

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA – UNIPAMPA
CAMPUS DOM PEDRITO
CURSO DE BACHARELADO EM ENOLOGIA**

DIMAS LEONEZA SOUZA DE PAULA

**DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE VARIEDADES
VITIS VINIFERA: ‘TANNAT’, ‘CHARDONNAY’ E ‘PINOT NOIR’.**

**Dom Pedrito, RS
2015**

DIMAS LEONEZA SOUZA DE PAULA

**DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE VARIEDADES
VITIS VINIFERA: ‘TANNAT’, ‘CHARDONNAY’ E ‘PINOT NOIR’.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Enologia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Enólogo.

Orientador: Dr. Norton Victor Sampaio

Co Orientadora: Msc Daniele Camargo Nascimento

**Dom Pedrito, RS
2015**

d324d de Paula, Dimas Leoneza Souza
DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO IN VITRO DE VARIEDADES
VITIS VINIFERA: 'TANNAT', 'CHARDONNAY' E 'PINOT NOIR'. / Dimas
Leoneza Souza de Paula.

29 p.

Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação)-- Universidade
Federal do Pampa, BACHARELADO EM ENOLOGIA, 2015.

"Orientação: Norton Victor Sampaio".

1. Cultura de tecidos. 2. Micropropagação. 3. Segmento
nodal. 4. Vitis vinifera. 5. Ácido ascórbico. I. Título.

DIMAS LEONEZA SOUZA DE PAULA

**DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE VARIEDADES
VITIS VINIFERA: ‘TANNAT’, ‘CHARDONNAY’ E ‘PINOT NOIR’.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Enologia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Enólogo.

Orientador: Dr. Norton Victor Sampaio

Co Orientadora: Msc Daniele Camargo Nascimento

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em:
Banca Examinadora:

Prof. Dr. Norton Victor Sampaio
Orientador
UNIPAMPA - Campus Dom Pedrito

TAE Msc. Daniele Camargo Nascimento,
UNIPAMPA - Campus Dom Pedrito

Prof. Dr^a. Etiane Caldeira Skrebsky
UNIPAMPA - Campus Dom Pedrito

Dedico este Trabalho de Conclusão de Curso a minha família, em especial a Inês Leoneza e Célio Cosme que jamais mediram esforços para me apoiar em minhas decisões, bem como sempre foram motivo de muito orgulho para minha vida. Que um dia eu possa ser tão forte e bom como vocês.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro momento a Deus sua proteção, pela condução de minhas decisões e força nos momentos mais tortuosos do meu caminho, bem como por me proporcionar momentos de grande aprendizado.

Aos meus pais Inês e Célio que dedicaram muito esforço, tempo, amor, carinho e paciência apoiando minhas escolhas e ações esforçando-se ao máximo para torná-las possíveis sendo os pilares para o meu amadurecimento pessoal.

Aos meus queridos Danilo, Ana Flávia, Geraldo J., Lorrana, e Iná, por sempre estarem ao meu lado, estando presente de alguma forma, compartilhando risadas, sendo o apoio nos momentos de dificuldade e o principal sendo tudo o que eu sei, e sinto quando falo em família.

Aos amigos Raquel, Maíra, Higor, Hector e Carlos Magno, por não medirem esforços para tornar nossos momentos juntos inesquecíveis, e por sempre me motivarem nessa caminhada. Pela paciência e pelos bons momentos, como também por sempre dedicar esse amor amigo que nos uni de maneira tão honesta.

Ao professor, orientador Norton Victor Sampaio, por sua atenção, por acreditar em mim, pelo acolhimento nos momentos que mais precisei, pelo acompanhamento no desenvolvimento de novas ideias que nos proporcionou chegar neste projeto, assim como incentivar para sempre continuar buscando dedicar o meu melhor, e principalmente por este trabalho de conclusão de curso, promovendo novas descobertas para o desenvolvimento de futuros trabalhos e, configurando-se como exemplo de profissional.

A minha orientadora Daniele Nascimento, que me ensinou com muita paciência e dedicação tudo o que eu sei hoje na prática da área a qual apresento neste trabalho, também pelas risadas, pelos puxões de orelha e principalmente por ser uma excelente amiga e companheira de trabalho, agradeço todo seu esforço para sempre me ensinar e me mostrar que devemos dar o melhor de nós para os projetos de vida que decidimos seguir.

As queridas amigas Nádia Bucco e Nara Montiel, não existem palavras para demonstrar toda minha gratidão, bem como todo o carinho que tenho por vocês, obrigado pelos abraços, pelas palavras de carinho e por estarem sempre por perto. Por me proporcionar momentos de felicidade e me passar segurança ao poder confiar em vocês.

Ao Professor e amigo Wilson Valente da Costa Neto, por idealizar este curso, por sempre acreditar em nosso potencial. Por ter se tornado um irmão nos momentos de turbulência e dificuldades, estendo aqui a Professora Larissa meu agradecimento pela acolhida em sua família, quando não pude estar próximo a minha.

Aqui transmito meu agradecimento as TAE'S, em especial a Melissa Vargas, Fatima Rosa e Patricia Zaupa, por Deus ter colocado cada uma de vocês em meu caminho, pela dedicação e por tudo o que vivenciamos juntos nessa caminhada acadêmica, e junto a isto agradeço aos Técnicos de laboratório meu eterno agradecimento e respeito. Pela paciência, pela educação, por todo conhecimento transmitido e por todos os momentos que compartilhamos.

Deixo aqui meu agradecimento especial aos funcionários: Vera, Sandro e Neiva, por estarem presente de forma tão significativa durante minha formação, estendendo também este agradecimento especial a Regina.

Aos mestres e companheiros de caminhada, cada um de vocês se fez presente, colaborando de alguma maneira para o meu amadurecimento pessoal e profissional, me guiando e me preparando para o futuro próximo que exigirá cada vez mais.

Aos colegas que conheci que fiz na trajetória da academia e, que ao longo do tempo transformaram se em amigos.

À Universidade Federal do Pampa que proporcionou várias oportunidades para ampliar minhas visões acerca da academia, bem como me fez ter a compreensão e ter a oportunidade de participar em diversos momentos da construção deste ambiente de ensino.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível”.

Charles Chaplin

RESUMO

O presente trabalho se configura como uma pesquisa aplicada de abordagem quantitativa, que tem com o objetivo testar metodologia para o controle de contaminação e oxidação de explantes visando estabelecimento *in vitro* de variedades *Vitis vinifera*: ‘Tannat’, ‘Chardonnay’ e ‘Pinot Noir’. Devido ao crescimento da produção de mudas viníferas no Brasil e com os avanços tecnológicos no setor de propagação vegetal, muitas pesquisas tem sido iniciadas buscando otimizar e estabelecer métodos padrões para o a propagação de mudas de videiras. No experimento I, foram testadas duas concentrações de hipoclorito de sódio (1% e 2%), e quatro tempos de imersão (15, 20, 25 e 30 minutos) para o estabelecimento *in vitro* de explantes de videira variedade Tannat. Ao verificar o alto índice de oxidação, iniciou-se o experimento II, onde foram repetidas as concentrações de hipoclorito de sódio e os tempos de imersão, alterando para variedade Chardonnay. No experimento III, foram testados o uso de água corrente (30 minutos) e ácido ascórbico (500mg/L – 30 minutos) para as variedades ‘Chardonnay’ e ‘Pinot Noir’, com intuito de otimizar o processo de desinfestação e reduzir a contaminação e a oxidação do material propagado. O resultado para o experimentos I, apresentou eficácia de 70% em T2 e T5 para contaminação bacteriana, 96,7% e 76,7% de eficiência para contaminação fúngica e oxidação respectivamente em T8. O experimento II não apresentou tratamento eficaz para contaminação bacteriana, onde T4, T6, T7 e T8 apresentou 100% de eficiência para contaminação fúngica e 100% no controle de oxidação para T2. O resultado do experimento III apresentou 90% e 95% de eficiência no controle de contaminação bacteriana e fúngica respectivamente em T3. Apresentando 100% controle da oxidação em T1, T2, T4, obtivemos confirmação para a utilização de ácido ascórbico na redução do processo de oxidação dos explantes. Foram identificadas contaminações bacterianas nos três experimentos, em sua maioria ocasionadas por bactérias endógenas, o que dificulta a utilização de agentes que possam otimizar os tratamentos, mas não impede de buscar novos agentes que minimizem as contaminações. Os resultados para as contaminações fúngicas encontradas podem ser justificados, devido o material utilizado como fonte de explantes ser lenhoso e coletado diretamente a campo e não de uma planta matriz previamente tratada e mantida em ambiente protegido. Concluiu-se que o uso de água corrente e ácido ascórbico reduzem a oxidação de explantes de videira *Chardonnay*, e *Pinot Noir*, possibilitando maior porcentagem de sobrevivência na etapa de estabelecimento *in vitro*.

Palavras-chave: cultura de tecidos, micropropagação, segmento nodal, *Vitis vinifera*, ácido ascórbico.

ABSTRACT

This work is configured as a quantitative approach applied research, which has aimed to test methodology for contamination control and explants oxidation aiming *in vitro* establishment of *Vitis vinifera* varieties: 'Tannat', 'Chardonnay and Pinot Noir'. Due to the increased production of grapes seedlings in Brazil and with the technological advances in plant propagation sector, much research has been initiated in order to optimize and establish standard methods for the the spread of vine seedlings. In experiment I, were both tested concentrations of sodium hypochlorite (1% and 2%) and four immersion times (15, 20, 25 and 30 minutes) for the establishment *in vitro* explant grape variety Tannat. When checking the high oxidation rate, began the second trial, which were repeated the sodium hypochlorite concentrations and immersion times, changing to Chardonnay variety. In experiment III were tested using running water (30 minutes) and ascorbic acid (500 mg / L - 30 minutes) to the varieties' Chardonnay and Pinot Noir, aiming to optimize the process of disinfection and reduce contamination and oxidation of propagado.O result for experiments I material showed efficacy of 70% in T2 and T5 for bacterial contamination, 96.7% and 76.7% efficiency for fungal contamination and oxidation T8 respectively. The second experiment showed no effective treatment for bacterial contamination, where T4, T6, T7 and T8 showed 100% efficiency for fungal contamination and 100% in the oxidation control to T2. The result of experiemnto III presented 90% and 95% efficiency in the control of bacterial and fungal contamination in T3 respectively. With 100% control of rust on T1, T2, T4, obtained confirmation for the use of ascorbic acid in reducing the explants oxidation process. Bacterial contamination were identified in the three experiments, mostly caused by endogenous bacteria, which complicates the use of agents that can optimize the treatments, but does not stop to look for new agents that minimize contamination. The results for fungal contamination found may be justified, because the material used as a source of explants be woody and collected directly in the field and not from a mother plant previously treated and maintained in greenhouse. It was concluded that the use of water and ascorbic acid reduces the vine explants oxidation Chardonnay and Pinot Noir, enabling higher percentage of survival in the establishment stage *in vitro*.

Keywords: tissue culture, micropropagation, nodal segment, *Vitis vinifera*, ascorbic acid.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Contaminação bacteriana em explantes de videira variedade <i>Tannat</i> no estabelecimento <i>in vitro</i> sob diferentes tratamentos de desinfestação.	19
Tabela 02 – Contaminação fúngica em explantes de videira variedade <i>Tannat</i> no estabelecimento <i>in vitro</i> sob diferentes tratamentos de desinfestação.	20
Tabela 03 – Oxidação em explantes de videira variedade <i>Tannat</i> no estabelecimento <i>in vitro</i> sob diferentes tratamentos de desinfestação.	20
Tabela 04 – Contaminação bacteriana em explantes de videira variedade <i>Chardonnay</i> no estabelecimento <i>in vitro</i> sob diferentes tratamentos de desinfestação.	21
Tabela 05 – Contaminação fúngica em explantes de videira variedade <i>Chardonnay</i> no estabelecimento <i>in vitro</i> sob diferentes tratamentos de desinfestação.	21
Tabela 06 – Oxidação em explantes de videira variedade <i>Chardonnay</i> no estabelecimento <i>in vitro</i> sob diferentes tratamentos de desinfestação.	22
Tabela 07 – Contaminação bacteriana em explantes de videira variedade <i>Chardonnay</i> e <i>Pinot Noir</i> no estabelecimento <i>in vitro</i>	24
Tabela 08 – Contaminação fúngica em explantes de videira variedade <i>Chardonnay</i> e <i>Pinot Noir</i> no estabelecimento <i>in vitro</i>	24
Tabela 09 – Oxidação em explantes de videira variedade <i>Chardonnay</i> e <i>Pinot Noir</i> no estabelecimento <i>in vitro</i>	24

LISTA DE ANEXOS

Gráfico 01- Experimento I – Desinfestação e estabelecimento in vitro de variedade <i>Vitis vinifera</i> : Tannat	30
Gráfico 02 - Experimento II – Desinfestação e estabelecimento in vitro de variedade <i>Vitis vinifera</i> : Chardonnay	30
Gráfico 03 - Experimento III – Uso de água corrente e ácido ascórbico no controle de oxidação e contaminação no estabelecimento in vitro de variedade <i>Vitis vinifera</i> : 'Chardonnay' e 'Pinot Noir'	31

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
MATERIAIS E MÉTODOS	17
Experimento I - DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE VARIEDADE <i>VITIS VINIFERA</i> : 'TANNAT'	17
Experimento II - DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE VARIEDADE <i>VITIS</i> <i>VINIFERA</i> : 'CHARDONNAY'	17
Experimento III – USO DE AGUÁ CORRENTE E ÁCIDO ASCÓRBICO NO CONTROLE DE OXIDAÇÃO E CONTAMINAÇÃO NO ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE VARIEDADE <i>VITIS VINIFERA</i> : 'CHARDONNAY' E 'PINOT NOIR'	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
Experimento I – DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE VARIEDADE <i>VITIS</i> <i>VINIFERA</i> : 'TANNAT'	19
Experimento II - DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE VARIEDADE <i>VITIS</i> <i>VINIFERA</i> : 'CHARDONNAY'	20
Experimento III- USO DE ÁGUA CORRENTE E ÁCIDO ASCÓRBICO NO CONTROLE DE OXIDAÇÃO E CONTAMINAÇÃO NO ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE VARIEDADE <i>VITIS VINIFERA</i> : 'CHARDONNAY' E 'PINOT NOIR'	23
CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

INTRODUÇÃO

O cultivo da videira (*Vitis spp.*) é muito antigo. Achados arqueológicos obtidos em escavações na antiga cidade comercial de Kannisch, revelaram que a viticultura era praticada desde a idade do bronze, cerca de 3.500 anos a.C. A história da viticultura no Brasil, teve início por volta de 1532, pelo colonizador Português Martim Afonso de Sousa, na capitania São Vicente (LEÃO & SOARES, 2000).

A videira é pertencente à família Vitaceae tendo como destaque o gênero *Vitis*. A planta apresenta tronco retorcido, ramos flexíveis, folhas grandes e repartidas em cinco lóbulos pontiagudos, flores esverdeadas em ramos e frutos de formas, tamanhos, cores e sabores variados (SIMÃO, 1971).

De acordo com Dzazio (2002), a videira possui valor econômico e social para o desenvolvimento do nosso País, devido ao amplo crescimento das atividades agrícolas do setor vitivinícola. A atividade concentra-se na produção de uvas, matéria-prima na elaboração de vinhos e outros derivados.

A viticultura brasileira, diferente de outros países que são conhecidos apenas por algumas regiões e características específicas, vem se destacando comercialmente devido a sua alta variabilidade na produção e conseqüentemente nos produtos, conquistando assim, lugar de destaque entre os países potenciais a se tornar grande produtor do setor.

Segundo Regina et al. (1998), no Brasil, a implantação de um vinhedo, consiste no plantio de porta-enxertos para posteriormente ser realizada a enxertia das variedades copa. A formação do vinhedo por este método leva, no mínimo, dois anos e, apesar de apresentar baixo custo, favorece a disseminação de várias doenças.

Dentre essas doenças, as viroses representam um dos mais importantes problemas fitossanitários em escala mundial, ocorrendo em quase todas as áreas de cultivo dessa frutífera. As viroses têm considerável importância por apresentar redução na produtividade e por restringir à longevidade das plantas (KUHN & FAJARDO, 2004).

Uma das alternativas para minimizar a ocorrência de doenças é através do uso da técnica de micropropagação. Esta consiste basicamente, no processo de enraizamento de brotações axilares ou adventícias multiplicadas *in vitro* para a regeneração de plantas inteiras. Este processo possibilita a rápida multiplicação de plantas, a obtenção de plantas matrizes livres de vírus, a propagação de híbridos e a preservação de germoplasmas de interesse (KRUL & MOWBRAY, 1984). Os explantes normalmente

utilizados são segmentos nodais (GRIBAUDO & FRONDA, 1991) e meristemas (PASSOS et al., 1985).

O potencial de multiplicação *in vitro* é elevado, sendo estimado por Bottiet al. (1993) a obtenção anual de 2.808.990 brotações da cultivar Thompson Seedless, 26.494 brotações da cultivar Ribier e 1.213 da cultivar Black Seedless em meio MS com 2 mgL⁻¹ de BAP, a partir de um explante. Harris & Stevenson (1982) estabeleceram um protocolo capaz de produzir 12.000 brotações em 4 meses, a partir de apenas um ápice meristemático. Na cultura de ápices fragmentados, Barlass & Skene (1978) estimaram a produção de aproximadamente 8.000 plantas em 4 meses.

O sucesso da micropropagação depende da sequência de fases ou etapas, em que o êxito de cada uma é necessário para o êxito da próxima etapa e a introdução do explante no meio de cultivo (estabelecimento), cujo sucesso depende de uma eficiente assepsia dos explantes a serem estabelecidos (GEORGE, 1993).

Na fase de estabelecimento do cultivo, a contaminação pode comprometer o trabalho de micropropagação. Quando é exógena, a possibilidade de controle dos principais agentes contaminantes (fungos e bactérias) é considerável; quando a contaminação é endógena, as consequências podem ser limitantes, podendo haver perda de tempo, de recursos financeiros e de material genético (SOUZA et al., 2006).

Para minimizar a contaminação microbiana, alguns protocolos de esterilização já foram apresentados por diversos autores. . Dentre as substâncias com ação germicida, as mais usadas para a desinfestação de explantes são os compostos à base de cloro, tais como: o hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio. O hipoclorito de sódio por ser um alvejante comercial e de fácil acesso é o mais utilizado em laboratórios de cultura de tecidos. Assim sendo, a utilização desses, é uma importante ferramenta para o controle de contaminações bacterianas endógenas, que frequentemente representam sérios problemas no estabelecimento das culturas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Na iniciação de culturas lenhosas, é comum a ocorrência de compostos fenólicos, que podem estar ligados a processos de regulação de crescimento, especialmente as auxinas que, dependendo da concentração endógena no tecido, induzem à síntese desses compostos. Nas plantas lenhosas, sobretudo, acumulam-se polifenóis e produtos de oxidação, como melanina, suberina, lignina, cutina e calose em torno da superfície incisada, os quais modificam a composição do meio de cultivo e a absorção de metabólitos (ANDRADE et al., 2000).

A utilização de diversos antioxidantes é relatada na literatura como alternativa para a diminuição do processo de oxidação. Grattapaglia & Machado (1998) recomendam a adição ao meio de cultivo ou o pré- tratamento em solução de antioxidantes.

Tendo em vista a importância do uso de porta – enxertos e variedades copas na viticultura, os quais por sua vez apresentam grandes diferenças e potenciais de adaptação às mais diversas condições de clima e solo, somado ao fato de que nas condições de resistência de uma e os fatores produtivos de outra, ambas se tornam necessárias/importantes mutuamente, torna-se fundamental um estudo detalhado, visando avaliar e definir técnicas eficazes para a produção de mudas em larga escala com qualidade genética e fitossanitária.

Este trabalho foi realizado com o objetivo testar metodologia para o controle de contaminação e oxidação de explantes visando estabelecimento *in vitro* de variedades *Vitis vinifera*: ‘Tannat’, ‘Chardonnay’ e ‘PinotNoir’.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Produção Vegetal da Universidade Federal do Pampa, Campus Dom Pedrito, RS

Experimento I - DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE VARIEDADE *VITIS VINIFERA*: ‘TANNAT’.

O material vegetal utilizado (coletado em 06 de outubro de 2014) foram ramos de aproximadamente 20 cm de plantas de videira ‘*Tannat*’ de um vinhedo, localizado em uma propriedade rural no município de Bagé/RS. O material sofreu deslocamento de 2 horas até o laboratório. No laboratório, foram separados explantes de 2 cm os quais foram submetidos aos tratamentos de desinfestação. Os explantes foram colocados em álcool 70% por 30 segundos, seguido pela imersão em solução de hipoclorito de sódio. Os tratamentos com hipoclorito de sódio foram: T1(1%, 15 min), T2 (1%, 20 min), T3(1%, 25 min), T4(1%, 30 min), T5(2%, 15 min), T6 (2%, 20 min), T7 (2%, 25 min) e T8 (2%, 30 min). Em todos os tratamentos foi adicionada uma gota de detergente (10 gotas. L⁻¹ Tween20) e os frascos foram mantidos sob agitação.

Experimento II - DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE VARIEDADE *VITIS VINIFERA*: ‘CHARDONNAY’.

O material vegetal utilizado (coletado em 13 de outubro de 2014) foram ramos de aproximadamente 20 cm de plantas de videira ‘*Chardonnay*’ de um vinhedo implantado em 2010, com 01 ano de produção, sob o porta-enxerto Paulsen 1103, localizado em uma propriedade rural no município de Dom Pedrito/RS. O material sofreu deslocamento de 45 minutos até o laboratório. No laboratório, foram separados explantes de 2 cm os quais foram submetidos aos tratamentos de desinfestação. Os explantes foram colocados em álcool 70% por 30 segundos, seguido pela imersão em solução de hipoclorito de sódio. Os tratamentos com hipoclorito de sódio foram: T1 (1%, 15 min), T2 (1%, 20 min), T3 (1%, 25 min), T4 (1%, 30 min), T5 (2%, 15 min), T6 (2%, 20 min), T7 (2%, 25 min) e T8 (2%, 30 min). Em todos os tratamentos foi adicionada uma gota de detergente (10 gotas. L⁻¹ Tween20) e os frascos foram mantidos sob agitação.

Experimento III – USO DE AGUÁ CORRENTE E ÁCIDO ASCÓRBICO NO CONTROLE DE OXIDAÇÃO E CONTAMINAÇÃO NO ESTABELECIMENTO IN VITRO DE VARIEDADE VITIS VINIFERA: ‘CHARDONNAY’ E ‘PINOT NOIR’.

O material vegetal utilizado (coletado em 20 de outubro de 2014) foram ramos de aproximadamente 10 cm de plantas de videira ‘*Chardonnay*’ e ‘*Pinot Noir*’ de um vinhedo implantado em 2010, com 01 ano de produção, sob o porta-enxerto: Paulsen 1103, localizado em uma propriedade rural no município de Dom Pedrito/RS. O material sofreu deslocamento de 45 minutos até o laboratório. No laboratório, foram separados explantes de 2 cm os quais foram submetidos a diferentes tratamentos antes da desinfestação. Os tratamentos foram: T1 (*Chardonnay* por 30 min em água corrente), T2 (*Pinot Noir* por 30 min em água corrente), T3 (*Chardonnay* por 30 min em ácido ascórbico 500mg/L), T4 (*Pinot Noir* - por 30 min em ácido ascórbico 500mg/L). Após os tratamentos, os explantes foram colocados em álcool 70% por 30 segundos, seguido pela imersão por 30min em solução de hipoclorito de sódio 2% acrescido de uma gota de detergente (Da Silva.et al. 2003), por 30 minutos.

Nos três experimentos, após os tratamentos de desinfestação, os explantes foram lavados três vezes com água destilada e autoclavada em câmara de fluxo laminar e inoculados em frascos contendo 30 ml de meio de cultivo. O meio de cultivo utilizado foi o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado de sacarose (30g.L⁻¹) e ágar (7g.L⁻¹). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da adição de ágar, conforme descrito por NALI, et al(2005). A esterilização do meio realizada por autoclavagem a 1,0 kgf/cm² e 120 °C, durante 15 minutos. Após a inoculação os explantes permaneceram em câmara de crescimento na condição de escuro por cinco dias (temperatura de 25±2°C), sendo então transferidos para condições de um fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2°C. Aos sete dias foram avaliadas as porcentagens de contaminação fúngica e bacteriana e porcentagem de oxidação.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, sendo nos Experimentos I e II com esquema fatorial 2 x 4, com oito tratamentos e dez repetições, sendo cada repetição representada por três explantes, totalizando duzentos e quarenta explantes. No experimento III com esquema fatorial 2 x 2, com 4 tratamentos e dez repetições, sendo cada repetição representada por quatro explantes, totalizando cento e quarenta explantes. Os dados foram obtidos foram submetidos a análise de variância, e

as médias, comparadas pelo teste de Tukey, Ducan e DMS, a 5% de probabilidade. Os dados foram processados pelo programa computacional ASSISTAT 7.7 Beta (Silva,2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I – DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE VARIEDADE *VITIS VINIFERA*: ‘TANNAT’.

Ao analisarmos os dados podemos observar que no experimento I, ao compararmos os tratamentos obtivemos a mesma eficácia para os tratamentos T2 e T5 tendo a eficácia de 70% para os explantes em relação a desinfestação para contaminação bacteriana (Tabela 01), o que se mostra de maneira diferente para a contaminação fúngica (Tabela 02) – onde a maior eficiência foi para T8 obtendo eficiência de 96,7% sendo este também o melhor tratamento para oxidação (Tabela 03) com 76,7%. Podemos observar no gráfico 01 (em Anexo), a interposição dos dados das avaliações (contaminação bacteriana, fúngica e oxidação) feitas no experimento I.

Tabela 01 – Contaminação bacteriana em explantes de videira variedade *Tannat* no estabelecimento *in vitro* sob diferentes tratamentos de desinfestação.

Tratamentos	Total Explan	Contaminação Bacteriana	
		Quantidade	%
T1	30	13	43.33
T2	30	9	30
T3	30	16	53.33
T4	30	12	40
T5	30	9	30
T6	30	14	46.66
T7	30	12	40
T8	30	10	33.33

Fonte: Autor, 2014

T1(Hipoclorito 1% - 15 min.), T2 (Hipoclorito 1% - 20 min.), T3(Hipoclorito 1% - 25 min.), T4 (Hipoclorito 1% - 30 min.), T5 (Hipoclorito 2% - 15 min), T6 (Hipoclorito 2% - 20 min), T7 (Hipoclorito 2% - 25 min) e T8 (Hipoclorito 2% - 30 min).

Tabela 02 – Contaminação fúngica em explantes de videira variedade *Tannat* no estabelecimento *in vitro* sob diferentes tratamentos de desinfestação.

Contaminação Fúngica			
Tratamentos	Total Explan	Quantidade	%
T1	30	2	6.66
T2	30	4	13.33
T3	30	4	13.33
T4	30	4	13.33
T5	30	2	6.66
T6	30	4	13.33
T7	30	3	10
T8	30	1	3.33

Fonte: Autor, 2014

T1(Hipoclorito 1% - 15 min.), T2 (Hipoclorito 1% - 20 min.), T3(Hipoclorito 1% - 25 min.), T4 (Hipoclorito 1% - 30 min.), T5 (Hipoclorito 2% - 15 min), T6 (Hipoclorito 2% - 20 min), T7 (Hipoclorito 2% - 25 min) e T8 (Hipoclorito 2% - 30 min).

Tabela 03 – Oxidação em explantes de videira variedade *Tannat* no estabelecimento *in vitro* sob diferentes tratamentos de desinfestação.

Oxidação			
Tratamentos	Total Explan	Quantidade	%
T1	30	16	53.33
T2	30	8	26.66
T3	30	12	40
T4	30	11	36.66
T5	30	12	40
T6	30	8	26.66
T7	30	8	26.66
T8	30	7	23.33

Fonte: Autor, 2014

T1(Hipoclorito 1% - 15 min.), T2 (Hipoclorito 1% - 20 min.), T3(Hipoclorito 1% - 25 min.), T4 (Hipoclorito 1% - 30 min.), T5 (Hipoclorito 2% - 15 min), T6 (Hipoclorito 2% - 20 min), T7 (Hipoclorito 2% - 25 min) e T8 (Hipoclorito 2% - 30 min).

Experimento II - DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE VARIEDADE *VITIS VINIFERA*: ‘*CHARDONNAY*’.

Para o experimento de desinfestação II, foi observada alta porcentagem de contaminação para todos os tratamentos com hipoclorito a 2%, onde tivemos índices iguais e maiores a 80% de contaminação, apresentando como melhor índice T4 (53%)

para contaminação bacteriana (Tabela 04) ao contrário do que foi observado para contaminação fúngica (Tabela 05) onde 3 entre 4 dos tratamentos obtivemos 100 de eficácia com hipoclorito a 2% com destaque para T4 sendo o único tratamento a 1% de concentração que apresentou 100% de desinfestação fúngica. Ao realizarmos a contagem para oxidação (Tabela 06) verificou-se índice igual a 100% de eficiência para T2, tendo destaque para T3, T6 e T7 também com índices de eficácia acima de 90%. Podemos observar no gráfico 02 (em Anexo), a interposição dos dados das avaliações (contaminação bacteriana, fúngica e oxidação) feitas no experimento II.

Tabela 04 – Contaminação bacteriana em explantes de videira variedade *Chardonnay* no estabelecimento *in vitro* sob diferentes tratamentos de desinfestação.

Contaminação Bacteriana			
Tratamentos	n° de Explantes	Quantidade	%
T1	30	18	60
T2	30	19	63.33
T3	30	23	76.66
T4	30	16	53.33
T5	30	24	80
T6	30	28	93.33
T7	30	26	86.66
T8	30	27	90

Fonte: Autor, 2014

T1(Hipoclorito 1% - 15 min.), T2 (Hipoclorito 1% - 20 min.), T3(Hipoclorito 1% - 25 min.), T4 (Hipoclorito 1% - 30 min.), T5 (Hipoclorito 2% - 15 min), T6 (Hipoclorito 2% - 20 min), T7 (Hipoclorito 2% - 25 min) e T8 (Hipoclorito 2% - 30 min).

Tabela 05 – Contaminação fúngica em explantes de videira variedade *Chardonnay* no estabelecimento *in vitro* sob diferentes tratamentos de desinfestação.

Contaminação Fúngica			
Tratamentos	n° de Explantes	Quantidade	%
T1	30	1	3.33
T2	30	1	3.33
T3	30	2	6.66
T4	30	0	0
T5	30	2	6.66
T6	30	0	0
T7	30	0	0
T8	30	0	0

Fonte: Autor, 2014

T1(Hipoclorito 1% - 15 min.), T2 (Hipoclorito 1% - 20 min.), T3(Hipoclorito 1% - 25 min.), T4 (Hipoclorito 1% - 30 min.), T5 (Hipoclorito 2% - 15 min), T6 (Hipoclorito 2% - 20 min), T7 (Hipoclorito 2% - 25 min) e T8 (Hipoclorito 2% - 30 min).

Tabela 06 – Oxidação em explantes de videira variedade *Chardonnay* no estabelecimento *in vitro* sob diferentes tratamentos de desinfestação.

Tratamentos	n° de Explantes	Oxidação	
		Quantidade	%
T1	30	8	26.66
T2	30	0	0
T3	30	1	3.33
T4	30	19	63.33
T5	30	8	26.66
T6	30	2	6.66
T7	30	2	6.66
T8	30	6	20

Fonte: Autor, 2014

T1(Hipoclorito 1% - 15 min.), T2 (Hipoclorito 1% - 20 min.), T3(Hipoclorito 1% - 25 min.), T4 (Hipoclorito 1% - 30 min.), T5 (Hipoclorito 2% - 15 min), T6 (Hipoclorito 2% - 20 min), T7 (Hipoclorito 2% - 25 min) e T8 (Hipoclorito 2% - 30 min).

Para os experimentos I e II, do ponto de vista estatístico, não houve diferença significativa, utilizando testes: Tukey, Duncan e DMS (Assistatic 7.7) – onde em todas as análises o coeficiente de variação se mostrou igual ou maior que 40% para as contaminações bacterianas e fúngicas. Deve-se considerar que estes experimentos foram realizados com material advindo de plantas do campo, e não de matrizes em casa de vegetação, aliado a matrizeiro e disponibilidade de insumos e controle de tratamento fitossanitário (fungicida e bactericida).

De acordo com Willadino e Camara (apud. Carvalho; Silva ,2012), “a planta matriz é aquela da qual serão retirados os explantes,ou seja, os segmentos de tecido ou órgão vegetal utilizado para iniciar a cultura *in vitro*”.

Complementado por Carvalho; George et al (apud. Carvalho; Silva, 2012):

“Os cuidados com a planta matriz devem assegurar o seu bom estado fisiológico (nutricional e hídrico) e fitossanitário. A ontogenia e fisiologia da planta que é fonte de explantes têm uma profunda influência sobre a resposta *in vitro*, devendo-se utilizar explantes coletados de regiões meristemáticas juvenis. Além disso, eles devem ser retirados, preferencialmente, de plantas

sadias e vigorosas que foram mantidas em crescimento ativo e que não estejam passando por qualquer tipo de estresse e ataque de pragas ou doenças, pois a sanidade da planta matriz é um importante fator no que tange à facilidade de descontaminação do explante no processo de isolamento (CARVALHO et al., 2006; GEORGE et al., 2008; WILLADINO; CAMARA, 2005). ”

Experimento III- USO DE ÁGUA CORRENTE E ÁCIDO ASCÓRBICO NO CONTROLE DE OXIDAÇÃO E CONTAMINAÇÃO NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE VARIEDADE *VITIS VINIFERA*: ‘*CHARDONNAY*’ E ‘*PINOT NOIR*’.

Ao testar água corrente e ácido ascórbico, assim como Pannetier e Buffard – Morel (apud - Siqueira e Inque ,1991) : “A observação de que o problema de oxidação haviam sido relatados nas primeiras culturas de tecidos , sem contudo dar detalhes de sua incidência, continua válida. Sendo complementados por Siqueira e Inque (1991) quando utilizaram antioxidante: “Os tratamentos consistem da imersão dos explantes nas soluções por 30 min antes da inoculação em meio básico.”

Observamos os seguintes resultados: T 3 – *Chardonnay* em ácido ascórbico sendo eficaz para contaminação bacteriana (Tabela 07), o mesmo tratamento teve eficácia de 95% para contaminação fúngica (Tabela 08), porem para os resultados em desacordo para oxidação (Tabela 09), o T3 foi o único dos tratamentos que apresentou oxidação.

No experimento III, houve diferença significativa para o tratamento 3 – no que ressalta apenas sua ineficácia para oxidação, tendo em vista que o mesmo foi o único tratamento a apresentar resultado diferente de 0 para a oxidação, não tendo apresentado resultados significativos para contaminação bacteriana e fúngica. Podemos observar no gráfico 03 (em Anexo), a interposição dos dados das avaliações (contaminação bacteriana, fúngica e oxidação) feitas no experimento III.

Tabela 07 – Contaminação bacteriana em explantes de videira variedade *Chardonnay* e *Pinot Noir* no estabelecimento *in vitro*.

Contaminação Bacteriana			
Tratamentos	Total Explan	Quantidade	%
T1	40	9	22.5
T2	40	5	12.5
T3	40	4	10
T4	40	15	37.5

Fonte: Autor, 2014

T1 (*Chardonnay* – 30 min água corrente), T2 (*Pinot Noir* – 30 min água corrente), T3 (*Chardonnay* – 30 min ácido ascórbico), T4 (*Pinot Noir* - 30 min ácido ascórbico).

Tabela 08 – Contaminação fúngica em explantes de videira variedade *Chardonnay* e *Pinot Noir* no estabelecimento *in vitro*.

Contaminação Fúngica			
Tratamentos	Total Explan	Quantidade	%
T1	40	9	22.5
T2	40	5	12.5
T3	40	2	5
T4	40	4	10

Fonte: Autor, 2014

T1 (*Chardonnay* – 30 min água corrente), T2 (*Pinot Noir* – 30 min água corrente), T3 (*Chardonnay* – 30 min ácido ascórbico), T4 (*Pinot Noir* - 30 min ácido ascórbico).

Tabela 09 – Oxidação em explantes de videira variedade *Chardonnay* e *Pinot Noir* no estabelecimento *in vitro*.

Oxidação			
Tratamentos	Total Explan	Quantidade	%
T1	40	0	0
T2	40	0	0
T3	40	9	22.5
T4	40	0	0

Fonte: Autor, 2014

T1 (*Chardonnay* – 30 min água corrente), T2 (*Pinot Noir* – 30 min água corrente), T3 (*Chardonnay* – 30 min ácido ascórbico), T4 (*Pinot Noir* - 30 min ácido ascórbico).

Silva et al. (1997) observou índice de 65% de explantes sobreviventes para diferentes porta-enxertos de videira. Assim como em outras espécies, como pessegueiro, Rogalski (2002) obteve taxas de 63% e 59% de sobrevivência para explantes oriundos de ápices caulinares e gemas laterais, respectivamente.

Compreendendo assim que as taxas de assepsia demonstradas neste estudo se mostram eficazes, isoladamente para contaminação bacteriana, fúngica ou para redução na oxidação.

De acordo com Moraes et. al. (2004): “As contaminações por bactérias em espécies lenhosas são geralmente de origem endógena. Neste sentido, os processos de desinfestações comumente utilizados são pouco eficientes”.

Tornando assim necessária uma observação mais detalhada sobre a manifestação das bactérias endógenas, buscando agentes que eliminem ou reduzam sua proliferação.

De acordo com Montarroyos (2000):

“Na maioria dos casos, a presença de fungos e bactérias ocorre poucos dias após a inoculação. Em alguns casos, a presença de bactérias e fungos nas plantas é detectada após algum tempo de cultivo, geralmente quando um grande número de plantas já está em produção. Além disso, por serem de difícil visualização, são facilmente transmitidas de um material para outro durante a manipulação dos explantes para a inoculação *in vitro*. Quando as condições do meio de cultura (nutrição, pH) tornam-se favoráveis ao seu desenvolvimento, os fitopatógenos passam a competir por nutrientes minerais e carboidratos do meio de cultura, comprometendo a multiplicação e o desenvolvimento dos explantes”.

Na iniciação de culturas lenhosas, é comum a ocorrência de compostos fenólicos, que podem estar ligados a processos de regulação de crescimento, especialmente as auxinas que, dependendo da concentração endógena no tecido, induzem à síntese desses compostos. Nas plantas lenhosas, sobretudo, acumulam-se polifenóis e produtos de oxidação, como melanina, suberina, lignina, cutina e calose em torno da superfície incisada, os quais modificam a composição do meio de cultivo e a absorção de metabólitos (ANDRADE et al., 2000).

De acordo com Pereira (2003), esta deterioração dos explantes está relacionada com a produção de metabólitos fitotóxicos pelos fitopatógenos, tais como os ácidos láctico e acético e cianeto. O que justifica o escurecimento do meio e também a morte do explante.

Em alguns resultados observamos diferenças importantes que nos leva a questionar o modo como os dados foram expostos e, a partir disso, refletimos uma forma para que na coleta de dados sejam demonstrados da seguinte maneira: devendo considera como unidade experimental, cada explante. Avaliando apenas como contaminado ou não, com 0 (zero) e 1 (um) obtendo uma avaliação binomial, reduzindo assim a margem numérica a ser testada, com a margem de confiança maior e reduzindo a variação numérica atual dos resultados, onde as unidades experimentas analisadas em blocos – podendo ter como resultados de 0 , 1,2 ou 3.

Sugerimos novas pesquisas utilizando plantas matrizes que tenham sido mantidas em ambiente protegido e que sejam feitas testes com maior amplitude de variedades tintas e brancas, indicamos a busca da padronização da metodologia e iniciar estudos para obtenção de protocolos para melhor utilização da micropropagação in vitro de videira.

CONCLUSÃO

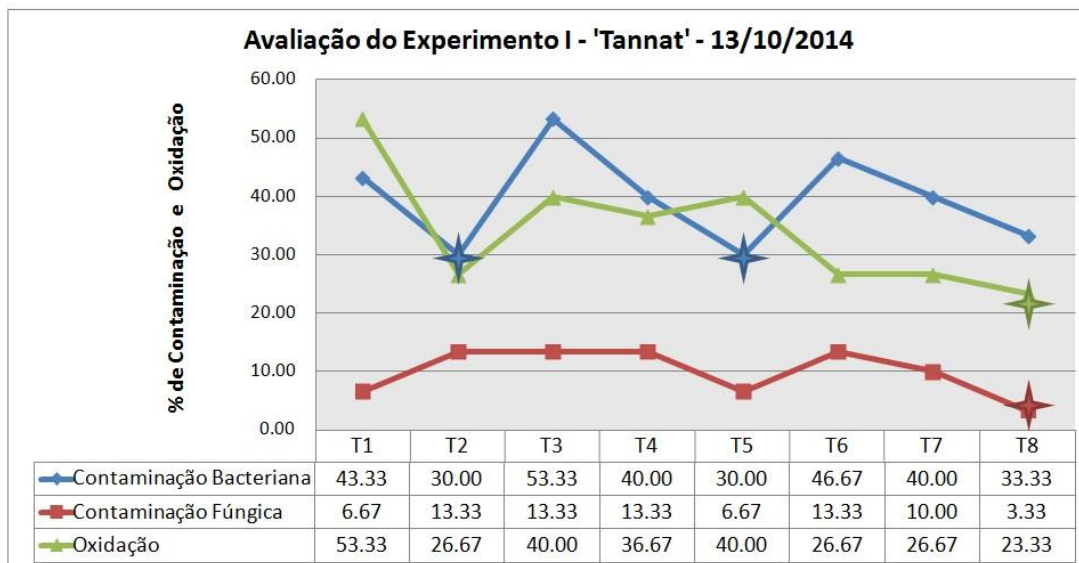
Este trabalho responde os objetivos estabelecidos, compreendendo que os testes de desinfestação para contaminação bacteriana e fúngica não apresentaram resultados significativos, mas devendo ser considerado: Experimento I – apresentou eficácia de 70% em T2 e T5 para contaminação bacteriana, 96,7% e 76,7% de eficiência para contaminação fúngica e oxidação respectivamente em T8. Experimento II – não apresentou tratamento eficaz para contaminação bacteriana, onde T4, T6, T7 e T8 apresentou 100% de eficiência para contaminação fúngica e 100% no controle de oxidação para T2. Experimento III – apresentou 90% e 95% de eficiência no controle de contaminação bacteriana e fúngica respectivamente em T3. Apresentando 100% controle da oxidação em T1,T2,T4. Verificou-se a eficácia do uso de água corrente e ácido ascórbico para a redução no processo de oxidação dos explantes das variedades *Chardonnay* e *Pinot Noir*. É necessária a obtenção de plantas matrizes mantidas em casa de vegetação para utilização de explantes para estabelecimento *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, et al. **Micropropagação de aroeira** (*Myracrodruonurundeuva* Fr. Allemao). *Ciência Agrotecnologia*, Lavras, v. 24, n.1, p.174-180, 2000.
- BARLASS, M.; SKENE, K.G.M. ***In vitro* propagation of grapevine (*Vitisvinifera* L.) from fragmented shoot apices.** *Vitis*, v. 17, p. 335-340,1978.
- BOTTI, C.; GARAY, L.; REGINATO, G. **The influence of culture dates, genotype and size and type of shoot apices on *in vitro* shoot proliferation of *Vitisvinifera*cv Thompson Seedless, Ribier and Black Seedless.** *Vitis*, Siebeldingen, v. 32, n.2, p. 125-126, 1993.
- DA SILVA. et al. **Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus*** - Rev. Bras. Frutic. vol.25 no.2 Jaboticabal Aug. 2003
- D.A.;AMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. **Handbook of plant cell culture**, Mac Millan Publishing, 1984. v. 6, p 396-434
- DE SIQUEIRA, E. R; INQUE, M.T. **Controle da oxidação na cultura de tecidos de coqueiro.** *Pesq. Agropec. Brás*, Brasília, 26(7) 949-953,Jul, 1991
- DZAZIO, P. M.; BIASI, A. L.; ZANETTE, F. **Micropropagação do Porta-enxerto de Videira "420-A".** *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal, v.24, n.3, p. 759 - 764. 2002.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: the Technology.** 2nd ed London: Hardcover, 1993. p.98-165
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. **Micropropagação.** In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa/SPI, 1998. v. 1, p. 183-260.
- GRIBAUDO, I; FRONDA, A. **Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated *in vitro*.** *HortScience*, Alexandria, v. 26, n. 8, p. 1083,1991.
- HARRIS, R.E.; STEVENSON, J.H. ***In vitro* propagation of *Vitis*.** *Vitis*, Siebeldingen, v. 21, n. 1, p. 22-32, 1982.
- KRUL, W.R.; MOWBRAY, G.H. **Grapes.** In: SHARP, W.R.; EVANS, KUHN, G. B.; FAJARDO, T.V.M. **Viroses da Videira no Brasil.** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. Capacitação técnica em viticultura. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/viticultura/viroses.html> >. Acesso em: 10 setembro 2014

- LEÃO, P.C.S., SOARES, J.M. **A Viticultura no semi-árido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2000, p. 15-16.
- MORAES, L. K, A et. al. **Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Pyrus calleryana* D-6 em sistema de cultura 'dupla-fase**. Rev. Bras. Frutic. vol.26 no.3 Jaboticabal Dec. 2004
- MONTARROYOS, A.V.V. **Contaminação *in vitro***. ABCTP Notícias, Brasília, n.36 e 37, p.5-10, 2000.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A **revised medium for rapid growth and biossay with tobacco tissue cultures**.PhysiologiaPlantarum, Kobenhavn, v. 15, p.473-497, 1962.
- NALI, L. R, et al. **Propagação *in vitro* em videiras - Magistra, Cruz das Almas-BA, v. 17, n. 2, p. 96-100, mai./ago., 2005.**
- PASSOS, I.R. da S.; SONDAHL, M.R.; RIBEIRO, I.J.A.; TERRA, M.M.; PIRES, E.J.P. **Cultura *in vitro* de meristemas de videira. I. Concentrações do hormônio 6-BA em meio primário**. Bragantia, Campinas, v.44, n. 1, p. 473-479, 1985.
- PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. de L. **Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 38, n. 7, p. 827-834, jul. 2003
- REGINA, M.A.; SOUZA.C.R.; SILVIA,T.G.; PEREIRA, A.F.; **A propagação de videira**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.19, n.194, p.20-27,1998.
- ROGALSKI, M. **Propagação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus*: cultura de embriões, estabelecimento, multiplicação, enraizamento e aclimatização**. 2002. 93f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.
- SILVA, A.L. da; SCHUCK, E.; HARISCAIN-LAFITTE, P.; PARIZZOTTO, A. **Cultura *in vitro* do porta-enxerto de videira var. 043-43 resistente a fusariose**. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE FRUTÍFERAS, 1., 1997, Jaboticabal. **Anais...** p. 51-53
- SILVA, F.A.S. **Assistat 7.7** UFCG Campina Grande,2013
- SIMÃO, S. **Manual de fruticultura**. Piracicaba: CERES LTDA, 1971. 530p.
- SOUZA, et al. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2006, 152p.
- YU, D.; MEREDITH, C.P.**The influence of explant origin on tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine**. Journal of the American Society for Horticultural Science, Alexandria, v. 111, n. 6, p. 972-975. 1986.

ANEXOS

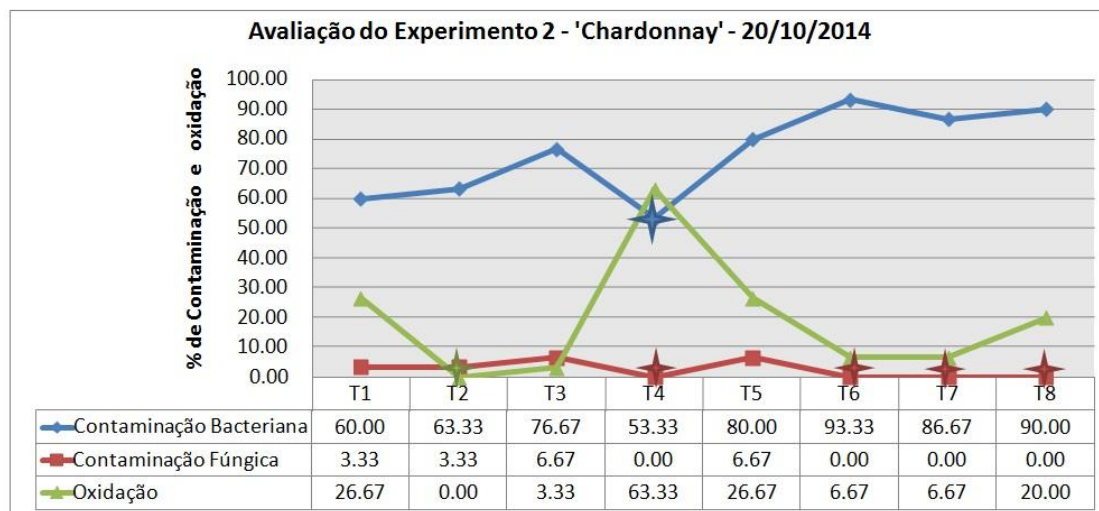


8 Tratamentos - 10 repetições - 3 explantes

Totalizando: **240 explantes**

T1(Hipoclorito 1% - 15 min.), **T2** (Hipoclorito 1% - 20 min.), **T3**(Hipoclorito 1% - 25 min.), **T4** (Hipoclorito 1% - 30 min.), **T5** (Hipoclorito 2% - 15 min), **T6** (Hipoclorito 2% - 20 min), **T7** (Hipoclorito 2% - 25 min) e **T8** (Hipoclorito 2% - 30 min).

Gráfico 01- Experimento I – Desinfestação e estabelecimento in vitro de variedade *Vitis vinifera*: Tannat

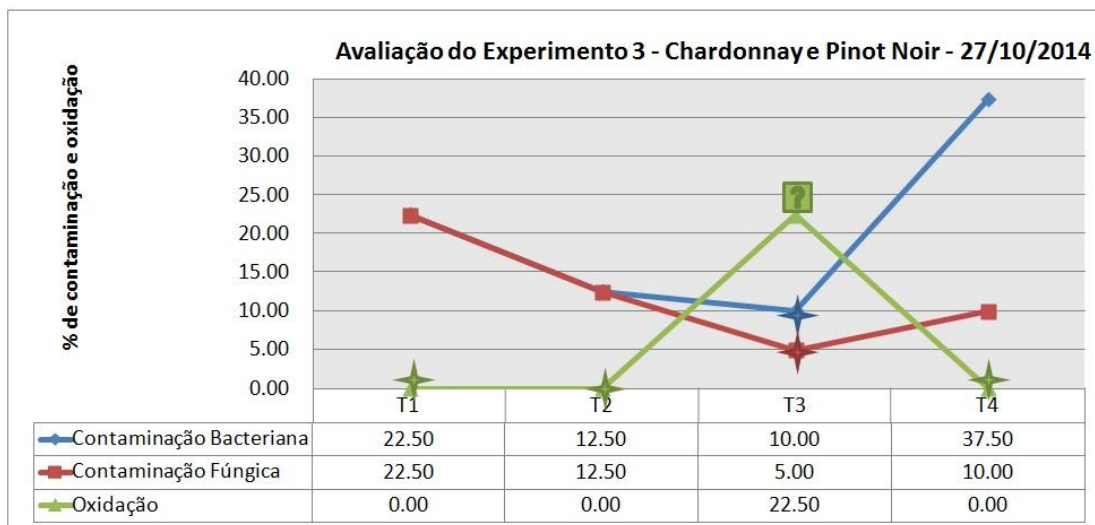


8 Tratamentos - 10 repetições - 3 explantes

Totalizando: **240 explantes**

T1(Hipoclorito 1% - 15 min.), **T2** (Hipoclorito 1% - 20 min.), **T3**(Hipoclorito 1% - 25 min.), **T4** (Hipoclorito 1% - 30 min.), **T5** (Hipoclorito 2% - 15 min), **T6** (Hipoclorito 2% - 20 min), **T7** (Hipoclorito 2% - 25 min) e **T8** (Hipoclorito 2% - 30 min).

Gráfico 02 - Experimento II – Desinfestação e estabelecimento in vitro de variedade *Vitis vinifera*: Chardonnay



T1 (Chardonnay – 30 min água corrente), **T2** (Pinot Noir – 30 min água corrente),
T3 (Chardonnay – 30 min ácido ascórbico), **T4** (Pinot Noir - 30 min ácido ascórbico).

4 Tratamentos - 10 repetições - 4 explantes

Totalizando: 160 explantes

Gráfico 03 - Experimento III – Uso de água corrente e ácido ascórbico no controle de oxidação e contaminação no estabelecimento in vitro de variedade *Vitis vinifera*: ‘Chardonnay’ e ‘Pinot Noir’.