

GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES E DE EMBRIÕES
ZIGÓTICOS MÁDUROS DE CULTIVARES DE VIDEIRAS (*Vitis* spp.)

OTALÍCIO DAMÁSIO DA COSTA JÚNIOR

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2020

GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES E DE EMBRIÕES
ZIGÓTICOS MÁDUROS DE CULTIVARES DE VIDEIRAS (*Vitis* spp.)

OTALÍCIO DAMÁSIO DA COSTA JÚNIOR

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.”

Orientadora: Prof.^a. Virginia Silva Carvalho

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ

FEVEREIRO – 2020

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

C837 Costa Júnior, Otalício Damásio da.

Germinação *in vitro* de sementes e de embriões zigóticos maduros de cultivares de videiras (*Vitis* spp.) / Otalício Damásio da Costa Júnior. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2020.

75 f. : il.

Bibliografia: 45 - 57.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2020.
Orientadora: Virginia Silva Carvalho.

1. Cultura de tecidos vegetais. 2. Videira. 3. Superação da dormência e germinação *in vitro* de sementes. 4. Meios de cultura. 5. Cultivo *in vitro* de embriões . I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

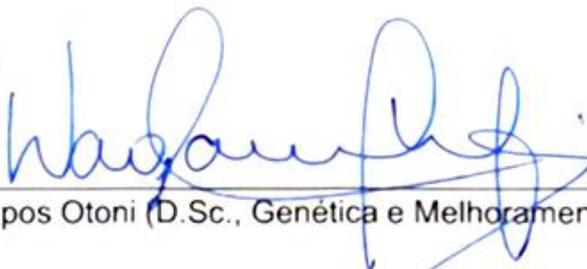
GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES E DE EMBRIÕES
ZIGÓTICOS MÁDUROS DE CULTIVARES DE VIDEIRAS (*Vitis* spp.)

OTALÍCIO DAMÁSIO DA COSTA JÚNIOR

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.”

Aprovada em 13 de fevereiro de 2020.

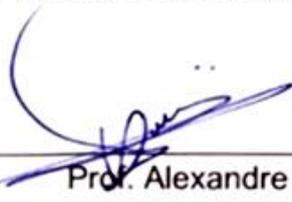
Comissão Examinadora:



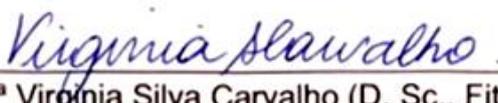
Prof. Wagner Campos Otoni (D.Sc., Genética e Melhoramento) – UFV



Dr.ª Andressa Leal Generoso (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) – UENF



Prof. Alexandre Pio Viana (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF



Prof.ª Virginia Silva Carvalho (D. Sc., Fitotecnia) – UENF
(Orientadora)

Dedico,

Dedico este trabalho à minha mãe Maria Solange Barbosa de Araújo Costa, ao meu pai Otalício Damásio da Costa e aos meus irmãos Bruno e Brena, por todo apoio, incentivo e por entenderem os momentos de ausência, permitindo, assim, a realização de mais um sonho.

*“Se a educação sozinha não transforma a sociedade,
sem ela tampouco a sociedade muda.”*

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças para que eu pudesse permanecer firme durante toda a caminhada diante das dificuldades que surgiram ao longo do curso.

Aos meus pais, Maria Solange Barbosa de Araújo Costa e Otávio Damásio da Costa, exemplos de garra e perseverança, agradeço por sempre me incentivarem, mostrando que o estudo é o melhor caminho a se seguir.

Aos meus irmãos, Bruno de Araújo Costa e Brena de Araújo Costa, pelo apoio e por acreditarem em mim.

Agradeço imensamente à professora Virginia Silva Carvalho, por ter me dado a oportunidade de fazer parte de sua equipe, pelos ensinamentos, pela confiança e pelos conselhos dados, os quais irei carregar por toda a vida.

Agradeço a Danilo Força Baronni pelo acolhimento em sua casa, pela convivência, pela paciência; por todo conhecimento trocado e pela ajuda durante o meu primeiro contato com a pós-graduação, bem como pelos momentos de descontração e por sua amizade, a qual levarei por toda a vida.

A todos os meus amigos de laboratório, agregados e demais amigos que fiz em Campos, em especial Rafael Walter, pelo acolhimento e incentivo durante o meu primeiro contato com o laboratório. Agradeço imensamente a Vinicius, Renato, Lidiane, Roberta, Daniel, Andressa, Tertuliano, Taynara, Maria, Mariana, Patrícia, Diego, Kezia, Alexandra, Wanderson e Afonso pela troca de conhecimentos e pelos momentos de descontração.

A todos os meus colegas de turma, em especial a Giovanna Campos, Bianca, Luanna e Kissila, pessoas incríveis com quem pude compartilhar e adquirir muito conhecimento, agradeço imensamente pela amizade e companheirismo.

A todos os professores que compõem o quadro docente da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, por todo conhecimento transmitido.

A todos os servidores e técnicos administrativos que compõem a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da minha bolsa de estudo. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro pela oportunidade de poder concretizar mais um sonho.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição das cultivares utilizadas nos experimentos.	15
Tabela 2. Descrição entre os constituintes dos meios de cultura MS, ½MS, WPM e ½WPM para o cultivo <i>in vitro</i> de embriões zigóticos maduros de cultivares de videira. Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.	21
Tabela 3. Médias e desvios padrão das variáveis de vigor: índice de velocidade de germinação (IVG), emissão da raiz primária (ERP), plântulas normais (PN), plântulas anormais (PA), sementes não germinadas (SNG), após cultivo <i>ex vitro</i> em BOD das cultivares ‘Niágara Rosada’ (NR), ‘Itália’ (I) e ‘Red Globe’ (RG) por 28 dias. Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.	24
Tabela 4. Resumo da análise de variância com os quadrados médios para as variáveis de vigor: índice de velocidade de germinação (IVG), plântulas normais (PN), plântulas anormais (PA), sementes não germinadas (SNG), protrusão da raiz primária (PRP), número de folhas (NF), comprimento da planta (CP), massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA), massa da matéria seca da raiz (MMSR) e massa da matéria seca total (MMST) em função da cultivar de videira e corte, de cultivares de videira cultivadas por 54 dias <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.	26
Tabela 5. Análise de desdobramento das variáveis de vigor: índice de velocidade de germinação, plântulas normais, plântulas anormais e sementes não germinadas, em função da interação entre cultivares de videira (‘Niágara Rosada’, ‘Itália’ e ‘Red Globe’) e tipo de corte (semente intacta, semente com corte na região da micrópila	

e semente com corte transversal), após 54 dias de germinação *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.....28

Tabela 6. Médias das variáveis de vigor: número de folhas e comprimento da parte aérea para as cultivares de videira ('Niágara Rosada', 'Itália' e 'Red Globe') e para os tipos de corte (semente intacta, semente com corte na região da micrópila e semente com corte transversal), após 54 dias em cultivo *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.....29

Tabela 7. Médias das variáveis de vigor: massa da matéria seca da raiz e da parte aérea para as cultivares de videira ('Niágara Rosada', 'Itália' e 'Red Globe') e para os tipos de corte (semente intacta, semente com corte na região da micrópila e semente com corte transversal), após 54 dias em cultivo *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.....30

Tabela 8. Médias das variáveis de vigor: massa da matéria seca total para as cultivares de videira ('Niágara Rosada', 'Itália' e 'Red Globe') e para os tipos de corte (semente intacta, semente com corte na região da micrópila e semente com corte transversal), após 54 dias em cultivo *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.....31

Tabela 9. Resumo da análise de variância com os quadrados médios para as variáveis de vigor: índice de velocidade de germinação (IVG), plântulas normais (PN), plântulas anormais (PA), embriões não germinados (ENG), número de folhas (NF), comprimento da planta (CP), comprimento da raiz (CR) e massa da matéria seca total (MMST) em função do tipo de cultivar e meio de cultura, após o cultivo *in vitro* por 28 dias dos embriões zigóticos maduros. Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.....34

Tabela 10. Porcentagem e médias das variáveis de vigor: plântulas normais (PN), número de folhas (NF), comprimento da planta (CP) e massa da matéria seca total (MMST) para as diferentes concentrações de sais utilizadas (MS, $\frac{1}{2}$ MS, WPM e $\frac{1}{2}$ WPM), após 28 dias de cultivo *in vitro* dos embriões zigóticos maduros de diferentes cultivares de videira. Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.....35

Tabela 11. Análise de desdobramento das variáveis de vigor: plântulas anormais e comprimento da raiz, em função da interação entre cultivares de videira ('Niágara

Rosada' e 'Itália') e concentração de sais (MS, ½MS, WPM e ½WPM), após 28 dias de cultivo *in vitro* dos embriões zigóticos maduros. Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.....37

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Frutos e sementes das cultivares ‘Niágara Rosada’, ‘Itália’ e ‘Red Globe’ (A e B) e sementes utilizadas como explantes, sendo sementes intactas (C), sementes com corte na região da micrópila (D) e sementes com corte transversal (E). 18
- Figura 2.** Processo de excisão dos embriões zigóticos maduros de videira. Semente intacta estratificada em ácido sulfúrico (A); corte longitudinal na semente (B); remoção do tegumento que constitui e recobre a região da micrópila (C e D); remoção de parte do endosperma que recobre o embrião (em) (E e F); remoção do embrião (G) e embrião isolado (H e I). 20
- Figura 3.** Resultados do experimento aos 28 dias após o cultivo *ex vitro* em BOD. Protrusão da raiz primária das cultivares ‘Red Globe’ (A) e ‘Itália’ (B); plântula normal da cultivar ‘Red Globe’ (C); plântulas anormais das cultivares ‘Itália’ (D) e ‘Red Globe’ (E) e sementes não germinadas após teste de viabilidade em 2-3-5-Trifenil cloreto de tetrazólio (F)..... 23
- Figura 4.** Germinação acumulada após 28 dias em BOD. Cultivar ‘Niágara Rosada’ em NRC (Tratamento controle) e NRE (Estratificada); cultivar ‘Itália’ em IC (Tratamento controle) e IE (Estratificada) e cultivar ‘Red Globe’ em RGC (Tratamento controle) e RGE (Estratificada). 24
- Figura 5.** Germinação acumulada após 54 dias de cultivo *in vitro*. Cultivar ‘Niágara Rosada’ em A1 (Sementes intactas), A2 (Sementes com corte na região da micrópila) e A3 (Semente com corte transversal); cultivar ‘Itália’ em B1 (Sementes

intactas), B2 (Sementes com corte na região da micrópila) e B3 (Semente com corte transversal) e cultivar 'Red Globe' em C1 (Sementes intactas), C2 (Sementes com corte na região da micrópila) e C3 (Semente com corte transversal).32

Figura 6. Resultados do experimento aos 54 dias após o cultivo *in vitro*. 'Niágara rosada' em A, B e C; 'Itália' em D, E e F e 'Red Globe' em G, H e I, sendo sementes intactas (SI), sementes com corte na região da micrópila (SCRM) e sementes com corte transversal (SCT).33

Figura 7. Plântulas anormais aos 28 dias após o cultivo *in vitro*. Cultivar 'Niágara rosada' em A, B e C e cultivar 'Itália' em D, E e F.....36

Figura 8. Germinação de embriões zigóticos maduros após 28 dias de cultivo *in vitro*. 'Niágara Rosada' em A, B, C e D nas concentrações de sais MS, ½ MS, WPM e ½ WPM respectivamente e 'Itália' em E, F, G e H nas concentrações de sais MS, ½ MS, WPM e ½ WPM respectivamente.38

Figura 9. Embriões germinados após o quarto dia de cultivo *in vitro* (A e B) e embrião com sistema radicular alongado e folhas cotiledonares expandidas na segunda semana de cultivo *in vitro* (C).39

Figura 10. Germinação acumulada após 28 dias de cultivo *in vitro* dos embriões zigóticos maduros. Cultivar 'Niágara Rosada' (MS A, ½MS A, WPM A e ½WPM A) e Cultivar 'Itália' (MS B, ½MS B, WPM B e ½WPM B).39

Figura 11. Sobreposição dos dados para a porcentagem de germinação acumulada de todos os experimentos. Germinação acumulada após 28 dias em BOD das cultivares 'Niágara Rosada' em NRC (Tratamento controle) e NRE (Estratificada); cultivar 'Itália' em IC (Tratamento controle) e IE (Estratificada) e cultivar 'Red Globe' em RGC (Tratamento controle) e RGE (Estratificada). Germinação acumulada após 54 dias de cultivo *in vitro* das cultivares 'Niágara Rosada' em NR1 (Sementes intactas), NR2 (Sementes com corte na região da micrópila) e NR3 (Semente com corte transversal); cultivar 'Itália' em I1 (Sementes intactas), I2 (Sementes com corte na região da micrópila) e I3 (Semente com corte transversal) e cultivar 'Red Globe' em RG1 (Sementes intactas), RG2 (Sementes com corte na região da micrópila) e RG3 (Semente com corte transversal). Germinação acumulada após 28 dias de cultivo *in vitro* dos embriões zigóticos maduros das cultivares 'Niágara

Rosada' (NR MS, NR ½MS, NR WPM e NR ½WPM) e Cultivar 'Itália' (I MS, I ½MS, I WPM e I ½WPM). 43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Videira: origem, aspectos botânicos e propagação.....	4
2.2. Importância econômica da videira.....	5
2.3. Dormência e germinação <i>in vitro</i> de sementes	7
2.4. Cultura de tecidos vegetais e suas técnicas associadas à cultura da videira ..	9
2.5. Cultivo <i>in vitro</i> de embriões	10
2.6. Meios de cultura associados à cultura da videira	11
3. OBJETIVOS	14
3.1. Geral	14
3.2. Específicos.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1. Caracterização do local.....	15
4.2. Material vegetal.....	15
4.3. Experimento I: Germinação <i>ex vitro</i> das sementes.....	16
4.4. Experimento II: Germinação <i>in vitro</i> : superação de dormência mecânica das sementes	17
4.4.1. Estabelecimento <i>in vitro</i>	17
4.4.2. Germinação <i>in vitro</i>	17

4.4.3. Análise estatística	19
4.5. Experimento III: Germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos maduros de diferentes cultivares de videira: concentrações de sais minerais do meio de cultura	19
4.5.1. Estabelecimento <i>in vitro</i> dos embriões zigóticos maduros isolados	19
4.5.2. Germinação <i>in vitro</i> dos embriões zigóticos maduros de videira	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1. Experimento I: Germinação <i>ex vitro</i> de três cultivares de videira.....	22
5.2. Experimento II: Germinação <i>in vitro</i> : quebra da dormência mecânica das sementes	25
5.3. Experimento III: Germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos maduros de diferentes cultivares de videira: concentrações de sais	34
6. RESUMO E CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

RESUMO

COSTA JÚNIOR; Otávio Damásio; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro 2020; Germinação *in vitro* de sementes e de embriões zigóticos maduros de cultivares de videiras (*Vitis* spp.); Orientadora: Prof.^a. Virginia Silva Carvalho; Coorientador: Prof^o. Alexandre Pio Viana.

Para que novas variedades de videiras sejam lançadas, os programas de melhoramento necessitam de mudas advindas de sementes. Porém, as sementes de videira possuem dormência, o que ocasiona problemas durante a germinação, bem como, os métodos convencionais de germinação são muito demorados e as vezes pouco eficientes. Com isso, a utilização do cultivo *in vitro* de sementes e de embriões zigóticos maduros são promissores para a superação de barreiras germinativas, permitindo a obtenção das mudas em curto período de tempo. Dessa forma, objetivou-se nesse trabalho desenvolver metodologias eficientes para a superação da dormência em sementes de videiras por meio do cultivo *in vitro*. Nesse trabalho foram realizados três experimentos. O primeiro foi o experimento de germinação *ex vitro* com as cultivares 'Niágara Rosada', 'Itália' e 'Red Globe', a fim de verificar a qualidade fisiológica das sementes e a eficiência do teste de acordo com as Regras para Análise de Sementes (RAS). Após a realização do experimento, foi possível concluir que mesmo após 28 dias, os percentuais para todas as análises de vigor não foram representativos para um teste de germinação, sendo necessário o uso do cultivo *in vitro* de sementes e de embriões zigóticos maduros para superar as barreiras germinativas. No segundo experimento, foi realizado a superação da dormência mecânica das sementes a partir de diferentes

explantes (sementes intactas, sementes com corte na região da micrópila e sementes com corte transversal) nas cultivares 'Niágara Rosada', 'Itália' e 'Red Globe', constituindo um esquema fatorial 3x3. As avaliações de vigor foram feitas aos 54 dias de cultivo *in vitro*. O corte transversal realizado nas sementes proporcionou as maiores médias para todas as variáveis de vigor avaliadas nas três cultivares, sendo observado efeito genotípico entre essas. No último experimento com o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos maduros isolados, foram testadas quatro concentrações de sais minerais (MS, $\frac{1}{2}$ MS, WPM e $\frac{1}{2}$ WPM) e duas cultivares ('Niágara Rosada' e 'Itália'), constituindo um esquema fatorial 4x2. As análises foram feitas após 28 dias de cultivo *in vitro*. Observou-se que para a maioria das análises de vigor, as exigências nutricionais para a germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros das cultivares foram supridas quando utilizado o meio de cultura $\frac{1}{2}$ WPM. Nas condições experimentais, conclui-se que é possível superar a dormência das sementes das cultivares 'Niágara Rosada', 'Itália' e 'Red Globe' por meio da germinação *in vitro* de sementes e o cultivo de embriões zigóticos maduros isolados de maneira mais eficiente que os métodos convencionais, reduzindo o período de germinação até a obtenção de alta porcentagem de germinação com plântulas normais e com elevado vigor.

ABSTRACT

COSTA JÚNIOR; Otávio Damásio; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February 2020; *In vitro* germination of seeds and isolated mature embryos of vine (*Vitis* spp.) cultivars; Advisor: D.Sc. Virginia Silva Carvalho; Co-advisor: D.Sc. Alexandre Pio Viana.

For new grape varieties to be launched, breeding programs rely on seedlings from seeds. However, grape seeds have dormancy which causes problems during germination. In addition, conventional germination methods take a long time. The use of *in vitro* cultivation of seeds and mature zygotic embryos is a promising strategy for overcoming germinative barriers allowing the seedlings to be obtained in a short period of time. Thus, the objective of this work was to develop efficient methodologies for overcoming dormancy in grape seeds through *in vitro* cultivation. In this work, three experiments were carried out. The first one involved the germination test *ex vitro* with vine cultivars, 'Niágara Rosada', 'Itália' and 'Red Globe', in order to assess the physiological quality of the seeds and the efficiency of the test according to the Rules for Seed Analysis (RAS). It was concluded that even after 28 days, the percentages for all vigor analyzes were not representative for a germination test, being necessary the use of *in vitro* seeds germination and culture of mature zygotic embryos to overcome germinative barriers. In the second experiment, we attempted to overcome the mechanical dormancy of the seeds of the cultivars 'Niágara Rosada', 'Itália' and 'Red Globe' using different explants (intact seeds, seeds cut in the micropile region and seeds with transversal cut), constituting a 3x3 factorial scheme. The vigor assessments were made at 54 days

of *in vitro* culture. The cross section carried out on the seeds provided the highest averages for all the vigor variables evaluated in the three cultivars, with a genotypic effect being observed among them. In the third experiment, *in vitro* cultivation of isolated mature zygotic embryos of two vine cultivars ('Niágara Rosada' and 'Itália') was performed on, four concentrations of mineral salts (MS, $\frac{1}{2}$ MS, WPM and $\frac{1}{2}$ WPM), constituting a 4x2 factorial scheme. The analyzes were performed after 28 days of *in vitro* culture. Interestingly, for most vigor analyzes, the nutritional requirements for the *in vitro* germination of mature zygotic embryos of both cultivars were met when half strength WPM ($\frac{1}{2}$ WPM) culture medium was used. Taken together, the results indicate that it is possible to overcome seed dormancy of the targeted vine cultivars by means of the *in vitro* of seed germination and culture of isolated mature zygotic embryos more efficiently than conventional methods, reducing the germination period, yielding a high percentage of germination with normal seedlings and with a high vigor.

1. INTRODUÇÃO

De acordo com Galet (1998), a videira pertence à ordem Rhamnales, família Vitaceae ou Ampelidaceae que compreende 19 gêneros e 1126 espécies. Dentre essa grande diversidade de espécies está a *Vitis vinifera* L., de origem europeia, destacando-se como responsável pela produção de uvas finas e a *Vitis labrusca* L., de origem americana, que se destaca pela produção de uvas rústicas (Ritschel et al., 2014; Narduzzi et al., 2015).

As uvas são consideradas como uma das culturas frutíferas que mais são produzidas em todo o mundo, com aproximadamente 75 milhões de toneladas produzidas ao ano. As uvas são consumidas *in natura* ou são processadas como vinho, geleia, suco, uvas secas, vinagre e também como óleo advindo de suas sementes (FAO e OIV, 2016).

A produção anual brasileira de uvas (*Vitis* spp.) está em torno de 1,6 milhões de toneladas, sendo utilizada para o consumo *in natura* e para processamento (IBGE, 2018). Vale ressaltar que o Brasil apresentou aumento de 81% no consumo de uvas de mesa nos últimos quinze anos (FAO e OIV, 2016).

Segundo Camargo et al., (2011), no Brasil existem mais de 120 cultivares de *V. vinifera* e mais de 40 cultivares de uvas americanas, incluindo castas de *V. labrusca*, *V. bourquina* e de híbridos interespecíficos. Os cruzamentos interespecíficos, normalmente estão associados à resistência a doenças (Camargo e Ritschel, 2008). Segundo Garrido e Angelotti (2011), são diversas as doenças e pragas que acometem os parreirais. Podem ser causadas por fungos, como antracnose (*Elsinoe ampelina*), escoriose (*Phomopsis viticola*), míldio (*Plasmopara viticola*), oídio (*Uncinula necator*), entre outros, bem como por bactérias como o

cancro-bacteriano-da-videira (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*). Há também doenças associadas a nematoides das lesões radiculares das videiras, que pertencem ao gênero *Pratylenchus* (Puerari et al., 2012). Além da filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae*) causada pelo inseto que pertence à família *Phylloxeridae* (Botton et al., 2004).

Com relação à propagação das videiras, as sementes apresentam dormência, resultando em baixas taxas de germinação (Ergenoglu et al., 1997), o que pode vir a dificultar ou atrasar os programas de melhoramento genético dessa cultura. Segundo Rajasekaran et al. (1982) a dormência nas sementes de uva está associada a elevados níveis endógenos de ácido abscísico (ABA). Neste caso, a estratificação a frio pode levar à rápida redução no teor desse hormônio, promovendo, assim, a germinação. Segundo as Regras para Análise de Sementes (RAS) (Brasil, 2009) para a superação da dormência em sementes de uva, é necessário um pré-esfriamento em substrato úmido em temperaturas de 3 a 5°C por três meses, antes dos testes de germinação. Porém, esse tratamento não é eficiente, resultando em percentuais que não ultrapassam aos 50% de germinação (Ellis et al., 1983).

A cultura de tecidos vegetais envolve diversas técnicas capazes de solucionar alguns problemas que são enfrentados pelos programas de melhoramento genético, um exemplo é a germinação de sementes que apresentam alguma barreira germinativa, advindas de cruzamentos intraespecíficos ou de cruzamentos interespecíficos, que são regularmente usados em programas de melhoramento. A germinação de sementes e de embriões zigóticos *in vitro* vem sendo estudada buscando-se acelerar a germinação, quebrar os diferentes tipos de dormência e obter uniformidade nas plântulas (Ferreira et al., 2002; Braun et al., 2010; Val et al., 2010; Pinhal et al., 2011; Walter et al., 2018). Dessa forma, a cultura de tecidos vegetais pode ser uma alternativa viável para solucionar o problema de germinação em sementes de videira. Segundo Val et al. (2010) e Generoso et al. (2019), a ruptura do tegumento para a quebra de dormência mecânica, pode ser uma alternativa eficiente na promoção de maiores taxas de germinação de sementes de videira por meio do cultivo *in vitro*.

Na cultura da videira, o uso do resgate de embriões imaturos é muito comum para a obtenção de uvas sem sementes e de plantas que apresentem resistência às pragas e doenças (Tian et al., 2008; Tang et al., 2009; Li et al., 2018; Li et al.,

2020). Nesses trabalhos, são investigados meios de cultura e o uso de fitorreguladores para a germinação e obtenção das plantas. Além disso, é observado que quanto mais avançado o estágio de desenvolvimento desses embriões, maior é a capacidade de resposta para originar plântulas normais *in vitro*. Porém, na literatura, são inexistentes trabalhos que investigam a germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros de videira.

Diante do exposto, o uso do cultivo *in vitro* de sementes e de embriões zigóticos maduros de videira pode ser uma alternativa eficiente para alcançar o sucesso na germinação de sementes oriundas de cruzamentos controlados, cujas plântulas resultantes podem apresentar características genéticas de interesse ao melhorista.

Com isso, a utilização de técnicas biotecnológicas como a cultura de tecidos vegetais, pode ser vista como uma alternativa eficiente para aumentar a germinação de sementes e de embriões zigóticos maduros *in vitro*, dando suporte aos programas de melhoramento genético para o desenvolvimento de novas cultivares de videira com características desejadas, tendo em vista que o surgimento de novas cultivares no mercado, provêm de longos processos de melhoramento a partir de mudas obtidas por sementes.

Sendo assim, objetivou-se com o presente estudo, desenvolver metodologias mais eficientes para a superação da dormência em sementes de videiras por meio do cultivo *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Videira: origem, aspectos botânicos e propagação

A videira é uma das mais antigas plantas cultivadas pelo homem (Sato, 2000). Com base em registros arqueológicos coletados no Irã, o cultivo da videira teve início por volta de 5400 a 5000 a. C. (McGovern et al., 1996). Estudos paleontológicos revelam que a videira surgiu no período Terciário há milhões de anos, provavelmente onde está situada a atual Groenlândia. Essas videiras primitivas, se dispersaram principalmente em duas direções, a américo-asiática e a eurasiática. Já no período Quaternário, durante o início da era glacial, a videira sobreviveu em apenas alguns centros de refúgio, levando a adaptação das variedades às condições climáticas e, posteriormente com o cultivo pelo homem durante milhares de anos, surgiu vasta diversidade de variedades espalhadas por todo o mundo (Alvarenga et al., 1998).

As videiras são plantas trepadeiras, lenhosas e perenes, podendo ser monoicas ou dioicas, com flores hermafroditas perfeitas, masculinas ou femininas (Galet, 1998). As plantas são geralmente caracterizadas pela presença de gavinhas opostas às folhas, sendo as gavinhas consideradas brotações modificadas (Gerrath et al. 2004). Seus frutos são bagas, os quais são constituídos por casca, polpa e sementes e durante o seu desenvolvimento passam por modificações quanto ao tamanho, composição, cor, textura e sabor (Coombe e McCarthy, 2000; Kennedy, 2002).

O gênero *Vitis* é dividido em dois subgêneros: *Muscadinia* Planch e *Euvitis* Planch, cujas espécies estão agrupadas de acordo com sua morfologia e origem

geográfica (Galet, 1998). O subgênero *Muscadinia* é constituído por apenas três espécies, sendo elas: *V. rotundifolia*, uva comum conhecida em todo o sudeste dos Estados Unidos; *V. munsoniana*, variante semitropical de *V. rotundifolia* nativa do sul da Flórida; e *V. popenoei*, nativa tropical do sul do México, sendo suas bagas apreciadas tanto para o consumo *in natura* como para processamento de sucos e vinhos (Conner e Maclean, 2013). Já o subgênero *Eu vitis* Planch, é constituído por mais de 60 espécies, sendo *V. vinifera* L. e *V. labrusca* L. as que possuem maior importância econômica (Fengqin et al., 1990; Alleweldt et al., 1991; Giovannini, 2008).

A espécie *V. vinifera* L. é de origem europeia, na qual estão agrupadas 90% das cultivares destinadas à produção de vinhos. Já *V. labrusca* L. é de origem americana e apresenta características rústicas, principalmente quanto a sua resistência às doenças (Giovannini, 2008).

A forma de propagação comercial da videira é por estaquia ou por enxertia. A estaquia é indicada para videiras rústicas, como por exemplo, as americanas e híbridas. A enxertia é obrigatória para as cultivares de uvas finas viníferas, sendo indicada até mesmo para as videiras americanas e híbridas, pois, com a utilização de um porta-enxerto adequado, além do controle de pragas como a filoxera que ataca as raízes, obtém-se melhor produção e qualidade do fruto (Nachtigal e Mazzarolo, 2008).

Além desses dois métodos de propagação citados, as videiras também podem ser propagadas via sementes. Porém, esse método não é utilizado para a propagação comercial da videira, não só pelo tempo necessário para a obtenção de plantas adultas, mas também pelo fato de as plantas originadas não reproduzirem exatamente as mesmas características da variedade original. Dessa forma, a propagação seminífera é mais explorada no melhoramento genético da videira (Nachtigal e Mazzarolo, 2008). Assim, o surgimento de novas cultivares no mercado por meio do melhoramento são advindas de sementes.

2.2. Importância econômica da videira

A videira é uma das fruteiras de maior importância econômica em todo o mundo. O consumo de uva pode ser feito *in natura*, todavia, ela é mais explorada

na produção de vinhos, bebidas destiladas, passas, suco, além do óleo extraído das sementes e do uso farmacêutico (FAO e OIV, 2016).

No Brasil, o consumo de vinho baseia-se principalmente em produtos provenientes de outros países (Almeida et al., 2015) e, desde 2014, tem ocorrido um aumento significativo na importação de vinho e de outros derivados da uva. No ano de 2018, a importação de vinho e de outros derivados alcançou números de 53,09 milhões de litros no primeiro semestre de 2018, ultrapassando os números observados no mesmo período do ano anterior, que foram de 50,04 milhões de litros. Em 2018 o Brasil exportou cerca de 1,59 milhão de litros de vinhos e outros derivados da uva, resultando em aumento de 39,23% em relação ao volume de 1,14 milhão exportado no mesmo período do ano anterior. No Brasil, o Rio Grande do Sul é considerado como principal estado produtor e, estima-se, que a região da Serra Gaúcha seja responsável por mais de 80% da produção nacional de vinho (CONAB, 2018).

A viticultura tem recebido grande estímulo para a produção de uvas de qualidade nas regiões mais quentes do Brasil, em comparação às regiões tradicionalmente produtoras do sul do país, devido ao baixo índice de precipitação, alta luminosidade e alta temperatura (Tonietto e Carbonneau, 2004). Em estudo desenvolvido por Pommer et al. (2009), foi comprovado que o município de Campos dos Goytacazes na região do Norte Fluminense, apresenta aptidão climática para produção de uvas, com condições favoráveis para colheita de frutos em mais de uma época por ano. Atualmente na região, já são mais de 40 hectares destinados à produção de uva.

A uva é considerada uma das principais frutas comercializadas no Brasil (Oliveira et al., 2017). A produção brasileira anual de uvas alcançou um total de 1,6 milhão de toneladas, sendo utilizada para o consumo *in natura* e também para processamento (IBGE, 2018). Segundo Camargo et al. (2011), são mais de 120 cultivares de *V. vinifera* e mais de 40 cultivares de uvas americanas existentes, incluindo castas de *V. labrusca*, *V. bourquina* e de híbridas interespecíficas, produzidas em regiões com considerável diversidade ambiental entre as zonas de produção, incluindo regiões de clima temperado, subtropical e tropical.

Na indústria farmacêutica, estudos sugerem que os flavonoides, especialmente os abundantes nas uvas, podem estar associados a benefícios para a saúde e, em particular, benefícios para pessoas que sofrem de problemas

cardiovasculares (Wightman et al., 2015). Nas uvas, e em seus derivados, também é encontrada uma substância conhecida como resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene), um composto fenólico do tipo estilbeno, da classe dos polifenóis não flavonoides, que vem despertando cada vez mais interesse em pesquisadores, devido a seus efeitos benéficos à saúde (Chang et al., 2015).

De modo geral, os resíduos da uva, como casca, sementes e caules, também são fontes potenciais de compostos fenólicos e flavonoides importantes para a saúde humana (Sridhar e Charles, 2019). Segundo Chemat et al. (2014), as sementes de uva (*V. vinifera* L.) são consideradas como os principais sub-produtos da indústria vinícola. Estudos recentes desenvolvidos por Bolonio et al. (2019), têm chamado a atenção para o aproveitamento dos sub-produtos da produção de vinho. Nesses estudos as sementes e as cascas, por exemplo, são um material promissor para a produção de bioetanol, principalmente em países que são grandes produtores de vinho. O interesse em pesquisas para a produção de bioetanol vem crescendo principalmente porque a tendência é que os combustíveis fósseis fiquem cada vez mais escassos.

Segundo a Organização Internacional do Vinho - OIV em relatório publicado em abril de 2019 intitulado de "Aspectos da Conjuntura Mundial – Situação do Setor em 2018", abordou temas como a superfície vitícola mundial, produção e consumo de vinhos. O relatório apontou que houve uma estabilização da área cultivada com uvas entre os anos de 2017 e 2018, considerando tanto os cultivos para o consumo *in natura* da fruta quanto aqueles voltados para processamento. A superfície global cultivada com vinhedos em 2018 está estimada em 7429 mil ha, enquanto que em 2017 a área cultivada foi estimada em 7428 mil ha (CONAB, 2019).

O crescimento na indústria vitivinícola está relacionado a fatores como: o aumento do comércio internacional, a melhoria da renda global, a políticas e a notáveis inovações tecnológicas de produção, armazenamento e transporte (Daane et al., 2008).

2.3. Dormência e germinação *in vitro* de sementes

A dormência é caracterizada pela incapacidade de ocorrer a germinação mesmo quando as sementes estão sob condições ambientais favoráveis (Marcos

Filho, 2005). A dormência pode ser de origem primária (geralmente induzida pelo ABA) quando já está presente nas sementes recém dispersas, ou pode ser de origem secundária, devido às alterações fisiológicas que ocorrem após a exposição das sementes a condições desfavoráveis à germinação (Taiz et al., 2017).

Para a superação da dormência em sementes, são diversos os trabalhos que utilizam o cultivo *in vitro* para a solução desse problema, do ponto de vista agrônômico, de modo que as condições *in vitro* possibilitem aumento na germinação com alta porcentagem de plântulas normais e com alto vigor. Em trabalho desenvolvido por Rosa et al. (2012), o uso da estratificação mecânica com lixa associado ao cultivo *in vitro*, proporcionou a superação da dormência tegumentar das sementes de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) possibilitando aumento significativo na germinação. Já em estudo realizado por Inácio et al. (2010), o uso do cultivo *in vitro* associado a métodos de estratificação química em ácido, devido a presença de um tegumento muito rígido da semente, também proporcionou alta porcentagem de germinação em sementes de algodãozinho-do-campo (*Cochlospermum regium*).

As sementes de uva, normalmente apresentam dormência durante a germinação. Segundo Rajasekaran et al. (1982), essa dormência está associada a um alto conteúdo de ABA endógeno nas sementes. A estratificação a frio, que é o método tradicional para a superação da dormência em uva, leva à rápida redução no teor de ABA, promovendo, assim, a germinação. Além disso, as sementes de uva possuem tegumento muito rígido com espessura variável e rica em tanino (Reisch e Pratt, 1996).

De acordo com Carvalho e Nakagawa (2000), o tanino, juntamente com a suberina, lignina, cutina, pectina e outros derivados da quinona, são compostos presentes em sementes e responsáveis por conferir impermeabilidade tegumentar à água. Para superar essa barreira tegumentar em sementes, Cordazzo e Hackbart (2009) afirmam que a superação da dormência mecânica favorece a entrada de água e facilita as trocas gasosas levando assim à germinação. Em trabalho realizado por Val et al. (2010) e por Generoso et al. (2019), foi possível alcançar altas taxas de germinação por meio de cortes realizados no tegumento de sementes de videiras, estando esse método associado ao uso de fitorreguladores como o GA₃ em condições de cultivo *in vitro*. O corte das sementes tem se mostrado

imprescindível à germinação de sementes de videira não-estratificadas (Val et al., 2010).

Diante da possibilidade de métodos alternativos à estratificação de sementes de videira para alcançar a germinação, novos estudos devem ser explorados, por meio de técnicas como a cultura de tecidos vegetais, a partir do cultivo *in vitro*. Dessa forma, diante do sucesso do cultivo *in vitro* na germinação de sementes, o uso dessa técnica tem se mostrado um método promissor para a superação da dormência e para a germinação de sementes de videira.

2.4. Cultura de tecidos vegetais e suas técnicas associadas à cultura da videira

A cultura de tecidos vegetais possibilita o cultivo *in vitro* de células, tecidos, órgãos e plantas inteiras que são cultivados em ambiente asséptico em um meio de cultura nutritivo e sob condições controladas, como a densidade de fluxo de fótons, fotoperíodo e temperatura (Carvalho et al., 2011).

Sendo assim, a cultura de tecidos vegetais vem se destacando cada vez mais na agricultura moderna, possibilitando a obtenção de plantas livres de patógenos, a conservação e intercâmbio de germoplasma *in vitro*, a micropropagação de plantas, a transformação genética, a superação de dormência de sementes, o resgate e o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos, entre outras.

Na cultura da videira, o cultivo *in vitro* pode ser utilizado como uma técnica capaz de superar uma série de barreiras. Dentre os trabalhos encontrados na literatura estão: o resgate de embriões a partir de sementes traço para obtenção de uvas de mesa sem sementes e com resistência a pragas e doenças (Tian et al., 2008; Tang et al., 2009; Ebadi et al., 2016; Li et al., 2013; Li et al., 2015; Li et al., 2018); a obtenção de embriões a partir da embriogênese somática como forma de propagação clonal (Vidal et al., 2009; Acanda et al., 2013; Carra et al., 2016; Maillot et al., 2016); trabalhos com termoterapia também vêm sendo realizados para o estabelecimento *in vitro* e obtenção de plantas livres de vírus (Baránek et al., 2010; Naue et al., 2014); transformação genética (Dhekney et al., 2019); micro-enxertia (Aazami e Bagher, 2010); criopreservação (Matsumoto e Sakai, 2003; Bi et al., 2017); entre outros trabalhos.

Dessa forma, estudos que abordam a superação da dormência de sementes de videiras devem ser mais explorados, tanto pela germinação *in vitro* de sementes como pelo uso de embriões zigóticos maduros. Contribuindo, assim, com os programas de melhoramento genético vegetal para produção de novas cultivares, tendo em vista que, após a realização dos cruzamentos e obtenção dos frutos, todo o processo de seleção é realizado por meio de mudas obtidas via sementes.

2.5. Cultivo *in vitro* de embriões

O termo 'cultura de embrião' tem sido utilizado para descrever os processos de isolamento e crescimento de embrião zigótico *in vitro*, independentemente da idade, do tamanho e do estágio de desenvolvimento em que o embrião foi excisado (Rappapot, 1954). Segundo Ebert et al. (2014), o cultivo de embriões apresenta-se como uma técnica que possibilita a produção de mudas, permitindo a obtenção de plantas saudáveis em um espaço de tempo reduzido, proporcionando ganhos econômicos e homogeneidade produtiva.

São diversas as aplicações a partir da cultura de embriões, dentre elas, se destacam a recuperação de híbridos provenientes de cruzamentos incompatíveis, produção clonal de plantas a partir da micropropagação, a esterilidade de sementes, além da superação de dormência presente em alguns tipos de sementes (Ferreira e Hu, 1998). Dentro do grupo de sementes que apresentam dormência estão as sementes de videira, sendo assim, o uso do cultivo *in vitro* de embriões pode ser uma técnica promissora para a superação de dormência das sementes desse grupo de plantas.

São diversos os fatores que estão associados ao sucesso da técnica de cultivo *in vitro* de embriões, como por exemplo, a maturidade fisiológica das sementes, a desinfestação das sementes, o processo de excisão do embrião, o meio de cultivo e os sais minerais adequados, a fonte de carbono selecionada, o pH do meio de cultivo, os fitorreguladores, além das condições de cultivo quanto à luminosidade e temperatura (Carvalho e Araújo, 2007).

O primeiro relato na literatura de cultivo de embrião, foi realizado por Hannig (1904), que utilizou embriões imaturos de crucífera (*Raphanus sativus*, *R. caudatus* e *Colchlearia danica*), e observou a necessidade de uma fonte de

carbono para germinação dos embriões. Além disso, nesse estudo também foi apresentado o efeito de diferentes fontes de nitrogênio no meio de cultura sobre a morfologia do embrião. Segundo Dieterich (1924), isolar o embrião impede que este apresente dormência durante os processos germinativos.

Para a produção de novas cultivares de uva resistentes a doenças e que possuem frutos sem sementes, é necessário a realização de hibridações interespecíficas entre uma planta pai, com a característica de ausência de sementes, e uma planta mãe com semente. Após esse processo, os frutos são formados e as sementes são obtidas. A partir dessas sementes é feito o resgate dos embriões com o seu cultivo realizado em condições *in vitro* (Li et al., 2013; Li et al., 2015). Para o sucesso dessa técnica, é necessário realizar o isolamento do embrião zigótico sem lesões e o seu cultivo deve ser feito em um meio nutritivo adequado para o seu crescimento até a formação da plântula completa (Bridgen, 1994).

São inexistentes na literatura trabalhos que exploram o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos maduros de sementes de videira. Segundo Raghavan (1980), a utilização de sementes fisiologicamente maduras, para germinação e desenvolvimento dos embriões, requer apenas a presença de sais inorgânicos e sacarose no meio de cultura, em virtude de possuírem estrutura bipolar desenvolvida e passarem rapidamente para o estado autotrófico.

Devido à dificuldade de germinação de sementes de videira pelos métodos convencionais, o estudo do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos maduros pode ser uma alternativa eficiente para alcançar o sucesso na germinação e obtenção de plântulas normais e com um alto vigor.

2.6. Meios de cultura associados à cultura da videira

Existe uma infinidade de meios de cultura utilizados na cultura de tecidos vegetais, os quais podem ser constituídos por diferentes tipos de formulações, e são responsáveis por oferecer condições necessárias para que os explantes possam crescer e se desenvolver *in vitro* (Phillips e Garda, 2019).

Para a obtenção de melhores respostas durante o cultivo *in vitro* e germinação de sementes, a composição do meio de cultura desempenha um

importante papel no crescimento de células e tecidos vegetais (Braga et al., 2009). Os explantes que são cultivados *in vitro* possuem exigências nutricionais bastante específicas, pois necessitam de meios nutritivos que são compostos por minerais, vitaminas e por uma fonte de energia. Os meios de cultura devem ser utilizados de acordo com a necessidade de cada tipo de explante e espécie em estudo (Torres et al., 2001).

Na cultura da videira, os meios de cultura utilizados também podem ser os mais diversos, todavia, devem estar de acordo com o objetivo da pesquisa em questão.

O estabelecimento *in vitro* é considerado como a primeira fase do sistema de micropropagação, o qual é iniciado pela seleção dos explantes para posterior multiplicação e finaliza-se com a obtenção de uma grande quantidade clonal de mudas (Grattapaglia e Machado 1998). Para o estabelecimento e propagação *in vitro* da videira, são indicados, por exemplo, meios de cultura como o DSD1 (Silva e Doazan, 1995) indicado por Borghezian et al. (2003); o meio MS (Barreto et al., 2006; Ayub et al., 2010); o meio ½MS (Silva et al., 2012); além desses, existe o meio de cultura WPM (Woody Plant Medium) (Lloyd e McCown, 1980), desenvolvido especialmente para o cultivo *in vitro* de espécies lenhosas.

Para indução da organogênese em videira, podem ser utilizados o meio ½MS (Carvalho et al., 2011) e o meio NN (Nitsch e Nitsch, 1969) indicado por Nali e Almeida (2008).

Para indução da embriogênese somática (ES) em videira, podem ser utilizados meios de cultura como o NN (Yang et al. 2006) e o meio MS (Dai et al., 2015; Carra et al., 2016; San et al., 2017).

Com relação ao estudo de meios de cultura na germinação de sementes de videira *in vitro*, ainda são poucos os estudos observados na literatura. Em estudo desenvolvido por Val et al. (2010) para a germinação de sementes de uva, é recomendado o uso do meio MS. Geralmente, o meio MS é utilizado quando não existem protocolos pré-estabelecidos para determinada cultura.

Na técnica de resgate *in vitro* de embriões de videira para produção de uvas sem sementes, também são testados meios de cultura que possam suprir as necessidades nutricionais dos embriões, uma vez que esses ainda se encontram nos estádios iniciais de desenvolvimento. Para auxiliar no desenvolvimento desses embriões antes do resgate, Tang et al. (2009) utilizaram o meio ER (Emershad e

Ramming, 1994) em seu estado líquido, e após isso, os embriões são resgatados e transferidos para o meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) para a germinação. Em trabalho desenvolvido por Li et al. (2015) também no resgate de embriões, o meio de cultura utilizado para a germinação foi o WPM (Lloyd e McCow, 1981).

Conforme os trabalhos supracitados, é possível observar alguns meios de cultura com diferentes formulações e que podem ser utilizados para as mais diversas finalidades no cultivo *in vitro* de videira. Vale ressaltar que a diversidade de meios de cultura é necessária, devido ao objetivo do estudo em questão, e também pela grande quantidade de espécies e cultivares que respondem das mais diversas formas, de acordo com as suas especificidades biológicas durante o cultivo *in vitro*.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Desenvolver metodologias mais eficientes para a superação da dormência em sementes de videiras por meio do cultivo *in vitro*.

3.2. Específicos

- Verificar a germinação *ex vitro* de sementes das cultivares de videira 'Niágara Rosada', 'Itália' e 'Red Globe' a partir da estratificação em baixas temperaturas;
- Verificar o aumento da germinação *in vitro* por meio da superação da dormência mecânica das sementes das cultivares de videira 'Niágara Rosada', 'Itália' e 'Red Globe';
- Estabelecer um meio de cultivo eficiente para promover o aumento da germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros das cultivares de videira 'Niágara Rosada' e 'Itália'.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Caracterização do local

Os experimentos foram conduzidos no Setor de Horticultura do Laboratório de Fitotecnia (LFIT) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) em Campos dos Goytacazes, RJ. O município se situa na latitude 21° 45' S e na longitude 41° 20' W e possui altitude média de 11 metros.

4.2. Material vegetal

Foram utilizadas nos experimentos, sementes retiradas de frutos frescos das cultivares de videira 'Niágara Rosada', 'Itália' e 'Red Globe' (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição das cultivares utilizadas nos experimentos.

Cultivares	Cruzamento/Mutação	Espécie
'Niágara Rosada'	Mutação somática da uva Niágara Branca	<i>V. labruscana</i> L. (Fox Grape)
'Itália'	'Bicane' x 'Moscatel de Hamburgo'	<i>V. vinifera</i> L.
'Red Globe'	(Hunisa x Emperor) x (Hunisa x Emperor x Nocera)	<i>V. vinifera</i> L.

4.3. Experimento I: Germinação *ex vitro* das sementes

Para o teste de germinação em BOD, foram utilizadas sementes extraídas de frutos frescos das cultivares 'Niágara Rosada', 'Itália' e 'Red Globe' (Tabela 1), de acordo com as Regras para Análise de Sementes (RAS) (Brasil, 2009).

As sementes foram retiradas dos frutos e lavadas em água corrente. Em seguida, as sementes foram postas sobre papel toalha para secagem em temperatura ambiente e após, foram estratificadas em temperatura de 5°C durante 90 dias.

O teste de germinação foi conduzido com oito repetições de 25 sementes para cada cultivar. Cada repetição foi constituída por uma Caixa Plástica Gerbox, contendo três camadas de papel germiteste umedecido com água destilada. Devido a presença de dormência, foram utilizadas como controle sementes sem estratificação, sendo oito repetições de 25 sementes para cada cultivar. As sementes foram transferidas para câmara do tipo BOD com temperatura de 20°C (luz) e 30°C (escuro) e fotoperíodo de 16:8 horas de luz:escuro.

Ao longo de 28 dias foi avaliada diariamente a germinação para a realização do Índice de Velocidade de Germinação (IVG), sendo observando o número de sementes com a protrusão da raiz primária. Para o cálculo de IVG foi utilizada a fórmula proposta por Maguire (1962).

$$IVG = + \frac{G_1}{D_1} + \frac{G_2}{D_2} + \dots + \frac{G_n}{D_n}$$

Aos 28 dias, foi realizada a contagem final da porcentagem de germinação de plântulas normais, de plântulas anormais, da protrusão da raiz primária, sementes não germinadas e germinação acumulada.

As sementes que não germinaram foram removidas e testadas quanto à sua viabilidade por meio do teste de tetrazólio. Para isso, as sementes foram cortadas transversalmente com auxílio de pinça e bisturi e colocadas para embeber em água durante um dia, após isso, as sementes foram cortadas longitudinalmente e metade dessas sementes foram postas em uma solução de 2,3,5 - Trifenil cloreto de tetrazólio a 0,5% por 2 horas a 40°C em câmara BOD, após isso, foi observado a mudança da coloração para comprovar a viabilidade. Metodologia modificada de Conner (2008).

4.4. Experimento II: Germinação *in vitro*: superação de dormência mecânica das sementes

4.4.1. Estabelecimento *in vitro*

A desinfestação das sementes antes da inoculação *in vitro*, foi realizada em ambiente asséptico em câmara de fluxo laminar, com imersão em álcool 70% durante 30 segundos e em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) 1% com duas gotas de Tween 20 em 75 mL de solução por 20 minutos, posteriormente foram enxaguadas três vezes em água desionizada e autoclavada nos tempos de 5, 10 e 10 minutos.

4.4.2. Germinação *in vitro*

Para este experimento foram utilizadas sementes extraídas de frutos frescos de três cultivares de videira (Figura 1 A e B) (Tabela 1). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial de 3x3 (três tipos de explantes e três cultivares) com oito repetições. Cada repetição foi constituída por 10 tubos de ensaio (25x150 mm) contendo 10 mL de meio de cultivo e um explante por tubo. Os explantes foram sementes intactas, sementes com corte na região da micrópila e sementes com corte transversal (Figura 1 C, D e E). O meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige e Skoog, 1962) contendo metade das concentrações de sais mineirais ($\frac{1}{2}$ MS) e das vitaminas de White. Foram adicionados 30 g L⁻¹ de sacarose, 200 mg L⁻¹ de Polivinilpirrolidona (PVP) (SIGMA®), o pH foi ajustado para 5,7±0,1 e em seguida, foram solidificados com 6 g L⁻¹ de ágar bacteriológico (SIGMA®), antes da autoclavagem a 121°C e 1,1 atm de pressão por 15 minutos.

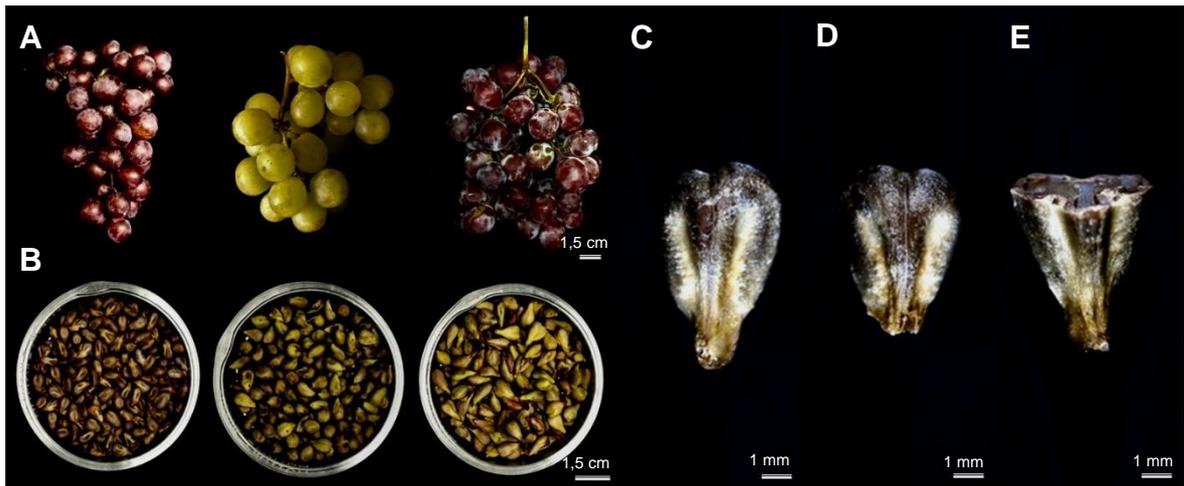


Figura 1. Frutos e sementes das cultivares ‘Niagara Rosada’, ‘Itália’ e ‘Red Globe’ (A e B) e sementes utilizadas como explantes, sendo sementes intactas (C), sementes com corte na região da micrópila (D) e sementes com corte transversal (E).

Antes dos cortes e da inoculação *in vitro* as sementes foram desinfestadas e posteriormente embebidas em água desionizada e autoclavada por 24 horas.

O corte nas sementes foi realizado em câmara de fluxo laminar sobre placa de Petri, com auxílio de pinça e bisturi estéreis.

O experimento foi acondicionado em sala de cultivo, com temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo 16:8 horas (luz - escuro), fornecidas por lâmpadas fluorescentes OSRAM® luz do dia, irradiância de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Ao longo de 54 dias foi avaliado diariamente a germinação para a realização do Índice de Velocidade de Germinação (IVG). Para o cálculo de IVG foi utilizada a fórmula proposta por Maguire (1962). Além desta variável, ao final dos 54 dias, foram avaliadas a porcentagem de plântulas normais, plântulas anormais, protrusão da raiz primária, sementes não germinadas, o comprimento das plântulas (mm), comprimento da raiz principal (mm), o número de folhas, massa da matéria seca da raiz (g), parte aérea (g) e total (g) e a porcentagem de germinação acumulada.

As sementes que não germinaram foram removidas e testadas quanto à sua viabilidade por meio do teste de tetrazólio. Para isso, as sementes foram cortadas transversalmente com auxílio de pinça e bisturi e colocadas para embeber em água durante um dia, após isso, as sementes foram cortadas longitudinalmente e metade dessas sementes foram postas em uma solução de 2,3,5 - Trifenil cloreto de

tetrazólio a 0,5% por 2 horas a 40°C em câmara BOD, após isso, foi observado a mudança da coloração para comprovar a viabilidade. Metodologia modificada de Conner (2008).

4.4.3. Análise estatística

As observações foram submetidas à pressuposição de normalidade pelo teste Shapiro Wilk. Após isso, foram transformados em \sqrt{x} , em seguida, foram submetidos à análise de variância e as médias quando significativas pelo teste F foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade estatística, com o auxílio do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011).

4.5. Experimento III: Germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros de diferentes cultivares de videira: concentrações de sais minerais do meio de cultura

4.5.1. Estabelecimento *in vitro* dos embriões zigóticos maduros isolados

Para facilitar o isolamento dos embriões maduros das sementes, foi empregada a metodologia proposta por Zarek (2007), de maneira adaptada, utilizando ácido sulfúrico para facilitar a retirada do tegumento das sementes. Foram utilizadas sementes extraídas de frutos frescos das cultivares 'Niágara Rosada' e 'Itália'. As sementes foram estratificadas em ácido sulfúrico H₂SO₄ (Vetec®) 50% durante 15 minutos, proporcionando a diminuição da espessura do tegumento, em seguida, as sementes foram lavadas em água corrente. As sementes foram desinfestadas seguindo a mesma metodologia citada no item 4.4.1. Com auxílio de um microscópio estereoscópico (Tecnival®), pinça e bisturi, os embriões zigóticos maduros foram isolados (Figura 2).

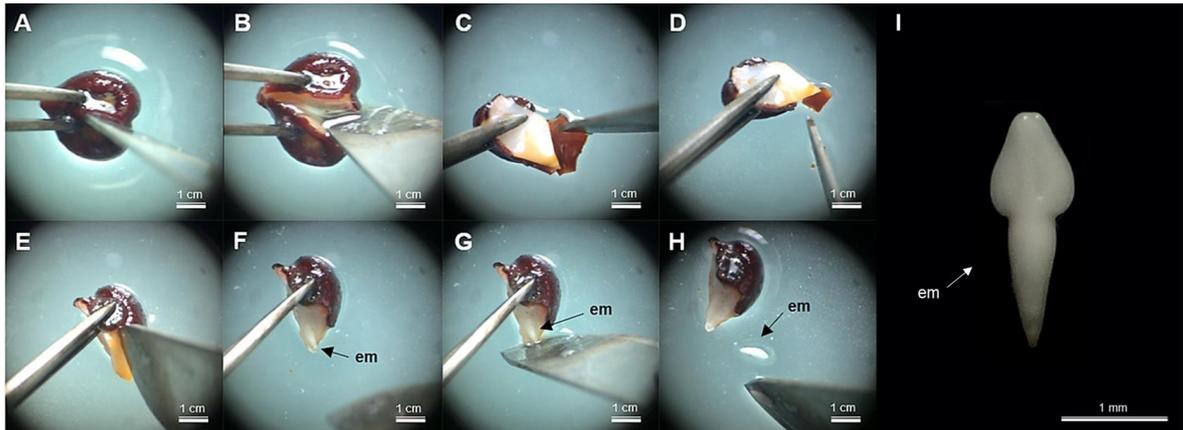


Figura 2. Processo de excisão dos embriões zigóticos maduros de videira. Semente intacta estratificada em ácido sulfúrico (A); corte longitudinal na semente (B); remoção do tegumento que constitui e recobre a região da micrópila (C e D); remoção de parte do endosperma que recobre o embrião (em) (E e F); remoção do embrião (G) e embrião isolado (H e I).

4.5.2. Germinação *in vitro* dos embriões zigóticos maduros de videira

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), em um esquema fatorial 4x2 (quatro concentrações de sais minerais e duas cultivares), com seis repetições. Cada repetição foi constituída por uma placa de Petri (82 x 15 mm) contendo 10 mL de meio de cultura com quatro explantes por repetição. Os meios de cultura foram o MS e WPM (Lloyd e McCown, 1981) com as concentrações totais dos sais minerais e das vitaminas de White e com metade das concentrações de sais minerais e das vitaminas de White ($\frac{1}{2}$ MS e $\frac{1}{2}$ WPM) (Tabela 2). Foram adicionados 20 g L⁻¹ de sacarose, 200 mg L⁻¹ de Polivinilpirrolidona (PVP) (SIGMA®), o pH foi ajustado para 5,7±0,1 e em seguida, foram solidificados com 2 g L⁻¹ de Phytigel (SIGMA®), antes da autoclavagem a 121°C e 1,1 atm de pressão por 30 minutos. Posteriormente os meios de cultura foram vertidos em placas de Petri (82 x 15 mm) descartáveis em câmara de fluxo laminar.

Tabela 2. Descrição dos constituintes dos meios de cultura MS, ½MS, WPM e ½WPM para o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos maduros de cultivares de videira. Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

Nutrientes	MS (mg L⁻¹)	½MS (mg L⁻¹)	WPM (mg L⁻¹)	½WPM (mg L⁻¹)
KNO₃	1900	950	-	-
NH₄NO₃	1650	825	400	200
K₂SO₄	-	-	990	495
MgSO₄.7H₂O	370	185	180,7	90,35
KH₂PO₄	170	85	170	85
Ca(NO₃)₂	-	-	386	193
CaCl₂.2H₂O	440	220	72,5	36,25
FeSO₄.7H₂O	27,8	13,9	27,8	13,9
Na₂.EDTA.2H₂O	37,2	18,6	37,2	18,6
MnSO₄.H₂O	16,9	8,45	22,3	11,15
KH₂PO₄	-	-	170	85
ZnSO₄.7H₂O	8,6	4,3	8,6	4,3
H₃BO₃	6,2	3,1	6,2	3,1
KI	0,83	0,415	-	-
Na₂MoO₄.2H₂O	0,25	0,125	0,25	0,125
CoCl₂.6H₂O	0,025	0,0125	-	-
CuSO₄.5H₂O	0,025	0,0125	0,25	0,125
Ácido nicotínico	0,5	0,25	0,5	0,25
Piridoxina	0,5	0,25	0,5	0,25
Tiamina	0,1	0,01	0,1	0,01
Glicina	2	1	2	1
Mio-inositol	100	100	100	100

O experimento foi acondicionado em sala de cultivo, com temperatura de 27±2°C com fotoperíodo 16:8 horas (luz - escuro), fornecidas por lâmpadas fluorescentes OSRAM® luz do dia, irradiância de 50 µmol m⁻² s⁻¹.

Ao longo destes 28 dias foi avaliada diariamente a germinação para a realização do Índice de Velocidade de Germinação (IVG). Para o cálculo de IVG foi utilizada a fórmula proposta por Maguire (1962). Além desta variável, ao final dos 28 dias, foram avaliados a porcentagem de plântulas normais, plântulas anormais, embriões não germinados, comprimento das plantas (mm), comprimento da raiz principal (mm), número de folhas, massa da matéria seca total (mg) e germinação acumulada.

Foi realizada a mesma análise estatística do item 4.4.3.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Experimento I: Germinação *ex vitro* de três cultivares de videira

Não foi observado germinação nos tratamentos controles para todas as cultivares utilizadas. Para a cultivar 'Niágara Rosada', também não houve germinação das sementes que foram estratificadas em temperatura de 5°C durante 90 dias como recomendado pela RAS (Brasil, 2009).

Em trabalho desenvolvido por Pommer et al. (1988), também não foi observado germinação das sementes de 'Niágara Rosa' no tratamento sem estratificação. Nesse mesmo trabalho, quando estratificadas, as sementes resultaram em percentual de germinação de 26,4%, cultivadas em temperaturas alternadas de 16 horas a 15°C e 8 horas a 35°C. Essa divergência de resultados após a realização do teste de germinação pode ocorrer devido a fatores, como por exemplo, a temperatura. Segundo Marcos Filho (2005), as variações de temperatura durante a germinação são responsáveis por afetar a velocidade, a porcentagem e a uniformidade de germinação de sementes.

Para a variável de vigor IVG, foi obtido índice de 0,334 para 'Itália' e 0,740 para 'Red Globe', com 4% e 3%, respectivamente, para a protrusão da raiz primária (Figura 3 A e B). Quanto à porcentagem de plântulas normais, foi obtido apenas 0,5% para a cultivar 'Red Globe' (Figura 3 C). Já para plântulas anormais (Figura 3 D e E), foi observado 2% e 9% para as cultivares 'Itália' e 'Red Globe' respectivamente. Para porcentagem de sementes não germinadas, foi obtido um percentual total de 94% para 'Itália' e 87% para 'Red Globe' (Tabela 3).



Figura 3. Resultados do experimento aos 28 dias após o cultivo *ex vitro* em BOD. Protrusão da raiz primária das cultivares ‘Red Globe’ (A) e ‘Itália’ (B); plântula normal da cultivar ‘Red Globe’ (C); plântulas anormais das cultivares ‘Itália’ (D) e ‘Red Globe’ (E) e sementes não germinadas após teste de viabilidade em 2-3-5-Trifenil cloreto de tetrazólio (F).

Dificuldades na germinação de sementes de videira seguindo os métodos convencionais também foram encontradas por Conner (2008) em sementes de *Vitis rotundifolia* Michx., sendo obtido 68% de sementes germinadas. Porém, desse total, apenas 3,4% resultaram em plântulas normais, após 8 semanas de cultivo. Segundo Ellis et al. (1983) e Pommer et al. (1988), em média, a taxa de germinação de sementes de uva dificilmente chega a um total de 50%, levando em torno de 120 dias, ou mais, para a obtenção das plântulas.

A baixa porcentagem de germinação das sementes de uva, ocorre devido à presença de dormência (Ellis et al., 1983; Maeda et al., 1985; Pommer et al., 1988). Além disso, o tegumento rígido das sementes de uva possui espessura variável e rica em tanino (Reisch e Pratt, 1996). De acordo com Carvalho e Nakagawa (2000), o tanino, juntamente com a suberina, lignina, cutina, pectina e outros derivados da quinona, são compostos presentes no tegumento de sementes e são responsáveis por conferir impermeabilidade à água, impedindo que se iniciem os processos germinativos.

Tabela 3. Médias e desvios padrão das variáveis de vigor: índice de velocidade de germinação (IVG), emissão da raiz primária (ERP), plântulas normais (PN), plântulas anormais (PA), sementes não germinadas (SNG), após cultivo ex vitro em BOD das cultivares ‘Niágara Rosada’ (NR), ‘Itália’ (I) e ‘Red Globe’ (RG) por 28 dias. Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

Cultivares	IVG	PRP (%)	PN (%)	PA (%)	SNG (%)
NR (Controle)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	100,0±0,0
NR (Estratificada)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	100,0±0,0
I (Controle)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	100,0±0,0
I (Estratificada)	0,3±0,1	4±1,4	0,0±0,0	2,0±1,4	94,0±2,5
RG (Controle)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	100,0±0,0
RG (Estratificadas)	0,7±0,2	3,0±1,1	0,5±0,4	9,0±2,7	87,5±3,1

A germinação das sementes iniciou ao décimo quinto dia após a semeadura. Foi observado uma baixa porcentagem de sementes germinadas, além disso, a germinação ocorreu de maneira desuniforme, ainda havendo germinação ao vigésimo sétimo dia em uma das cultivares (Figura 4).

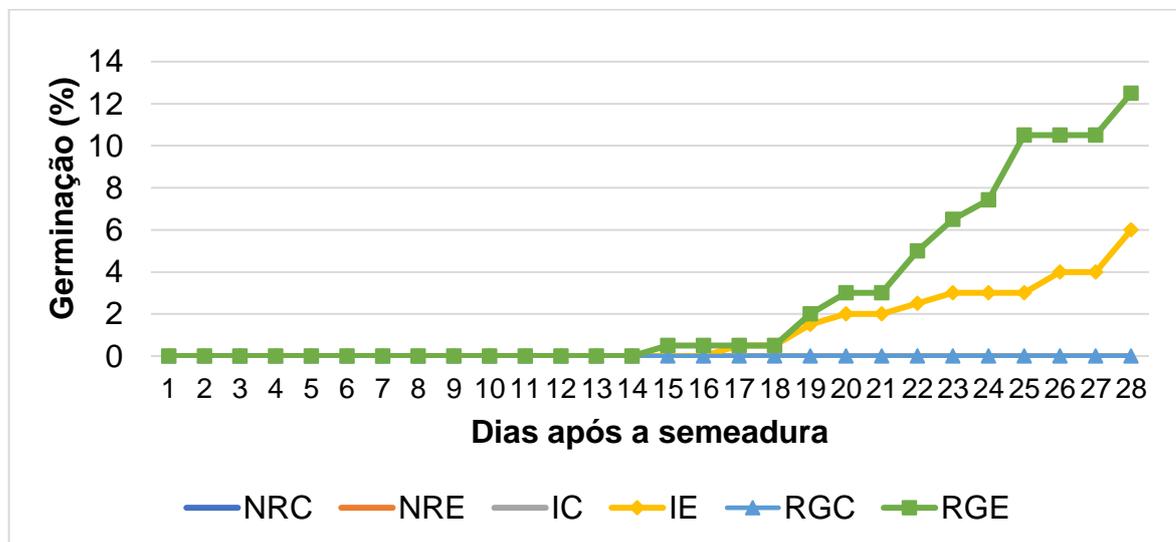


Figura 4. Germinação acumulada após 28 dias em BOD. Cultivar ‘Niágara Rosada’ em NRC (Tratamento controle) e NRE (Estratificada); cultivar ‘Itália’ em IC (Tratamento controle) e IE (Estratificada) e cultivar ‘Red Globe’ em RGC (Tratamento controle) e RGE (Estratificada).

Nesse teste de germinação, foi observado que mesmo após os 28 dias em câmara de germinação BOD, seguindo as recomendações descritas pelas Regras para Análise de Sementes (RAS) (Brasil, 2009), o percentual para todas as análises de vigor das três cultivares de videira utilizadas, 'Niágara Rosada', 'Itália' e 'Red Globe', não foram representativas para um teste de germinação, dessa forma, foi mais que necessário a aplicação da cultura de tecidos vegetais, a partir do cultivo *in vitro* de sementes e também pelo cultivo *in vitro* de embriões zigóticos maduros para obtenção de uma maior porcentagem de germinação e plântulas com alto vigor.

5.2. Experimento II: Germinação *in vitro*: quebra da dormência mecânica das sementes

Na germinação *in vitro* das sementes das três cultivares de videira, a análise de variância detectou interação significativa entre a cultivar e corte apenas para as variáveis de vigor IVG, plântulas normais, plântulas anormais e para sementes não germinadas. Para as variáveis número de folhas, comprimento da planta, massa da matéria seca da parte aérea, raiz e total, foi observada diferença significativa para o tipo de cultivar e corte. Não houve efeito significativo para a variável protrusão da raiz primária (Tabela 3).

Tabela 4. Resumo da análise de variância com os quadrados médios para as variáveis de vigor: índice de velocidade de germinação (IVG), plântulas normais (PN), plântulas anormais (PA), sementes não germinadas (SNG), protrusão da raiz primária (PRP), número de folhas (NF), comprimento da planta (CP), massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA), massa da matéria seca da raiz (MMSR) e massa da matéria seca total (MMST), em função da cultivar de videira e corte, de videiras cultivadas por 54 dias *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

FV	QM					
	GL	IVG	PN	PA	SNG	PRP
Cultivar	2	15,7*	9,7 ^{ns}	343,0*	422,2 ^{ns}	3,7 ^{ns}
Corte	2	109,6*	4001,3*	622,2*	7301,3*	0,01 ^{ns}
Cult*Corte	4	17,2*	236,8*	488,8*	1188,8*	16,4 ^{ns}
Resíduo		1,5	70,8	62,1	104,3	10,7
CV (%)		44,8	47,3	127,7	7,6	357,0
FV	GL	NF	CP	MMSR	MMSPA	MMST
Cultivar	2	88,4*	3479,0*	0,0002*	0,0010*	0,0021*
Corte	2	155,8*	3371,8*	0,00008*	0,0004*	0,0008*
Cult*Corte	4	4,7 ^{ns}	334,2 ^{ns}	0,0001 ^{ns}	0,0002 ^{ns}	0,0005 ^{ns}
Resíduo		9,7	412,3	0,0001	0,0002	0,0006
CV (%)		54,6	59,2	89,8	75,6	76,9

*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{ns}Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Para a variável Índice de Velocidade de Germinação, foi observado que o maior índice para todas as cultivares foi obtido quando utilizado o corte transversal das sementes, sendo esse mais eficiente para a cultivar 'Red Globe'. Em trabalho desenvolvido por Val et al. (2010), não houve diferença significativa na velocidade de germinação em função das diferentes modalidades de cortes que foram aplicados às sementes de 'Niágara Rosada'. Já em trabalho realizado por Generoso et al. (2019), utilizando sementes das cultivares 'Niágara Rosada', 'Itália' e 'Red Globe' sendo empregado o uso de diferentes concentrações de GA₃ e cortes realizados nas extremidades das sementes, diferente dos resultados obtidos no presente estudo, o melhor IVG foi observado na cultivar 'Itália' com índices entre 0,59 e 2,79 ao longo de 45 dias de avaliação.

O corte transversal também proporcionou um maior percentual para a variável de vigor plântulas normais em todas as cultivares. Porém, para 'Itália', foi observado que não houve diferença estatística entre as sementes com corte transversal das sementes intactas. Para a mesma cultivar também não foi observado diferença estatística entre o corte na região da micrópila com as sementes intactas (Tabela 5).

A porcentagem de plântulas normais para todas as cultivares analisadas não ultrapassou os 50% de germinação. Segundo Ellis et al. (1983), esses resultados são obtidos mesmo quando as sementes passam por um longo período de estratificação em baixas temperaturas, levando em torno de 120 dias até a obtenção de plântulas. No presente estudo, após um período de 54 dias já foi possível a obtenção de plântulas normais com potencial para serem aclimatizadas sem a necessidade da estratificação por longos períodos.

Segundo Val et al. (2010), a velocidade de obtenção de plantas é uma característica mais que desejável em um programa de melhoramento genético. Dessa forma, avançar essa etapa de 90 dias de estratificação das sementes em baixas temperaturas como recomendado pela RAS, já é um ganho considerável perante a necessidade de obtenção de plantas em curto período de tempo pelos programas de melhoramento vegetal, permitindo acelerar o processo de desenvolvimento para a obtenção de novas cultivares.

Foi observada uma maior porcentagem de plântulas anormais para 'Red Globe', diferindo estatisticamente das demais. Isso se deve justamente por esta ter sido a cultivar que apresentou a maior taxa de germinação das sementes. Para a cultivar 'Itália', não houve diferença estatística entre as sementes intactas e sementes com corte transversal. Para 'Niágara Rosada' não foi observada diferença estatística entre nenhum dos tipos de corte utilizados (Tabela 5).

Para a variável de vigor sementes não-germinadas após 54 dias de cultivo *in vitro*, o corte transversal foi o mais eficiente, proporcionando um menor percentual para todas as cultivares, porém, não foi observada diferença estatística entre os cortes para 'Itália'. A menor porcentagem de sementes não germinadas foi observada para 'Red Globe', diferindo estatisticamente das demais cultivares. Para o corte na região da micrópila, não foi observada diferença estatística entre nenhuma das cultivares utilizadas (Tabela 5).

Tabela 5. Análise de desdobramento das variáveis de vigor: índice de velocidade de germinação, plântulas normais, plântulas anormais e sementes não germinadas, em função da interação entre cultivares de videira ('Niágara Rosada', 'Itália' e 'Red Globe') e tipo de corte (semente intacta, semente com corte na região da micrópila e semente com corte transversal), após 54 dias de germinação *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

Cultivares	Índice de velocidade de germinação (IVG)			Média
	Sementes Intactas	Corte na região da micrópila	Corte transversal	
Niágara Rosada	0,0 bC	0,8 aB	3,1 bA	1,3 b
Itália	1,2 aB	1,6 aB	3,1 bA	2,0 a
Red Globe	0,4 bB	1,1 aB	7,3 aA	2,9 a
Média	0,5 B	1,2 B	4,5 A	2,0
Plântulas normais (%)				
Cultivares	Sementes Intactas	Corte na região da micrópila	Corte transversal	Média
Niágara Rosada	1,2 bB	6,2 aB	31,2 aA	12,9 a
Itália	10,0 aAB	8,7 aB	21,2 aA	13,3 a
Red Globe	3,7 bB	6,2 aB	32,5 aA	14,1 a
Média	5,0 B	7,0 B	28,3 A	13,4
Plântulas anormais (%)				
Cultivares	Sementes Intactas	Corte na região da micrópila	Corte transversal	Média
Niágara Rosada	0,0 bA	0,0 aA	2,5 bA	0,8 b
Itália	10,0 aA	1,2 aB	5,0 bAB	5,4 a
Red Globe	1,2 bB	0,0 aB	23,7 aA	8,3 a
Média	3,7 B	0,4 B	10,4 A	4,8
Sementes não germinadas (%)				
Cultivares	Sementes Intactas	Corte na região da micrópila	Corte transversal	Média
Niágara Rosada	98,7 aA	92,5 aA	63,7 aB	85,0 a
Itália	78,7 bA	87,5 aA	73,7 aA	80,0 ab
Red Globe	93,7 abA	92,5 aA	43,7 bB	76,6 b
Média	90,4 A	90,8 A	60,4 B	80,5

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Para as variáveis de vigor número de folhas e comprimento da parte aérea, foi observado que 'Itália' e 'Red Globe' apresentaram as maiores médias, não havendo diferença estatística entre si. Para as mesmas variáveis, foi observado que o corte transversal das sementes proporcionou a maior média. (Tabela 6). Quando os explantes utilizados foram sementes intactas e sementes com corte na

região na micrópila, observou-se as menores médias para as variáveis comprimento da parte aérea e número de folhas, isso pode ser atribuído à ocorrência de uma germinação mais tardia dessas sementes.

Tabela 6. Médias das variáveis de vigor: número de folhas e comprimento da parte aérea para as cultivares de videira ('Niágara Rosada', 'Itália' e 'Red Globe') e para os tipos de corte (semente intacta, semente com corte na região da micrópila e semente com corte transversal), após 54 dias em cultivo *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

Cultivar	Número de folhas	Comprimento da parte aérea (mm)
Niágara Rosada	2,8 b	14,3 b
Itália	6,3 a	27,7 a
Red Globe	5,9 a	38,3 a
Média	5,0	26,7

Explantes	Número de folhas	Comprimento da parte aérea (mm)
Semente intacta	2,5 c	15,2 b
Semente com corte na micrópila	5,0 b	26,1 b
Semente com corte transversal	7,6 a	38,9 a
Média	5,0	26,7

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Após 54 dias de cultivo *in vitro* para a variável de vigor massa da matéria seca da parte aérea, foi observado que não houve diferença estatística entre as três cultivares de videira analisadas. Para massa da matéria seca da raiz, 'Itália' foi responsável por apresentar a maior média não diferindo estatisticamente de 'Red Globe'. O corte transversal realizado nas sementes foi responsável por proporcionar uma maior média para a massa da matéria seca da raiz e parte aérea, não diferindo estatisticamente das sementes que receberam o corte na região da micrópila. Também não foi observada diferença estatística entre as sementes intactas e as sementes que receberam o corte na região da micrópila (Tabela 7).

Tabela 7. Médias das variáveis de vigor: massa da matéria seca da raiz e da parte aérea para as cultivares de videira ('Niágara Rosada', 'Itália' e 'Red Globe') e para os tipos de corte (semente intacta, semente com corte na região da micrópila e semente com corte transversal), após 54 dias em cultivo *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

Cultivar	Massa da matéria seca da raiz (g)	Massa da matéria seca da parte aérea (g)
Niágara Rosada	0,002 b	0,008 a
Itália	0,008 a	0,020 a
Red Globe	0,007 ab	0,019 a
Média	0,005	0,015

Explantos	Massa da matéria seca da raiz (g)	Massa da matéria seca da parte aérea (g)
Semente intacta	0,004 b	0,012 b
Semente com corte na micrópila	0,006 ab	0,015 ab
Semente com corte transversal	0,008 a	0,020 a
Média	0,006	0,015

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

As médias para a variável de vigor massa da matéria seca total após 54 dias de cultivo *in vitro*, mostram que 'Itália' foi responsável por apresentar uma maior média, não diferindo estatisticamente da 'Red Globe'. Para a mesma variável, não foi observada diferença estatística entre 'Niágara Rosada' e 'Red Globe'. Para a fonte de variação explante, o corte transversal foi responsável por apresentar a maior média. Também não foi observada diferença estatística entre as sementes que receberam o corte transversal das sementes que receberam o corte na região da micrópila (Tabela 8).

Tabela 8. Médias das variáveis de vigor: massa da matéria seca total para as cultivares de videira ('Niágara Rosada', 'Itália' e 'Red Globe') e para os tipos de corte (semente intacta, semente com corte na região da micrópila e semente com corte transversal), após 54 dias em cultivo *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

Cultivar	Massa da matéria seca total (g)
Niágara Rosada	0,011 b
Itália	0,028 a
Red Globe	0,027 ab
Média	0,022
Explantes	Massa da matéria seca total (g)
Semente intacta	0,017 b
Semente com corte na micrópila	0,021 ab
Semente com corte transversal	0,029 a
Média	0,022

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

A germinação teve início no quinto dia após a semeadura *in vitro* para todas as cultivares avaliadas. Para as sementes intactas, em todas as cultivares, observou-se que mesmo sem a estratificação das sementes em baixas temperatura, os cortes e as condições controladas do cultivo *in vitro* proporcionaram a germinação das sementes, mesmo que de maneira tardia. De modo geral, a germinação das sementes em todas as cultivares não ocorreu de maneira uniforme (Figura 5), mesmo para aqueles tratamentos que apresentaram as melhores médias para todas as análises de vigor citadas anteriormente. Essa desuniformidade na germinação pode ser atribuída ao grau de dormência presente nas sementes. Segundo Carvalho e Nakagawa (2000), o grau de dormência presente nas sementes pode variar de acordo com a espécie, entre indivíduos e também entre sementes presentes em um mesmo fruto.

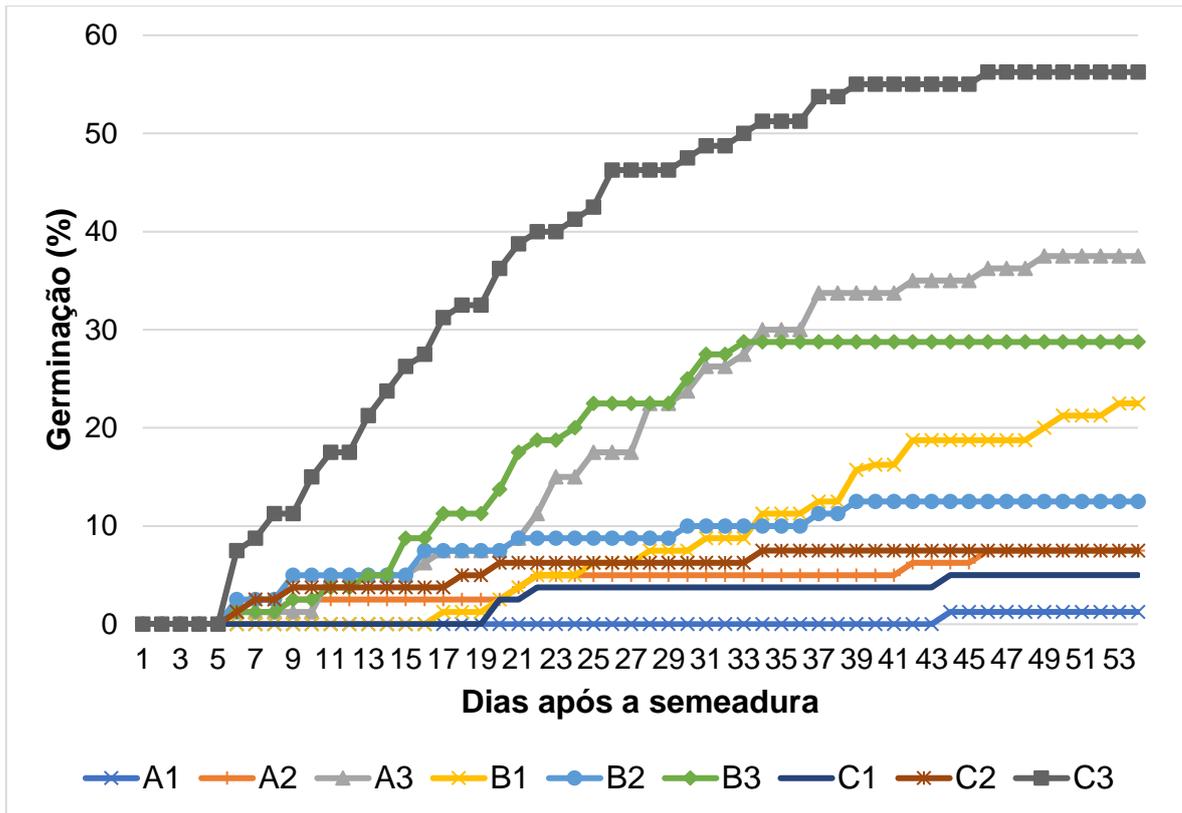


Figura 5. Germinação acumulada após 54 dias de cultivo *in vitro*. Cultivar ‘Niágara Rosada’ em A1 (Sementes intactas), A2 (Sementes com corte na região da micrópila) e A3 (Semente com corte transversal); cultivar ‘Itália’ em B1 (Sementes intactas), B2 (Sementes com corte na região da micrópila) e B3 (Semente com corte transversal) e cultivar ‘Red Globe’ em C1 (Sementes intactas), C2 (Sementes com corte na região da micrópila) e C3 (Semente com corte transversal).

De modo geral, o corte transversal realizado nas sementes foi responsável por proporcionar as maiores médias para todas as variáveis de vigor avaliadas, havendo grande influência entre os tipos de cultivares utilizadas. Esses resultados podem ser atribuídos a um maior contato do embrião com o meio de cultura, permitindo que os processos germinativos pudessem, assim, ser iniciados. Os resultados indicam que um ambiente controlado *in vitro* e a realização de cortes nas sementes de videira são imprescindíveis à germinação, quando essas não passam pelo processo de estratificação em baixas temperaturas como recomendado pela RAS. Em trabalhos desenvolvidos por Val et al. (2010) e Generoso et al. (2020) foi comprovado que cortes realizados em tegumentos de sementes não estratificadas de diferentes cultivares de videira é suficiente para superar a dormência física. A resposta na germinação de sementes de videira é genótipo dependente (Schuck et al., 2011; Generoso et al., 2019).

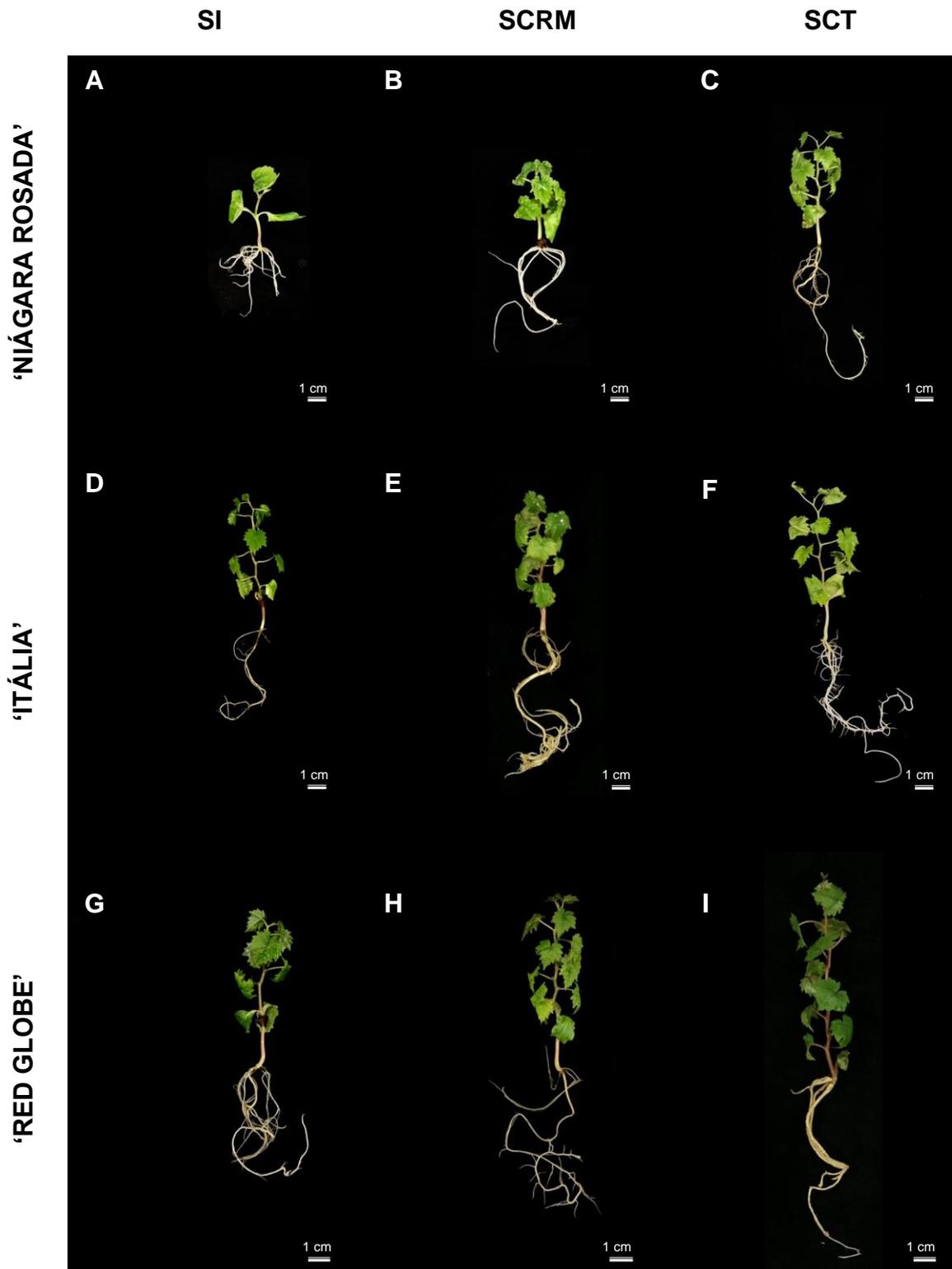


Figura 6. Resultados do experimento aos 54 dias após o cultivo *in vitro*. 'Niágara rosada' em A, B e C; 'Itália' em D, E e F e 'Red Globe' em G, H e I, sendo sementes intactas (SI), sementes com corte na região da micrópila (SCRM) e sementes com corte transversal (SCT).

5.3. Experimento III: Germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros de diferentes cultivares de videira: concentrações de sais

Na germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros de sementes das cultivares de videira 'Niágara Rosada' e 'Itália', a análise de variância mostrou interação significativa entre a cultivar e meio apenas para as variáveis de vigor plântulas anormais e comprimento da raiz. Para as variáveis de vigor plântulas normais, número de folhas, comprimento da planta e massa da matéria seca total, foi observada diferença significativa para o tipo de cultivar e meio. Não houve efeito significativo para as variáveis índice de velocidade de germinação e para embriões não germinados (Tabela 9).

Tabela 9. Resumo da análise de variância com os quadrados médios para as variáveis de vigor: índice de velocidade de germinação (IVG), plântulas normais (PN), plântulas anormais (PA), embriões não germinados (ENG), número de folhas (NF), comprimento da planta (CP), comprimento da raiz (CR) e massa da matéria seca total (MMST) em função do tipo de cultivar e meio de cultura, após o cultivo *in vitro* por 28 dias dos embriões zigóticos maduros. Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

FV	QM				
	GL	IVG	PN	PA	ENG
Cultivar	1	1,1 ^{ns}	0,7 ^{ns}	117,1 ^{ns}	117,1 ^{ns}
Meio	3	3,0 ^{ns}	102,9*	8381,0*	256,0 ^{ns}
Cult*Meio	3	1,9 ^{ns}	12,2 ^{ns}	1367,1*	117,1 ^{ns}
Resíduo	40	2,7	6,4	507,8	304,6
CV (%)		13,7	41,4	45,6	160,1

FV	QM				
	GL	NF	CP	CR	MMST
Cultivar	1	1,5 ^{ns}	61,7 ^{ns}	781,8 ^{ns}	0,000023 ^{ns}
Meio	3	8,4*	103,6*	957,3*	0,000037*
Cult*Meio	3	2,8 ^{ns}	41,1 ^{ns}	446,7*	0,000009 ^{ns}
Resíduo	40	1,6	21,4	148,3	0,000010
CV (%)		45,8	46,0	49,0	52,4

*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{ns}Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Foi observado que os resultados para as variáveis de vigor plântulas normais, número de folhas, comprimento da plântula e massa da matéria seca total, o meio de cultura WPM, contendo metade das concentrações de sais ($\frac{1}{2}$ WPM), foi

responsável por proporcionar as maiores médias (Tabela 10). Pode-se atribuir esses melhores resultados devido ao fato de o meio de cultura WPM ter sido desenvolvido por Lloyd e McCown, (1981) especialmente para espécies lenhosas. Segundo Gerrath et al. (2004), as videiras se encontram dentro desse grupo de plantas. Desta forma, para o sucesso da técnica, deve ser levada em consideração a espécie e o tipo de meio de cultura a ser empregado, aumentando assim, as chances de sucesso de germinação com alta porcentagem de plântulas normais. Em trabalho desenvolvido por Ghorpade et al. (2010), com embriões zigóticos maduros de *Boswellia serrata* Roxb, não foi observado diferença significativa entre os meios de cultura utilizados em seu estudo, porém, o meio de cultura WPM proporcionou um percentual de 88% de plântulas normais. Já no cultivo *in vitro* de embriões imaturos de *V. vinifera* em estudo realizado por Ebadi et al. (2016), o meio de cultura WPM utilizado como meio de cultura secundário para germinação dos embriões formados durante o resgate, forneceu um percentual de germinação significativamente mais alto que o meio de cultura MS, com 85,1% de germinação e 69,4% de plantas regeneradas. De acordo com Generoso (2018), para a germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros de maracujazeiro-azedo, o uso de metade das concentrações de sais minerais dos meios de cultura MS e MSM se mostraram superiores na germinação de plântulas normais, em comparação aos meios de cultura contendo as concentrações totais.

Tabela 10. Porcentagem e médias das variáveis de vigor: plântulas normais (PN), número de folhas (NF), comprimento da planta (CP) e massa da matéria seca total (MMST) para as diferentes concentrações de sais utilizadas (MS, ½MS, WPM e ½WPM), após 28 dias de cultivo *in vitro* dos embriões zigóticos maduros de diferentes cultivares de videira. Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

Meios de cultura	PN (%)	NF (%)	CP (%)	MMST (g)
MS	12,5 c	1,5 b	4,9 b	0,002 b
½MS	54,1 ab	3,0 a	9,1 a	0,004 ab
WPM	45,8 b	2,3 ab	9,9 a	0,003 ab
½WPM	87,5 a	3,4 a	11,8 a	0,006 a
Média	49,9	2,5	8,9	0,003

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

O desdobramento da interação entre os tipos de cultivares de videira e concentrações de sais minerais para a variável de vigor plântulas anormais (Figura 7), o meio de cultura WPM contendo metade das concentrações de sais minerais e das vitaminas de White ($\frac{1}{2}$ WPM), novamente se mostrou mais eficiente para ambas as cultivares, não havendo diferença estatística entre elas e proporcionando uma menor porcentagem para essa variável que é indesejada em trabalhos que abordam a germinação de sementes e de embriões (Tabela 11).

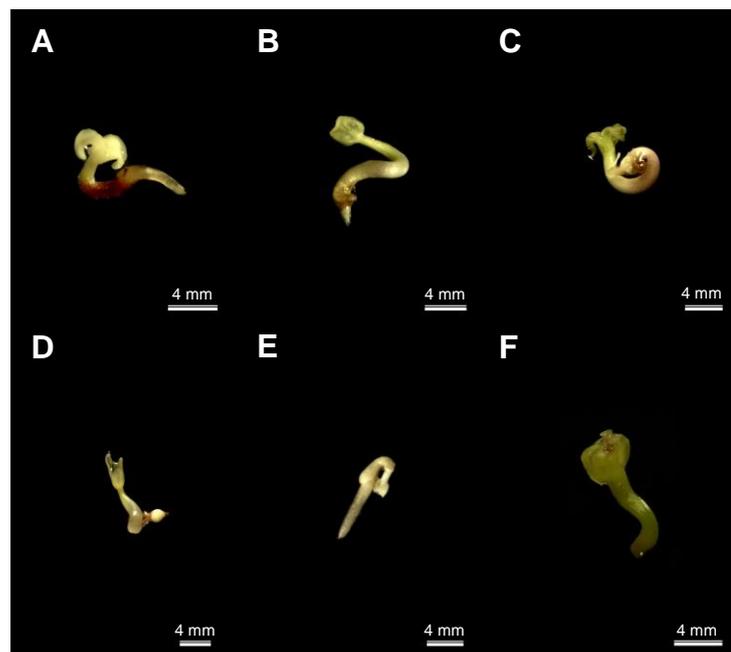


Figura 7. Plântulas anormais aos 28 dias após o cultivo *in vitro*. Cultivar 'Niágara rosada' em A, B e C e cultivar 'Itália' em D, E e F.

Para a variável de vigor comprimento radicular, o meio de cultura $\frac{1}{2}$ WPM apresentou a maior média para a cultivar 'Niágara Rosada', não havendo diferença estatística entre os demais meios de cultura. Já para a cultivar 'Itália', o meio de cultura MS com metade das concentrações de sais minerais e vitaminas de White ($\frac{1}{2}$ MS) apresentou a maior média, porém, não diferiu estatisticamente do meio de cultura $\frac{1}{2}$ WPM. Para essa variável não houve diferença estatística entre ambas as cultivares.

Segundo George et al. (2008), os meios de cultura que contêm altos níveis de sais minerais frequentemente inibem o crescimento radicular, por isso, sempre que o objetivo do estudo for enraizamento, o ideal é utilizar meios de cultura com

concentrações de sais minerais mais reduzidas. Além disso, a salinidade influencia diretamente no controle osmótico do meio de cultura e, em grandes concentrações, os sais minerais podem ocasionar um desequilíbrio osmótico, o que prejudica a absorção de água pelas raízes (Souza et al., 2010).

Tabela 11. Análise de desdobramento das variáveis de vigor: plântulas anormais e comprimento da raiz, em função da interação entre cultivares de videira ('Niágara Rosada' e 'Itália') e concentração de sais (MS, $\frac{1}{2}$ MS, WPM e $\frac{1}{2}$ WPM), após 28 dias de cultivo *in vitro* dos embriões zigóticos maduros. Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

Plântulas anormais (%)					
Cultivares	Meio de cultura				Média
	MS	$\frac{1}{2}$MS	WPM	$\frac{1}{2}$WPM	
Niágara Rosada	79,1 aA	50,0 aAB	29,1 bBC	8,3 aC	41,6 a
Itália	66,6 aA	25,0 bBC	54,1 aAB	8,3 aC	38,5 a
Média	72,9 A	37,5 B	41,6 AB	8,3 C	40,1

Comprimento radicular					
Cultivares	Meio de cultura				Média
	MS	$\frac{1}{2}$MS	WPM	$\frac{1}{2}$WPM	
Niágara Rosada	7,2 aA	12,4 bA	14,5 aA	18,7 aA	13,2 a
Itália	6,7 aB	34,5 aA	10,9 aB	33,0 aA	21,3 a
Média	7,0 B	24,0 A	12,7 AB	25,9 A	17,2

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

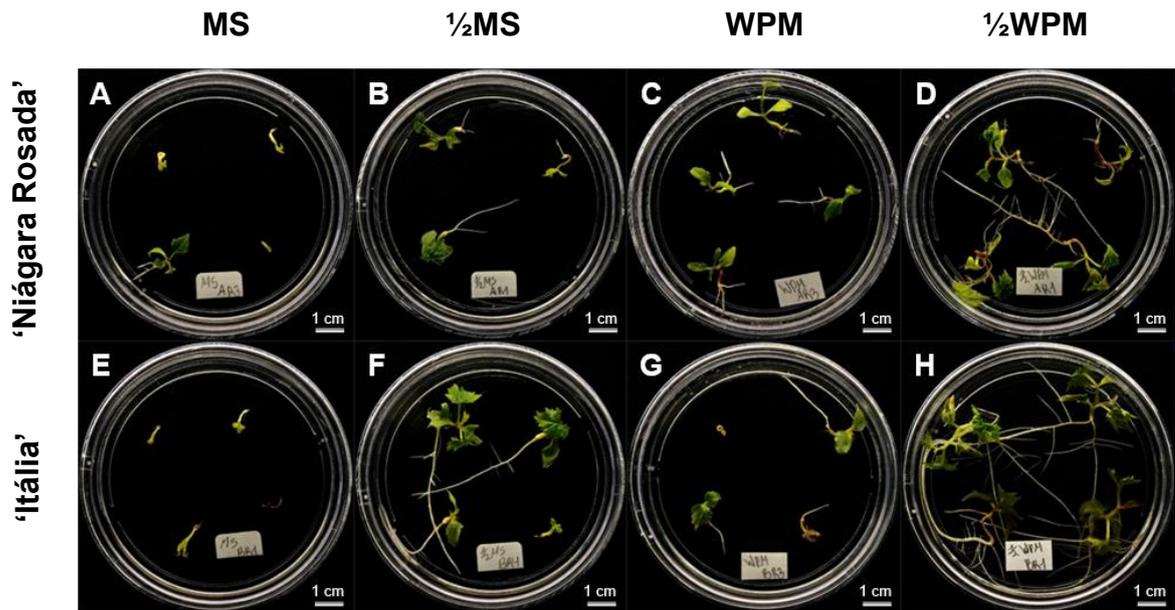


Figura 8. Germinação de embriões zigóticos maduros após 28 dias de cultivo *in vitro*. ‘Niágara Rosada’ em A, B, C e D nas concentrações de sais MS, $\frac{1}{2}$ MS, WPM e $\frac{1}{2}$ WPM respectivamente e ‘Itália’ em E, F, G e H nas concentrações de sais MS, $\frac{1}{2}$ MS, WPM e $\frac{1}{2}$ WPM respectivamente.

A germinação teve início no quarto dia após a inoculação *in vitro* dos embriões zigóticos maduros das cultivares utilizadas. Foi observado alongamento radicular a partir da segunda semana, além disso, também foi notado a expansão das folhas cotiledonares acima do meio de cultura (Figura 9). A partir desse dia, foi visto uma tendência de germinação rápida e de maneira uniforme. Em trabalho desenvolvido por Kingsley et al. (2016), o uso de embriões zigóticos maduros de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) também proporcionou rapidez e uniformidade na germinação de diferentes cultivares.

Segundo Silva (2002), o uso de embriões zigóticos viabiliza a produção de mudas por meio da uniformização e a redução do período de germinação das sementes. Após o sexto dia de cultivo foi observado mais de 50% de germinação em todos os tratamentos. O máximo da germinação ocorreu ao décimo sétimo dia após a inoculação dos embriões com mais de 80% de embriões germinados em todos os tratamentos, os quais, continuam as diferentes concentrações de sais minerais e vitaminas de White dos meios de cultura MS e WPM (Figura 10).

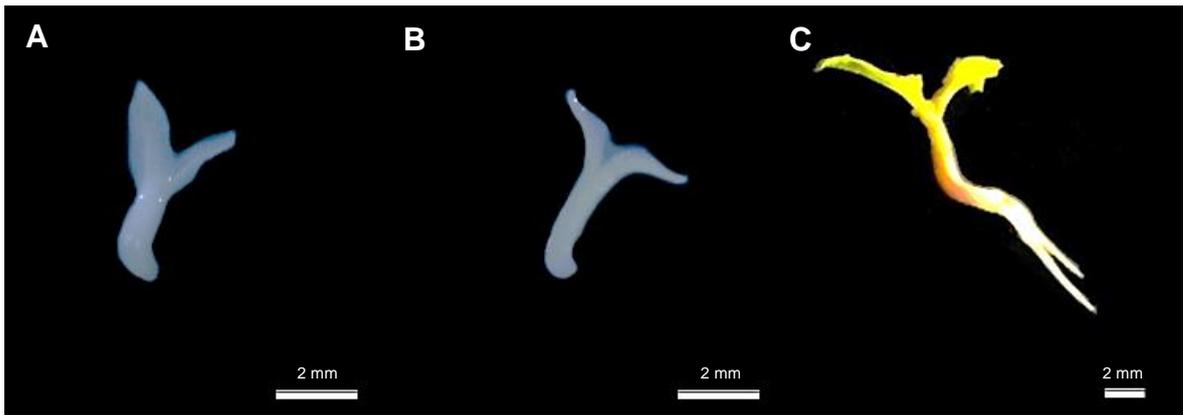


Figura 9. Embriões germinados após o quarto dia de cultivo *in vitro* (A e B) e embrião com sistema radicular alongado e folhas cotiledonares expandidas na segunda semana de cultivo *in vitro* (C).

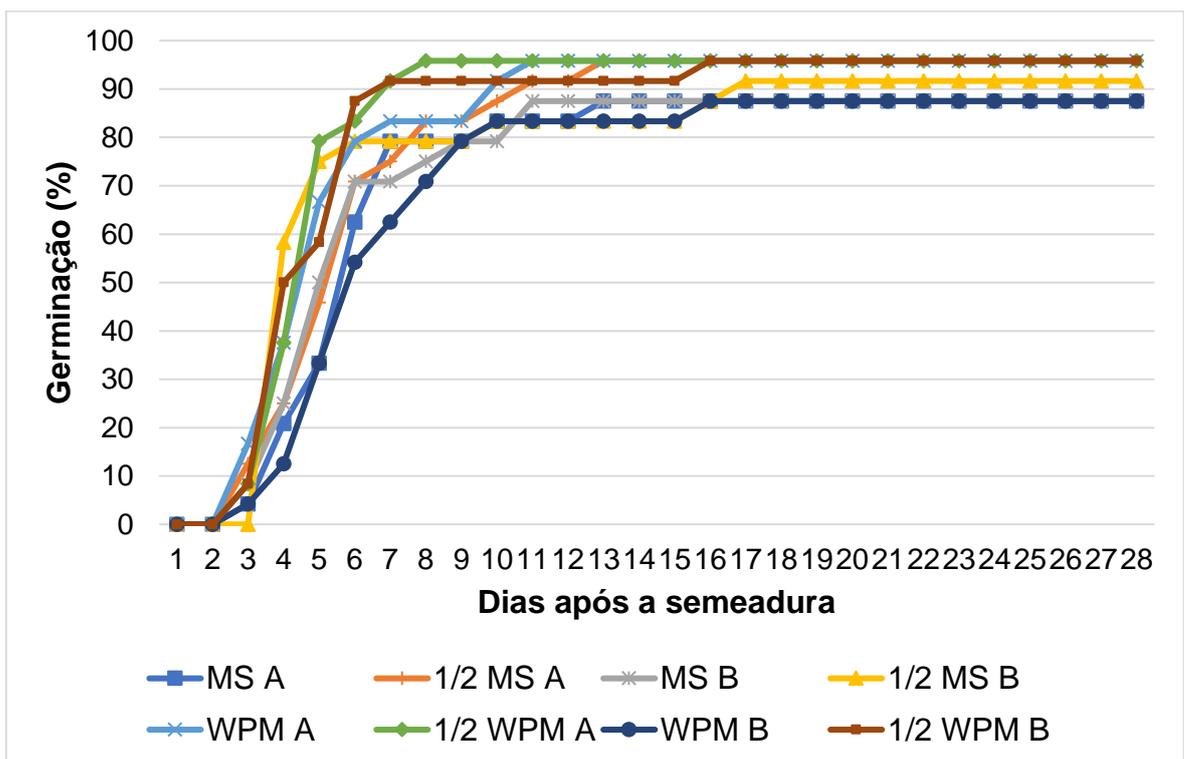


Figura 10. Germinação acumulada após 28 dias de cultivo *in vitro* dos embriões zigóticos maduros. Cultivar 'Niágara Rosada' (MS A, 1/2MS A, WPM A e 1/2WPM A) e Cultivar 'Itália' (MS B, 1/2MS B, WPM B e 1/2WPM B).

A dormência presente em sementes de muitas espécies vegetais se deve aos inibidores químicos ou à resistência mecânica presente nas estruturas que

recobrem o embrião e não a uma dormência do embrião, portanto, a cultura de embrião pode superar este tipo de dormência (Carvalho e Araújo, 2007). No presente estudo, essa afirmação se concretiza, tendo em vista que as sementes de videiras apresentam dormência tanto devido a presença de inibidores no interior da semente, como também, em razão da presença de um tegumento muito rígido que impede a entrada de água. Ambos os fatores naturalmente dificultam a germinação, o que não foi notado quando realizado o cultivo *in vitro* dos embriões zigóticos maduros isolados em um meio de cultura adequado, que atendia as suas exigências nutricionais. Além disso, foi possível observar que não houve efeito genotípico em resposta à porcentagem de plântulas normais entre as duas cultivares utilizadas, sendo o mesmo meio de cultura e concentrações de sais minerais adequado para ambas.

Pode-se atribuir o sucesso da germinação dos embriões e a conversão desses em uma alta porcentagem de plântulas normais, após 28 dias de cultivo *in vitro*, ao seu elevado estágio embrionário, tendo em vista que esse é um estudo com embriões zigóticos maduros. Segundo Raghavan (1980), o uso de sementes fisiologicamente maduras requer apenas a presença de sais inorgânicos e uma fonte de carbono no meio de cultura para germinação e desenvolvimento dos embriões, devido à presença de um eixo bipolar desenvolvido permitindo que esses embriões passem rapidamente para um estado autotrófico de seu desenvolvimento.

De modo geral, após 28 dias de cultivo *in vitro* dos embriões zigóticos maduros das cultivares de videira 'Niágara Rosada' e 'Itália', foi observado que para todas as análises de vigor houve uma tendência a valores mais significativos quando utilizados os meios de cultura MS e WPM contendo metade das concentrações de sais minerais e das vitaminas de White ($\frac{1}{2}$ MS e $\frac{1}{2}$ WPM), sendo o meio $\frac{1}{2}$ WPM o mais indicado para as cultivares 'Niágara Rosada' e 'Itália', em que essa concentração foi responsável pelas maiores médias obtidas. Em trabalho desenvolvido por Kingsley et al. (2016), a diferença nas respostas *in vitro* de diferentes cultivares de dendezeiro aos diferentes meios de cultura, variam de acordo com a força do meio e com a sua composição.

Sendo assim, é importante determinar a melhor concentração de sais minerais no meio de cultura para a germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros de videira, garantindo, assim, alta porcentagem de germinação,

uniformidade e desenvolvimento vigoroso das plântulas. Esse é um fator importantíssimo para o estabelecimento *in vitro* dos embriões zigóticos maduros diante das suas exigências nutricionais, as quais, são fornecidas pelos sais minerais presentes no meio de cultura.

Para a porcentagem de germinação acumulada, foi observado um avanço dos resultados obtidos ao longo de todos os experimentos realizados. O teste de germinação recomendado pela RAS se apresentou ineficiente, pois, além de demorado, resultou em uma baixa porcentagem de germinação após aproximadamente 120 dias de teste, diferente dos demais experimentos *in vitro*. O segundo experimento de superação da dormência mecânica realizado com sementes recém retiradas dos frutos frescos, proporcionou a germinação em todos os tratamentos após 54 dias de experimento. Foi possível observar que as condições controladas do cultivo *in vitro*, somadas ao corte nas sementes, foram suficientes para proporcionar a germinação das sementes de todas as cultivares utilizadas em todos os tratamentos (Figura 6) superando os resultados obtidos pelo teste de germinação recomendado pela RAS. Já para o último experimento, no qual foram utilizados embriões zigóticos maduros isolados de sementes retiradas de frutos frescos, as condições de cultivo *in vitro* e a ausência das estruturas externas que recobrem o embrião, mais a disponibilidade de nutrientes em quantidades essenciais para o embrião no meio de cultura, foram suficientes para proporcionar uma alta porcentagem de germinação, de maneira rápida, uniforme e resultando em aproximadamente 90% de germinação ao final de 28 dias, superando os resultados obtidos nos demais experimentos (Figura 11). Em trabalho desenvolvido por Kingsley et al. (2016) com embriões zigóticos maduros de diversas cultivares de *Elaeis guineensis* Jacq., foram obtidas plântulas ao final de 20 dias de cultivo *in vitro* com uma alta porcentagem de germinação e plântulas normais, nesse estudo, também foi enfatizado que, se fossem seguidos os métodos convencionais de superação da dormência para as cultivares utilizadas, seria necessário um período entre 105 e 120 dias. No presente estudo também foi obtido uniformidade e rapidez na germinação dos embriões zigóticos maduros de videira.

Foi observado que para a obtenção final de plântulas, o primeiro experimento seguindo as recomendações descritas pela RAS, necessitou de um período de 90 dias de estratificação das sementes e mais 28 dias de germinação, resultando em aproximadamente 120 dias. Para o segundo experimento, o tempo gasto foi de 54

dias, já o terceiro e mais eficiente, foram necessários apenas 28 dias até a obtenção final das plântulas. Vale ressaltar que para os dois últimos experimentos, não foi realizado a estratificação das sementes durante o período de 90 dias (Figura 11).

Levando em consideração os resultados apresentados, fica evidente que o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos maduros isolados, das cultivares de videira 'Niágara Rosada' e 'Itália', é mais eficiente que os demais métodos utilizados nesse trabalho, proporcionando a obtenção de uma alta porcentagem de germinação com um alto índice de plântulas normais em um curto período de tempo.

Esse é o primeiro relato na literatura que se preocupou em investigar a germinação de sementes maduras de cultivares de videiras a partir da técnica de cultivo *in vitro* de embriões zigóticos maduros isolados. Tendo em vista que a videira é uma cultura milenar e que cada vez mais vêm ganhando espaço no mercado, ressalta-se a grande necessidade de sucesso na germinação de sementes quando essas são provenientes de cruzamentos controlados realizados pelos programas de melhoramento genético para a produção de novas cultivares que sejam resistentes a fatores bióticos e abiótico. Além disso, o sucesso da metodologia desenvolvida neste trabalho para a excisão de embriões zigóticos maduros proporcionará o avanço de novas pesquisas voltadas para a superação da dormência de sementes.

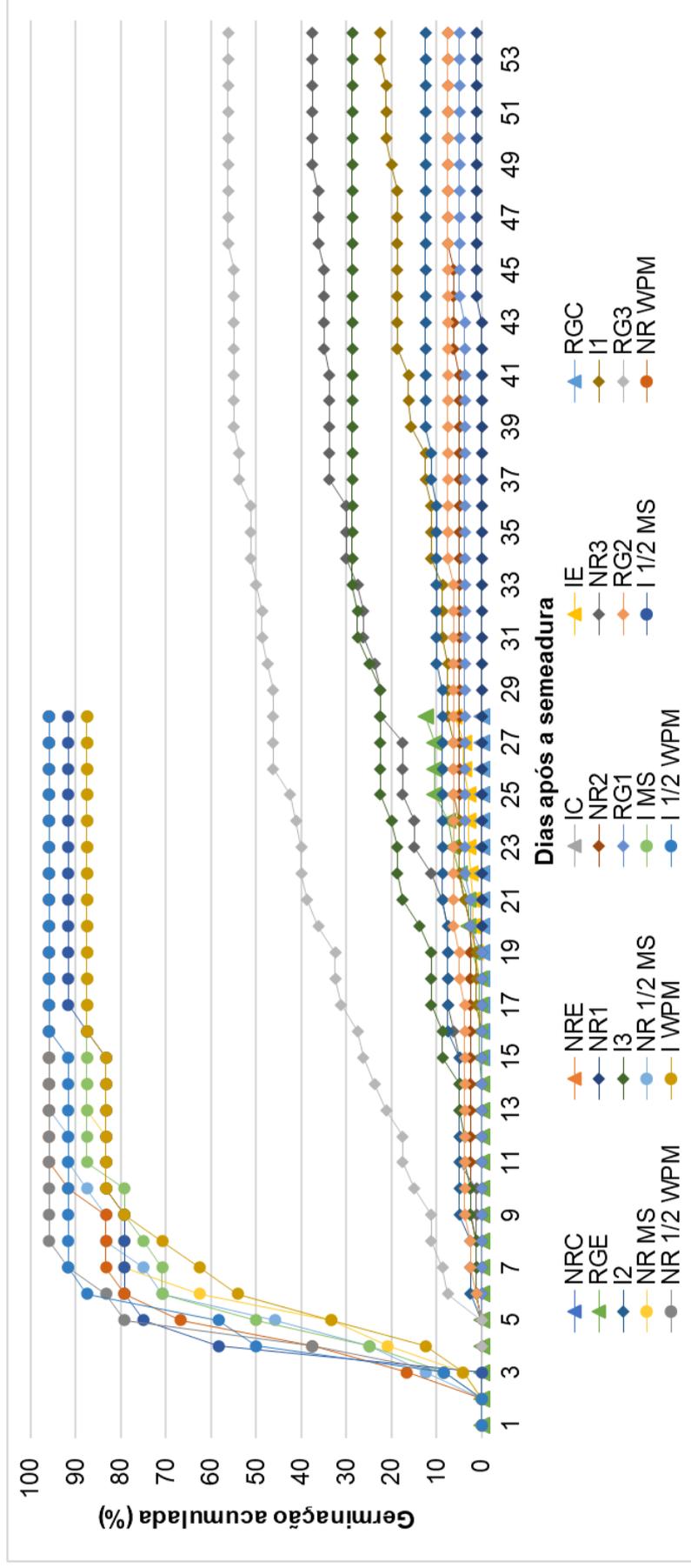


Figura 11. Sobreposição dos dados para a porcentagem de germinação acumulada de todos os experimentos. Germinação acumulada após 28 dias em BOD das cultivares 'Niágara Rosada' em NRC (Tratamento controle) e NRE (Estratificada); cultivar 'Itália' em IC (Tratamento controle) e IE (Estratificada) e cultivar 'Red Globe' em RGC (Tratamento controle) e RGE (Estratificada). Germinação acumulada após 54 dias de cultivo *in vitro* das cultivares 'Niágara Rosada' em NR1 (Sementes intactas), NR2 (Sementes com corte na região da micrópila) e NR3 (Semente com corte transversal); cultivar 'Itália' em I1 (Sementes intactas), I2 (Sementes com corte na região da micrópila) e I3 (Semente com corte transversal) e cultivar 'Red Globe' em RG1 (Sementes intactas), RG2 (Sementes com corte na região da micrópila) e RG3 (Semente com corte transversal). Germinação acumulada após 28 dias de cultivo *in vitro* dos embriões zigóticos maduros das cultivares 'Niágara Rosada' (NR MS, NR 1/2MS, NR WPM e NR 1/2WPM) e Cultivar 'Itália' (I MS, I 1/2MS, I WPM e I 1/2WPM).

6. RESUMO E CONCLUSÕES

A estratificação das sementes das cultivares de videira 'Niágara Rosada', 'Itália' e 'Red Globe' em baixas temperaturas ao longo de 90 dias não foi eficiente para superar a dormência e promover a germinação das sementes.

Foi possível obter um aumento na germinação das sementes das cultivares de videira 'Niágara Rosada', 'Itália' e 'Red Globe' por meio do cultivo *in vitro* e da superação da dormência mecânica, sendo a utilização do corte transversal nas sementes o mais recomendado para as três cultivares utilizadas.

O meio de cultura WPM contendo metade das concentrações de sais minerais e vitaminas de White ($\frac{1}{2}$ WPM), é o mais indicado para a germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros das cultivares de videiras 'Niágara Rosada' e 'Itália'. Porém, estudos adicionais são necessários para elucidar o papel dos componentes específicos presentes no meio de cultura, bem como o crescimento e desenvolvimento das plântulas obtidas durante a aclimatização até as condições de campo.

Dessa forma, pode-se concluir a partir dos resultados obtidos nesse trabalho, que o método mais eficiente para a germinação de sementes de videira é a partir do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos maduros isolados, tendo em vista os resultados obtidos nas cultivares pertencentes a espécies distintas. Além disso, foram alcançados resultados mais satisfatórios que os métodos convencionais recomendados pela RAS, em que foi observado uma grande redução do período de germinação até a obtenção de uma alta porcentagem de plântulas normais, com alto vigor e uniformes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aazami, M. A., Bagher, M. H. (2010). *In vitro* micro-grafting of some Iranian grapevine cultivars. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(5): 5577.
- Acanda, Y., Prado, M. J., González, M. V., Rey, M. (2013). Somatic embryogenesis from stamen filaments in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Mencía): changes in ploidy level and nuclear DNA content. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 49(3): 276-284.
- Alleweldt, G., Spiegel-Roy, P., Reisch, B. (1991). Grapes (*Vitis*). *Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops*, 290(7): 291-330.
- Almeida, A. N., Bragagnolo, C., Chagas, A. L. S. (2015). A Demanda por Vinho no Brasil: elasticidades no consumo das famílias e determinantes da importação. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, 53(3): 433-454.
- Alvarenga, A. A., Abrahão, E., Regina, M. A., Antunes, L. E. C., Pereira, A. F. (1998). Origem e classificação botânica da videira. *Informe Agropecuário*, 19(194): 5-8.
- Ayub, R. A., Spinardi, B., Basso, M. F., Biasi, L. A. (2010). Induction of multibrotacion *in vitro* in videira cv. Bordô. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32(3): 675-681.

- Baránek, M., Křížan, B., Ondrušíková, E., Pidra, M. (2010). DNA-methylation changes in grapevine somaclones following *in vitro* culture and thermotherapy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 101(1): 11-22.
- Barreto, M. S., Nookaraju, A., Harini, N. V. M., Agrawal, D. C. (2006). A one step *in vitro* cloning procedure for Red Globe grape: The influence of basal media and plant growth regulators. *Journal of Applied Horticulture*, 8(2): 138-142.
- Bi, W. L., Pan, C., Hao, X. Y., Cui, Z. H., Kher, M. M., Marković, Z., Silva, J. A. T. (2017). Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) a review. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 53(5): 449-460.
- Bolonio, D., García-Martínez, M. J., Ortega, M. F., Lapuerta, M., Rodríguez-Fernández, J., Canoira, L. (2019). Fatty acid ethyl esters (FAEEs) obtained from grapeseed oil: A fully renewable biofuel. *Renewable Energy*, 132(8): 278-283.
- Borghazan, M., Moraes, L. K. A., Moreira, F. M., Silva, A. L. (2003). Propagação *in vitro* e avaliação de parâmetros morfofisiológicos de porta-enxertos de videira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(7): 783-789.
- Botton, M., Ringenberg, R., Zanardi, O. Z. (2004). Chemical control of grape phylloxera *Daktulosphaira vitifoliae* (Fitch, 1856) leaf form (Hemiptera&58; Phylloxeridae) on vineyards. *Ciência Rural*, 34(5): 1327-1331.
- Braga, F. T., Nunes, C. F., Favero, A. C., Pasqual, M., Carvalho, J. G., Castro, E. M. (2009). Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 44(2): 128-132.
- Brasil. (2009). Regras para análise de sementes/ Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária- Brasília: Mapa/ACS, 395p.
- Braun, H., Lopes, J. C., Souza, L. T., Schmildt, E. R., Cavatte, R. P. Q., Cavatte, P. C. (2010). Germinação *in vitro* de sementes de beterraba tratadas com ácido giberélico em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. *Semina Ciências Agrárias*, 31(3).

- Bridgen, M. P. (1994). A review of plant embryo culture. *HortScience* 29: 1243–1246.
- Camargo, U, A., Tonietto, J., Hoffmann, A. (2011) Progressos na viticultura brasileira. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Volume Especial: 144-149.
- Camargo, U. A., Ritschel, P. S. (2008). New table and wine grape cultivars: world scenario with emphasis on Brazil. *Acta Horticulturae, The Hague*, 785: 89-95.
- Carra, A., Sajeva, M., Abbate, L., Siragusa, M., Pathirana, R., Carimi, F. (2016). Factors affecting somatic embryogenesis in eight Italian grapevine cultivars and the genetic stability of embryo-derived regenerants as assessed by molecular markers. *Scientia Horticulturae*, 204: 123-127.
- Carvalho, A. C. P. P., Torres, A. C., Braga, E. J. B., Lemos, E. E. P., Souza, F. V. D., Peters, J. A., Câmara, T. R. (2011). Glossário de cultura de tecidos de plantas. *Plant Cell Culture and Micropropagation*. 7(1): 30-60.
- Carvalho, D. C. D., Silva, A. L. L. D., Tanno, G. N., Purcino, M., Biasi, L. A. (2011). Organogenesis from leaf segments and internodes of grapevine cv. Merlot. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(1): 108-114.
- Carvalho, J. M. C., Araújo, S. S. (2007). Embriogênese somática. Embrapa algodão, Campina Grande-PB, 1: 1-35.
- Carvalho, N. M., Nakagawa, J. (2000). Sementes: ciência, tecnologia e produção. Jaboticabal, Funep, 4: 588p.
- Chang, G. R., Chen, P. L., Hou, P. H., Mao, F.C. (2015). Resveratrol protects against diet-induced atherosclerosis by reducing low-density lipoprotein cholesterol and inhibiting inflammation in apolipoprotein E-deficient mice. *Iranian journal of basic medical sciences*. 18(11): 1063.
- Chemat, F., Li, Y., Tomao, V., Ginies, C., Cravotto, G. (2014). Optimization of procedures for in-line extraction of lipids and polyphenols from grape seeds. *Food Analytical Methods*, 7(2): 459-464.

- CONAB. (2018). Companhia Nacional de Abastecimento. Análise mensal - Uva industrial. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/>. Acesso em: 05 de dezembro 2018.
- CONAB. (2019). Companhia Nacional de Abastecimento. Análise mensal - Uva industrial. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/>. Acesso em: 05 de março 2020.
- Conner, Patrick J. (2008). Effects of stratification, germination temperature, and pretreatment with gibberellic acid and hydrogen peroxide on germination of 'Fry' muscadine (*Vitis rotundifolia*) seed. *HortScience*, 43(3): 853-856.
- Conner, Patrick J., Maclean, Dan. (2013). Fruit anthocyanin profile and berry color of muscadine grape cultivars and Muscadinia germplasm. *HortScience*, 48(10): 1235-1240.
- Coombe, B. G., Mccarthy, M. G. (2000). Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(2): 131-135.
- Cordazzo, C. V., Hackbart, V. C. D. S. (2009). Efeitos da temperatura, lixiviação, KNO₃, GA₃ e escarificação sobre a germinação das sementes de *Hydrocotyle bonariensis* lam. *Atlântica*, 31(1): 79-84.
- Daane, K. M., Vincent, C., Isaacs, R., Ioriatti, C. (2018). Entomological opportunities and challenges for sustainable viticulture in a global market. *Annual Review of Entomology*, 63: 193-214.
- Dai, L., Zhou, Q., Li, R., Du, Y., He, J., Wang, D., Wang, Y. (2015). Establishment of a picloram-induced somatic embryogenesis system in *Vitis vinifera* cv. chardonnay and genetic transformation of a stilbene synthase gene from wild-growing *Vitis* species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 121(2): 397-412.
- Dhekney, S. A., Sessions, S. K., Brungart-Rosenberg, M., Claflin, C., Li, Z. T., Gray, D. J. (2019). Genetic Modification of Grapevine Embryogenic Cultures. *Transgenic Plants*, 1: 191-201.

- Dieterich, K. (1924). Über Kultur von embryonen ausserhalb dês samens. *Flora*, 117: 379-417.
- Ebadi, A., Aalifar, M., Farajpour, M., Fatahi, M. M. R. (2016). Investigating the most effective factors in the embryo rescue technique for use with 'Flame Seedless' grapevine (*Vitis vinifera*). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 91(5): 441-447.
- Ebert, A., Contini, A. Z., Brondani, G. E., Costa, R. B. (2014). Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *Mauritia flexuosa* sob diferentes temperaturas. *Advances in Forestry Science*, 1(1): 39-43.
- Ellis, R. H., Hong, T. D., Roberts, E. H. (1983). A note on the development of a practical procedure for promoting the germination of dormant seed of grape (*Vitis* spp.). *Vitis*, 22: 211-219.
- Emershad, R. L., Ramming, D. W., (1994). Somatic embryogenesis and plant development from immature zygotic embryos of seedless grapes (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Report*, 14: 6-12.
- Ergenoglu, F., Tangolar, S., Gök, S. (1997). The effects of some pretreatments for promoting germination of grape seeds. *Acta Horticulturae*, 44: 207-212.
- FAO., OIV. (2016). In FAO, (ed.), Non-alcoholic products of the vitivinicultural sector intended for human consumption. Focus 2016 Table and dried grapes. Disponível em: <http://www.oiv.int/js/lib/pdfjs/web/viewer.html?file=/public/medias/5268/fao-oiv-focus-2016.pdf>. Acesso em: 10 set 2018.
- Fengqin, Z., Fangmei, L., Dabin, G. (1990). Studies on germplasm resources of wild grape species (*Vitis* spp.) in China. *Vitis*, 1: 50-57.
- Ferreira, A. G., Hu, C.Y. (1998). Cultura de Embriões. In: Torres, A. C., Caldas, L. S., Buso, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa - SPI/Embrapa - CNPH, 371-393 p.
- Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 5(6): 1039-1042.

- Ferreira, M. E., Caldas, L. S., Resende, R. O. (2002). Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: Torres, A. C., Caldas, L. S., Buso, J. A. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: Embrapa, 1: 21-43.
- Galet, P. (1998). Grape varieties and rootstocks varieties. Paris: *Oenoplurimédia*, 315 p.
- Garrido, L. D. R., Angelotti, F. (2011). Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as doenças da videira no Brasil. Embrapa Semiárido-Capítulo em livro científico (ALICE).
- Generoso, A. L. (2018). Conservação e cultivo *in vitro* de embriões de maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims). Tese. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes. 184 p.
- Generoso, A. L., Viana, A. P., Carvalho, V. S., Júnior, C. (2019). *In vitro* germination to overcome dormancy in seeds of 'Red Globe', 'Italia' and 'Niagara Rosada' grapes. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 41 (5): 1-6.
- George, E. F., Hall, M. A., Klerk, G. J. (2008). The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects and support systems. In: George, E. F. et al. *Plant propagation by tissue culture*. *Netherland: Springer*, 1(3): 501p.
- Gerrath, J. M., Wilson, T., Posluszny, U. (2004). Morphological and anatomical development in the Vitaceae. VII. Floral development in *Rhoicissus digitata* with respect to other genera in the family. *Canadian Journal of Botany*, 82(2): 198-206.
- Ghorpade, R. P., Chopra, A., Nikam, T. D. (2010). *In vitro* zygotic embryo germination and propagation of an endangered *Boswellia serrata* Roxb., a source of boswellic acid. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 16(2): 159-165.
- Giovannini, E. (2008). Produção de uvas para vinho, suco e mesa. Porto Alegre: *Renascença*, 364p.

- Grattapaglia, D., Machado, M. A. (1998). Micropropagação. In: Torres, A. C., Caldas, L. S., Buso, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Embrapa, São Paulo-SP, 1: 184-250.
- Grattapaglia, D., Machado, M. A. (1998). Micropropagação. In: Torres, A. C., Calda, L. S., Buso, J. A. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Embrapa, Brasília-DF, 1: 183-260.
- Hannig, E. (1904). Zur physiologie pflanzlicher embryonen Ueber die cultur von cruciferen embryonen ausserhalb des embryosack. *Botanische Zeitung*, 62: 45-80.
- IBGE. (2018). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Banco de dados agregados: produção agrícola municipal. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=106&z=p&o=28>. Acesso em: 09 dez 2019.
- Inácio, M. C., Bertoni, B. W., Castro França, S., Pereira, A. M. S. (2010). Germinação de sementes *in vitro* e desenvolvimento de plantas *ex vitro* de algodãozinho-do-campo. *Ciência Rural*, 40(11): 2294-2300.
- Kennedy, J. (2002). Understanding grape berry development. *Practical Winery and Vineyard*, 4: 1-5.
- Kingsley, T, M., Brice, L. B. T., Godswill, N. N., Mir, B. A., Frank, E, G. N., Dieudonné, N., Celestine, N., Namuene, K. S., Emmanuel, Y. (2016). Mature zygotic embryo rescue improves *in vitro* germination and seedling production in high value oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) cultivars. *Industrial Crops and Products*, 94: 445-453.
- Li, G. R., Ji, W., Wang, G., Zhang, J. X., Wang, Y. J. (2013). An improved embryo-rescue protocol for hybrid progeny from seedless *Vitis vinifera* grapes x wild Chinese *Vitis* species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 50(1): 110-120.

- Li, S., Li, Z., Zhao, Y., Zhao, J., Luo, Q., Wang, Y. (2020). New disease-resistant, seedless grapes are developed using embryo rescue and molecular markers. *3 Biotech*, 10(1): 4.
- Li, T., Li, Z., Yin, X., Guo, Y., Wang, Y., Xu, Y. (2018). Improved *in vitro* *Vitis vinifera* L. embryo development of F1 progeny of 'Delight' × 'Ruby seedless' using putrescine and marker-assisted selection. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 54(3): 291-301.
- Li, Z., Li, T., Wang, Y., Xu, Y. (2015). Breeding new seedless grapes using in ovulo embryo rescue and marker-assisted selection. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 51(3): 241-248.
- Lloyd, G., McCow, B. (1981). Commercially feasible micropropagation of montaim laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Combinet Proceedings International Plant Propagators Society*, 30: 421-427.
- Maeda, J. A., Pereira, M. F. D. A., Terra, M. M. (1985). Condições de armazenamento na viabilidade e dormência de sementes de videira. *Bragantia*, 44(1): 245-254.
- Maguire, J. D. (1962). Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2(2): 176-177.
- Maillot, P., Deglène-Benbrahim, L., Walter, B. (2016). Efficient somatic embryogenesis from meristematic explants in grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Chardonnay: an improved protocol. *Trees*, 30(4): 1377-1387.
- Marcos Filho, J. (2005). Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: Fealq, 488p.
- Matsumoto T, Sakai A. (2003). Cryopreservation of axillary shoot tips of *in vitro* grown grape (*Vitis*) by a two-step vitrification protocol. *Euphytica*, 131(3): 299–304.
- McGovern, P. E., Glusker, D. L., Exner, L. J., Voigt, M. M. (1996). Neolithic resinated wine. *Nature*, 381(6582): 480-481.

- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473-497.
- Nachtigal, J. C., Mazzarolo, A. (2008). Uva: o produtor pergunta, a Embrapa responde. *Área de Informação da Sede-Col Criar Plantar ABC 500P/500R Saber (INFOTECA-E)*.
- Nali, L., Almeida, W. A. B. (2008). Organogênese *in vitro* de videira. *Magistra*, 20(2): 134-139.
- Narduzzi, L., Stanstrup, J., Mattivi, F. (2015). Comparing wild American grapes with *Vitis vinifera*: a metabolomics study of grape composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(30): 6823-6834.
- Naue, C. R., Barbosa, M. A. G., Batista, D. D. C., Souza, E. B. D., Mariano, R. D. L. R. (2014). Effect of treatment of 'Red Globe' vine cuttings on the control of bacterial canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *Viticola*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(4): 853-861.
- Nitsch, J. P., Nitsch, C. (1969). Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163: 85-87.
- Oliveira, L. D. S., Moura, M. S. B., Leão, P. C. S., Silva, T. G. F., Souza, L. S. B. (2017). Características agronômicas e sensibilidade ao rachamento de bagas de uvas sem sementes. *Journal of Environmental Analysis and Progress*, 2(3): 274-282.
- Phillips, G. C., Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 55(3): 242-257.
- Pinhal, H. F., Anastácio, M. R., Carneiro, P. A. P., Silva, V. J., Morais, T. P., Luz, J. M. Q. (2011). Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. *Ciência Rural*, 41(7): 1136-1142.
- Pommer, C. V., Maeda, J. A., Ribeiro, I. J. A. (1988). Capacidade de germinação e quebra de dormência em sementes de cultivares de videira. *Bragantia*, 47(2): 143-157.

- Pommer, C. V., Maeda, J. A., Ribeiro, I. J. A. (1988). Capacidade de germinação e quebra de dormência em sementes de cultivares de videira. *Bragantia*, 47(2): 143-157.
- Puerari H. H, Dias-Arieira, C.R., Moura, M. F., Biela, F., Chiamolera, F.M., Cunha, T. P. L. (2012). Reaction of grapevine rootstocks to *Pratylenchus brachyurus* and *Pratylenchus zaeae*. *Tropical Plant Pathology*, 37: 220-222.
- Raghavan, V. (1980). Embryo culture. In: Bohm, H. (Eds.). International Review of Cytology. *Colombus: Academic Press*, (11): 209-239.
- Rajasekaran, K.; Vine, J. Mullins, M.G. (1982). Dormancy in somatic embryos and seeds of *Vitis*: changes in endogenous abscisic acid during embryogeny and germination. *Planta*, 154:139-144.
- Rappaport, J. (1954). *In vitro* cultures of plant embryos and factors controlling their growth. *Botanical Review*, 20: 201-225.
- Reisch, I. B., Pratt, C. (1996). Grapes. In: Janickes, J., Moore, J. N. *Fruit breeding*. (2): 297-369.
- Ritschel, P., Maia, J. D. G., Camargo, U. A., Zanus, M. C., Souza, R. T. D., Fajardo, T. V. M. (2014). 'BRS MAGNA'-a novel grape cultivar for juice making, with wide climatic adaptation. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 14(4): 266-269.
- Rosa, F. C., Reiniger, L. R. S., Golle, D. P., Muniz, M. F. B., Curti, A. R. (2012). Superação da dormência e germinação *in vitro* de sementes de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth). *Semina: Ciências Agrárias*, 33(3): 1021-1026.
- San P, T., Gammoudi, N., Peiró, R., Olmos, A., Gisbert, C. (2017). Somatic embryogenesis from seeds in a broad range of *Vitis vinifera* L. varieties: rescue of true-to-type virus-free plants. *BMC Plant biology*, 17(1): 226.
- Sato, G. S. (2000). Panorama da viticultura no Brasil. *Informações Econômicas*, 30(11): 53-61.

- Schuck, M. R., Biasi, L. A., Mariano, A. M., Lipski, B., Riaz, S., Walker, M. A. (2011). Obtaining interspecific hybrids, and molecular analysis by microsatellite markers in grapevine. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46(11): 1480-1488.
- Silva, A. L., Doazan, J. P. (1995). Une méthode d'irradiation aux rayons gamma appliquée à des portegreffes de vigne *in vitro*. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 29(1): 1-9.
- Silva, R. D. C., Luis, Z. G., Scherwinski-Pereira, J. E. (2012). Short-term storage *in vitro* and large-scale propagation of grapevine genotypes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47(3): 344-350.
- Silva, V. S. (2002). Regeneração *in vitro* de embriões de *Cocos nucifera* L.. Dissertação. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 78 p.
- Souza, Y. A., Pereira, A. L., Silva, F. F. S., Reis, R. C. R., Evangelista, M. R. V., Castro, R. D., Dantas, B. F. (2010). Efeito da salinidade na germinação de sementes e no crescimento inicial de mudas de pinhão-manso. *Revista Brasileira de Sementes*, 32(2): 083-092.
- Sridhar, K., Charles, A. L. (2019). *In vitro* antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH and ABTS assays: Estimation methods for EC50 using advanced statistical programs. *Food Chemistry*, 275: 41-49.
- Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I. max., Murphy, A. (2017). Fisiologia e desenvolvimento vegetal. *Artmed* (6th ed.).
- Tang, D., Wang, Y., Cai, J., Zhao, R. (2009). Effects of exogenous application of plant growth regulators on the development of ovule and subsequent embryo rescue of stenospermic grape (*Vitis vinifera* L.). *Scientia Horticulturae*, 120 (1): 51-57.
- Tian, L., Wang, Y., Niu, L., Tang, D. (2008). Breeding of disease-resistant seedless grapes using Chinese wild *Vitis* spp. I. *In vitro* embryo rescue and plant development. *Scientia Horticulturae*, 117(2): 136-141.

- Tonietto, J., Carbonneau, A. (2004). A multicriteria climatic classification system for grape-growing regions worldwide. *Agricultural and Forest Meteorology*, 124(1-2): 81-97.
- Torres, A. C., Barbosa, N. V. R., Willadino, L., Guerra, M. P., Ferreira, C. F., Paiva, S. A. V. (2001). Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas: formulações de meios de cultura de tecidos de plantas. Brasília: Embrapa Hortaliças, Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, 24.19 p.
- Val, A. D. B, Alvarenga E. M., Cecon, P. R. (2010). Quebra de dormência de sementes da videira cv. Niágara Rosada sem estratificação. *Revista Ceres*, 57(2): 234–238.
- Vidal, J. R., Rama, J., Taboada, L., Martin, C., Ibanez, M., Segura, A., González-Benito, M. E. (2009). Improved somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) with focus on induction parameters and efficient plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96(1): 85-94.
- Walter, R., Carvalho, V. S., Generoso, A. L., Rodrigues, R., Gravina, G. D. A. (2018). Cultivation of immature *Capsicum* spp. embryos for incompatible-crossing embryo rescue. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 40(39474): 1-8.
- Wightman, J. D., Roschelle A. H. (2015). Effect of grape and other berries on cardiovascular health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(8): 1584-1597.
- Yang, X. M., Cao, Z. Y., An, L. Z., Wang, Y. M., Fang, X. W. (2006). *In vitro* tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Euphytica*, 152(2): 152-217.
- Zarek, M. (2007). A practical method for overcoming the dormancy of *Taxus baccata* isolated embryos under *in vitro* conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43(6): 623-630.