the observed at greenhouse and in the field. Proving to be an efficient method to available the effects of Al^{+3} at *in vitro* grapevine plants

The fitotoxicant effects of the aluminum can be explained by the Al^{+3} ion activities, and the tolerance mechanisms presented *in vitro* by the Gravesac and Paulsen 1103 varieties are related with the potential of elevation of the pH of the culture medium and reduction of the Al^{+3} activities.

I - INTRODUÇÃO:

A vitivinicultura brasileira é uma atividade consolidada e de grande importância sócio-econômica para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Nestes Estados estão envolvidas, aproximadamente, 18 mil famílias, com a geração de 320 mil empregos diretos, nos 40.600 ha ocupados com a atividade. Historicamente, a viticultura se constitui numa exploração agrícola fixadora do homem à terra, caracterizando-se pela produção familiar, com o emprego intensivo de mão-de-obra, gerando renda elevada com a utilização de pequenas áreas (ROSIER & LOSSO, 1997; DESPLOBINS, 2001).

No ano de 1998, a área ocupada pela videira no País foi de 57.929 ha, sendo grande parte desta implantada nos Estados do Rio Grande do Sul, com 58,1%, e Santa Catarina, com cerca de 5,2 % (ICEPA-SC, 1999). Estes Estados são também responsáveis pela maior parte da produção nacional de vinho, em torno de 98% de um mercado em plena expansão.

Nestes dois Estados da Região Sul a videira está implantada em condições de solos heterogêneos, pouco profundos, pedregosos e predominantemente ácidos com pH em torno de 5,0 (DESPLOBINS, 2001). Nos solos ácidos, os fatores que limitam o crescimento das plantas englobam a toxicidade do alumínio, do manganês, o baixo pH (toxicidade do H⁺) e as carências ou a não disponibilidade de alguns nutrientes essenciais como o cálcio, o magnésio, o fósforo e o molibdênio (WRIGHT, 1989). Entretanto, nestes solos a toxicidade por alumínio é o fator limitante de maior importância para a produtividade das culturas (FOY, 1988; KOCHIAN, 1995; FRÁGUAS, 1999).

Na viticultura catarinense verificou-se, a partir de 1985, uma acentuada queda de produtividade dos vinhedos e uma redução da área plantada de aproximadamente 1500 ha, o que representava cerca de 30% da área total (LOSSO, 1994). As causas estavam relacionadas com a menor rentabilidade no mercado de vinhos, baixa produtividade em função de viroses presentes na maioria dos vinhedos, morte de plantas devido ao declínio causado pela ocorrência da Fusariose (*Fusarium oxysporum* Sch. f.sp. *herbemontis*), da Margarodes (*Eurhizococcus brasiliensis*) e, principalmente, pela falta de porta-enxertos resistentes e/ou tolerantes a patógenos, e também fatores nutricionais relacionados às características dos solos (GALLOTTI & SCHUCK, 1991; SCHUCK *et al.* 1993; ROSIER & LOSSO, 1997; CEDERURAL, 1999).

A partir de 1998/99, verifica-se uma reversão do quadro pessimista que dominava o setor vitivinícola catarinense, com a expansão da área plantada impulsionada pelo

crescimento da demanda de uvas para vinho, suco e mesa. O mercado está mais dinâmico e favorável ao vinho e ao suco, e o setor industrial está se aprimorando através de novas tecnologias de produção. Observa-se que todos estes fatores, somados ao aumento do consumo de vinhos de melhor qualidade, definem um mercado atrativo para novos plantios nas diferentes regiões produtivas de Santa Catarina (CEDERURAL, 1999).

Para o plantio e a renovação dos vinhedos catarinenses existe uma grande demanda de mudas, principalmente de qualidade genética e sanitária comprovada. Entretanto, para os porta-enxertos observa-se o seguinte problema: as variedades recomendadas para o Brasil foram selecionadas principalmente na Europa, para condições de solos calcários, bem diferentes das encontradas nas regiões de produção do Sul do Brasil, caracterizadas por solos ácidos, com baixa CTC (capacidade de troca catiônica) e alta saturação de alumínio.

Para a resolução de alguns dos problemas edáficos, de patógenos e nutricionais que a cultura apresenta, o uso de porta-enxertos resistentes e/ou tolerantes é a alternativa mais promissora e econômica. Isto porque os tratamentos químicos usados (inseticidas, fungicidas, calagem) além de não se mostrarem como a solução definitiva para o problema, acarretam em custos adicionais para a aquisição de produtos e mão-de-obra, gerando problemas aos agricultores e riscos ao ambiente (SCHUCK *et al.*, 1993).

Quanto ao aspecto específico da acidez do solo, verifica-se que a calagem nem sempre é economicamente viável, especialmente nos solos com alta acidez no subsolo, onde esta prática, isoladamente, não é a solução definitiva, devido à baixa solubilidade e mobilidade do calcário no perfil do solo (ALCORDO & RECHIGL, 1993), dificultando a correção da acidez em camadas mais profundas, além dos seus outros efeitos detrimenais na estrutura do solo, e na disponibilidade de fósforo e de vários micronutrientes. Outro agravante é que a calagem precisa ser realizada com alguma periodicidade, prática que se torna impossível na viticultura, tendo em vista a característica perene da cultura.

Portanto, o emprego de genótipos adaptados às condições de solo ácido conjuntamente com a adição de calcário e adubações racionais, são estratégias de maior potencial para a utilização racional dos solos com elevados teores de alumínio trocável (BONA *et al.*, 1991; HOWELER, 1991; KOCHIAN, 1995).

Devido às características da videira (cultura perene, propagação vegetativa), um programa de melhoramento genético clássico com seleção de novos genótipos tolerantes e/ou resistentes e posterior avaliação a campo torna-se bastante oneroso e demorado.

Neste sentido, a biotecnologia, com metodologias de cultura de tecidos e seleção *in vitro*, pode ser de grande valia, permitindo o uso de técnicas que podem auxiliar na obtenção

de processos mais rápidos e precisos para a verificação de materiais genéticos resistentes e/ou tolerantes a fatores bióticos e abióticos do solo.

O grande interesse da seleção *in vitro* está, em princípio, no estabelecimento de testes precoces que permitam ao pesquisador apreciar, uma variabilidade pre-existente ou criada artificialmente, para em seguida, selecionar conforme o interesse desejado (TORREGROSA & BOQUET, 1993). Segundo diversos autores, entre eles TORREGROSA & BOQUET (1993), SINGH *et al.* (2000), PREDIERI (2001), JAIN (2001), a cultura *in vitro* oferece inúmeras vantagens quando comparada aos métodos clássicos de seleção. A seleção *in vitro* pode não substituir os métodos clássicos, mas pode desempenhar um papel complementar muito significativo, auxiliando também na elucidação dos processos fundamentais que conferem a resistência ao alumínio nas plantas.

As contribuições da cultura *in vitro* para um programa de melhoramento e seleção são muito importantes, uma vez que este sistema de produção pode ser facilmente manipulado, permitindo alterar vários fatores independentemente e fazer análises que seriam mais difíceis em outros sistemas de produção. Além disso, apresenta rapidez no ciclo vegetativo, requerer um espaço reduzido nas câmaras de crescimento e produzir uma grande quantidade de plantas num estado fisiológico uniforme, homogêneo e constante durante todo o ano (TORREGROSA & BOQUET, 1993 e LIMA DA SILVA, 1995).

Visando elucidar as principais dificuldades da introdução de novos genótipos, principalmente de porta-enxertos na viticultura, torna-se importante estudar a propagação *in vitro* e o desenvolvimento de novas metodologias de avaliação de genótipos em condições de estresse por alumínio. Diversos autores, entre eles: TORREGROSA & BOQUET (1993); MARTINELLI & MANDOLINO (1994), LIMA DA SILVA & DOAZAN (1995); HERRERA-ESTRELLA *et al.* (1997), TRONCOSO *et al.* (1999), SINGH *et al.* (2000) e PREDIERI (2001), evidenciam e indicam técnicas biotecnológicas como métodos alternativos, confiáveis e rápidos para viabilizar a seleção e a multiplicação da videira em larga escala. Assim, este trabalho busca determinar um método de avaliação do comportamento de porta-enxertos de videira, Paulsen 1103 e Gravesac, em condições estressantes de alumínio *in vitro*.

II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1. Alumínio e videira

O alumínio é o metal mais abundante e o terceiro elemento mais comum na crosta terrestre (KOCHIAN, 1995), compreendendo aproximadamente 7% da sua massa total (DELHAIZE & RYAN 1995), e a sua toxicidez é, provavelmente, o fator limitante mais importante para o crescimento e a produção dos vegetais nos solos ácidos do mundo (HAUG, 1984; FOY, 1988; KOCHIAN, 1995; VON UEXKULL & MUTERT, 1995; FRÁGUAS 1999).

Dados de ADAMS & MOORE (1983) e CURTIN & SMILLIE (1983) demonstram que a concentração total de alumínio na solução do solo está normalmente na faixa de 10-350 μM , porém níveis acima de 1000 μM podem ocorrer em algumas situações como em solos ácidos sulfatados. Em solos ligeiramente ácidos ou neutros, o alumínio total se encontra primariamente nas suas formas insolúveis de aluminossilicatos e óxidos (formas não tóxicas para o crescimento das plantas). No entanto, em solo mais ácido se estabelece um equilíbrio químico entre as formas insolúveis, os íons Al^{+3} na sua forma hexahidratada ($\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{+3}$) e os seus respectivos pares iônicos $\text{Al}(\text{OH})^{+2}$ e $\text{Al}(\text{OH})_2^+$, que são as formas fitotóxicas de alumínio que afetam a raiz e o crescimento da planta (KOCHIAN, 1995). O equilíbrio entre as diferentes espécies de alumínio é fortemente dependente do pH, da composição e concentração dos nutrientes no solo (MARSCHNER, 1991), além de substâncias orgânicas que possam estar presentes na solução do solo. Entretanto, a maioria dos relatos indicam o cátion trivalente como a espécie mais tóxica às plantas (HOWELER, 1991).

Na viticultura, o uso de porta-enxertos é uma prática generalizada. Neste sentido, busca-se a união da característica de resistência e/ou tolerância do porta-enxerto à cultivar produtora (copa), através da enxertia, além da possibilidade de conferir à planta enxertada a adaptação aos solos, maior vigor, produção superior e boa qualidade de frutos. A importância do uso de porta-enxertos para resistência à filoxera, nematóides, seca, umidade, solos calcários, tem sido bastante evidenciada na literatura. No entanto, poucos são os trabalhos sobre os efeitos prejudiciais de solos ácidos, com alumínio (FRÁGUAS, 1999). Verifica-se na literatura, principalmente nacional, a busca de estabelecer metodologias viáveis para analisar o comportamento de porta-enxertos de videira em condições de estresse por alumínio a campo

(FRÁGUAS & TERSARIOL, 1993; FRÁGUAS, 1999) e em soluções nutritivas (COMIN *et al.*, 1999).

Neste sentido, novas metodologias que utilizam soluções nutritivas, inclusive *in vitro*, podem auxiliar na busca de marcadores fisiológicos e bioquímicos para testes precoces de seleção às características desejadas. Igualmente ajudam na definição de níveis de tolerância de porta-enxertos ao alumínio em programas de melhoramento de videira em empresas de pesquisa, tais como: EMBRAPA/BR, EPAGRI/SC, EPAMIG/MG e outras (COMIN *et al.*, 1999).

II.2. Propagação da videira

Para a multiplicação e perpetuação de genótipos superiores da videira, o homem tem se utilizado em grande parte de métodos tradicionais de propagação vegetativa, usando estacas caulinares do porta-enxerto (estaquia) e o enxerto de variedades produtoras (enxertia) a campo. Porém, estes métodos apresentam problemas que são inerentes ao processo, como número limitado de plantas produzidas, maior tempo e mão-de-obra requeridos, fatos que elevam assim o custo de produção, além de apresentar um maior risco de transmissão de patógenos, principalmente as viroses.

Com as técnicas de propagação e multiplicação *in vitro* obtém-se uma taxa de multiplicação muito superior, atingindo milhares de plantas saudáveis, uniformes e homogêneas, originadas a partir de um único explante, em um curto período de tempo e em um espaço físico reduzido, além de permitir o trabalho durante todo o ano (PEIXOTO & PASCAL, 1994; LIMA DA SILVA, 1995). As técnicas de cultura *in vitro* também podem ser utilizadas como importante instrumento para estudos de fisiologia e melhoramento genético vegetal, principalmente com relação a conservação de recursos genéticos (GALZY *et al.*, 1990).

II.3. Propagação *in vitro* de videira

Para a multiplicação *in vitro* de videira, a metodologia mais usada é a propagação de gemas axilares, desenvolvida a partir dos anos 60 na ENSAM – École Nationale Supérieure de l'Agriculture de Montpellier (França), que permite manter e multiplicar *in vitro* variedades e clones de videira por tempo indeterminado através de repicagens sucessivas das plantas (GALZY, 1985).

Muitas formulações de meios de cultura têm sido utilizadas para a micropropagação da videira, como aquelas propostas por MURASHIGE & SKOOG (1962), CHEE & POOL (1985 e 1987), GALZY *et al.* (1990); MHATRE *et al.* (2000), e suas modificações ROUBELAKIS-ANGELAKIS & ZIVANOVIT (1991); LIMA DA SILVA & DOAZAN (1995), ZLENKO *et al.* (1995), DIAZ *et al.* (1997); FEUCHT *et al.* (1998).

Dentre os diferentes reguladores de crescimento utilizados na cultura *in vitro*, o mais utilizado para a micropropagação da videira é a citocinina 6-benzilamino-purina (BAP), usado em concentrações que variam de 0,2 a 0,5 mg/L (PEIXOTO & PASCAL, 1992). Porém, a presença de reguladores de crescimento no meio de cultura pode levar a problemas de instabilidade genética, como mudanças cromossômicas e ploídias (GALZY, 1985; BOUQUET, 1989).

Visando eliminar possíveis distúrbios genéticos, LIMA DA SILVA & DOAZAN (1995) e LIMA DA SILVA (1995), trabalhando com clones de porta-enxertos de videira para multiplicação e seleção *in vitro*, desenvolveram meios de cultura com um balanço de sais que dispensa a utilização de reguladores para que ocorra multiplicação *in vitro*.

II.4. Cultura e seleção *in vitro* de videira

Para diversos autores, entre eles LEBRUN *et al.* (1985); CHIADMI (1986); FALLOT *et al.* (1990) e TORREGROSA e BOQUET (1993) TRONCOSO *et al.* (1999), SINGH *et al.* (2000), PREDIERI (2001), JAIN (2001), a cultura *in vitro* oferece inúmeras vantagens quando comparada aos métodos clássicos de seleção. A seleção *in vitro* pode não substituir os métodos clássicos, mas desempenha um papel complementar muito significativo.

O grande interesse da seleção *in vitro* é, em princípio, no estabelecimento de testes precoces, permitindo assim ao selecionador apreciar, geralmente sobre as culturas *in vitro*.

uma variabilidade pre-existente ou criada artificialmente e, em seguida fazer uma triagem (TORREGROSA & BOQUET, 1993).

De acordo com este ponto de vista, sobre a videira, muito artigos foram publicados desde os anos 80, principalmente no setor fitopatológico, referente às doenças criptogâmicas (FALLOT *et al.*, 1990; VANNEL *et al.*, 1991; BARKA *et al.*, 2000; YAMAMOTO *et al.*, 2000; JAYASANKAR *et al.*, 2000) e fisiológico, como a sensibilidade e a resistência ao cloreto de sódio (LEBRUN *et al.*, 1985; LEBRUN, 1987; SINGH *et al.*, 2000; TRONCOSO *et al.*, 1999), à clorose calcária (CHIADMI, 1986; NETZER *et al.*, 1991; BAVARESCO *et al.*, 1993; DELL'ORTO *et al.*, 2000), ao frio (MUNIZ *et al.*, 1991), à incompatibilidade da enxertia (HASSANI & BOUBALS, 1991; D'KHILI *et al.*, 1994), ao vigor (THOMAS, 2000), ao diagnóstico de viroses (D'KHILI & GREANAN, 1995; TANNE *et al.*, 1996), à resistência as pragas (LOUBSER & MEYER, 1990; ASKANI & BEIDERBECK, 1991), à utilização do CO₂ e a transformação em biomassa (GALZY & COMPAN, 1992; IACONO *et al.*, 1992; LIMA DA SILVA, 1995; LIMA DA SILVA *et al.*, 1996; THOMAS, 1999; MOREIRA, 2000), as características estomáticas (NOVELLO *et al.*, 1992; LIMA DA SILVA & DOAZAN, 1995; LIMA DA SILVA, 1995; FILA *et al.*, 1998).

Em condições de cultura *in vitro* de videira, não foram encontrados na literatura trabalhos relacionados com avaliação de sensibilidade e/ou tolerância ao íon alumínio. Entretanto, metodologias *in vitro* para a videira, mencionadas por diversos autores (TRONCOSO *et al.*, 1999; SINGH *et al.*, 2000), permitiram evidenciar diferenças varietais relacionadas à tolerância ao cloreto de sódio. Para estes autores, o uso da técnica de cultura *in vitro* foi eficiente para a caracterização e a seleção de genótipos.

II.5. Efeitos adversos da toxicidez por alumínio

Os sintomas da toxicidez por alumínio em vegetais muitas vezes não são facilmente identificados (FOY *et al.*, 1978). O sintoma mais expressivo e típico da toxicidez por alumínio, que tem se tornado um importante indicador do estresse, ocorre na raiz que é o principal órgão afetado e tem o seu crescimento inibido (DELHAIZE & RYAN, 1995). O ápice radicular e as raízes laterais engrossam e tomam a coloração marrom/acastanhada, com início de emissão de raízes próximas ao ponto de crescimento da raiz principal (FOY, 1984), fazendo com que o sistema radicular como um todo adquira a aparência atrofiada, com muitas raízes laterais pequenas e deficientes em ramificações finas, com raízes quebradiças, que

apresentam baixa eficiência para a absorção de nutrientes e água (FOY *et al.*, 1978; FOY, 1984).

As altas concentrações de Al^{3+} podem inibir o crescimento radicular diretamente pela inibição da divisão celular ou do alongamento celular, ou também pela combinação destes dois fatores (MARSCHNER, 1991). Como consequência das alterações no desenvolvimento das raízes, o sistema radicular como um todo é pouco desenvolvido e, em condições de campo, podem acarretar reduções significativas na capacidade de exploração de água e nutrientes contidos nas camadas subsuperficiais do solo, induzindo maior suscetibilidade das plantas à deficiência hídrica e nutricional durante períodos curtos de estiagem (veranicos), com reflexos negativos na produtividade (BERTON, 1989). Além de afetar a absorção, o excesso de alumínio ainda interfere no transporte e uso de vários elementos, tais como o cálcio, magnésio, potássio, molibdênio e o ferro (FOY, 1984).

Em algumas espécies, os sintomas foliares são semelhantes aos de deficiência de fósforo: as folhas tornam-se pequenas e há ocorrência de avermelhamento dos caules e nervuras. Em outras espécies, os sintomas de toxicidez por alumínio confundem-se com os de deficiência de cálcio (enrolamento de folhas novas e morte das pontas de crescimento ou dos pecíolos), de ferro (cloroses internervurais) e de deficiência hídrica. Quanto aos aspectos adversos da toxicidez do alumínio no nível celular, muitos mecanismos têm sido hipotetizados, uma vez que o alumínio interage com um grande número de estruturas extra e intracelulares. Estes mecanismos incluem interação do alumínio com a parede celular, interrupção dos processos de transporte da membrana plasmática e interações com os constituintes do citoplasma.

II.6. Mecanismos da tolerância ao alumínio

Os mecanismos fisiológicos da toxicidade e tolerância ao alumínio têm sido amplamente debatidos. Estes podem ser distintos em diferentes espécies e variedades de plantas e são controlados por genes envolvidos em rotas bioquímicas não necessariamente correlacionadas. Os mecanismos de tolerância são regulados separadamente (e.g. tolerância a Al e Mn) ou são freqüentemente relacionados (tolerância a Al e eficiência na aquisição de P) (MARSCHNER, 1991). No entanto, dados obtidos por LISITSYN (2000), sugerem que os níveis de suscetibilidade ou resistência podem ser determinados pelo genótipo, mas também modificados por alguns aspectos químicos endógenos e fatores bioquímicos.

Muitas culturas e espécies de plantas nativas apresentam significativa variabilidade genética com relação a suas respostas à toxicidade por alumínio, variabilidade esta que pode ser utilizada para a produção de culturas “Al-resistentes”, termo aplicado as plantas que exibem maior crescimento e desenvolvimento do sistema radicular, o que resulta em aumento do vigor da planta em solos ou soluções ácidas contendo alumínio em níveis tóxicos (KOCHIAN, 1995).

Os mecanismos de resistência ao alumínio podem ser divididos em dois grandes grupos: no primeiro, aqueles mecanismos que excluem o alumínio do ápice radicular (exclusão do alumínio) e, no segundo, os que conferem à planta a habilidade de tolerar o alumínio no seu interior (tolerância ao alumínio).

II.6.1 Exclusão do alumínio via alteração do pH

Algumas cultivares de trigo, cevada, arroz, ervilha e milho elevam o pH da solução nutritiva em que estão crescendo, assim reduzindo a solubilidade e toxicidade do alumínio por precipitação (FOY *et al.*, 1978). Por sua vez, cultivares Al-sensíveis das mesmas espécies, diminuem ou não afetam o pH da solução, ficando expostas ao alumínio por longos períodos. Contradizendo esta informação, BLAMEY *et al.* (1990) encontraram em espécies de *Lotus*, tolerantes e sensíveis ao alumínio, padrões de mudanças de pH na solução de nutrientes compatíveis. No entanto, a barreira de pH não precisa estar na rizosfera, na medida em que, diferenças de pH no apoplasto do ápice radicular podem também provocar a imobilização do alumínio (TAYLOR, 1991).

Mudanças no pH, com frequência parecem mais proximamente relacionadas com o estado nutricional da raiz que com a absorção diferencial de ânions, e mudanças de pH na região do sistema radicular de variedades de trigo alumínio tolerantes e sensíveis estão associadas com a presença de raízes laterais e adventícias bem desenvolvidas (FOY *et al.*, 1978). No trigo, evidências sugerem que a habilidade de alteração do pH está associada com uma absorção diferencial de ânions e cátions (FOY, 1984).

Trabalhando com espécies de *Arabidopsis* mutantes e selvagens, KOCHIAN *et al.* (1998) verificaram que quando as duas variedades cresciam em uma solução fortemente tamponada, apenas a variedade mutante conseguia elevar o pH e apresentar certa tolerância ao Al, e que mudanças de 0,1 unidade de pH são suficientes para explicar a tolerância verificada. Com o uso de uma solução com tamponamento médio, as diferenças na tolerância ao alumínio

desapareciam, sugerindo que a resistência do mutante é conferida exclusivamente pela mudança de pH na rizosfera.

II.6.2. Exsudação de quelantes

O alumínio forma complexos estáveis com vários solutos orgânicos de baixo peso molecular, como polifenóis e ácidos orgânicos, e ainda com mucilagem (material gelatinoso de alto peso molecular), sendo que estes complexos não são tóxicos às plantas quando comparados com as formas de Al^{3+} livres. A capacidade de detoxificação dos ácidos orgânicos se deve à posição dos grupos OH/COOH da cadeia principal de carbono, que favorece a formação de cinco ou seis estruturas na forma de anel quando ligados ao alumínio (HUE *et al.*, 1986).

As plantas podem excluir o alumínio do citosol, exsudando solutos orgânicos quelantes na rizosfera, reduzindo assim a atividade do metal livre na solução do solo e a absorção através da membrana plasmática. Claramente, a taxa de transporte destes quelantes através da membrana reduz a toxicidade de alumínio, no entanto, a formação do complexo com alumínio serve para proteger sítios extracelulares sensíveis ao alumínio (TAYLOR, 1991).

Autores como ANDRADE & ISHIZUKA (1997) verificaram que variedades de trigo Al-tolerantes excretaram de 3 a 5 vezes mais malato que as variedades sensíveis, e que quando o citrato está presente nas soluções-tratamento juntamente com o alumínio, ambas as variedades (tolerante e sensível) apresentaram o mesmo comportamento. ZHENG *et al.* (1998a) encontraram diferentes padrões de exsudatos em diferentes espécies, sendo que espécies de trigo-mourisco exsudaram oxalato, o trigo exsudou malato, e a aveia, o rabanete e a colza exsudaram tanto citrato quanto malato. Estes mesmos autores, ao avaliarem a exsudação de ácidos orgânicos durante longos períodos de exposição ao alumínio, sugerem que uma secreção contínua de altos níveis de ácidos orgânicos está correlacionada com a tolerância ao alumínio. HUE *et al.* (1986), usando a raiz principal do algodão como indicador, agruparam os ácidos orgânicos de acordo com as suas capacidades de detoxificar o alumínio: ácidos cítrico, oxálico e tartárico (forte), málico, malônico e salicílico (moderado), succínico, láctico, fórmico e acético (fraco).

O ápice radicular é o sítio primário da toxicidade por alumínio (DELHAIZE *et al.*, 1993). Assim, o trigo-mourisco que apresenta exsudação de oxalato como uma resposta específica ao estresse por alumínio no ápice radicular (região de 0-10mm), tem associada a

secreção deste ácido à resistência ao alumínio (ZHENG *et al.*, 1998b). MA *et al.* (1998) estudando uma variedade de trigo-mourisco (*Fagopyrum esculentum* Moench.cv Jianxi), verificaram a existência de mecanismo de detoxificação interna de alumínio envolvendo ácidos orgânicos. Para estes autores, 90% do alumínio que se acumulou nas folhas apresentava-se complexado com oxaloacetato em taxas de 1:3, 1:2, e 1:1 (alumínio:oxaloacetato), e estes quelatos, quando aplicados no milho (*Zea mays*), não foram fitotóxicos ao alongamento das raízes.

Em fumo e mamão geneticamente modificados, buscando uma super expressão da enzima citrato sintase, HERRERA-ESTRELLA *et al.* (1997), verificaram que as plantas que apresentavam um maior número de cópias deste gene expressavam uma maior quantidade da enzima e exsudavam mais citrato, sendo então menos suscetíveis aos efeitos deletérios do alumínio.

Em estudos com sete espécies vegetais, ISHIKAWA *et al.* (2000) verificaram que uma maior quantidade de ácidos orgânicos foi detectada nos meios que apresentavam alumínio, exceto pela *Brachiaria brizantha* e uma cultivar Al-sensível de ervilha. Entretanto, a planta que excretou a maior quantidade de ácido cítrico apresentou crescimento consideravelmente afetado pelo efeito do alumínio. Verificaram também que a correlação de exsudação de maiores quantidades de ácidos orgânicos nas variedades Al-tolerantes não se verificou para todas as espécies avaliadas. Estes autores sugerem a existência de mecanismos mais efetivos que a exsudação de ácidos cítrico e málico na tolerância ao alumínio para as espécies estudadas.

II.6.3 Permeabilidade seletiva da membrana plasmática

O real mecanismo com o qual o alumínio atravessa a membrana plasmática é desconhecido (FOY, 1988). Para verificar se a membrana plasmática pode atuar como uma barreira seletiva ao alumínio seria necessário diferenciar ao nível do simplasto ou apoplasto a absorção de alumínio, fenômeno que não encontra consenso entre os cientistas (KOCHIAN, 1995). Além disso, se este mecanismo de tolerância puder ser demonstrado, terá que ser separado da absorção ao nível do apoplasto. Como estas tarefas apresentam muitas dificuldades técnicas, evidências para estas hipóteses são escassas. Contudo, começam a se acumular fatos que sugerem que a membrana tem um papel fundamental na tolerância ao alumínio (TAYLOR, 1991).

Baseado na observação de que em algumas cultivares de trigo resistentes ao alumínio a utilização de inibidores do metabolismo causa aumento na quantidade de alumínio na raiz, algumas pesquisas têm hipotetizado a existência de um efluxo ativo de alumínio para fora das células da raiz (LINDBERG, 1990 e TAYLOR, 1991). Pelo que já foi estudado a respeito dos transportadores de ânions em plantas, um transportador Al^{+3} -ATPase seria uma hipótese muito pouco provável, levando-se em conta que a energia fornecida pela hidrólise do ATP não seria suficiente para realizar o transporte através da membrana plasmática. No entanto, DELHAIZE & RYAN (1995) sugerem três formas nas quais o alumínio, provavelmente na sua forma Al^{+3} , por ser a forma mais tóxica em relação as outras ($\text{Al}(\text{OH})^{+2}$ e $\text{Al}(\text{OH})^{+}$), promove a abertura de um canal malato permeável, a fim de minimizar os efeitos fitotóxicos do alumínio: 1. O alumínio interage diretamente sobre o transportador alterando a sua conformação e aumentando o seu tempo de abertura ou a sua condutância. 2. O alumínio interage com um receptor específico na superfície da membrana ou com a própria membrana causando uma série de mensagens secundárias no citoplasma, mudando a atividade do transportador. 3. O alumínio entra no citoplasma e altera a atividade do transportador se ligando diretamente a ele ou indiretamente por intermédio de sinais transduzidos.

Existem também citações na literatura de outros mecanismos possivelmente envolvidos na desintoxicação do alumínio, como os mecanismos baseados nas propriedades da parede celular (GODBOLD & JENTSCHKE 1998), a compartimentalização do alumínio no vacúolo, a exsudação de vários compostos como fosfatos e proteínas que se ligam ao alumínio (SOMERS *et al.*, 1996; PELLET *et al.*, 1996; CANÇADO 1997; BASU *et al.*, 1999), a evolução de enzimas Al-tolerantes, a elevação da atividade de enzimas (HAMILTON *et al.*, 2001), dentre outros.

III. OBJETIVOS

III.1. Geral

Estudar metodologias *in vitro* para a avaliação da tolerância de porta-enxerto de videira ao estresse por alumínio.

III.2. Específicos

Introduzir e multiplicar *in vitro* porta-enxertos de videira (em meio líquido).

Avaliar o desenvolvimento de porta-enxertos de videira Paulsen 1103 e Gravesac *in vitro*, quando submetidos à acidez e alumínio.

Avaliar o comportamento varietal de porta-enxertos de videira à toxidez do alumínio.

Quantificar os efeitos morfo-fisiológicos de desenvolvimento *in vitro*, a alteração do pH no meio de cultura e as atividades do íon (Al^{+3}), e verificar se este mecanismo está envolvido na tolerância destes porta-enxertos ao alumínio.

IV - MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV) do Departamento de Fitotecnia (FIT) do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

IV.1. Material vegetal

Os porta-enxertos Paulsen 1103 e Gravesac, provenientes da EPAGRI - Estação Experimental de Videira, Videira (SC) e EPAMIG – Fazenda Experimental de Caldas, Caldas (MG), respectivamente, são variedades introduzidas no Brasil através de acordo de transferência de materiais de propagação dos programas de melhoramento de viticultura da Universidade de Davis - UC - Califórnia (EUA) e do Institut National de la Recherche Agronomique – Centre de Bordeaux (França).

A variedade Paulsen 1103 (*Vitis rupestris* x *Vitis berlandieri*) é o porta-enxerto atualmente mais utilizado na viticultura do Sul do Brasil, sendo a variedade oficialmente recomendada para Santa Catarina (SCHUCK *et al.*, 1999), por ser tolerante à fusariose, um dos principais problemas de solo desta cultura (GALLOTTI & SCHUCK, 1991), e apresentar ótimo crescimento, bom vigor, e resistência a seca. Por outro lado, mostra-se também tolerante ao excesso de umidade no solo. Apresenta, ainda, uma boa capacidade de enraizamento, bom pegamento da enxertia e ótima afinidade com as variedades produtoras (FERNANDEZ-CANO, 1975).

O Gravesac é uma variedade obtida do cruzamento entre [161-49 (*Vitis riparia* x *Vitis berlandieri*) X 3309 C (*Vitis riparia* x *Vitis rupestris*)] no Centre de Recherches de Bordeaux (França) e selecionada para solos ácidos. Apresenta boa capacidade de enraizamento e bom índice de pega de enxertia, boa resistência a filoxera, boa resistência à carência de magnésio e um vigor médio, características que permitem classificá-la como um porta-enxerto adaptado à produção de vinhos de qualidade (POUGET & OTTENWAELTER, 1986).

IV.2. Cultura *in vitro*

As plantas matrizes foram mantidas em casa de vegetação, em condições controladas contra patógenos, e submetidas à ferti-irrigação com solução nutritiva para videira estabelecida por POUGET (1984).

Para seleção dos explantes, desinfestação, introdução e manutenção *in vitro* foram utilizadas metodologias de cultura de tecidos para a videira, descritas por GALZY (1985) e LIMA DA SILVA (1995). O processo de desinfestação dos brotos foi realizado no laboratório, sendo previamente lavados em uma solução de água destilada contendo uma gota de Tween 20 (detergente) por um período de 10 minutos. Após, foram submetidos ao álcool 70% por 2 a 3 minutos e a seguir, já em câmaras de fluxo laminar, foram expostos por um período de 10 minutos sob agitação constante a uma solução de hipoclorito de sódio 40% contendo 1 gota de Tween 20. Todos os explantes foram lavados 3 vezes com posterior enxágue em água destilada autoclavada. Após, foram inoculados em tubos de ensaio Pyrex® (20X200mm) contendo 15mL de meio de cultura DSD1 (ANEXO I) estabelecido por LIMA DA SILVA & DOAZAN (1995).

As culturas *in vitro* foram transferidas para salas de crescimento e mantidas sob condições de temperatura de 25°C, fotoperíodo de 16 horas de luz, intensidade luminosa de 40-45 $\mu\text{mol fons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e umidade relativa de 60 - 70%. A sustentação dos explantes no meio líquido foi obtida por intermédio da utilização de segmentos de cortiça previamente preparados e esterilizados, conforme apresentação nas Figuras 01 e 02.

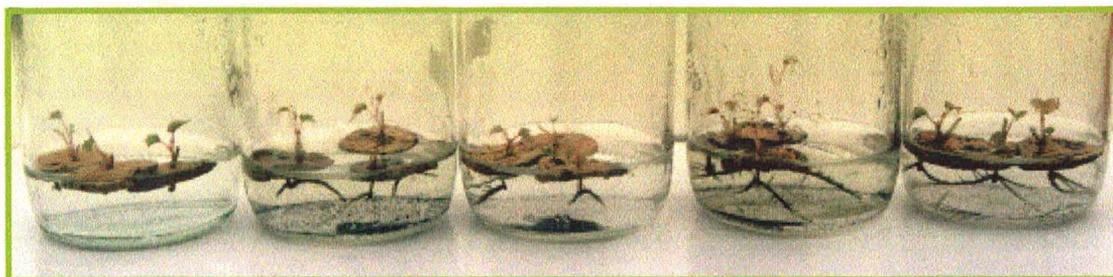


Figura 01 - Explantes de videira *in vitro* em meio líquido com uso de filtros de cortiça. UFSC - Fpolis/SC.



Figura 02 - Plantas *in vitro* de Paulsen 1103 aos 60 dias de cultura em meio líquido com uso de filtros de cortiça. UFSC - Fpolis/SC.

IV.3. Concentrações de alumínio

Os tratamentos com alumínio foram definidos com base nos seguintes critérios: considerando-se que a concentração final de alumínio na solução é fortemente dependente do pH, este deveria ser baixo o suficiente para permitir uma boa amplitude de atividades de Al^{+3} (com o menor prejuízo possível para a planta), sendo assim adotado o valor de $pH = 4,0$ como padrão. Outro aspecto observado foi a concentração total de alumínio encontrada naturalmente nos solos ácidos ($0-350\mu M$), podendo em casos especiais, atingir $1000\mu M$ (ADAMS & MOORE, 1983; CURTIN & SMILIE, 1983).

Para corrigir as “concentrações” termodinâmicas denominadas de atividades, que levam em consideração o pH, a força iônica, possíveis quelantes, a precipitação de solutos, a proteção de íons da solução, dentre outros, foi utilizado o programa GEOCHEM-PC v. 2.0 (PARKER *et al.*, 1987), ficando, então, a especiação e os tratamentos (concentrações de alumínio), conforme mostra a **Tabela 1**.

Tabela 1. Concentração total de alumínio (Al), concentração de Al^{+3} livre e atividade do Al^{+3} na solução DSD1 a pH = 4,0. A concentração de Al^{+3} livre, a atividade do Al^{+3} e a força iônica das soluções foram estimados através do software GEOCHEM-PC versão 2.0. UFSC - Fpolis/SC.

Al Total mM	Al^{+3} livre mM	Atividade de Al^{+3} mM	Força iônica
0,000	0,000	0,000	2.094E-02
0,250	0,056	0,015	2.160E-02
0,425	0,109	0,030	2.210E-02
0,650	0,162	0,044	2.258E-02
1,000	0,229	0,061	2.312E-02
1,200	0,283	0,074	2.353E-02
1,375	0,345	0,090	2.398E-02

O alumínio foi adicionado na forma de $AlCl_3$. Um cuidado especial adotado na elaboração dos tratamentos foi a autoclavagem das soluções (meio de cultura DSD1 + respectivas concentrações de alumínio), em frascos diferentes para prevenir que ocorressem reações entre o alumínio e os componentes orgânicos da solução (sacarose e vitaminas) em altas temperaturas e pressão (COMIN, 1999 comunicação pessoal). Assim, após a autoclavagem (DUNCAN *et al.* 1995), as doses de alumínio foram adicionadas ao meio de cultura em câmara de fluxo laminar e os valores de pH, corrigidos por titulação para 4,0.

IV.4 Aplicação dos tratamentos

Foram implantados dois experimentos. No primeiro, os explantes das duas variedades de porta-enxertos (Paulsen 1103 e Gravesac) foram colocados diretamente no meio de cultura (DSD1 líquido) com diferentes concentrações de alumínio, onde ficaram por um período de sessenta dias até avaliação. No segundo experimento, os explantes foram introduzidos em meio DSD1 líquido na ausência de alumínio. Após trinta dias em crescimento, as plantas *in vitro* foram selecionadas pelo tamanho e submetidas aos diferentes tratamentos (concentrações de alumínio), onde aguardaram por mais trinta dias até a fase de avaliação.

IV.5. Avaliação dos tratamentos

Para a avaliação da densidade estomática foram utilizados 100 (mg) de folhas previamente encubadas com 7 (ml) de Dimetil Sulfóxido a temperatura de 65° C durante 2,5 horas. Após este período as folhas foram lavadas com água destilada e observadas em microscopia (aumento de 400x) para observação e contagem do número de estômatos.

A sobrevivência das plantas em condição *ex vitro*, no processo de aclimatização, as plantas sofreram podas na parte aérea e no sistema radicular, de forma a deixa-las com aproximadamente 2 folhas e com 2 (cm) de raízes. Sendo acondicionadas em bandejas com substrato adequado e mantidas em condições de 100% de umidade relativa por aproximadamente 25 dias. Após este período as plantas permaneceram por 3 dias em condições de redução gradativa da umidade relativa (ainda nas bandejas) quando então foram transferidas para o túnel de nebulização, ali permanecendo por 4 dias até avaliação do índice de sobrevivência.

Devido a inexistência de uma metodologia para avaliar os efeitos fitotóxicos do alumínio sobre a cultura da videira em condições *in vitro*, foram feitas adaptações de algumas metodologias que tratam de aspectos da toxicidez por alumínio (FAHL *et al.*, 1982; ALVA *et al.*, 1986; PINTRO *et al.*, 1995; COMIN *et al.*, 1999; DANTAS *et al.*, 2001) e da seleção de videiras *in vitro* (BAVARESCO *et al.*, 1993; SINGH *et al.*, 2000), a fim de se definir os principais parâmetros de avaliação.

Para a avaliação, as plantas foram retiradas dos frascos, momento no qual realizou-se a contagem das raízes primárias e secundárias, que foram cortadas com o auxílio de um bisturi e imediatamente pesadas (obtenção do peso fresco) e acondicionadas em envelopes. As folhas foram retiradas com uma tesoura, tendo seus valores de área foliar determinados a partir de imagens obtidas por digitalização e analisadas com auxílio do programa IDRISI. Posteriormente, foram pesadas (obtenção do peso fresco) e acondicionadas em envelopes. O caule por sua vez também foi pesado e acondicionado em um envelope próprio. Após estes procedimentos, todos os envelopes devidamente identificados foram submetidos a temperatura de 60°C por um período de aproximadamente 96 h. Após este período, os envelopes foram retirados da estufa e todos os materiais foram pesados para a obtenção dos pesos secos individuais de cada parte (raízes, folhas, caule), para cada planta.

Desta forma foram avaliadas variáveis relacionadas ao sistema radicular (nº de raízes, peso seco), parte aérea (área foliar, peso seco das folhas, peso seco do caule e peso seco total), e combinações entre elas.

IV.6. Avaliação do pH e atividades de alumínio

Para a avaliação do pH nos diferentes tratamentos, retiraram-se alíquotas de 0,5 mL (em ambiente de câmara de fluxo laminar) de cada frasco referente aos tratamentos (6 frascos), perfazendo uma amostra composta com volume final de 3,0 mL. O pH foi medido em um aparelho digital HANNA HI 8417, com um intervalo médio de 5 dias, ao longo de trinta dias.

Foram geradas com o auxílio do programa GEOCHEM-PC versão 2.0, curvas de atividades de Al^{+3} , corrigidas pelos valores de pH apresentados por cada tratamento durante todo o período de avaliação.

IV.7. Análise estatística

Para todos os experimentos o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Para as avaliações morfológicas dos porta-enxertos (Paulsen 1103 e Gravesac) foram utilizadas 6 repetições de plantas *in vitro* crescidas em tubos de ensaio. Os experimentos com estresse de íon Al^{+3} foram compostos por seis vidros (AZ 300), contendo três plantas cada um, num total de sete tratamentos (Tabela 01).

Para os dados referentes ao estresse de alumínio, em uma análise preliminar mostraram variabilidade, recebendo uma censura a fim de excluir os dados discrepantes. A censura imposta foi a exclusão dos dados distantes de média (± 2) desvios padrões. Para o primeiro experimento com concentrações de alumínio, por imprecisão da balança, foram excluídos os dados das plantas que apresentaram peso seco igual a zero.

As análises estatísticas foram realizadas com base nas concentrações de alumínio, de forma a se obter modelos de regressões.

V - RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1. Avaliação do desenvolvimento dos porta-enxertos de videira Paulsen 1103 e Gravesac *in vitro* sem alumínio

As diferentes variedades de porta-enxertos de videira pertencentes ao banco de germoplasma do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, UFSC/CCA/FIT, foram avaliadas quanto ao comportamento e a propagação *in vitro*. Resultados obtidos por MOREIRA (2000) e LIMA DA SILVA *et al.* (2000) indicaram diferenças significativas para as variáveis e clones de videira relacionadas à produção de biomassa entre diferentes porta-enxertos de cultura *in vitro*.

Desta forma, julgou-se importante avaliar as variedades, Paulsen 1103 e Gravesac, previamente escolhidas com base em características de desenvolvimento *in vitro* e interesse agrônômico especial, como modelos para estudos fisiológicos, principalmente quanto às condições adversas de estresse de alumínio.

Os resultados apresentados na **Tabela 02** mostram diferenças existentes entre os dois porta-enxertos de videira avaliados *in vitro* quanto às características analisadas.

Tabela 02 - Características morfológicas dos porta-enxertos de videira Paulsen 1103 e Gravesac *in vitro*. UFSC - Fpolis/SC, (plantas de 60 dias, n = 6).

Porta-Enxertos	Número		Comprimento (cm)		Área Foliar (cm ²)
	Raízes	Folhas	Raízes	Caule	
Paulsen 1103	1,33±0,52 b	7,33±0,52 a	9,87±1,86 a	6,33±0,62 b	13,98±1,68 a
Gravesac	2,33±0,82 a	6,67±0,52 a	5,59±1,63 b	11,70±1,00 a	11,06±2,33 b

Os valores seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente para 5% (teste Newman-Keuls).

Observou-se que, quanto ao número de raízes, as diferenças nas médias obtidas entre os porta-enxertos foram significativas, com superioridade do Gravesac. Da mesma forma, quanto ao comprimento de caule. Entretanto, para os parâmetros comprimento de raízes e área foliar, a variedade Paulsen 1103 apresentou resultados superiores. Estes valores são, em geral, inferiores àqueles observados por LIMA DA SILVA & DOAZAN (1995); LIMA DA SILVA (1995), em diversos porta-enxertos de videira, inclusive para a variedade Gravesac.

Os valores observados para o número de folhas em *Vitis vinifera* var. Cabernet Sauvignon (GREGORI & TIZIO, 1997) também foram superiores aos deste trabalho, assim

como o número de raízes de videira avaliados por ZLENKO *et al.* (1995), e na maioria dos genótipos estudados por ROUBELAKIS-ANGELAKIS & ZIVANOVITC (1991). Entretanto, para as variedades Cabernet Sauvignon (GREGORI & TIZIO, 1997), Rupestris du Lot, Chardonnay e Pinot Noir (GALZY *et al.*, 1990), o número médio de raízes observados foi semelhante.

Em relação ao comprimento do caule, observa-se que os resultados obtidos foram similares às variedades Cabernet Franc (ROUBELAKIS-ANGELAKIS & ZIVANOVITC, 1991), Fercal (TERREGOSA & BOUQUET, 1995; LIMA DA SILVA, 1995) e 140 Ru (LIMA DA SILVA, 1995). Entretanto, foram superiores à maioria das variedades estudadas por ZLENKO *et al.* (1995) e GREGORI & TIZIO (1997).

Quanto ao crescimento radicular, os resultados obtidos são semelhantes aos encontrados para outras variedades de videira por GALZY *et al.* (1990) e ZLENKO *et al.* (1995). Entretanto, se mostraram muito inferiores aos obtidos por LIMA DA SILVA (1995) e GREGORI & TIZIO (1997). Quanto a esta característica, é importante ressaltar que há dificuldade na comparação destes resultados, uma vez que muitos autores adotam diferentes metodologias.

A área foliar apresentou valor superior do porta-enxerto Paulsen 1103. Verifica-se que apesar da var. Cabernet Sauvignon ter mostrado valor semelhante em trabalhos de GREGORI & TIZIO (1997), as duas variedades de porta-enxertos estudadas apresentaram valores inferiores aos apresentados por (LIMA DA SILVA, 1995; LIMA DA SILVA *et al.*, 1995).

Os resultados referentes ao peso de raiz, caule, folha e seco total (Tabelas 03), indicam diferenças significativas entre os genótipos, com superioridade da variedade Paulsen 1103 ao Gravesac, para a maioria dos parâmetros avaliados.

Tabela 03 - Peso seco da raiz, caule, folha e total dos porta-enxertos de videira Paulsen 1103 e Gravesac *in vitro*. UFSC - Fpolis/SC, (plantas de 60 dias, n = 6).

Porta-enxerto	Peso seco (mg)			
	RAIZ	CAULE	FOLHA	TOTAL
Paulsen 1103	7±3 a	6±1 a	20±2 a	33±5 a
Gravesac	2±1 b	8±2 a	14±3 b	24±5 b

Os valores seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente para 5 % (teste Newman-Keuls).

Os pesos secos totais de Paulsen 1103 e Gravesac foram similares às observações de GREGORI & TIZIO (1997) para a variedade Cabernet Sauvignon, assim como os valores de GALZY *et al.* (1990) para a variedade Chardonnay. Para as outras variedades estudadas por estes autores, Rupestris du Lot e Pinot Noir, os valores encontrados foram superiores, assim como os resultados encontrados por GALZY *et al.* (1990), LIMA DA SILVA (1995) e FILA *et al.* (1998) para outras variedades de videira.

Estes resultados sugerem que, além do genótipo, outros efeitos importantes parecem influenciar o desenvolvimento das plantas *in vitro* (GALZY *et al.*, 1990; ROUBELAKIS-ANGELAKIS & ZIVANOVITC, 1991; GALZY & COMPAN, 1992; LIMA DA SILVA, 1995; ZLENKO *et al.*, 1995; FILA *et al.*, 1998; TICHÁ *et al.*, 1998; MOREIRA, 2000; LIMA DA SILVA *et al.*, 2000). Para estes autores, os fatores de maior influência parecem ser o meio e as condições de cultura *in vitro*.

V.1.2. Avaliação dos estômatos e aclimatização dos porta-enxertos de videira Paulsen 1103 e Gravesac a *in vitro*

Os estômatos de plantas originárias da cultura *in vitro* foram estudados sobretudo a fim de otimizar o processo de multiplicação e a aclimatização de plantas, devido principalmente a sua importância na regulação das trocas gasosas e perdas de água pela transpiração das folhas, durante a fase de transferência de *in vitro* para *ex vitro*.

Observa-se na **Figura 03** os resultados de densidades estomáticas dos porta-enxertos Paulsen 1103 e Gravesac *in vitro* e em casa de vegetação (*ex vitro*).

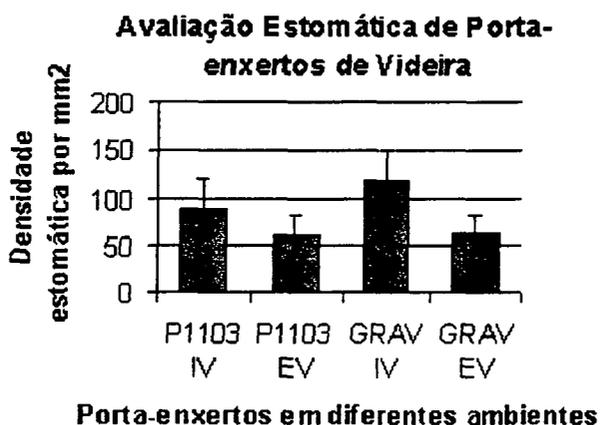


Figura 03 - Densidades estomáticas das variedades Gravesac e Paulsen 1103 *in vitro* (IV) e *ex vitro* (EV) em casa de vegetação. UFSC - Fpolis/SC.

Verificou-se que as variedades Paulsen 1103 e Gravesac apresentaram densidades estomáticas *in vitro* de 53,8 % e 46,2 %, respectivamente superiores às plantas em casa de vegetação. Estes resultados indicam que o ambiente de cultura *in vitro* proporciona condições para a indução e diferenciação de maior número de estômatos em videira. Resultados similares foram observados em macieira por BLANKE & BELCHER (1989), roseira por CAPELLADES *et al.* (1991) e videira por LIMA DA SILVA (1995) e MOREIRA (2000). Entretanto, para BRAINERD *et al.* (1981), o valor de densidade estomática foi superior em plantas *ex vitro* de ameixeira, enquanto SCIUTTI & MORINI (1993) não observaram diferenças significativas entre os dois ambientes para esta mesma espécie.

A avaliação visual demonstrou que os estômatos de plantas de Gravesac e Paulsen 1103 *in vitro* apresentaram forma elíptica normal e pouca variação no tamanho. Estas observações contradizem a literatura, onde os estômatos *in vitro* são considerados como malformados, reduzidos em número e não funcionais, tornando as plantas mais susceptíveis à desidratação na aclimatização (ZIV *et al.*, 1987; SALLANON *et al.*, 1993; SANTAMARIA & KERSTIENS, 1994; DESJARDINS, 1995; DURING & HARST, 1996).

Provavelmente, estas características estomáticas normais desenvolvidas pelos porta-enxertos Paulsen 1103 e Gravesac devem-se às condições de maior troca gasosa entre a atmosfera dos frascos e da sala de cultura, possibilitada pelo tipo de fechamento não hermético dos tubos.

Quanto à aclimatação (fase de transferência das plantas *in vitro* para as condições naturais), esta é uma etapa crítica para a maioria das espécies (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998), basicamente pelo fato da planta passar de uma situação de reduzido fluxo transpiratório e elevada umidade relativa, para um ambiente que demanda um incremento na taxa de transpiração, ficando muito susceptível ao estresse hídrico.

As plantas originárias de cultura *in vitro* usualmente mostram rápido murchamento quando transferidas para condições *ex vitro*, comportamento este atribuído à baixa regulação da transpiração, devido a uma cutícula mais fina (SUTTER, 1988) associada com mau funcionamento estomático (SUTTER, 1988; BLANKE & BELCHER, 1989; SANTAMARIA & KERSTIENS, 1994).

Sobrevivência de porta-enxertos no processo de aclimatização

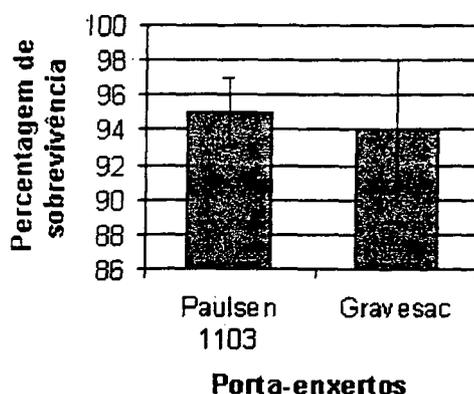


Figura 04 - Taxas de sobrevivência das variedades Paulsen 1103 e Gravesac originárias de multiplicação *in vitro* durante a fase de aclimatização. UFSC - Fpolis/SC.

Os resultados observados na fase de aclimatização para as variedades de porta-enxertos de videira Gravesac e Paulsen 1103 são apresentados na **Figura 04**. Verificou-se que o índice de sobrevivência variou de 90-98%, após a transferência para ambiente *ex vitro*.

Os resultados observados indicam que a metodologia de aclimatização utilizada é adequada e que, conforme MARTIN *et al.* (1987), LIMA DA SILVA *et al.* (1995), LIMA DA SILVA *et al.* (1997) e MOREIRA (2000), a videira é uma espécie que não apresenta problemas sérios de aclimatização quando comparada a outras espécies lenhosas.

Este alto índice de sobrevivência verificado em videira, possivelmente está relacionado à funcionalidade dos estômatos e à aquisição precoce da diferenciação do sistema fotossintético *in vitro* (LIMA DA SILVA *et al.*, 1996). Para GALZY & COMPAN (1992), IACONO *et al.* (1992) e (1995), LIMA DA SILVA (1995), MARTINELLI (1995) e MOREIRA (2000), plantas *in vitro* de videira (*Vitis* spp.) apresentam mecanismo fotossintético ativo e eficiente utilização de água. Além disso, para YUE *et al.* (1993) e DESJARDINS (1995), as condições do ambiente de cultura *in vitro*, com alta luminosidade, alta concentração de CO₂ e sistemas que permitem as trocas gasosas com o meio externo, podem determinar plantas *in vitro* mais aptas para transferência e maior sobrevivência na aclimatização.

V.1.3. Conclusões

- O desenvolvimento *in vitro* do porta-enxerto Paulsen 1103 foi superior ao do Gravesac para as seguintes variáveis: número de folhas, comprimento das raízes, área foliar, peso seco total.
- Os estomas dos porta-enxertos (Paulsen 1103 e Gravesac) *in vitro* apresentaram aspectos normais e densidades superiores a *ex-vitro*.
- As variedades testadas não apresentaram problemas de aclimatização.

V.2. Avaliação de explantes dos porta-enxertos de videira Paulsen 1103 e Gravesac introduzidas *in vitro* em meio com alumínio

Nestes experimentos buscou-se avaliar uma metodologia e ter uma noção aprofundada da intensidade dos fenômenos envolvidos na toxicidez por alumínio, em porta-enxertos de videira mantidos em cultura *in vitro*.

Verificou-se que as avaliações morfológicas, para a maioria dos parâmetros avaliados, não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre as variedades e concentrações de alumínio ao nível de 5% de probabilidade.

Dentre os parâmetros que mostraram diferenças significativas, observou-se que a maior parte apresentou regressões de grau elevado (quarta e quinta ordem), demonstrando dificuldades de explicação ao nível fisiológico.

Analisando os resultados para os parâmetros de produção de biomassa: peso fresco e seco total (PFTotal e PSTotal), conforme **Figuras 05 e 06**, pôde-se inferir que a variedade Paulsen 1103 demonstrou maior susceptibilidade, apresentando uma redução de crescimento a partir de 0,650mM de alumínio, e praticamente crescimento nulo em concentrações superiores a 1,2mM.

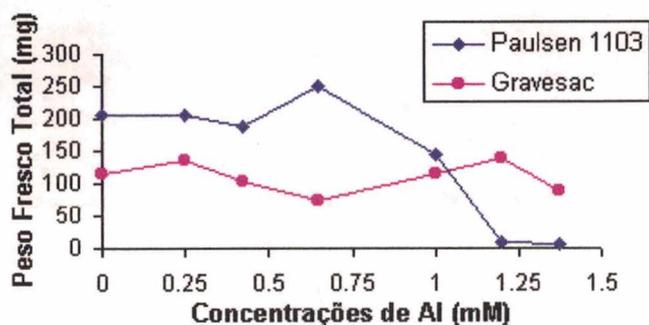


Figura 05 – Relação do peso fresco total (mg), em função das concentrações de Al (mM). Var. Paulsen 1103 e Gravesac. UFSC – Fpolis/SC.

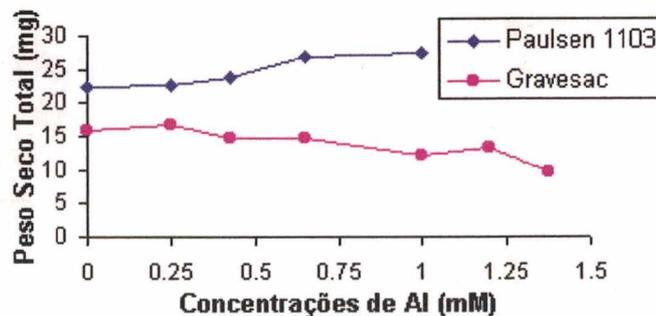


Figura 06 – Relação do peso seco total (mg), em função das concentrações de Al (mM). Var. Paulsen 1103 e Gravesac. UFSC - Fpolis/SC.

Com relação aos pesos secos totais do porta-enxerto Paulsen 1103 (**Figura 06**), observou-se a ausência dos dados para concentrações superiores a 1,00mM de Alumínio, que apresentaram valores muito reduzidos. Desta forma, atendendo à censura imposta, ao conjunto de dados, eles foram eliminados.

Para a variedade Gravesac, observou-se de modo geral que as concentrações de alumínio apresentaram efeitos menos marcantes, conforme **Figuras 05 e 06**. Verificou-se que os pesos secos totais para esta variedade de porta-enxerto de videira apresentaram redução gradativa de biomassa com relação ao efeito do alumínio.

Acredita-se que os comportamentos apresentados pelos explantes dos porta-enxertos *in vitro* podem estar relacionados principalmente ao baixo valor de pH (4,0) no meio de cultura, a concentração de alumínio ou a características dos explantes, tais como: origem, tipo, idade dos tecidos utilizados (MARSCHNER, 1991; FOURNIOUX & BESSIS, 1993; ONO *et al.*, 1995; JONES *et al.*, 1998).

A utilização de explantes de videira *in vitro*, diretamente em meio de cultura líquido, em condições de estresse de pH e alumínio, apresentou resultados variáveis com explantes de reduzido crescimento radicular e aéreo. Tais informações demonstraram que o uso direto dos explantes a uma condição estressante de H^+ e Al^{+3} não é a opção mais adequada para avaliar o efeito de toxicidade de metais, especialmente para o íon alumínio, que necessita de baixo pH para exercer o efeito tóxico em vegetais. Acredita-se que tal método necessite de maiores estudos, avaliações e ajustes metodológicos.

Sugere-se que as explicações possíveis para estes resultados estejam relacionadas com o desenvolvimento *in vitro* dos explantes. Nesta metodologia o explante, quando submetido ao efeito direto de toxicidade de H^+ e Al^{+3} , ainda não apresentava o sistema radicular e aéreo, necessitando a formação de raízes e brotação das gemas. Acredita-se que a presença de H^+ e Al^{+3} no meio pode ter promovido reações de toxicidade nas células do câmbio (MARSCHNER, 1991; JONES *et al.*, 1998), impedindo a formação e o desenvolvimento de raízes e, conseqüentemente, não permitindo a brotação e desenvolvimento da gema axilar responsável pela formação de nova planta.

Outro fator de importância é que os explantes da videira *in vitro* (microestacas) apresentam a formação e desenvolvimento das gemas axilares de forma escalonada, sendo que gemas basais apresentam idade e estruturas com diferenciação superiores às gemas apicais. Com isto, pode-se afirmar que cada explante apresenta condições fisiológicas específicas, ou seja, cada explante pode ser considerado único, pois dentro da mesma planta *in vitro* todas as gemas estão em estágios evolutivos diferentes e, conseqüentemente, com balanços hormonais e nutricionais distintos (FOURNIOUX & BESSIS, 1986; FOURNIOUX & BESSIS, 1993; LIMA DA SILVA, 1995). Para LISITSYN *et al.* (2000), existem diferentes fatores que determinam e que podem explicar repostas diferenciadas das plantas com relação ao alumínio.

Com o conhecimento adquirido e o aprimoramento desta metodologia, foram implantados novos experimentos. Nestes, foram utilizadas plantas de cultura *in vitro* em meio líquido com pH de 6,4, com trinta dias de idade, selecionadas pelo tamanho, na ausência de alumínio.

A hipótese prevista é que plantas com estágio de crescimento mais acelerado poderiam apresentar mecanismos fisiológicos para desintoxicação do alumínio e principalmente um sistema radicular já formado, onde o alumínio poderia exercer a sua ação fitotóxica, e induzir a “ativação” dos mecanismos de tolerância.

Outro aspecto que manifestou importância, nesta fase do trabalho, foi a necessidade de realizar o monitoramento do pH no meio de cultura, para um melhor entendimento dos processos envolvidos na toxicidez por alumínio.

V.2.1. Conclusões

- Ocorreu variabilidade nas respostas de crescimento de plantas *in vitro* em condições estressantes de H^+ e Al^{+3} .
- São necessários aprimoramentos nesta metodologia para testes de toxicidez por alumínio, utilizando explantes diretamente nas condições estressantes.

V.3. Avaliação do pH e atividades de Al^{+3} no meio de cultura *in vitro*

Os solos ácidos apresentam o alumínio como o fator limitante de maior importância para o desenvolvimento de plantas e, a atividade do íon na solução é o parâmetro que melhor caracteriza o efeito tóxico deste elemento (BERTON, 1989). No entanto, é possível melhorar as condições para o crescimento do sistema radicular pela redução da atividade de alumínio, sem com isso reduzir os seus teores absolutos. Esta redução na atividade pode ser obtida pela adição de sais e/ou substâncias orgânicas, ou por simples alterações de pH.

V.3.1. Atividades de alumínio em meio de cultura *in vitro* para Gravesac e Paulsen 1103

Com base nos valores de pH observados nas soluções do meio de cultura com plantas *in vitro*, monitorados durante todo o período experimental (Anexo II, Figuras 31 a 44), foram realizadas as correções através do software GEOCHEM PC V.2 para as atividades correspondentes de Al^{+3} (ALVA *et al.*, 1986). Esta correção de atividades levou em consideração, exclusivamente, as alterações de pH observadas. Verificou-se que esta informação poderá auxiliar na avaliação dos resultados e, principalmente, acompanhar a atividade do alumínio no decorrer do tempo, porém, com restrições sobre predições das atividades do Al^{+3} , uma vez que esta variável também poderá sofrer influências de outros fatores.

Verificou-se na Figura 07 o comportamento das atividades de Al^{+3} para todos os tratamentos com alumínio até a concentração de 1,00mM para a variedade Gravesac *in vitro*. De maneira geral, para todas as concentrações, observou-se que o comportamento das atividades apresentaram dois períodos característicos: no primeiro (0-15 dias), ocorreu uma queda acentuada nas atividades de Al^{+3} , e no segundo (15-30 dias), as atividades apresentam reduções lentas e gradativas.

Observou-se que a magnitude de alteração dos valores de pH (Figura 07) afetou drasticamente a atividade de Al^{+3} . A correção da atividade pelo pH, apesar de não ser exata, tende a ser pouco influenciada pelos outros fatores envolvidos (absorção de água e nutrientes pelas plantas).

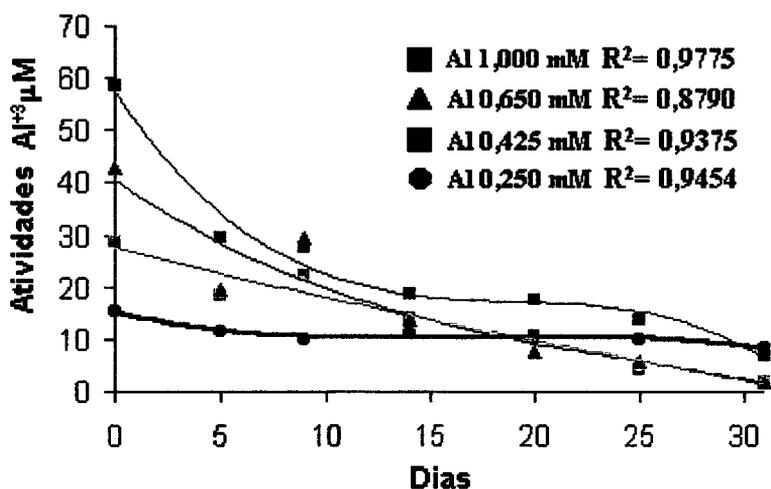


Figura 07 – Atividades de Al^{+3} estimadas em cultura *in vitro* da var. **Gravesac** nas concentrações de alumínio entre 0,250mM e 1,00mM. UFSC - Fpolis/SC.

A variedade *Gravesac in vitro* apresentou um alto potencial de alteração do pH no meio de cultura (**Anexo II, Figuras 31 a 37**). Esta modificação reflete significativamente o nível de atividade de Al^{+3} e os seus efeitos de toxicidade nos tecidos vegetais. Este comportamento é de origem genética e/ou fisiológica, podendo determinar características de tolerância ou resistência ao efeito tóxico do íon Al^{+3} . Para diversos autores, entre eles *ZHENG et al.* (1998b), *LARSEN et al.* (1998), *ISHIKAWA et al.* (2000), *LI et al.* (2000) e *MA* (2000), o comportamento de tolerância ao alumínio está relacionado com a liberação de ácidos orgânicos. Para outros autores, a tolerância se manifesta através de mecanismos múltiplos com a exsudação de fosfato e ácidos orgânicos, simultaneamente (*PELLET et al.*, 1996). No caso específico da variedade de porta-enxerto de videira *Gravesac*, a tolerância parece estar intimamente relacionada com a elevação do pH do meio de cultura, como também verificado por *KOCHIAN et al.* (1998) em um mutante de *Arabidopsis*.

Outra observação importante é que o porta-enxerto *Gravesac*, originário do programa de melhoramento do Centre de Recherches de Bordeaux (INRA-França), foi selecionado para solos ácidos por *POUGET & WALTENWALTER* (1986). Possivelmente devido ao processo de seleção, esta variedade apresenta a capacidade de elevação do pH do meio para o seu crescimento e desenvolvimento, podendo assim reduzir os efeitos prejudiciais causados pelos íons H^{+} e Al^{+3} , uma vez que os baixos valores de pH são requisitos necessários para que o alumínio possa apresentar efeitos tóxicos.

Levando-se em conta o potencial de alteração de pH no meio de cultura que a variedade apresentou, pode-se supor que o pH da solução ao nível do apoplasto pode ter

atingido níveis mais elevados que aqueles verificados nos frascos, desta forma diminuindo ainda mais as atividades de Al^{+3} nas regiões radiculares onde ele exerce o seu efeito tóxico. Acredita-se que, caso a videira apresente mecanismos de exclusão do alumínio via exsudação de compostos quelantes, esta condição levaria à verificação de atividades inferiores às apresentadas na **Figura 07**.

Para as concentrações de alumínio entre 1,200 e 1,375mM, as alterações de valores pH (**Anexo II, Figuras 36 e 37**) apresentaram variações pouco expressivas. Pode-se observar, através das curvas estimadas, conforme a **Figura 08**, que as atividades de alumínio foram pouco afetadas, apresentando variação mínima para o período avaliado.

Verifica-se que este comportamento, de não modificação do pH do meio de cultura, demonstra a incapacidade das plantas *in vitro* de alterarem o pH destas soluções. Estes resultados poderão estar relacionados principalmente com as altas concentrações de alumínio (1,200 e 1,375mM) no meio de cultura e/ou ao tamponamento mais elevado destas soluções.

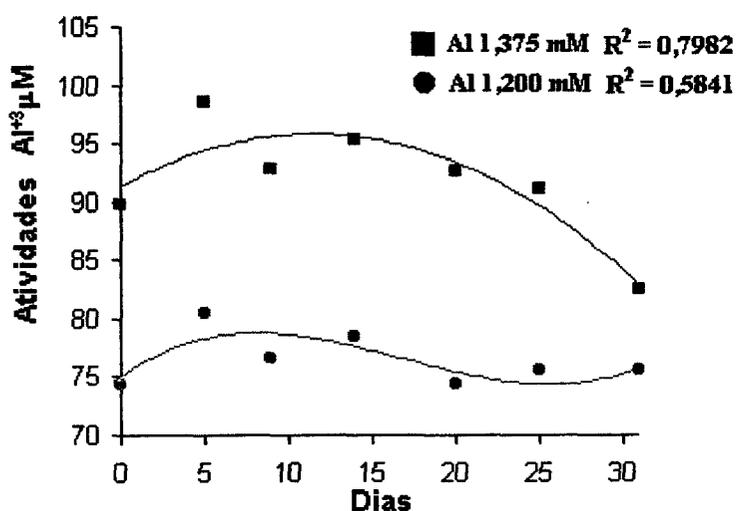


Figura 08 - Atividades de Al^{+3} estimadas em cultura *in vitro* da var. **Gravesac** nas concentrações de alumínio de 1,200mM e 1,375mM. UFSC - Fpolis/SC.

Provavelmente ao se atingir concentrações superiores a 1,000mM, os efeitos deletérios do alumínio são tão expressivos a ponto de causar uma paralisação no metabolismo das células das raízes impedindo a atuação dos seus mecanismos protetores, tais como a exsudação de compostos orgânicos e inorgânicos quelantes, elevação do pH e outros.

Com relação à variedade Paulsen 1103, foram constatados valores de pH (**Anexo II, Figuras 38 a 44**) diferentes dos observados para o Gravesac. Enquanto o Gravesac atua na

elevação do pH das soluções do meio *in vitro*, o Paulsen 1103 demonstrou, de maneira geral, diminuição dos valores de pH durante o período inicial (0-15º dia). Entretanto, observou-se certas alterações nos valores de pH após a terceira leitura, que permitem uma redução das atividades de alumínio para as concentrações inferiores a 0,650mM (Figura 09).

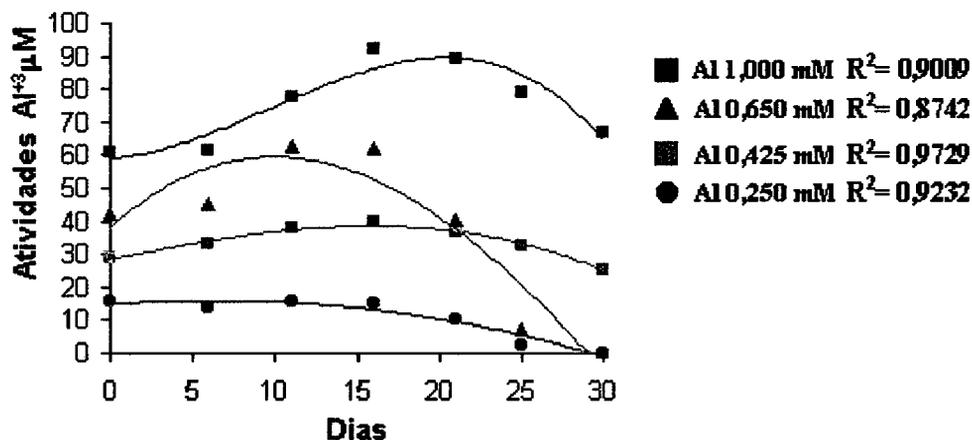


Figura 09 - Atividades de Al³⁺ estimadas em cultura *in vitro* da var. **Paulsen 1103** nas concentrações de alumínio entre 0,250mM e 1,00mM. UFSC - Fpolis/SC.

Outro aspecto importante verificado para a variedade Paulsen 1103 *in vitro* é que nas concentrações de 1,200mM e 1,375mM de alumínio, entre o 20º e o 30º dia, ocorreu elevação dos valores de pH (Anexo II, Figuras 43 e 44), de forma que as reduções nas atividades destes tratamentos passaram a ser expressivas (Figura 10). Porém, estes resultados devem ser observados com cautela, mostrando a necessidade de maiores estudos para verificar se as alterações se devem ao baixo tamponamento dos meios neste nível de pH (inferior a 4), ou a um real potencial expressado pela variedade.

É possível que as reduções de pH verificadas na variedade Paulsen 1103 estejam relacionadas com a exsudação de ácidos orgânicos (ácidos fracos), fato que abre possibilidades para novas inferências e estudos complementares.

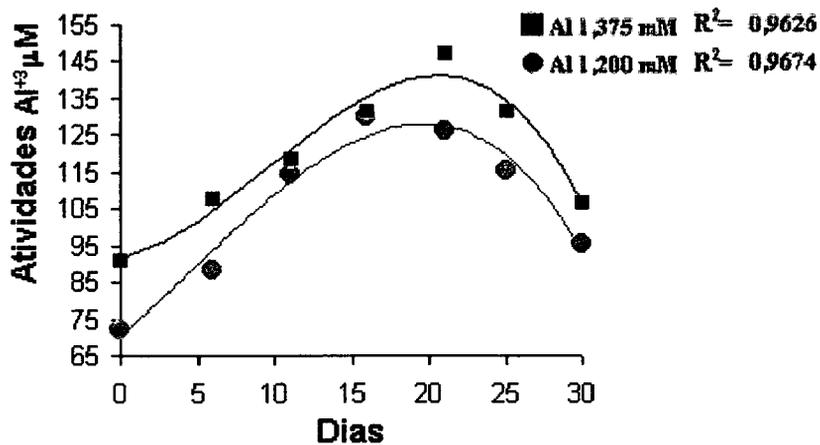


Figura 10 - Atividades de Al³⁺ estimadas em cultura *in vitro* da var. Paulsen 1103 nas concentrações de alumínio entre 0,250mM e 1,00mM. UFSC - Fpolis/SC.

V.3.2. Conclusões

- Os porta-enxertos de videira Gravesac e Paulsen 1103, apresentam mecanismos de exclusão do alumínio via elevação do pH do meio de cultura *in vitro*.
- A variedade Gravesac apresentou respostas de variação de pH mais rápidas que a variedade Paulsen 1103.

V.4. Avaliação de plantas dos porta-enxertos de videira Pauisen 1103 e Gravesac introduzidas *in vitro* em meio com alumínio

V.4.1. Efeito do alumínio no sistema radicular

As primeiras variáveis avaliadas foram aquelas relacionadas ao sistema radicular. Quando da introdução das plantas nos tratamentos, elas já apresentavam, tanto a parte aérea quanto o sistema radicular formados, aspecto pelo qual os diferentes tratamentos não poderiam ter influenciado no número de raízes primárias. Quanto ao número de raízes secundárias, a variedade Gravesac se mostrou altamente influenciada pelas diferentes concentrações de alumínio.

As Figuras 11 e 12, apresentam os resultados dos efeitos de diferentes tratamentos sobre o número de raízes secundárias e totais para a variedade Gravesac. Verificou-se que as menores concentrações de alumínio promoveram uma pequena redução do número de raízes secundárias, observado até a concentração de 0,425mM. Em concentrações superiores a 0,425mM de alumínio ocorreu um crescimento no número de raízes secundárias até atingir o máximo próximo da concentração de 1,2mM. A partir desta concentração verificou-se um efeito de maior toxicidez nas raízes primárias, a ponto de impedir até mesmo o crescimento das ramificações. Também foi observado o aparecimento de pontuações, com tonalidades marrons e/ou negras, indicando a tentativa de emissão de primórdios radiculares, mas devido o efeito da alta toxicidade no meio não apresentou a capacidade de regenerar novas raízes.

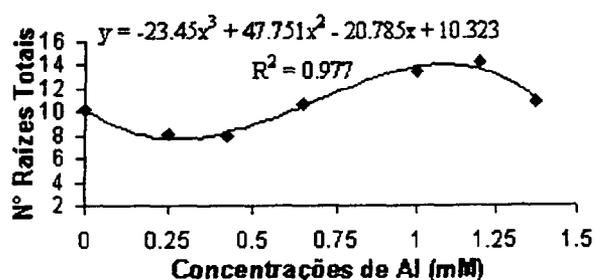
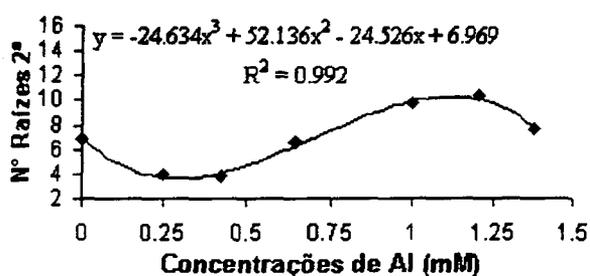


Figura 11 – Relação de Nº de Raízes Secundárias em função das concentrações de Al (mM) na var. Gravesac *in vitro*. UFSC - Fpolis/SC.

Figura 12 – Relação de Nº de Raízes Totais em função das concentrações de Al (mM) na var. Gravesac *in vitro*. UFSC - Fpolis/SC.

Verifica-se na literatura que a toxicidez por alumínio provoca o aumento do número de raízes secundárias (BRACCINI *et al.*, 1998; DANTAS *et al.*, 2001). Provavelmente o efeito fitotóxico do alumínio promova a destruição das células meristemáticas da raiz alterando a produção de hormônios que controlam o crescimento da parte apical (FOY *et al.*, 1978), quebrando a dominância da raiz principal e induzindo a ramificação de raízes secundárias. BENNET *et al.* (1986) relataram que o milho tratado com alumínio apresenta uma maior proliferação das raízes laterais e que este mecanismo possivelmente evita a inibição da absorção de nutrientes.

Na variedade Paulsen 1103 não foram observadas diferenças significativas com relação ao número de raízes secundárias e totais. Este comportamento, diferentemente do verificado para a variedade Gravesac, pode demonstrar que o efeito de toxicidez de alumínio é dependente do genótipo, conforme sugerido por FRÁGUAS (1999). No entanto, COMIN *et al.* (1999) encontraram reduções no número total de raízes para a variedade Paulsen 1103 de 31,9; 66,9; 73,1 e 65,5% em concentrações de Al de 200, 400, 600 e 800 μM , respectivamente, trabalhando em solução nutritiva. Porém, existem outros sintomas também relacionados com o sistema radicular, atribuídos ao alumínio, que puderam ser observados no cultivo *in vitro*. Ocorreu a inibição do alongamento do eixo principal (**Figuras 14, 15, 16, 17 e 18**), também verificado por FURLANI (1989) e FRÁGUAS (1996), presença de raízes com coloração marrom, principalmente nas extremidades (**Figuras 17 e 18**), conforme relatado por FOY (1984), e BASSO *et al.* (2000) e também por FRÁGUAS (1996) que trabalhou especificamente com porta-enxertos de videira. Observou-se também raízes laterais curtas e grossas (**Figura 13**), além de frágeis e quebradiças, com o início de emissão de raízes próximas ao ponto de crescimento da raiz principal (**Figuras 14, 15, 16, 17 e 18**), também descrito por FOY (1984), TAYLOR (1988), FURLANI (1989) e BASSO *et al.* (2000). Ocorreu também o aparecimento de um sintoma característico não descrito na literatura: raízes secundárias com tamanho superior a raiz principal, que apresentava crescimento paralisado devido a reações provocadas pelo alumínio (**Figuras 14 e 15**).

Quanto ao peso seco radicular, não verificou-se relação com as diferentes concentrações de alumínio em ambas as variedades. Resultados estes que estão de acordo com FAHL *et al.* (1982) e SOUZA *et al.* (2000).

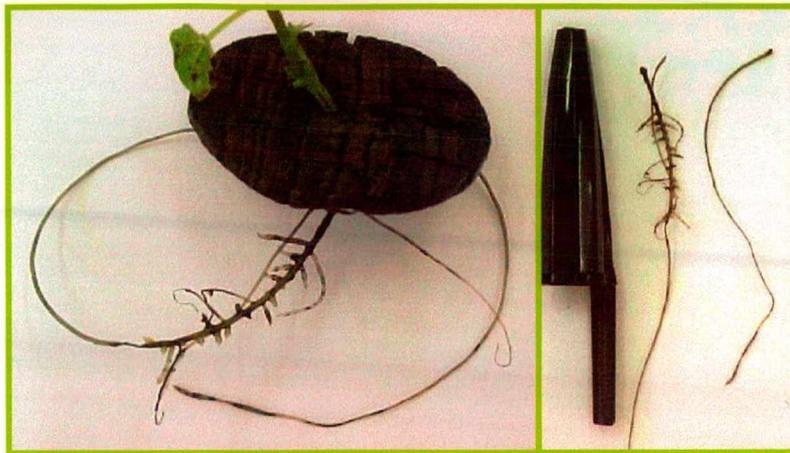


Figura 13 - Sintomas de toxicidez de alumínio no sistema radicular de porta-enxerto de videira Paulsen 1103 *in vitro*. Grande número de raízes laterais curtas e grossas (atrofiadas) com coloração escura. Concentração de Al = 0,425mM. UFSC - Fpolis/SC.

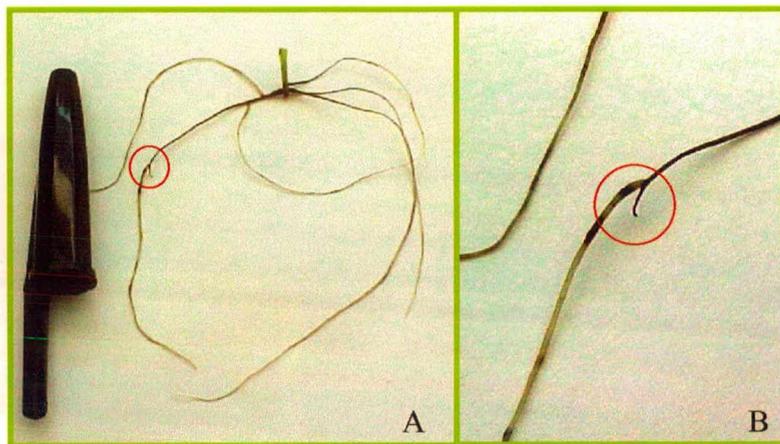


Figura 14 - Sintomas de morte do meristema apical com emissão de uma nova raiz próxima ao ápice radicular em porta-enxerto de videira Paulsen 1103 *in vitro*. Evidenciado em (A) a nova raiz que apresenta tamanho semelhante a original. Em (B) mudança típica de coloração da nova raiz. Concentração de Al=0,425mM. UFSC - Fpolis/SC.

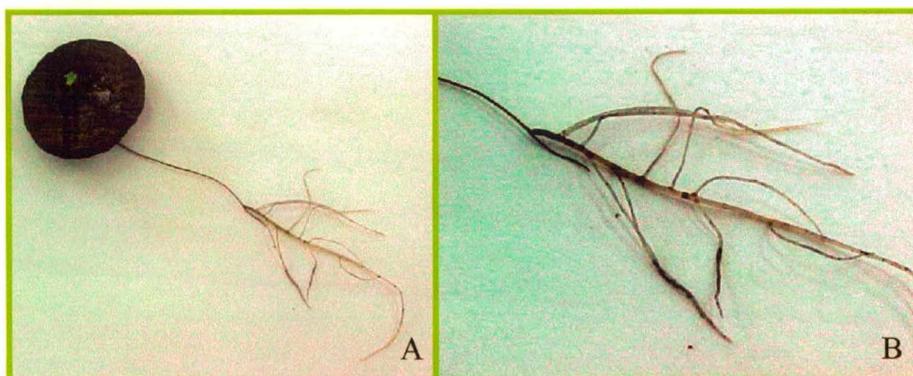


Figura 15 - Sintomas de morte do meristema apical com emissão de uma nova raiz em porta-enxertos de videira Paulsen 1103 *in vitro* (A). Em (B) a emissão de uma raiz secundária de maior diâmetro que a raiz principal, e sinais de lesões no sistema radicular. Concentração de Al =1,00mM. UFSC - Fpolis/SC.

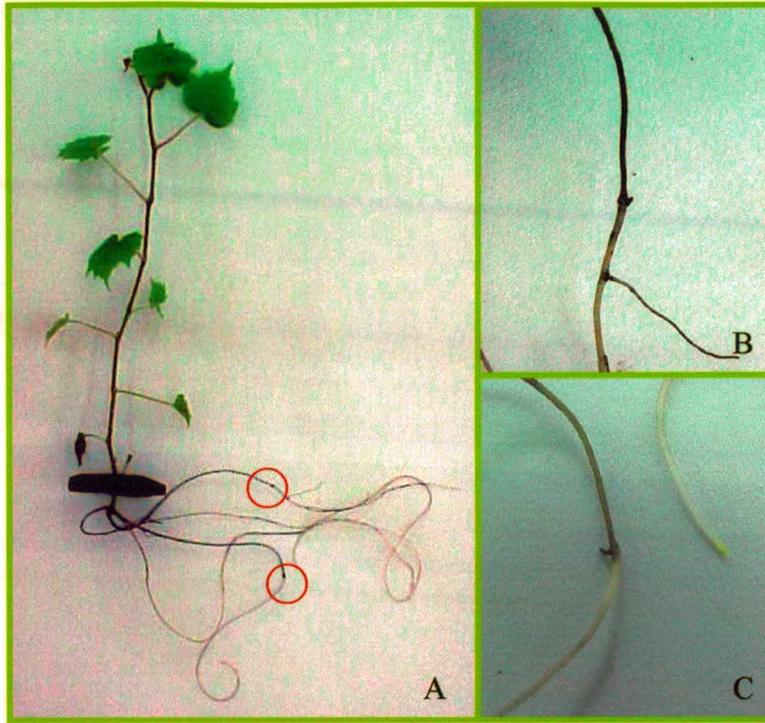


Figura 16 - Sintomas de morte do meristema apical com emissão de uma nova raiz muito próxima ao ápice radicular em porta-enxertos de videira Paulsen 1103 *in vitro* (A). Em (B) e (C) detalhes da formação de novas raízes. Concentração de Al=1,00mM. UFSC - Fpolis/SC.

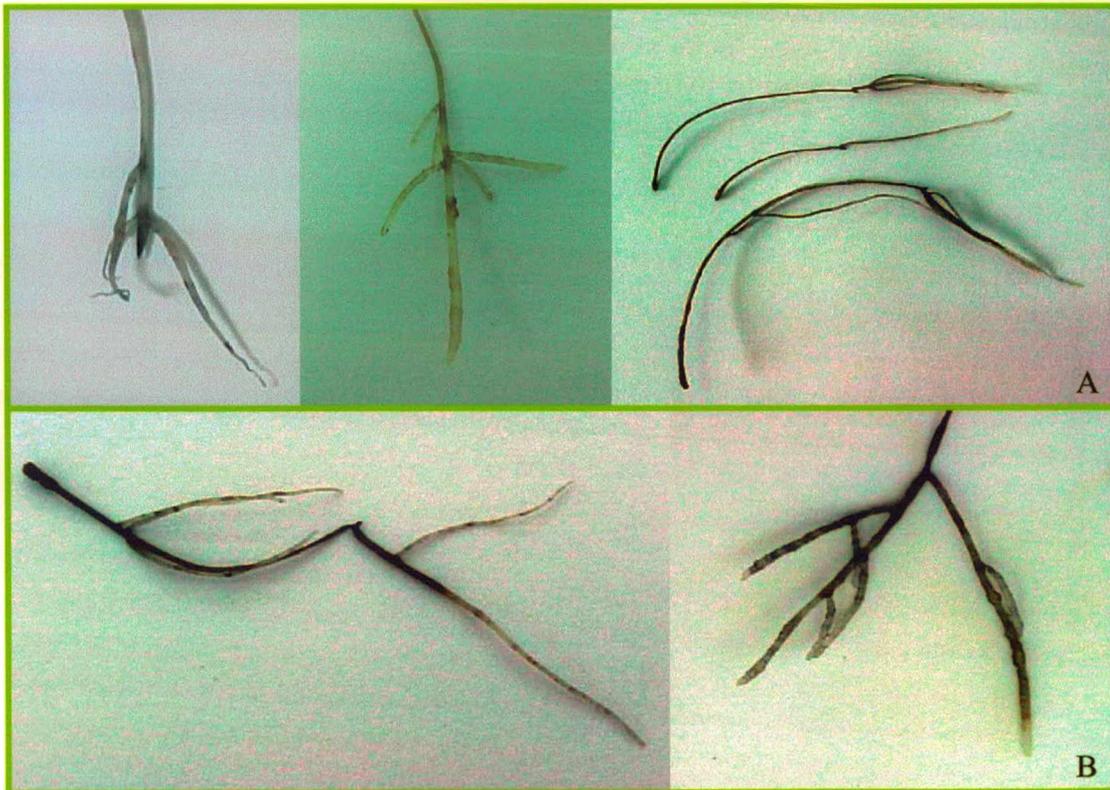


Figura 17- Sintomas causados pela toxicidez por alumínio em porta-enxertos de videira Paulsen 1103 *in vitro*. (A) paralisação do crescimento apical radicular; as concentrações de alumínio são respectivamente de 0,425 mM, 0,650 mM, e 1,375 mM. (B) raízes anormais e de coloração escura (Al = 1,2 mM). UFSC - Fpolis/SC.

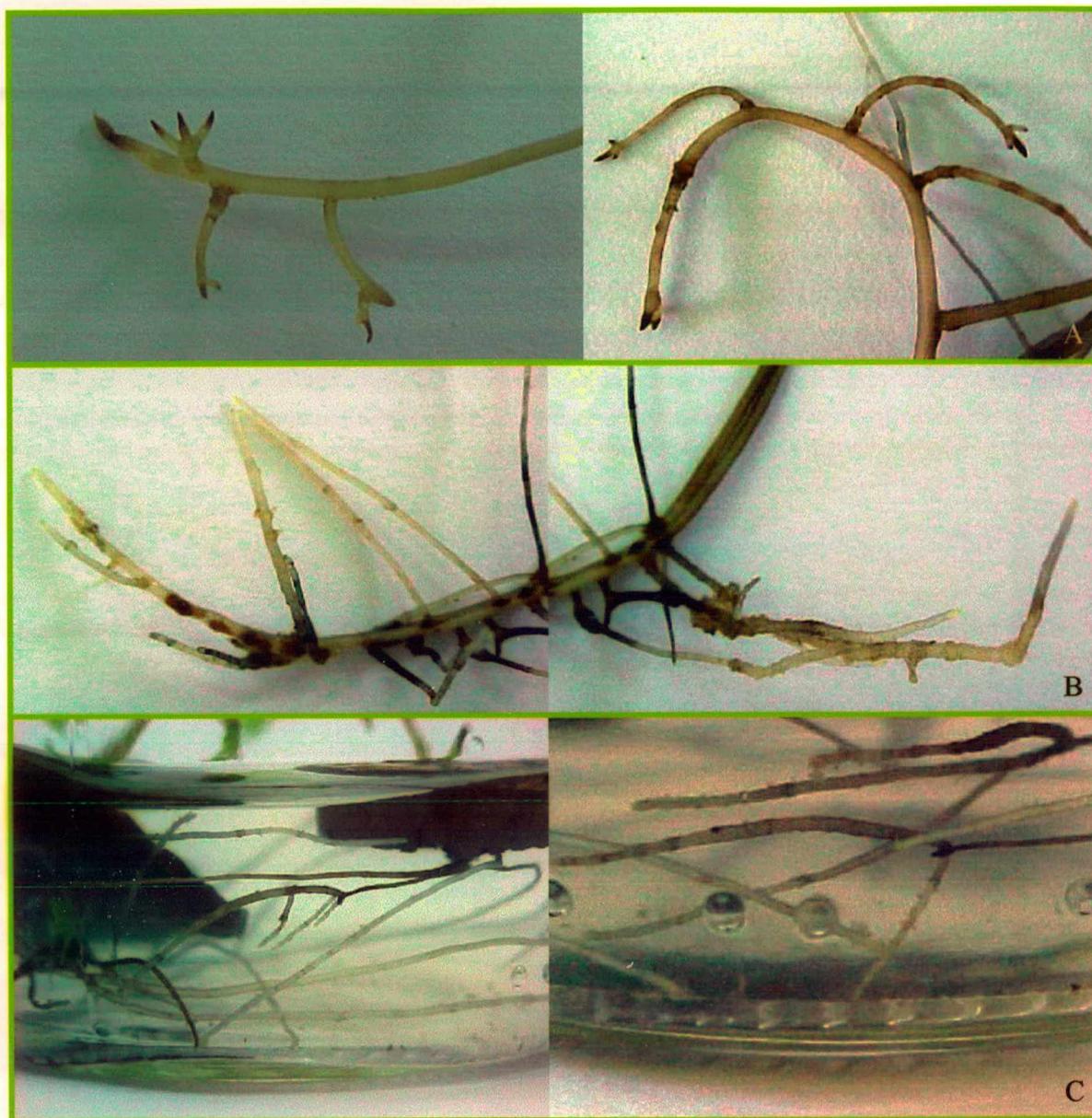


Figura 18 - Sintomas causados pela toxicidez por alumínio em porta-enxertos de videira Gravesac *in vitro*. (A) paralisação do crescimento apical radicular (Al = 0,250 mM). (B) raízes anormais e de coloração escura (Al = 0,425 mM). (C) detalhes de raízes com crescimento apical paralisado no meio de cultura (Al = 0,425 mM). UFSC - Fpolis/SC.

V.4.2. Efeito do alumínio no crescimento do caule

No caule crescido *in vitro* buscou-se avaliar a variável peso seco, que expressa o crescimento e a biomassa do caule da planta *in vitro*.

Através das Figuras 19 e 20 observa-se que as plantas submetidas ao estresse de alumínio *in vitro* apresentam um comportamento de acúmulo de biomassa no caule em dois períodos bem característicos: um estímulo ao acúmulo de biomassa no caule até as concentrações de alumínio próximas de 0,650mM e uma redução do peso seco em concentrações superiores. Os resultados demonstram claramente para ambas as variedades, que as concentrações de alumínio superiores a 0,650mM são prejudiciais ao desenvolvimento do caule *in vitro*, provocando redução da biomassa do caule.

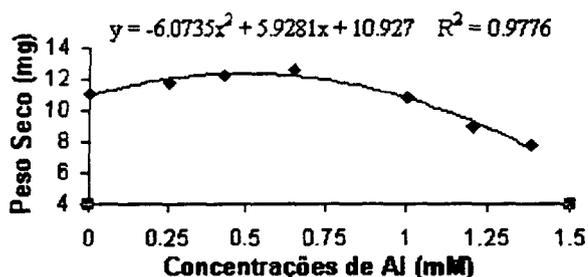


Figura 19 – Relação do peso seco do caule (mg) em função das concentrações de Al (mM) na var. **Gravesac** *in vitro*. UFSC - Fpolis/SC.

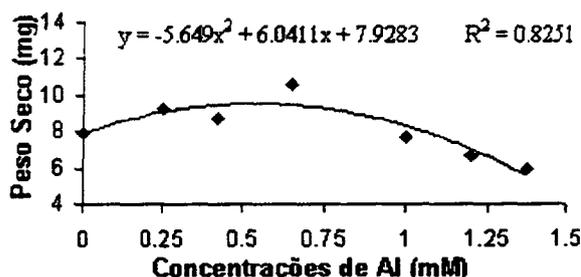


Figura 20 – Relação do peso seco do caule (mg) em função das concentrações de Al (mM) na var. **Paulsen 1103** *in vitro*. UFSC - Fpolis/SC.

A redução de biomassa (peso seco) em plantas submetidas ao estresse de alumínio foi relatada por diversos autores, entre eles: FAHL *et al.* (1982), MAGALHÃES (1987), PINTRO *et al.* (1995), COMIN *et al.* (1999), FRÁGUAS (1999) e DANTAS *et al.* (2001), que verificaram que a ação do alumínio pode inibir o desenvolvimento radicular. Como existe uma correlação estreita entre o desenvolvimento do sistema radicular e a parte aérea das plantas, soluções com teores altos de alumínio promovem a inibição do desenvolvimento da folha/caule (CAMARGO & FURLANI, 1989). Entretanto, MAGALHÃES (1987), trabalhando com porta-enxertos de *Citrus* verificou que o aumento nas concentrações de alumínio, até um certo limite, promovia ganhos de peso seco tanto na parte aérea quanto no sistema radicular.

Como sintomas visuais da toxicidez por alumínio no caule, a variedade Paulsen 1103 apresentou morte das pontas de crescimento (verificado a partir da segunda semana de tratamento). Este sintoma é normalmente relacionado à deficiência de cálcio provocado pelo alumínio (FOY, 1984). Tais observações estão de acordo com FRÁGUAS (1999), que relatou grandes reduções nos teores de cálcio da variedade Paulsen 1103, submetida ao estresse de alumínio.

V.4.3. Efeito do alumínio no crescimento das folhas

Nas folhas crescidas *in vitro* avaliou-se os parâmetros de crescimento relacionados com a área foliar e a produção de biomassa (peso seco).

Os resultados relacionados ao desenvolvimento foliar *in vitro* para os porta-enxertos Gravesac e Paulsen 1103 são apresentados nas Figuras 21 e 22.

Observa-se que a variedade Gravesac (Figura 21) apresentou uma regressão quadrática, onde aumentos nas concentrações de alumínio até 0,650mM promovem um incremento da área foliar, e concentrações superiores a 0,650mM restringem progressivamente o crescimento das folhas. A variedade Paulsen 1103 (Figura 22), apresentou redução da área foliar nas concentrações de alumínio a partir de 0,250mM. Em concentrações superiores a esta, o alumínio passa a exercer um efeito fitotóxico reduzindo o crescimento da área foliar até a concentração de 1,0mM, estabilizando em concentrações mais elevadas.

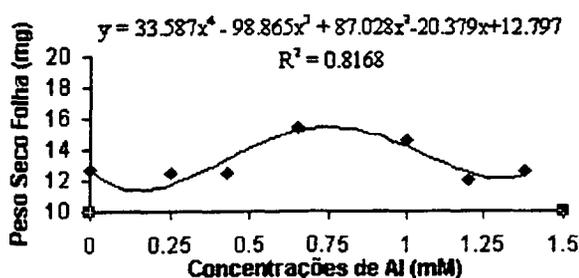


Figura 21 – Relação da Área Foliar (cm^2), em função das concentrações de Al (mM) para a var. Gravesac *in vitro*. UFSC - Fpolis/SC.

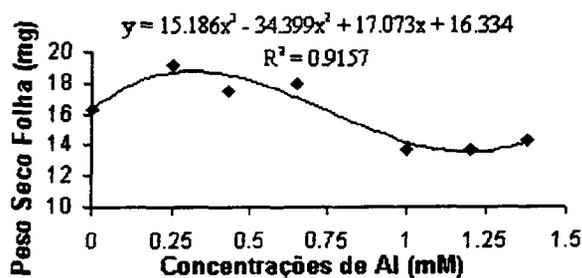


Figura 22 – Relação da Área Foliar (cm^2), em função das concentrações de Al (mM) para a var. Paulsen 1103 *in vitro*. UFSC - Fpolis/SC.

Para as duas variedades avaliadas verificou-se um (forte) efeito de redução da área foliar *in vitro*. DANTAS *et al.* (2001) encontraram respostas diferenciadas quanto ao número

de folhas em porta-enxertos de macieira nos tratamentos com alumínio. SANTOS *et al.* (1999), verificaram reduções na área foliar específica, de porta-enxertos de *Citrus*, com o aumento das concentrações de alumínio. Estes resultados são diferentes dos obtidos por SOUZA *et al.* (2000), que não encontraram diferenças na área foliar de variedades de milho cultivados em diferentes saturações de alumínio. No entanto, pode-se ressaltar que estes ensaios foram realizados no solo, de forma que as diferentes saturações de alumínio propostas, não necessariamente levaram a obtenção de maiores atividades de alumínio. E no caso afirmativo, este fenômeno pode não ter apresentado a magnitude necessária para permitir a avaliação entre as diferentes variedades.

De modo geral, foi constatado que as folhas jovens apresentaram redução significativa de crescimento, sintoma relacionado com a deficiência de fósforo (FURLANI, 1989). Também verificou-se o enrolamento das folhas, um sintoma típico de toxicidez por alumínio que normalmente está envolvido com a deficiência de cálcio (FOY, 1984). Para porta-enxertos de videira, a absorção de nutrientes em presença de alumínio apresenta respostas variadas; no entanto, as maiores reduções observadas se referem ao teor de cálcio nas folhas (FRÁGUAS, 1999). Diversos pesquisadores sugerem que as células das raízes e protoplastos respondem, na presença do alumínio, com mudanças fisiológicas necessárias para restabelecer a homeostase interna, mecanismos possíveis apenas em altas concentrações de Ca^{+2} e K^{+} (LINDBERG & STRID, 1997). E, que o alumínio bloqueia os transportadores de Ca^{+2} presentes na membrana plasmática, podendo ser uma das principais atividades fitotóxicas exercidas pelo alumínio (JONES *et al.*, 1998).

Os resultados relacionados ao peso seco das folhas das variedades Gravesac e Paulsen 1103 crescida *in vitro* são apresentados nas **Figuras 23 e 24**.

Foram identificados comportamentos distintos entre as variedades. De maneira geral, as médias do peso seco das folhas para a variedade Gravesac (**Figura 23**) não apresentaram correlações negativas com as concentrações de alumínio, demonstrando um certo efeito positivo na produção de biomassa seca nas concentrações de alumínio entre 0.650mM e 1.0mM, com decréscimo em concentrações superiores.

Na variedade Paulsen 1103 (**Figura 24**), observou-se que na concentração de alumínio de 0,250mM ocorreu um pequeno acréscimo de biomassa nas folhas, porém nas concentrações superiores a esta, verificou-se redução dos pesos secos das folhas até atingir valores mínimos de crescimento foliar nas concentrações superiores a 1,0mM de alumínio.

Observou-se, através das curvas de regressão, que o efeito do alumínio no crescimento foliar (redução do peso) foi muito pronunciado em ambas as variedades. Mostrando fortes

reduções nas variedades Gravesac e Paulsen 1103 a partir das concentrações de 0.650mM e 0.425mM, respectivamente.

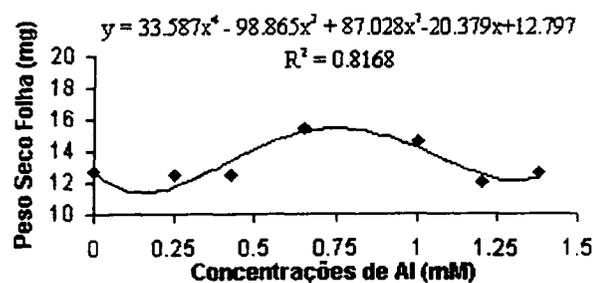


Figura 23 – Relação do peso seco das folhas (mg) em função das concentrações de Al (mM) na var. **Gravesac** *in vitro*. UFSC - Fpolis/SC.

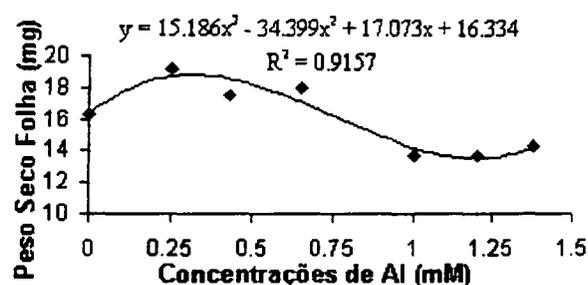


Figura 24 – Relação do peso seco das folhas (mg) em função das concentrações de Al (mM) na var. **Paulsen 1103** *in vitro*. UFSC - Fpolis/SC.

Para MOUSTAKAS *et al.* (1996), o alumínio induz reduções na fotossíntese, mecanismo que está em parte associado com o fechamento dos estômatos, como também a um menor transporte de elétrons no fotossistema II, fenômenos que provavelmente são resultantes de prejuízos causados pelo alumínio, que afetam o metabolismo de carbono e a regulação dos estômatos. LIDON *et al.* (2000) observaram que a translocação de fósforo e cálcio no milho, em concentrações de alumínio superiores a 0,33mM, decresceu. Desta maneira, pode-se associar que plantas com restrições à fotossíntese, deficiência de fósforo e cálcio, apresentam redução da biomassa radicular, bem como da brotação (folhas e caule), conforme observado por SUZUKI *et al.* (1999) e LIDON *et al.* (2000).

V.4.4. Efeito do alumínio sobre as variáveis compostas

Após realizadas as análises das partes das plantas (raízes, caules e folhas), a fim de conhecer o comportamento de cada uma delas individualmente, fez-se necessário, para melhor compreensão dos resultados obtidos, avaliar o comportamento das interações destas partes como um todo, em condições de estresse por alumínio.

Seguindo metodologias propostas por FAHL *et al.* (1982), BAVARESCO *et al.* (1993), COMIN *et al.* (1999), FRÁGUAS (1999), DANTAS *et al.* (2001), foram realizadas

avaliações sobre parâmetros da parte aérea (caule + folhas) e total (caule +folha +raízes) bem como a sua relação.

Através dos resultados apresentados nas Figuras 25 e 26, pode-se observar o comportamento do peso seco da parte aérea em função das diferentes concentrações de alumínio. Para a variedade Gravesac (Figura 25), observa-se que as baixas concentrações de alumínio não exercem nenhum efeito sobre o peso seco para a parte aérea. A partir da concentração de 0,425mM de alumínio, ocorre um incremento de biomassa aérea até as concentrações próximas de 0,650mM. A partir desta concentração verifica-se uma inibição do crescimento das plantas, de forma que nas concentrações superiores (1,2mM e 1,375mM) de alumínio o crescimento torna-se limitado.

Para a variedade Paulsen 1103 (Figura 26), observou-se uma maior sensibilidade ao alumínio. Verificou-se na concentração 0,250mM de alumínio um estímulo ao acúmulo de biomassa na parte aérea. Entretanto, a partir desta concentração verifica-se uma queda acentuada no peso seco da parte aérea.

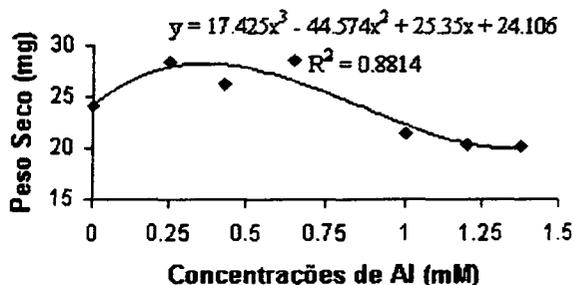
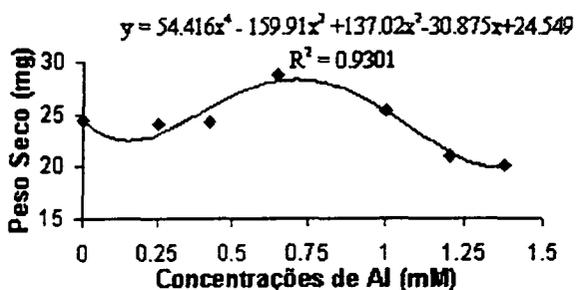


Figura 25 – Relação do peso seco da parte aérea (caule + folhas), em função das concentrações de Al (mM) na var. **Gravesac** *in vitro*. UFSC - Fpolis/SC.

Figura 26 – Relação do peso seco da parte aérea (caule + folhas), em função das concentrações de Al (mM) na var. **Paulsen 1103** *in vitro*. UFSC - Fpolis/SC.

Os efeitos do alumínio relacionados ao acúmulo de biomassa da parte aérea das plantas têm sido estudados por vários autores (FAHL *et al.*, 1982; COMIN *et al.*, 1999; FRÁGUAS, 1999; DANTAS *et al.*, 2001). COMIN *et al.* (1999), trabalhando com as variedades de videiras Paulsen 1103 e Gravesac, em solução nutritiva, verificaram redução do peso seco da parte aérea, correlacionado com acréscimo nas concentrações de alumínio. Entretanto, FRÁGUAS (1999), avaliando diferentes variedades de porta-enxertos de videira e, DANTAS *et al.* (2001) com porta-enxertos de macieira, verificaram que existe variabilidade entre genótipos com relação a estresse de alumínio. Estes autores encontraram variedades que

responderam tanto positivamente quanto negativamente no acúmulo de biomassa da parte aérea, em resposta as concentrações de alumínio.

Quanto as divergências de respostas verificadas por FAHL *et al.* (1982), FRÁGUAS (1999) e DANTAS *et al.* (2001), podem ser atribuídas aos vários fatores que estão envolvidos, como questões de tolerância de genótipos, metodologias e processos de avaliação, concentrações e/ou atividades de alumínio, além de outros.

Levando em consideração as avaliações de pH realizadas e as correções das atividades de Al^{+3} , observadas no item V.3.1 (Figuras 07, 08, 09 e 10), estes dados foram interpolados com os parâmetros morfo-fisiológicos para avaliar o crescimento da videira *in vitro* e suas interações com os mecanismos de tolerância.

Com os resultados de peso seco da parte aérea e suas respectivas correções de atividades de Al^{+3} obteve-se os resultados apresentados nas Figuras 27 e 28.

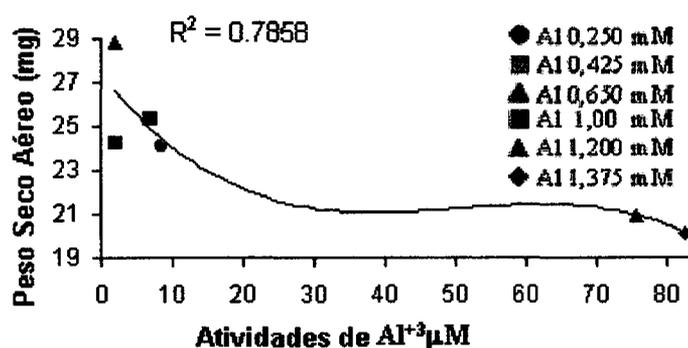


Figura 27 - Relação do peso seco da parte aérea (Caule+Folhas), em função das atividades de Al^{+3} corrigidas pelos valores de pH. Var. Gravesac *in vitro*. UFSC - Fpolis/SC.

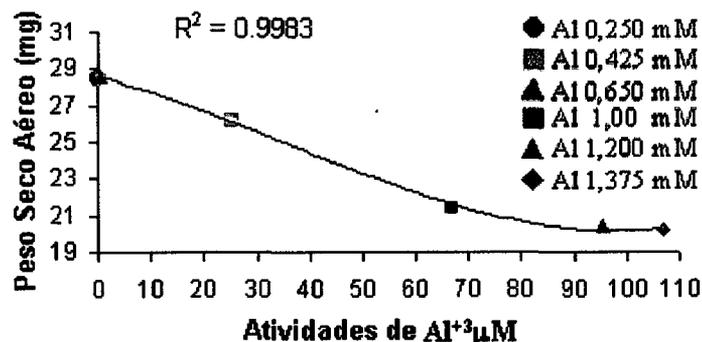


Figura 28 - Relação do peso seco da parte aérea (Caule+Folhas), em função das atividades de Al^{+3} corrigidas pelos valores de pH. Var. Paulsen 1103 *in vitro*. UFSC - Fpolis/SC.

Os resultados (Figuras 27 e 28) permitiram verificar que as respostas de peso seco aéreo, em função da atividade de Al^{+3} , apresentam diferenças significativas entre as duas variedades. A variedade Gravesac (Figura 27) apresentou peso seco aéreo e atividades de Al^{+3} muito próximos naqueles tratamentos com concentração de alumínio entre 0,250mM e 1,000mM. As concentrações de alumínio superiores se mostraram bem limitantes para o crescimento das plantas, mostrando que nestas concentrações as respostas das plantas em termos de crescimento passam a ser mínimas.

A variedade Paulsen 1103 (Figura 28), por sua vez, apresentou proximidade nas observações de peso seco aéreo naqueles tratamentos com concentração de alumínio entre 0,250mM e 0,650mM. A resposta do tratamento com 1,000mM de alumínio está mais próxima das verificadas nas concentrações de 1,200mM e 1,375mM que não apresentaram desenvolvimento das plantas. As testemunhas não fizeram parte das análises de peso seco aéreo e atividades de Al^{+3} porque as suas respostas foram diferentes das observadas nos tratamentos com Al^{+3} . Supõem-se que o alumínio no meio cultura induz mecanismos bioquímicos e fisiológicos na planta, que melhoram as condições de crescimento neutralizando a toxicidez por H^+ e Al^{+3} .

ALVA *et al.* (1886) trabalhando com várias culturas, tais como alfafa, girassol, soja e trevo, realizaram correção das atividades das espécies monoméricas de $Al(OH)^{+2}$ e $Al(OH)^+$ pelo pH, determinando correlações positivas com o crescimento das raízes.

Como análises finais, buscou-se comparar a distribuição do carbono (partição de biomassa) entre o sistema radicular e a planta como um todo. Os resultados para a variedade Gravesac estão apresentados nas Figura 29. Verificou-se que existe uma grande estabilidade entre a relação do peso seco radicular e o peso seco total (PSR/PST), até a concentração de alumínio de 0,650. Para concentrações superiores esta relação se altera, apresentando valores maiores.

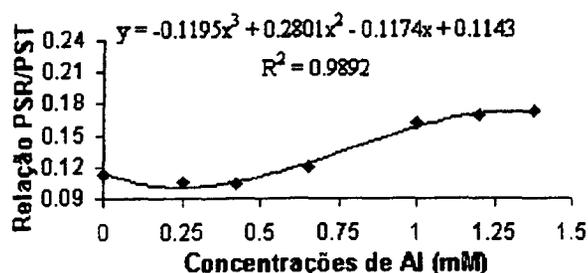


Figura 29 - Relação peso seco raízes/peso seco total, em função das concentrações de Al (mM) para a var. Gravesac *in vitro*. UFSC - Fpolis/SC.

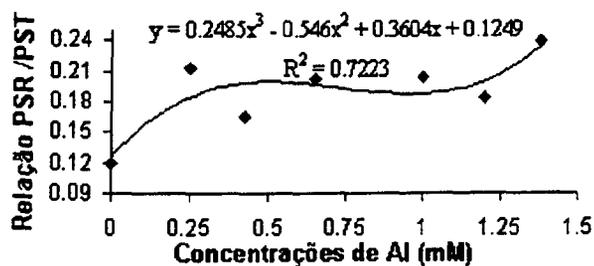


Figura 30 - Relação peso seco raízes/peso seco total, em função das concentrações de Al (mM) para a var. Paulsen 1103 *in vitro*. UFSC - Fpolis/SC.

A variedade Paulsen 1103 (**Figura 30**), por sua vez, apesar de não ter apresentado regressão significativa para esta variável, apresentou um padrão de elevação da relação bem definido, com acréscimos praticamente constantes a medida que aumenta a concentração de alumínio. Elevação esta que se faz notar desde a primeira concentração de alumínio utilizada.

Os valores apresentados pelas testemunhas, da relação (PSR/PST), dentro dos tratamentos testados, provavelmente representam o valor mais próximo daqueles verificados em condições de crescimento adequadas. Tomando isto como premissa, os valores da relação (PSR/PST), que se afastam daqueles verificados na testemunha, provavelmente estão relacionados com os efeitos fitotóxicos do alumínio sobre as plantas.

Assim, o Gravesac, que apresentou relação (PSR/PST) constante até a concentração de 0,650mM de alumínio, parece ter um crescimento adaptado às condições de acidez e toxicidez de Al^{+3} .

V.4.5. Conclusões

- As avaliações morfo-fisiológicas demonstraram comportamentos distintos entre as variedades (Gravesac e Paulsen 1103), com relação as concentrações de alumínio.
- Ocorreu correlação negativa entre atividades de Al^{+3} e produção de biomassa.
- A partição de carbono entre as variedades foi alterada pelas diferentes concentrações de alumínio.

VIII - Considerações Finais

A videira (*Vitis* spp) demonstrou excelente comportamento para avaliações *in vitro*. As variedades de porta-enxerto Gravesac e Paulsen 1103 foram micropropagadas e apresentaram crescimentos diferenciados, confirmando que a variabilidade genética é expressada *in vitro* e deve ser considerada nos trabalhos de fisiologia, bioquímica e melhoramento da videira.

Na propagação *in vitro*, as duas variedades estudadas apresentaram crescimento adequado, desenvolvimento normal dos estômatos e uma eficiente fase de aclimatização, onde foram observadas taxas de 90–98% de sobrevivência das plantas.

A nova metodologia de propagação *in vitro* em meio líquido produziu plantas com crescimento e desenvolvimento normais, demonstrando ser um método viável e confiável. Apresenta como vantagens maior facilidade no processo de elaboração dos meios de cultura e menores custos por dispensar a utilização de ágar-ágar (cerca de 50% do meio de cultura). Pode, então, ser normalmente utilizada em substituição às técnicas até agora empregadas, tanto para a propagação quanto para a avaliação de videiras *in vitro*.

A metodologia proposta para avaliação dos efeitos fitotóxicos do alumínio, em explantes introduzidos diretamente nos tratamentos (concentrações de alumínio), indicou diferenças entre as variedades, com maior suscetibilidade da variedade Paulsen 1103. No entanto, o uso de explantes introduzidos diretamente no meio com baixo pH e concentrações de alumínio, apresentou uma alta variabilidade de respostas, provavelmente devido a inexistência de sistema radicular, toxicidez de H^+ e diferenças entre os explantes.

Com as informações e conhecimentos acumulados, foram propostas modificações na metodologia inicial, substituindo os explantes por plantas com 30 dias de *cultura in vitro*, previamente selecionadas pelo tamanho, com avaliações periódicas do pH dos meios de cultura, afim de verificar o comportamento das variedades em condições de estresse por alumínio.

Buscando verificar diferenças entre os dois porta-enxertos ao estresse por alumínio, foram realizadas as correções das atividades de Al^{+3} , em função dos valores de pH observados. As variedades Gravesac e Paulsen 1103 apresentaram mecanismos de exclusão do alumínio, via elevação do pH dos meios de cultura *in vitro*. No entanto, a variedade Gravesac apresentou respostas mais rápidas e acentuadas, apresentando mecanismos capazes de elevar os valores de pH dos meios mais precocemente. Além disto, o Gravesac apresentou

elevação do pH com concomitante a redução das atividades de Al^{+3} , indicando que apresenta mecanismos de tolerância e/ou adaptação a solos com baixos valores de pH, podendo assim, suportar melhor o estresse do alumínio no meio.

Como os mecanismos de tolerância ao alumínio apresentados pelas duas variedades têm correlação com o potencial de elevação do pH rizosférico (toxicidez H^+), o melhor desempenho do Gravesac provavelmente está relacionado com o seu processo de seleção para solos ácidos, que lhe permitiu apresentar mecanismos com respostas rápidas para toxicidez por H^+ , de maior magnitude; mecanismos estes que também propiciam melhores condições de crescimento em ambientes com elevadas atividades de Al^{+3} .

Com base nos sintomas visuais da fitotoxidez por alumínio observados nas plantas *in vitro*, verificou-se a eficiência do sistema utilizado em reproduzir situações de estresse por alumínio. Verificou-se também sintomas ainda não descritos na literatura, como o crescimento de raízes próximas ao ápice da raiz principal, com proporções superiores a da raiz que lhe deu origem.

Quanto as avaliações morfo-fisiológicas, as variedades de porta-enxertos de videira apresentaram comportamentos bem característicos e distintos para uma mesma variável analisada. Demonstrando que as respostas são varietais (genotípicas) com relação às concentrações de alumínio.

A avaliação de pH no meio de cultura permitiu demonstrar alta correlação entre as atividades de Al^{+3} nos tratamentos com as produções de biomassa (peso seco) observadas.

Verificou-se entre o Gravesac e Paulsen 1103 comportamentos distintos para as diferentes variáveis estudadas. Observa-se que o melhor desempenho deve ser efetuado simultaneamente sobre várias características, sendo adotado aquele que apresentar superioridade no maior número de variáveis significativas.

Desta forma, acredita-se através da metodologia de avaliação *in vitro*, que o Gravesac demonstrou ser um porta-enxerto promissor quando submetido as condições estressantes de baixo pH e atividades de alumínio, considerando principalmente os seguintes aspectos:

- a) Maior capacidade de elevar o pH dos meios com respectiva redução das atividades de alumínio.
- b) Prejuízos menos acentuados sobre os parâmetros morfo-fisiológicos de desenvolvimento, quando submetido ao alumínio.
- c) Menores alterações apresentadas na relação entre a biomassa acumulada.

Com relação a experimentos futuros, sugere-se :

A verificação do envolvimento do metabolismo de ácidos orgânicos em videira *in vitro* com a tolerância ao alumínio. Tanto no nível de solução, com a determinação das concentrações destes ácidos no meio de cultura, quanto no nível enzimático, com a determinação das quantidades e atividades das enzimas envolvidas.

O desenvolvimento de metodologias que permitam, *in vitro*, manter o potencial fitotóxico do alumínio ao longo de todo o período experimental, o que talvez permitiria a obtenção de resultados mais precoces.

A utilização de novos genótipos, bem como de outros meios de cultura de menor concentração de sais, visando verificar o efeito do alumínio no comportamento das variedades, e a magnitude do efeito protetor causado pelo Ca, K e P.

Aperfeiçoamento de técnicas que permitam selecionar plantas homogêneas micropropagadas *in vitro* em meio líquido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, F.; MOORE, B.L. Chemical factors affecting root growth in subsoil horizons of coastal plain soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, v. 47, n. 1, p. 99-102, 1983.
- ALCORDO, I.S.; RECHEIGL, J.E. Phosphogypsum in agriculture. *Adv. Agron.* v. 49, p. 55-118, 1993.
- ALVA, A.K.; EDWARDS, D.G.; ASHER, C.J.; BLANEY, F.P.C. Relationships between root length of soybean and calculated activities of aluminum monomers in nutrient solution. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, v. 50, p. 959-962, 1986.
- ANDRADE, L.R.M. ; ISHIZUKA, M.I.J. Stimulation of organic acid excretion by roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat varieties under aluminum stress. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.*, v. 9, n. 1, p. 27-34, 1997.
- ASKANI, A.; BEIDERBECK, R. *In vitro* propagation of *Dactylosphaera vitifolii* SHIMER (Homoptera: Phylloxeridae) on shoot and root cultures of *Vitis* hybrid. *Vitis*, v. 30, p. 223-232, 1991.
- BARKA, E.A.; BELARBI, A.; HACHET, C.; NOWAK, J.; AUDRAN, J.C. Enhancement of *in vitro* growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *Fems microbiology letters*, v. 86, n. 1, p. 91-95, 2000.
- BASSO, S.M.S.; AGNOL, M.D.; CAETANO, J.H.S.; JACQUES, A.V.A. Crescimento de plântulas de *Adesmia* ssp. submetidas a doses de alumínio em solução nutritiva. *Ciência Rural*, v. 30, n. 2, p. 217-222, 2000.
- BASU, U.; GOOD A.G.; AUNG, T.; SLASKI, J.J.; BASU, A.; BRIGGS, K.G.; TAYLOR, G.J. A 23-Kda, root exudate polypeptide co-segregates with aluminum resistance in *Triticum aestivum*. *Physiol. Plant.*, v. 106, n. 1, p. 53-61, 1999.
- BAVARESCO, L.; FREGONI, M.; GAMBI, E. *In vitro* method to screen grapevine genotypes for tolerance to lime-induced chlorosis. *Vitis*, v. 32, p. 145-148, 1993.
- BENNET, R.J.; BREEN, C.M.; FEY, M.V. Aluminum toxicity and induced nutrient disorders involving the uptake and transport of P, K, Ca and Mg in *Zea mays* L. *South African J. of Plant and Soil*, v. 3, p. 11-17, 1986.
- BERTON, S.A. Especificação iônica da solução do solo – metodologia e aplicações. In: *Simpósio Avançado de Solos e Nutrição de Plantas*, 2., Piracicaba, 1989. Anais. Campinas, Fundação Cargill, p. 17-23, 1989.
- BLANKE, M.M.; BELCHER, A.R. Stomata of apple leaves cultured *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, v. 19, p. 85-89, 1989.

- BLAMEY, F.P.C.; WHEELER, D.M.; EDMEADES, D.C.; CHRISTIE, R.A. Independence of differential aluminum tolerance in *Lotus* species. **J. Plant. Nutr.**, v. 13, p. 729-744, 1990.
- BONA, L.; MATUZ, J.; PURNHAUSER, L. Aluminium tolerance of *Triticum aestivum* L. populations related to plant-induced pH changes of nutrient solution. In: **Plant-soil interactions at low pH**. Netherlands: Kluwer Academic, p. 1057-1062, 1991.
- BOUQUET, A. Intérêt des techniques de culture *in vitro* pour l'amélioration génétique de la vigne. **Bull. O.I.V.**, v. 697-698, n. 179-192, 1989.
- BRACCINI, M.C.L.; MARTINEZ, H.E.P.; PERREIRA, P.R.G.; SAMPAIO, N.F.; SILVA, E.A.M. Tolerância de genótipos de cafeeiro ao Al em solução nutritiva. I. Crescimento e desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 22, p. 435-442, 1998.
- BRAINERD, K.E.; FUCHIGAMI, L.H.; KWIAKOWSKI, S.; CLARK, C.S. Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured 'Pixy' plum grown under different environments. **HortScience**, v. 16, p. 173-175, 1981.
- CAMARGO, O.A.; FURLANI, P.R. Alumínio no solo: concentração, especiação e efeito no desenvolvimento radicular. In: **Simpósio Avançado de Solos e Nutrição de Plantas**, 2., Piracicaba, 1989. Anais. Campinas, Fundação Cargill, p. 45-69, 1989.
- CANÇADO, G.M. A. **Aspectos bioquímicos e genético da tolerância ao alumínio tóxico em milho**. Viçosa. UFSC. 1997. 92p. Dissertação de Mestrado.
- CAPELLADES M.; LEMEUR R.; DEBERGH P. Effect of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in rosa cultured *in vitro*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 25, p. 21-26, 1991.
- CEDERURAL - Conselho Estadual de Desenvolvimento Rural. **Projeto de expansão de viticultura no Vale do Rio do Peixe**. Videira, 1999.
- CHEE, R.; POOL, R.M. *In vitro* propagation of *Vitis*: the effects of organic substances on shoot multiplication. **Vitis**, v. 24, p. 106-108, 1985.
- CHEE, R.; POOL, R.M. Improved inorganic media constituents for *in vitro* shoot multiplication of *Vitis*. **Scientia Hort.**, v. 32, p. 85-95, 1987.
- CHIADMI, N. **Culture *in vitro* de la vigne: régénération de plantes à partir de fragments de limbes foliaires et mise au point d'un test précoce de résistance à la chlorose calcaire**. Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay. 1986. 150p. Tese de Doutorado.
- COMIN, J.J.; FRANZON, R.C.; BURKHARDT, S.L.; SILVA, A. L.; Toxidez do Al em dois porta-enxertos de videira em solução nutritiva. In: **XXIV Reunião de fertilidade do solo e nutrição de plantas**. Resumo, p. 141, 1999.
- CURTIN, D.; SMILLIE, G.W. Soil solution composition as affected by liming and incubation. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v. 4, p. 701-707, 1983.

- DANTAS, A.C.M.; FORTES, G.R.L.; SILVA, J.B.; NEZI, A.N.; RODRIGUES A.C. Tolerância ao alumínio em porta-enxertos somaclonais de macieira cultivados em solução nutritiva. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 36, n. 4, p. 615-623, 2001.
- DELHAIZE, E.; RYAN, P.; RANDALL P. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. **Plant Physiol.**, v. 29, p. 511-566, 1993.
- DELHAIZE, E.; RYAN, P. Update on environmental stress: aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiol.**, v. 107, n. 2, p. 315-321, 1995.
- DELL'ORTO, M.; BRANCADORO, L.; SCIENZA, A.; ZOCCHI, G. Use of biochemical parameters to select grapevine genotypes resistant to iron-chlorosis. **J. of Plant Nutr.**, v. 23, n. 11-12, p. 1767-1775, 2000.
- DESJARDINS, Y. Overview of factors influencing photosynthesis of micropropagated plantlets and their effect on acclimatization. In: **Ecophysiology and photosynthetic *in vitro* cultures**. Cadarache, CEA, 1995. p. 145-160.
- DESPLOBLINS, G. Resistence ou reactivité des producteurs face aux incitations des dispositifs institutionnels: les viticultures riograndense et catarinense du sul-bresilien. Montpellier. 2001. 157p. Dissertação de Mestrado.
- DIAZ, T.; MOSQUERA, M.V.; SANJOSE, M.C.; GONZALEZ, E. Effect of culture media and explant type ion propagation of *Vitis vinifera* L cv Albarino. **Phyton-int. J. of Exp. Bot.**, v. 60, p. 11-15, 1997.
- D'KHILI, B.; BOUBALS, D.; GREANAN, S. Etude de l'incompatibilité au greffage chez la vigne. **Prog. Agr. Vit.**, v. 15-16, p. 351-359, 1994.
- D'KHILI, B.; GREANAN, S. Diagnostic rapide de la nécrose des nervures par la technique de microgreffage de tiges *in vitro*. **J. Int. Sc. Vigne Vin.**, v. 29, n. 1, p. 11-15, 1995.
- DUNCAN, R.R.; WASKON, R.M.; NABORS, M.W. *In vitro* screening and field evaluation of tissue-culture-regenerated sorghum (*Sorghum bicolor*(L.) Moench) for soil stress tolerance. **Euphytica**, v. 85, p. 373-380, 1995.
- DÜRING, H.; HARST, M. Stomatal behavior, photosynthesis and photorespiration of *in vitro* – grown grapevine: effects of light and CO₂. **Vitis**, v. 35, n. 4, p. 163-167, 1996.
- FAHL, J.I.; CARELLI, M.L.C.; DEUBER, R.; NOGUEIRA, S.S.S.; HIROCE, R. Influencia do alumínio no crescimento e na nutrição mineral de cultivares de arroz. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 6, p. 203-208, 1982.
- FALLOT, J.; TEY-RULH P.; COUTOULY, P.; PETITPREZ, M.; ROUSTAN, J.R., PHILIPPE, I.; TABACCHI, R.; Culture *in vitro*: étude de l'Eutypiose et stratégie de creation de somaclones de vigne tolérants. In: **'Cinquantenaire de la culture *in vitro*'**. Colloques de l' INRA, v. 51, p. 151-156, 1990.

- FERNADEZ-CANO, L.H. Los portainjertos en viticultura. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias-Ministerio da Agricultura, Madrid, 31p. (**cuaderno I.N.I.A. n° 4**), 1975.
- FEUCHT, W.; TREUTTER, D.; KEUKENKAMP, I. Growth enhancement of grapevine callus by catechin on auxin-free media. **Vitis**, v. 37, n. 2, p. 67-71, 1998.
- FILA, G.; GHASHGHAIE, J.; HOARAU, J.; CORNIC, G. Photosynthesis, leaf conductance and water relations of *in vitro* cultured grapevine rootstock in relation to acclimatisation. **Physiol. Plant.**, v. 102, n. 3, p. 411-418, 1998.
- FOURNIOUX, J.C.; BESSIS, R. Influence de la teneur en gaz carbonique sur la morphogenèse de la vigne en culture *in vitro*. **Can. J. Bot.**, v. 64, p. 2608-2616, 1986.
- FOURNIOUX, J.C.; BESSIS, R. Use of carbon dioxide enrichment to obtain adult morphology of grapevine *in vitro*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 33, p. 51-57, 1993.
- FOY, C.D.; CHANEY, R.L.; WHITE, M.C. The Physiology of Metal Toxicity in Plants. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v. 29, p. 511-566, 1978.
- FOY, C.D. Physiological Effects of Hydrogen, Aluminum, and Manganese Toxicities in Acid Soils. **In: Soil Acidity and Liming**. 2nd ed. Agronomy Monograph n. 12, p. 57-97, 1984.
- FOY, C.D. Plant Adaptation to Acid, Aluminum-Toxic Soils. **Commun. In: Soil Sci. Plant Anal.**, v. 19, p. 959-987, 1988.
- FRÁGUAS, J.C. & TERSARIOL, A.L. Comportamento de porta-enxertos de videira em relação a níveis de saturação de alumínio no solo. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 28, n. 8, p. 897-906. 1993.
- FRÁGUAS, J.C. Sintomatologia da toxidez do alumínio em porta-enxertos de videira. Bento Gonçalves: Embrapa-CNPUV, 1996. 20p. (Embrapa-CNPUV, **circular técnica, n. 20**).
- FRÁGUAS, J.C. Tolerância de porta-enxertos de videira ao alumínio do solo. **Pesq. Agropec. Bras.** v. 34, n. 7, p. 1193-1200, 1999.
- FURLANI, P. R., Efeitos fisiológicos do alumínio em plantas. **In: Simpósio Avançado de Solos e Nutrição de Plantas, 2.**, Piracicaba, 1989. Anais. Campinas, Fundação Cargill, p. 73-87, 1989.
- GALLOTTI, G.J.M.; SCHUCK, E. Ocorrência de Fusariose em porta-enxertos de videira. **Rev. Agrop. Cat.**, v. 4, n. 1, p. 47-48, 1991.
- GALZY, R. Les possibilités de conservation *in vitro* d'une collection de clones de vignes. **Bull. O.I.V.**, v. 650, p. 375-390, 1985.
- GALZY, R.; HAFFNER, V.; COMPAN, D. Influence of three factors on the growth and nutrition of grapevine microcutting. **J. Exp. Bot.**, v. 41, p. 295-443. 1990.

- GALZY, R.; COMPAN, D. Remarks on mixotrophic and autotrophic carbon nutrition of *Vitis* plantlets cultured *in vitro*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 31, p. 239-244, 1992.
- GODBOLD, D.L.; JENTSCHKE, G. Aluminum accumulation in root cell wall coincides with inhibition of root growth but not with inhibition of magnesium uptake in Norway spruce. **Physiol. Plant.**, v. 102, p. 553-560, 1998.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagation. **In: Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998, v. 2, 864p.
- GREGORI, M.T.; TIZIO, R. Effect of the mycelium, diffused substances and extracts of the fungus *Cladosporium herbarum* (Pers.) link on the *in vitro* and *in vivo* growth of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Cabernet Sauvignon. **Vitis**, v. 36, n. 2, p. 61-65, 1997.
- HAMILTON, C.A.; GOOD, A.G.; TAYLOR, G.J. Induction of vacuolar ATPase and mitochondrial ATP synthase by aluminum in an aluminum-resistant cultivar of wheat. **Plant physiol.**, v.125, n. 4, p. 2068-2077, 2001.
- HASSANI, Z.; BOUBALS, D. Le microgreffage *in vitro*. **Prog. Agr. Vit.**, v. 108, p. 443-445, 1991.
- HAUG, A. Molecular aspects of aluminum toxicity. **C.R.C. Crit. Rev. Plant Sci.** v. 1, p. 345-373, 1984.
- HERRERA-ESTRELLA, L.; CABRERA-PONCE, J. L.; RAMÍRES-RODRIGUE, V.; FLUENTE, J. M.. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. **Science**, v. 276, p. 1566-1568, 1997.
- HOWELER, R. H. Identifying plants adaptable to low pH conditions. **In: Plant-soil interactions at low pH**. p. 885-904, 1991.
- HUE, N. V.; CRADDOCK, G. R.; ADAMS, F. Effect of organic acids on aluminium toxicity in subsoils. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v. 50, p. 28-34, 1986.
- ICEPA - INSTITUTO DE PLANEJAMENTO E ECONOMIA AGRÍCOLA DE SANTA CATARINA. **Síntese anual da agricultura de Santa Catarina**. Florianópolis, 1999.
- IACONO, F.; MICHELI, L.; CAMPOSTRINI, F.; FALCETTI, M.; MARTINELLI, L. Comparation between photosynthesis and transpiration of *in vitro* cultured plantlets and *in vivo* cultured plants of genus *Vitis*. Implications of transplanting. **In: Proc. IV Int. Symp. Grapevine physiol.**, p. 507-511, 1992.
- IACONO, F.; RENIERO, F.; SCIENZA, A. Discriminazione isotopica del carbonio, emissione di fluorescenza e scambi gassosi nel genere *Vitis* durante l'adattamento allo stress idrico. Definizione di un indice di tolleranza genotipica alla siccità. **Riv. Vit. Enol.**, v. 2, p. 25-34, 1995.

- ISHIKAWA, S.; WAGATSUMA, T.; SASAKI, R.; OFEI-MANU, P. Comparison of the amount of citric and malic acids in Al media of seven plant species and two cultivars each in five plant species. **Soil Sci. and Plant Nutr.**, v. 46, n. 3, p. 751-758, 2000.
- JAIN, S.M. Tissue culture-derived variation in crop improvement. **Euphytica**, v. 118, n. 2, p. 153-166, 2001.
- JAYASANKAR, S.; LI Z.J.; GRAY, D.J. *In-vitro* selection of *Vitis vinifera* 'Chardonnay' with *Elsinoe ampelina* culture filtrate is accompanied by fungal resistance and enhanced secretion of chitinase. **Planta** v. 211, n. 2, p.200-208, 2000.
- JONES, D.L.; KOCHIAN, J.V.; GILROY, S. Aluminum induces a decrease in cytosolic calcium concentration in BY-2 tobacco cell cultures. **Plant Physiol.**, v. 116, p. 81-89, 1998.
- KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum resistance in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, v. 46, p. 237-260, 1995.
- KOCHIAN, V.L.; DEGENHARDT, J.; LARSEN, P.B.; HOWELL, S.H. Aluminum resistance in the *Arabidopsis* mutant *alr-104* is caused by a aluminum-induced increase in rhizosphere pH. **Plant Physiol.**, v. 117, p. 19-27, 1998.
- LARSEN, P. B.; DEGENHARDT, J.; TAI, C.; STENZLER, L. M.; HOWELL, S. H.; KOCHIAN, L. V. Aluminium-resistant *Arabidopsis thaliana* mutants that exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid release from roots. **Plant Physiol.**, v. 117, p. 9-18, 1998.
- LEBRUN, L.; RAJASEKARAN, K.; MULLINS, M.G. Selection *in vitro* for NaCl-tolerance in *Vitis rupestris* Scheele. **Ann. Bot.**, v. 56, p. 733-739, 1985.
- LEBRUN, L. **Etude de l'embryogenèse somatique *in vitro* chez la vigne (*Vitis sp.*) et application à la sélection de plantes tolérantes de fortes concentrations en chlorure de sodium.** Paris. Université de Paris-Sud - Centre d'Orsay. 1987. 145p. Tese de Doutorado.
- LI, X.F.; MA, J.F.; MATSUMOTO, H. Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. **Plant Physiol.**, v. 123, n. 4, p. 1537-1543, 2000.
- LIDON, F.C.; AZINHEIRA, H.G.; BARREIRO, M.G. Aluminum toxicity in maize: Biomass production and nutrient uptake and translocation. **J. of Plant Nutr.**, v. 23, n. 2, p. 151-160, 2000.
- LIMA-DA-SILVA, A. **Mutagenèse *in vitro* de porte-greffes de la Vigne: méthodologie d'irradiation, d'isolement et caractérisation de mutants.** Bordeaux. Université de Bordeaux II. 1995. 135p. Tese de Doutorado.
- LIMA-DA-SILVA, A.; DOAZAN, J. P. Une méthode d'irradiation aux rayons gamma appliquée à des porte-greffes de Vigne *in vitro*. **J. Int. Sci. Vigne Vin**, v. 29, p. 1-9, 1995.

- LIMA-DA-SILVA, A.; HARISCAIN, P.; OLLAT, N.; DOAZAN, J.P. Photosynthetic abilities of *Vitis* plantlets (rootstock var. Gravesac) cultivated *in vitro* under different carbon nutrition conditions. In: **Ecophysiology and Photosynthetic *in vitro* cultures**. p. 203-204, 1995.
- LIMA-DA-SILVA, A.; HARISCAIN, P.; OLLAT, N.; DOAZAN, J. P. Estimation de la capacité photoautotrophique de vitroplants de porte-greffe de vigne (var. Gravesac): mise au point d'un système de mesure de la photosynthèse nette de vitroplants. **Vitis**, v. 35, n. 2, p. 73-78, 1996.
- LIMA-DA-SILVA, A.; SCHUCK, E.; HARISCAIN-LAFITTE, P.; PARIZZOTTO, A. Cultura *in vitro* do porta-enxerto de videira var. 043-43 resistente a fusariose. In: **I Simpósio Brasileiro de Melhoramento de Frutíferas**. Jaboticabal/SP, p. 51-53, 1997.
- LIMA DA SILVA, A.; HARISCAIN, P.; OLLAT, N.; DOAZAN, J. P. Comparative *in vitro* development of five grapevine rootstock varieties and mutants from the cultivar "Gravesac". **Acta Horticulturae**, v. 528, p. 51-358, 2000.
- LINDBERG, S. Aluminium interactions with K^+ ($^{86}Rb^+$) and $^{45}Ca^{+2}$ fluxes in three cultivars of sugar beet (*Beta vulgaris*). **Physiol. Plant.**, v. 79, p. 275-282, 1990.
- LINDBERG, S; STRID, H. Aluminum induces rapid changes in cytosolic pH and free calcium and potassium concentrations in root protoplasts of wheat (*Triticum aestivum*). **Physiol. Plant.**, v. 99, p. 405-414, 1997.
- LISITSYN, E.M. Intravarietal level of aluminum resistance in cereal crops. **J. of Plant Nutr.**, v. 23, n. 6, p. 793-804, 2000.
- LOSSO, M. A viticultura Catarinense: Diagnósticos, conclusões e sugestões. Florianópolis, EPAGRI, 1994.
- LOUBSER, J.T.; MEYER, A.J. Dual cultures of *Meloidogyne javanica* and grapevine rootstocks on artificial media. **S. Afr. J. Enol. Vitic.**, v. 11, p. 42-45, 1990.
- MA, J.F.; HIRADATE, S.; MATSOMOTO, H. High aluminum resistance in buckwheat. II. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. **Plant Physiol.**, v. 117, p. 753-759, 1998.
- MA, J.F. Role of organic acids in detoxication of aluminum in hight plants. **Plant and Cell Physiol.**, v. 41, n. 4, p.383-390, 2000.
- MAGALHÃES, A.F.J. Tolerância de Porta-Enxertos de *Citrus* ao Alumínio. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 9, n. 3, p. 51-55, 1987.
- MARSCHNER, H. Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. In: **Plant-Soil Interactions at Low pH**. p. 683-702, 1991.

- MARTIN, C.; VERNON, R.; CARRE, M.; VESSELLE, G.; COLLAS, A.; BOUGEREY, C. Vignes et techniques de cultures *in vitro*. Quelques résultats d'une collaboration entre recherche publique et entreprise privée. **Bull. O.L.V.**, v. 675-676, p. 447-458, 1987.
- MARTINELLI, L.; MANDOLINO, G. Genetic-transformation and regeneration of transgenic plants in grapevine (*Vitis rupestris*). **Theoretical and applied genetics**, v. 88, n. 6-7, p. 621-628, 1994.
- MARTINELLI, L. Riflessioni sulla prospettiva di introdurre le tecniche molecolari nel miglioramento genetico della vite. **Frutticoltura**, v. 5, p. 71-74, 1995.
- MHATRE, M.; SALUNKHE C.K.; RAO, P.S. Micropropagation of *Vitis vinifera* L: towards an improved protocol. **Sci. horticulturae**, v. 84, n. 3-4, p. 357-363, 2000.
- MOREIRA, F.M. Avaliação morfo-fisiológica e bioquímica do porta-enxerto de videira "Paulsen 1103" *in vitro*. Florianópolis: UFSC. 2000. 91p. Dissertação de Mestrado.
- MOUSKATAS, M.; OUZOUNIDOU, G.; ELEFThERIOS, P.; LANNOYE, R. Indirect effects of aluminium stress on the function of the photosynthetic apparatus. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 34, n. 4, p. 553-560, 1996.
- MUNIZ, J.E.; WAMPLE, R.L.; LOESCHER, W.H. Cultivar differences in response to low temperatures in *Vitis vinifera* L. callus *in vitro*. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 42, p. 341-346, 1991.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissues cultures. **Physiol. Plant.**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NETZER, M.H.; GUELLEC, V.; BRANCHARD, M. Etude du comportement au cours de l'embryogenèse somatique de divers porte-greffes de vigne cultivés en conditions chlorosantes. **Agronomie**, v. 11, p. 125-131, 1991.
- NOVELLO, V.; GRIBAUDO, L.; ROBERTS, A.V. Stomatal conductance in rooted and unrooted tissue-cultured grapevines. In: **Proc. IV Int. Symp. Grapevine physiol.**, Turin, (Italy), p. 493-497, 1992.
- ONO, K.; YAMAMOTO, Y.; HACHIYA, A. Synergistic inhibition of growth by aluminum and iron of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells in suspension culture. **Plant Cell Physiol.**, v. 36, n. 1, p. 115-125, 1995.
- PARKER, D.R.; ZELAZNY, L.W.; KINRAIDE, T.B. Improvements to the program **Geochem. Soil Sci. Soc. Am. J.**, v. 51, p. 488-491, 1987.
- PEIXOTO, P.H.P. & PASCAL, M. Multiplicação *in vitro* de brotações do porta-enxerto de videira. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 27, n. 4, p. 617-622, 1992.
- PEIXOTO, P.H.P.; PASCAL, M. Efeitos de benzilaminopurina e ácido naftaleno acético na multiplicação *in vitro* de brotações do porta-enxerto de videira (*Vitis* spp.) "RR-101-14". **Rev. Ceres**, v. 41, n. 236, p. 358-365, 1994.

- PELLET, D.M.; PAPERNIK, L.A.; KOCHIAN, L.V. Multiple aluminum-resistance mechanisms in wheat. **Plant Physiol.**, v. 112, p. 591-597, 1996.
- PINTRO, J.; BARLOY, J.; FALLAVIER, P. Alluminum toxicity in corn plants cultivated in a low ionic strength nutrient solution. I. Discrimination of two cultivars. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 7, n. 2, p. 121-128, 1995.
- POUGET, R. Action de la concentration de la solution nutritive sur quelques caractéristiques physiologiques et technologiques chez *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. I - Vigueur, rendement, qualité du moût et du vin. **Agronomie**, v.4, n. 5, p. 437-442, 1984.
- POUGET, R.; OTTENWAEALTER, M. Recherches de porte-greffes adaptés aux sols acides: une nouvelle variété, le Gravesac. **VigneVini**, v.13, n.12, p.134-137. 1986.
- PREDIERI, S. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 64, n. 2-3, p. 185-210, 2001.
- ROSIER, J.P.; LOSSO, M. Cadeias produtivas do Estado de Santa Catarina: Vitivinicultura. Florianópolis, EPAGRI, 41p. 1997. (**Boletim Técnico**, n. 83).
- ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A.; ZIVANOVITC, S.B. A new culture medium for *in vitro* rhizogenesis of grapevine (*Vitis* spp) genotypes. **HortScience**, v. 26, n. 12, p. 1551-1553, 1991.
- SALLANON, H.; TORT M.; COUDRET, A. The ultrastucture of micropropagated and greenhouse rose plant stomata. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 32, p. 227-233, 1993.
- SANTAMARIA, J.M.; KERSTIENS, G. The lack of control of water loss in micropropagated plants is not related to poor cuticle development. **Physiol. Plant.**, v. 91, p. 191-195, 1994.
- SANTOS, C.H.; FILHO, H.G.; RODRIGUES, J.D.; PINHO, S.Z. Influência de diferentes níveis de alumínio no desenvolvimento de dois porta-enxertos cítricos em condições de cultivo hidropônico – análise quantitativa de crescimento. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v.11(supl.), 1999.
- SCHUCK, E.; ANDRADE, E.R.; GALLOTTI, G.J.M.; DAL-BÓ, M.A. Novas alternativas na busca de soluções para o controle do declínio da videira. **Rev. Agrop. Cat.** v. 6, n. 4, p. 48-50, 1993.
- SCHUCK, E.; DALBÓ, M.A.; ANDRADE, E.R. **Uva. Recomendações de cultivares para o estado de Santa Catarina 1999/2000.** Florianópolis, n. 103, p. 147-149, 1999.
- SCIUTTI R.; MORINI S. Modified stomatal characteristic in actively proliferating *in vitro* plum cultures at varying levels of relative humidity. **Adv. Hort. Sci.**, v. 7, p. 157-159, 1993.
- SINGH, S.K.; SHARMA, H.C.; GOSWAMI, A.M.; DATTA S.P.; SINGH, S.P. *In vitro* growth and leaf composition of grapevine cultivars as affected by sodium chloride. **Biologia Plant.**, v. 43, n. 2, p. 283-286, 2000.

- SOMERS, D.J.; BRIGGS, K.G.; GUSTAFSON, J.P. Aluminum stress and protein synthesis in near isogenic lines of *Triticum aestivum* differing in aluminum tolerance. **Physiol. Plant.**, v. 97, p. 694-700, 1996.
- SOUZA, J.R.P.; GUIMARAES, M.F.; MULLER, M.M.L.; SANTOS, C.H. Morphological alterations of corn (*Zea mays* L.) plants in response to aluminum toxicity in the soil. **Bra. Arch. of Biol. and Tech.**, v. 43, n. 4, p. 415-420, 2000.
- SUTTER, E.G. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry, and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.**, v. 113, p. 234-238, 1988.
- SUZUKI, A.; MIURA, A.; AOBA, K. Effects of aluminum, calcium, and phosphate on shoot growth, viability, and aluminum distribution in the root apices in highbush blueberry cultured *in vitro*. **J. of the Japanese Soc. for Hortic. Sci.**, v. 68, n. 5, p. 937-941, 1999.
- TANNE, E.; SPIEGELROY, P.; SHLAMOVITZ, N. Rapid *in vitro* indexing of grapevine viral diseases: The effect of stress-inducing agents on the diagnosis of leafroll. **Plant Disease**, v. 80, n. 9, p. 972-974, 1996.
- TAYLOR, G.J. The physiology of aluminum phytotoxicity. **In: Metal ions in biological systems: Aluminum and its role in biology**. Vol. 24. Marcel Dekker: New York, NY. p. 123-163, 1988.
- TAYLOR, G.J. Current views of the aluminum stress response; the physiological basis of tolerance. **Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.** v. 10, p. 57-93, 1991.
- THOMAS, P. Relationship between tissue growth, CO₂ level and tendril formation during *in vitro* culture of grape (*Vitis vinifera* L.). **Vitis**, v. 38, n. 1, p. 25-29, 1999.
- THOMAS, P. Microcutting leaf area, weight and position on the stock shoot influence root vigour, shoot growth and incidence of shoot tip necrosis in grape plantlets *in vitro*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 61, n. 3, p. 189-198, 2000.
- TICHÁ, I.; CÁP, F.; PACOVSKÁ, D.; HOFMAN, P.; HASEL, D.; CAPKOVÁ, V.; SCHÄFER, C. Culture on sugar medium enhances photosynthetic capacity and high light resistance of plantlets grown *in vitro*. **Physiol. Plant.**, v. 102, p. 155-162, 1998.
- TORREGROSA, L.; BOUQUET, A. Culture *in vitro*: apports actuels et perspectives pour la multiplication et l'amélioration de la vigne. **Prog. Agr. Vit.**, v. 5-6, p. 113-134, 1993.
- TRONCOSO, A.; MATTE, C.; CANTOS, M.; LAVÉE, S. Evaluation of salt tolerance of *in vitro*-grown grapevine rootstock varieties. **Vitis**, v. 38, n. 2, p. 55-60, 1999.
- VANNEL, D.; BARBIER, M.; BESSIS, R. Etude de la toxicité du filtrat de culture de *Botrytis cinerea* sur des vitroplants de vignes. I. Effet du filtrat brut. II. Effet des différentes fractions isolées à partir du filtrat brut. **Vitis**, v. 30, n. 167-175, p. 213-218, 1991.
- VON UEXKULL; MUTERT, E.H.R. Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant Soil**, v. 171, p. 1-15, 1995.

- YAMAMOTO, T.; IKETANI, H.; IEKI, H.; NISHIZAWA, Y.; NOTSUKA, K.; HIBI, T.; HAYASHI, T.; MATSUTA, N. Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 7, p. 639-646, 2000.
- YUE, D.; GOSSELIN, A.; DESJARDINS, Y. Re-examination of the photosynthetic capacity of *in vitro*-cultured strawberry plantlets. **J. Am. Soc. Hort. Sci.**, v. 118, n. 3, p. 419-424, 1993.
- ZHENG, S.J.; MA, J.F.; MATSUMOTO, H. Continuous secretion of organic acids is related to aluminium resistance during relatively long-term exposure to aluminium stress. **Physiol. Plant.**, v. 103, p. 209-214, 1998a.
- ZHENG, S. J.; MA, J. F.; MATSUMOTO, H. High aluminum resistance in buckwheat. I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. **Plant Physiol.**, v. 117, p. 745-751, 1998b.
- ZIV, M.; SCHWARTZ, A.; FLEMINGER, D. Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro*; implications for hardening. **Plant Sci.**, v. 52, p. 127-134, 1987.
- ZLENKO, V.A.; TROSHIN, L.P.; KOTIKOV, I.V. Na optimizes medium for clonal micropropagation of grapevine. **Vitis**, v. 34, n. 2, p. 125-126, 1995.
- WRIGHT, R.J. Soil aluminum toxicity and plant growth. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.** v. 20, p. 1479-1497, 1989.

VIII - ANEXOS

Anexo I: Composição do meio de cultura DSD1 (mg/L).

MACROELEMENTOS	DSD1 (mg)	QUANTIDADE
NH ₄ NO ₃ KNO ₃ MgSO ₄ .7H ₂ O KH ₂ PO ₄ Ca(NO ₃).4H ₂ O	100 1000 180 100 500	100,0 ml/L (SOLUÇÃO A)
MICROELEMENTOS		
MnSO ₄ .4H ₂ O H ₃ BO ₃ ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,2 1 1	10,0 ml/L (SOLUÇÃO B)
FeSO ₄ .7H ₂ O Na ₂ .EDTA	27,5 37,5	10,0 ml/L (SOLUÇÃO C)
CuSO ₄ .5H ₂ O CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025 0,025	1,0 ml/L (SOLUÇÃO D)
VITAMINAS		
Pyridoxina Thiamina Ácido nicotínico Mio-inositol	1 1 1 10	1,0 ml/L
SACAROSE AGAR-AGAR	20 g/L 7 g/L	20 g/L 5,5 g/l
pH	6,4	

Anexo II

Curvas de valores de pH do meio de cultura *in vitro* das variedades Gravesac e Paulsen 1103. UFSC - Fpolis/SC.

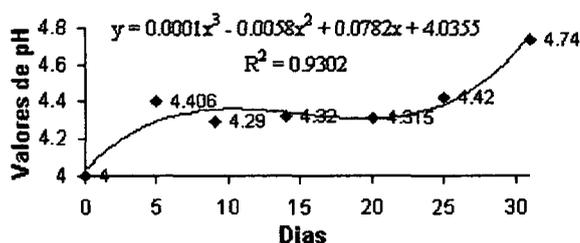


Figura 31 - Variação do pH em função dos dias, para a variedade Gravesac. Tratamento Al = 0 (testemunha). UFSC - Fpolis/SC.

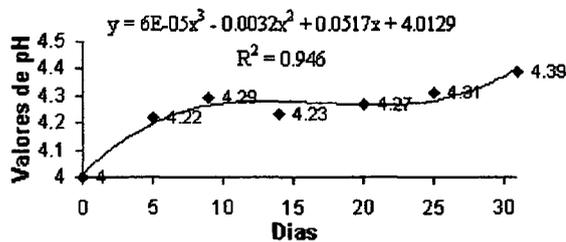


Figura 32 - Variação do pH em função dos dias, para a variedade Gravesac. Tratamento Al = 0,250 mM. UFSC - Fpolis/SC.

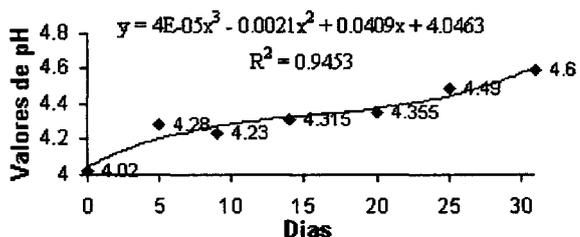


Figura 33 - Variação do pH em função dos dias, para a variedade Gravesac. Tratamento Al = 0,425 mM. UFSC - Fpolis/SC.

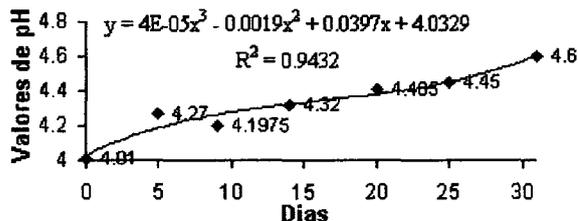


Figura 34 - Variação do pH em função dos dias, para a variedade Gravesac. Tratamento Al = 0,650 mM. UFSC - Fpolis/SC.

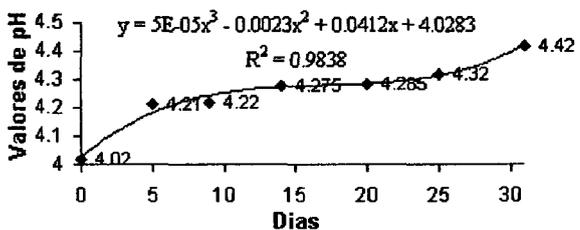


Figura 35 - Variação do pH em função dos dias, para a variedade Gravesac. Tratamento Al = 1,0 mM. UFSC - Fpolis/SC.

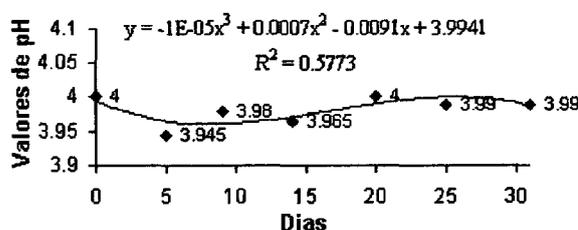


Figura 36 - Variação do pH em função dos dias, para a variedade Gravesac. Tratamento Al = 1,2 mM. UFSC - Fpolis/SC.

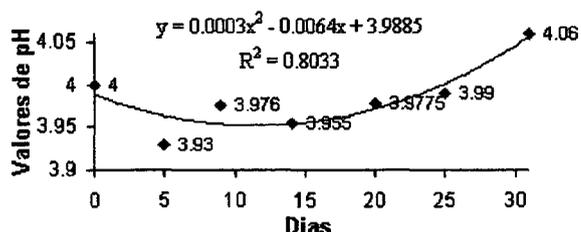


Figura 37 - Variação do pH em função dos dias, para a variedade Gravesac. Tratamento Al = 1,375 mM. UFSC - Fpolis/SC.

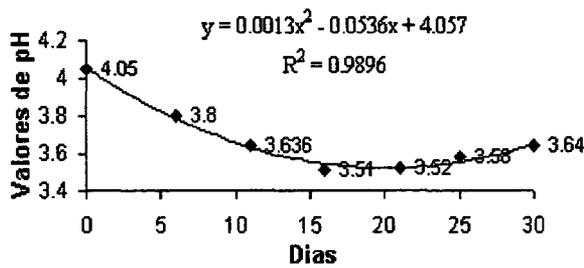


Figura 38 - Variação do pH em função dos dias, para a variedade **Paulsen 1103**. Tratamento Al = 0 (testemunha). UFSC - Fpolis/SC.

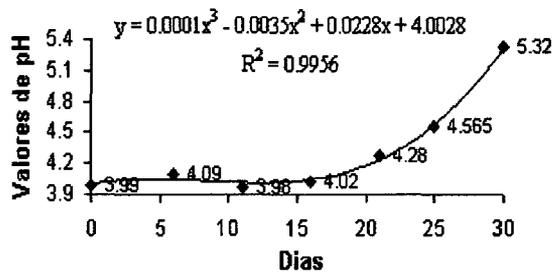


Figura 39 - Variação do pH em função dos dias, para a variedade **Paulsen 1103**. Tratamento Al = 0,250 mM. UFSC - Fpolis/SC.

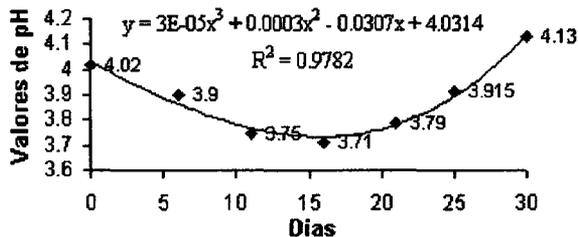


Figura 40 - Variação do pH em função dos dias, para a variedade **Paulsen 1103**. Tratamento Al = 0,425 mM. UFSC - Fpolis/SC.

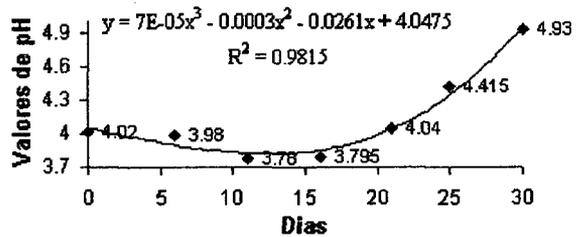


Figura 41 - Variação do pH em função dos dias, para a variedade **Paulsen 1103**. Tratamento Al = 0,650 mM. UFSC - Fpolis/SC.

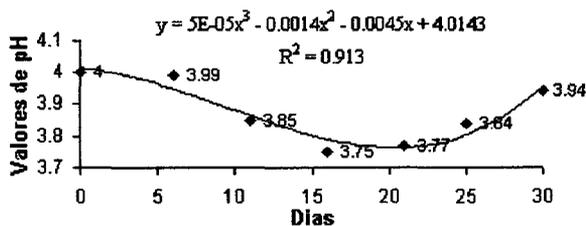


Figura 42 - Variação do pH em função dos dias, para a variedade **Paulsen 1103**. Tratamento Al = 1,0mM. UFSC - Fpolis/SC.

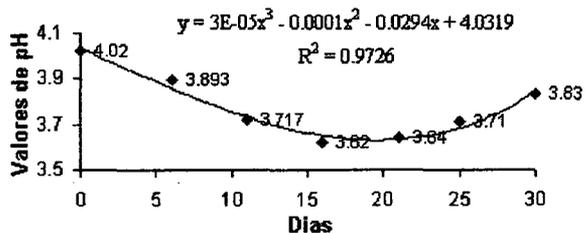


Figura 43 - Variação do pH em função dos dias, para a variedade **Paulsen 1103**. Tratamento Al = 1,2mM. UFSC - Fpolis/SC.

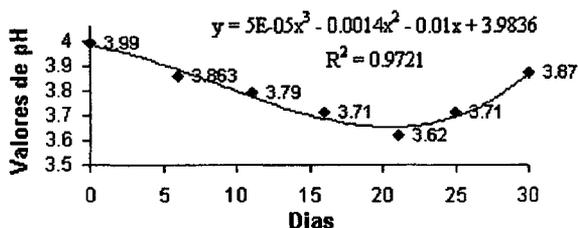


Figura 44 - Variação do pH em função dos dias, para a variedade **Paulsen 1103**. Tratamento Al = 1,375 mM. UFSC - Fpolis/SC.