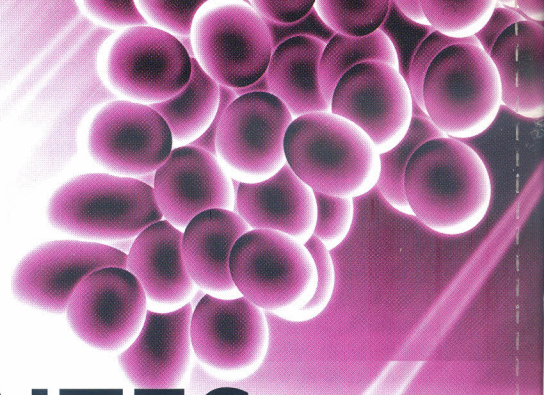


UVAS SEM SEMENTES



Uso da biotecnologia na busca de novas cultivares apirênicas ¹

Umberto Almeida Camargo

Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Uva e Vinho

Adriane Leite do Amaral

Eng.-Agr., M.Sc., Bolsista do CNPq/
BIOEX.

Paulo Ricardo Dias de Oliveira

Eng.-Agr., Dr., Embrapa Uva e Vinho,
Caixa Postal 130, CEP 95700-000
Bento Gonçalves, RS

Fotos cedidas pelos autores

1 . O CARÁTER APIRENIA NA UVA E O MELHORAMENTO GENÉTICO

O mercado de uvas in natura apresenta tendência de aumento do consumo de uvas sem sementes, substituindo as tradicionais uvas com sementes. Nos Estados Unidos as uvas apirênicas já dominaram o mercado e na Europa é crescente a demanda por uvas sem sementes. Certamente em outros mercados, como o brasileiro, os consumidores estão susceptíveis a mudanças de hábito de consumo, dando preferência às uvas apirênicas, consideradas de melhor qualidade.

Consonante com as demandas do mercado, atualmente a criação de cultivares de uvas de mesa sem sementes é uma das grandes prioridades dos programas de melhoramento da videira em todo o mundo.

Existem dois sistemas com determinação genética para apirenia, a partenocarpia e a estenoespermocarpia. A partenocarpia se caracteriza pela ausência total de sementes. Neste caso não ocorre fecundação. O fruto é desenvolvido exclusivamente a partir de tecidos maternos. Na estenoespermocarpia ocorre a fecundação para a formação do fruto, seguida de aborto do embrião ainda imaturo devido à ausên-

cia ou má formação do endosperma. Desse processo, originam-se frutos maduros com sementes-traço pouco desenvolvidas e macias, imperceptíveis ao consumidor (STOUT, 1936). Na maioria dos casos, o aborto do embrião ocorre depois de 8 semanas da fecundação (EMERSHAD et al., 1989, POMMER, et al., 1995) mas, também pode se dar de 2 a 10 semanas após a polinização (STOUT, 1936; NITSH et al., 1960; EMERSHAD et al., 1989).

A herança do caráter estenoespermocarpia ainda não está claramente definida e muitos são os modelos de herança sugeridos (PERL et al., 1998).

A necessidade de ampliação da variabilidade genética, através de cruzamentos para a seleção de indivíduos apirênicos superiores, determinou o abandono da partenocarpia e a adoção da estenoespermocarpia por todos os



Figura 1: Cultura *in vitro* de sementes-traço

programas de melhoramento empenhados na obtenção de cultivares de uvas apirênicas.

A estenospermocarpia vem sendo utilizada desde o século passado em cruzamentos incluindo genitor feminino pirênico e masculino apirênico (LEDBETTER & RAMMING, 1989). Este modelo de cruzamento é considerado de baixa eficiência porque não se pode esperar que mais de 25% da progênie seja portadora de apirenia (RAMMING, 1990). Diante desta baixa frequência, torna-se essencial a formação de grandes populações para aumentar as chances de seleção de um indivíduo apirênico. Por outro lado, também exige maior tempo uma vez que um mínimo de 8 anos são necessários para reunir as características de dois genitores apirênicos. Isto decorre de duas gerações de cruzamentos, com 4 anos para cada geração, onde se depende de genitor pirênico para garantir a produção de sementes. Considerando-se ainda o tempo médio necessário para as demais etapas do processo de seleção, a criação de uma nova cultivar pode exigir um período total de 20 anos. Um segundo modelo, utilizando cruzamentos entre genitores apirênicos seguido da técnica de resgate de embriões *in vitro*, é considerado de alta eficiência porque permite combinar características de dois genitores sem sementes em uma única geração, e resulta numa alta frequência de indivíduos apirênicos na progênie (mais de 80%). Utilizando-se este modelo a primeira

seleção é feita, em média, quatro anos após a realização do cruzamento, permitindo abreviar para até 10 anos o tempo de obtenção de uma nova cultivar. Além disso, também há maior facilidade de combinar caracteres complementares, sem os inconvenientes da presença de genes do genitor pirênico.

Apesar da recente história da cultura de tecidos em *Vitis sp.*, com apenas cinquenta e quatro anos de estudos documentados, o resgate de embriões nas hibridações entre genótipos apirênicos pode ser considerado como a

mais significativa contribuição para o melhoramento da videira (MULLINS, 1990). Resultados mais importantes da aplicação da técnica de resgate de embriões imaturos de uvas sem

sementes começaram a ser publicados somente em meados da década de 80 nos Estados Unidos (CAIN et al., 1983; EMERSHAD & RAMMING, 1984; EMERSHAD et al., 1989) e em Israel (SPIEGEL-ROY et al., 1985). Com base nesses trabalhos, o resgate de embriões passou a ser utilizado nos programas de melhoramento da videira em diversos países, como Austrália (BARLASS et al., 1988), Bulgária (TSOLOVA, 1990), França (BOUQUET & DAVIS, 1989), África do Sul (BURGUER & TRAUTMAN, 1998), Argentina (PONCE, et al., 1998) e Espanha (GARCIA et al., 1998). No Brasil, a técnica vem sendo

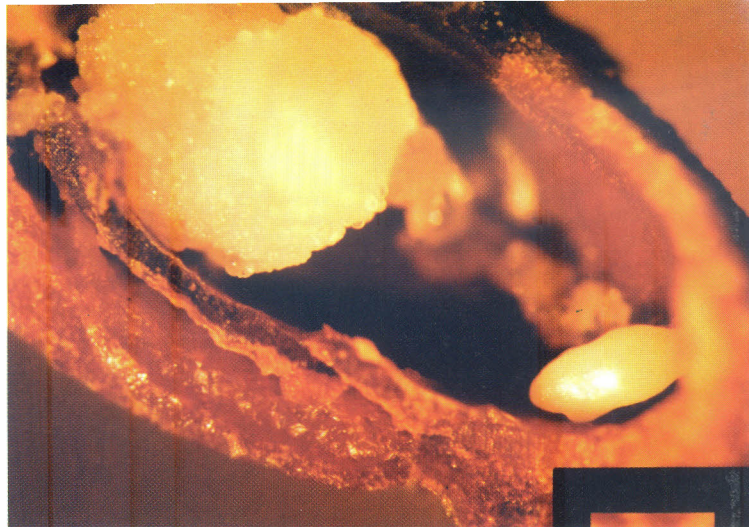


Figura 2: Corte da semente-traço com endosperma (esquerda) e embrião (direita). Aumento 40X

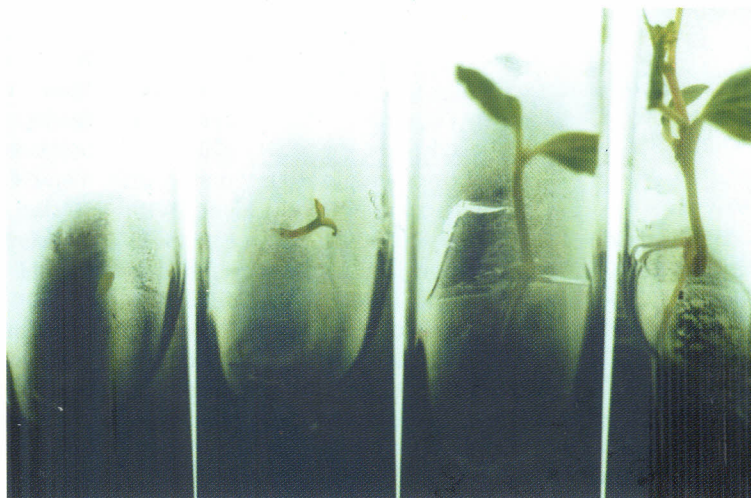
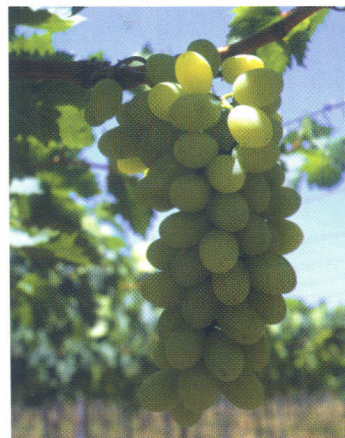


Figura 3: Seqüência de germinação do embrião

utilizando-se este modelo a primeira



Uva Centennial Seedless



Uva Centennial Seedless



Uva Crimson Seedless



Uva Flame Seedless

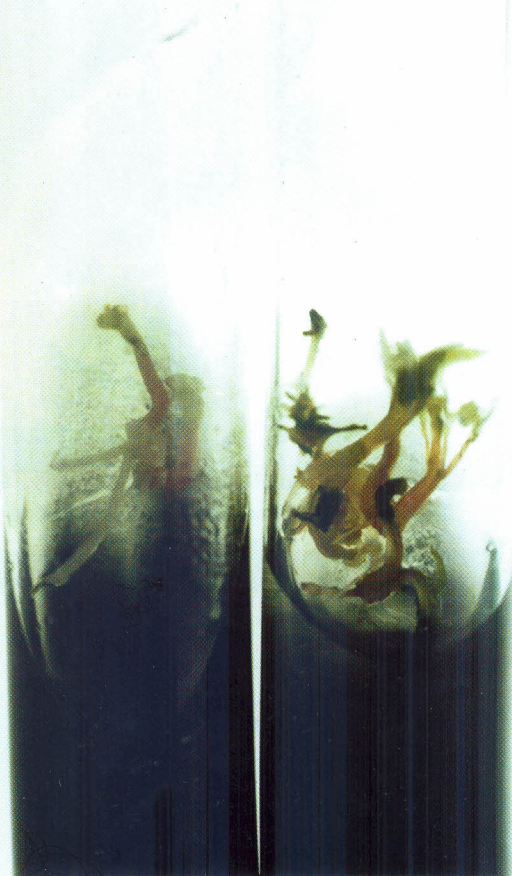


Figura 4: Poliembriõnia em *Vitis sp.*

utilizada desde o início da década de 1990 (PASSOS, et al., 1992; OLIVEIRA & CAMARGO, 1993; OLIVEIRA et al., 1994; POMMER et al., 1995; AMARAL et al., 1997; AMARAL et al., 1998; CAMARGO, 1998).

2. OBTENÇÃO DE PLANTAS PELO RESGATE DE EMBRIÕES

Na seqüência deste trabalho é descrita a rotina estabelecida no âmbito do programa de melhoramento de uvas de mesa conduzido pela Embrapa Uva e Vinho, visando a obtenção de novas cultivares a partir de cruzamentos entre genitores apirênicos.

2.1- Cultivo das sementes-traço - Na primeira etapa, as sementes-traço, provenientes de cruzamentos controlados entre genitores apirênicos, são retiradas das bagas imaturas para o cultivo in vitro. Os cachos devem ser colhidos de 6 a 8 semanas após a polinização, momento antes do aborto do embrião. As bagas são separadas dos cachos, desinfestadas sob agitação constante em álcool etílico 70% por um minuto, e em solução comercial de hipoclorito de sódio, com 2,5% de cloro ativo, por 5

minutos, seguidos de três enxágües em água destilada esterilizada. Concluída a desinfestação, as sementes-traço são extraídas das bagas em capela de fluxo laminar, com auxílio de instrumentos cirúrgicos esterilizados (pinças e bisturi) (Figura 1). A cultura das sementes-traço é feita em meio ER (EMERSHAD & RAMMING, 1984) com 0,65% de ágar, 6% de sacarose e 0,3% carvão ativado, em uma sala de crescimento sob as condições de escuro e com temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, por um período de dois meses. Este tempo é suficiente para completar o desenvolvimento dos embriões desde simples estruturas de 4-5 células, fase em que ocorreria o aborto, até atingirem um tamanho aproximado de 1mm, quando estarão aptos a germinar e desenvolver plantas (BARLASS et al., 1988).

2.2 - Resgate do embrião - As sementes-traço são dissecadas em capela de fluxo laminar, com auxílio de instrumentos cirúrgicos e microscópio estereoscópico, uma vez que o embrião pode medir frações de milímetro (Figura 2). Imediatamente a sua extração, o embrião é cultivado em tubos-de-ensaio (100x15mm) com meio-de-cultura Woody Plant (WP) (LLOYD & McCOWN, 1986). Este meio foi adaptado para resgate de embriões de videira por RAMMING & EMERSHAD (não publicado) e testado por POMMER et al. (1995). O meio WP foi elaborado com 0,65% de ágar, 3% de sacarose, 0,3% de carvão ativado, e suplementa-



Uva Flame Seedless.

do com 2 ml de uma solução $1 \mu\text{M}$ de BAP, para cada litro de meio-de-cultura. Neste meio-de-cultura e sob iluminação de 400 W/m^2 , com fotoperíodo de 16 horas de luz, a germinação ocorre geralmente em 15 dias (Figura 3). Passados 30 dias após a germinação, as plantas apresentam desenvolvimento suficiente para iniciar o processo de aclimação.

Tomando-se as medidas profiláticas, citadas anteriormente, raras são as contaminações. Se necessário, os embriões podem ser imersos em uma solu-

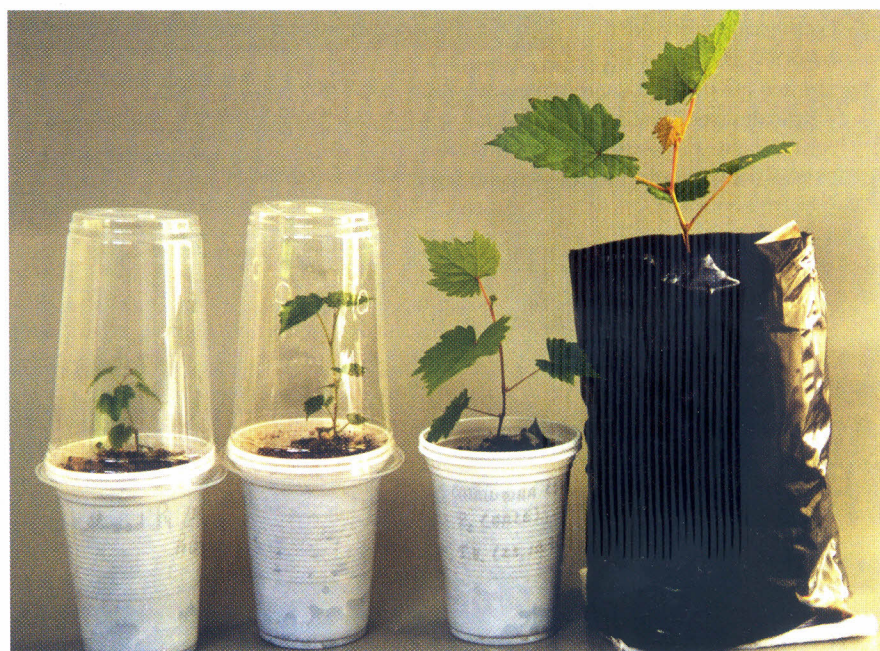


Figura 5: Desenvolvimento seqüencial das plantas na fase de aclimação

ção 5% do biocida comercial PPM®(PLANT CELL TECHNOLOGY, Inc.) por 5 minutos. A imersão pode ser repetida semanalmente, dependendo da reincidência da contaminação.

A formação de um banco para reposição de plantas pode ser usado como medida de segurança. Para obtenção de duplicatas realiza-se a repicagem e cultivo de segmentos com dois nós, em tubos-de-ensaio (200 x 25 mm), em meio sólido de GALZY (1964), próprio para multiplicação da videira. Convém salientar que este banco de reposição encarece o processo e torna-se dispensável quando não ocorrem perdas nas etapas de aclimação.

Em alguns cruzamentos, tem se observado uma frequência de poliembrião superior àquela de 0,5% documentada na literatura (BOUQUET, 1978) (Figura 4). Embora a poliembrião em *Vitis sp.* ainda seja pouco explorada, representa um potencial para uso da transformação genética, onde a inserção de genes favoráveis em embriões zigóticos múltiplos pode significar um grande avanço do germoplasma de um programa de melhoramento (EMERSHAD & RAMMING, 1994).

2.3. Aclimação - É a fase de adaptação das plantas, desde a saída da condição in vitro até estarem aptas para o cultivo em condições normais de campo (Figura 5). As plantas com desenvolvimento mínimo de cinco folhas, e vigoroso sistema radicular, estão aptas para iniciar o processo de aclimação. Elas são retiradas dos tubos-de-ensaio e plantadas em copos plásticos contendo um substrato composto por solo corrigido (pH=6,0), vermiculita e substrato comercial (PLANTMAX®) na proporção 1:2:1. A mistura é esterilizada em autoclave por 60 minutos a 120°C.

2.3.1. Sala de aclimação - Nesta etapa, as plantas são muito sensíveis às condições do ambiente, como temperatura e umidade. Devem ser corretamente protegidas para evitar perdas por desidratação e ressecamento. A infestação por patógenos também pode resultar em perdas se não forem tomadas as devidas precauções. Cada planta é mantida em câmara úmida individual, dentro de uma sala asséptica com temperatura entre 25 e 30°C, sob luminosidade constante (400 W/m²). Nos primeiros 4 dias a umidade relativa é mantida em torno de 80%, pela cobertura com copos plásticos transparentes. A umidade deve ser reduzida pela abertura gradual

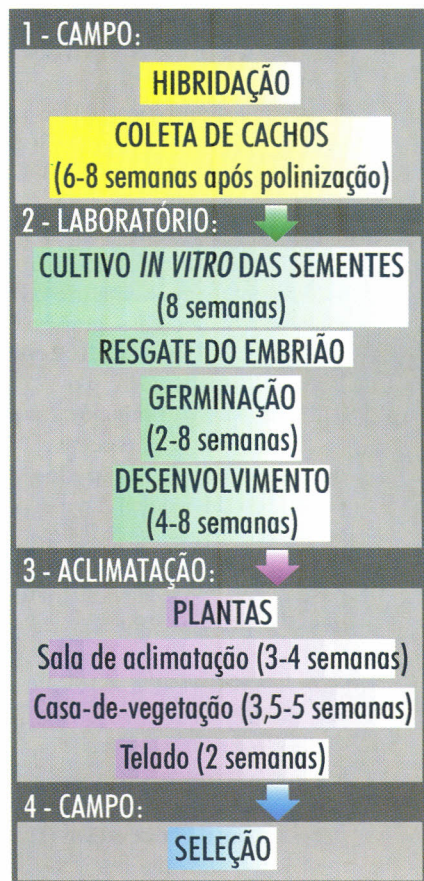


Figura 6: Rotina de obtenção de plantas oriundas de cruzamentos entre genitores apirênicos

da cobertura plástica até a sua retirada por completo, o que ocorre, em média, 15 dias após o plantio. Ao final deste período, as plantas devem ser transferidas para a casa-de-vegetação para completar o processo de aclimação.

2.3.2. Casa-de-vegetação - Durante esta fase a temperatura deve ser mantida entre 20 e 30°C, a umidade do ar deve ser superior a 60% e a luminosidade em torno de 400W/m². Nestas condições, em cerca de 10 a 15 dias as plantas atingem o tamanho necessário para o transplante para sacos plásticos contendo 1 kg do substrato já citado. Logo após o transplante e para assegurar um bom desenvolvimento das plantas, são feitas aspersões com solução Anti-stress 2000® (POLYMER AG), e adubações com solução nutritiva própria para a videira (EPSTEIN, 1975). Em aproximadamente 15 a 20 dias após o transplante as plantas já podem ir para o telado.

2.3.3. Telado - Na terceira etapa de aclimação, as plantas são mantidas, durante 15 dias, sob telado, com 40% de sombreamento, em condições naturais

de temperatura e de umidade relativa do ar. Acompanhamento com fertirrigações semanais e eventuais aspersões com solução anti-stress, sempre que necessárias, devem ser feitas até o momento do plantio no campo.

A rotina do processo para obtenção de plantas apirênicas exige um período variável de 6 a 10 meses, desde as hibridações até a obtenção de plantas em condições para plantio no campo, incluindo todas as etapas descritas neste trabalho (Figura 6).

3. RESULTADOS E PERSPECTIVAS

Em oito safras foram obtidas 2183 plantas de cruzamentos entre genitores apirênicos, utilizando-se a técnica de resgate e cultivo de embriões in vitro. Cabe salientar que 97% das plantas foram obtidas, nos dois últimos anos, como consequência dos ajustes e aprimoramentos da técnica. Do total de 151 cruzamentos foram cultivados in vitro mais de 17 mil sementes-traço e resgatados em torno de 4000 embriões imaturos. Atualmente, as plantas obtidas estão em processo de seleção no campo.

Considerando-se o domínio atual das técnicas para obtenção de plantas apirênicas no laboratório da Embrapa Uva e Vinho, é possível atingir a produção de 1500 plantas por ciclo de cruzamentos, com o trabalho de apenas dois laboratoristas. Como as condições subtropicais e tropicais do Brasil proporcionam a colheita de uvas em qualquer época do ano, estão sendo feitos três ciclos anuais de cruzamentos, em Bento Gonçalves - RS, em Jales - SP e em Petrolina - PE. Isto permitiu triplicar a capacidade do laboratório, obtendo-se entre 4000 e 5000 plantas de resgate de embriões por ano. Este fluxo pode ser mantido sem ampliação da área para avaliação de populações, devido ao rápido desenvolvimento das plantas em climas quentes, onde a primeira seleção, para a grande maioria das populações, pode ser feita em tempo inferior a 18 meses após o plantio no campo.

Dessa forma, o programa de melhoramento de uvas sem sementes da Embrapa Uva e Vinho deverá atender à grande demanda do setor produtivo com lançamento de novas cultivares de uvas apirênicas, adaptadas às diferentes regiões vitícolas do país e com a qualidade desejada pelo mercado.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, A.L.; OLIVEIRA, P.R.D. de; CAMARGO, U.A. Uvas de mesa sem sementes por aplicação da técnica de resgate de embriões *in vitro*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE FRUTÍFERAS, 1.1997, Jaboticabal. SP. **Anais...** Campus Jaboticabal: FCAVJ/UNESP.1997. p.36-38.
- AMARAL, A.L.; OLIVEIRA, P.R.D. de; CAMARGO, U.A. Uvas de mesa apirênicas de resgate de embriões *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 15. 1998, Poços de Caldas. MG. **Anais...** UFL/SBF. 1998.p.727.
- BARLASS, M.; RAMMING, D.W.; DAVIS, H.P. In-ovulo embryo culture: a breeding technique to rescue seedless x seedless table grape crosses. **The Australian Grapegrower & Wine-maker**. Australian, April, p.123-125. 1988.
- BURGER, P.; TRUTMANN, I.A. Breeding seedless grapes in South Africa by the mean of embryo culture. **Proceedings...** VIIème Symposium International sur la génétique et l'amélioration de la vigne (Montpellier), 6-10 Juillet 1998.
- BOUQUET, A.; DAVIS, H.P. Culture *in vitro* d'ovules et d'embryons de vigne (*Vitis vinifera* L.) appliquée à la sélection de variétés de raisins de table sans pépins. **Agronomie**, Paris, France, v. 9. p.565-574.1989.
- BOUQUET, A. La polyembryonie spontanée chez *Vitis vinifera* L.: intérêt pour la génétique et l'amélioration de la vigne. In: **Génétique et amélioration de la vigne**, Institut National de la Recherche Agronomique, Bordeaux, 1978. 472p.
- CAIN, D.W.; EMERSHAD, R.L.; TARALLO, R.E. *In ovulo* embryo culture and seedling development of seed and seedless grapes (*Vitis vinifera* L.). **Vitis**, Siebeldingen, v.22, p. 9-14. 1983.
- CAMARGO, U.A. Grape Breeding for the subtropical and tropical regions of Brazil. **Proceedings...** Symposium International sur la génétique et l'amélioration de la vigne (Montpellier), 6-10 Juillet 1998.
- EMERSHAD, R.L.; RAMMING, D.W. *In ovulo* embryo culture of *Vitis vinifera* L. cv. "Thompson Seedless". **American Journal of Botany**, Bronx, New York, v. 71, p.873-877. 1984.
- EMERSHAD, R.L.; RAMMING, D.W.; SERPE, M.D. *In ovulo* embryo development and plant formation from stenospemic genotypes of *Vitis vinifera* L. **American Journal of Botany**, Bronx, New York, v. 76, p. 397-402. 1989.
- EMERSHAD, R.L.; RAMMING, D.W. Somatic embryogenesis and plant development from immature zygotic embryos of seedless grapes (*Vitis vinifera* L.). **Plant Cell Reports**, Berlin, Germany, v.14, p.6-12, 1994.
- EPSTEIN, E. Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas. **Tradução e notas de Eurípedes Malavolta**. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos, 1975. 342p.
- GALZY, R. Technique de thérapie des viroses de la vigne. **Annales des Épiphyties**, Paris, v.15, n.3, p.245-256, 1964.
- GARCIA, E.; MARTINEZ, A.; GARCIA de la CALERA E.; PEREZ, L.J.; CENIS, J.L.; CARRENO, J. *In vitro* culture of ovules and embryos of grape for the obtention of new seedless table grapes cultivars. **Proceedings...** VIIème Symposium International sur la génétique et l'amélioration de la vigne (Montpellier), 6-10 Juillet 1998.
- LEDBETTER, C.A.; RAMMING, D.W. Seedlessness in Grapes. **Horticultural reviews**. Portland, v.11, p.159-184. 1989.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B.H. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel. *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Proceedings of International Plant Propagation Society**, v.30, p.421-427. 1986.
- MULLINS, M.G. Tissue culture and the genetic improvement of grapevines: a review. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.280, p.11-22. 1990.
- NITSH, J.P.; PRATT, C.; NITSH, C.; SHAULIS. Natural growth substances in Concord and Concord seedless grapes in relation to berry development. **American Journal of Botany**, Bronx, New York, v.47, p.566-576. 1960.
- OLIVEIRA, P.R.D.; CAMARGO, U.A. Recuperação de embriões oriundos de cruzamentos entre cultivares de uvas apirênicas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 7., 1993, Bento Gonçalves, RS. **Resumos**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho. 1993. p.24.
- OLIVEIRA, P.R.D.; KHUN, G.B.; SCANAGATTA, V.; MILANI, M.L. Principais atividades desenvolvidas no laboratório de cultura de tecidos da EMBRAPA-CNPUV. In: VII REUNIÃO ESTADUAL DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL. 1994. Bento Gonçalves, RS. **Resumos**. Bento Gonçalves, RS. Embrapa Uva e Vinho. 1994. p.64.
- PASSOS, I.R.S.; POMMER, C.V.; HASS, M.G.; PIRES, E.J.; TERRA, M.M.; FALCO, M.C. Obtenção de híbridos entre cultivares apirenas de videira, utilizando a técnica de resgate de embriões. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.14, n.2, p. 215-220, 1992.
- PERL, A.; SAHAR, N.; SPIEGEL-ROY, P.; OR, E. Conventional and biotechnological approaches in breeding of seedless table grapes. **Proceedings...** VIIème Symposium International sur la génétique et l'amélioration de la vigne (Montpellier), 6-10 Juillet 1998.
- POMMER, C.V.; RAMMING, D.W.; EMERSHAD, R. Influence of grape genotype, ripening season, seed trace size, and culture date on in ovule embryo development and plant formation. **Bragantia**, Campinas, v.54, n.2, p.237-249. 1995.
- PONCE, M.T.; AGUERO, C.B.; GREGORY, M.T.; TIZIO, R. Factors affecting performance of stenospemic grape embryo rescue technique. **Proceedings...** VIIème Symposium International sur la génétique et l'amélioration de la vigne (Montpellier), 6-10 Juillet 1998.
- RAMMING, D.W. The use of embryo culture in fruit breeding. **HortScience**, Alexandria, v.25, n.4, p.393-398. 1990.
- SPIEGEL-ROY, P.; SAHAR, N.; BARON, J.; LAVI, U. *In vitro* culture and plant formation from grape cultivars with abortive ovules and seeds. **Journal of American Society of Horticultural Science**, Mount Vermont, v.110, p.109-112. 1985.
- STOUT, A.B. **Seedlessness in grapes**. New York: Agricultural Experiment Station, 1936. Geneva, 68p. (Technical Bulletin, n.238).
- TSOLOVA, V. Obtaining plants from crosses of seedless grapevine varieties by means of *in vitro* embryo culture. **Vitis**, Siebeldingen, 29, p.1-4. 1990.

¹ Projeto executado em parceria com a Valexport e Cooperativa Jales Ltda., com apoio do Sebrae e do CNPq/BIO-EX.

