

ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES NA OBTENÇÃO DE PLANTAS EM CRUZAMENTOS ENTRE GENITORES APIRENOS DE VIDEIRA¹

ADRIANE LEITE DO AMARAL²; PAULO RICARDO DIAS DE OLIVEIRA³; ANA BEATRIZ COSTA CZERMAINSKI⁴; UMBERTO ALMEIDA CAMARGO⁴

RESUMO – Pesquisou-se o efeito do estágio de desenvolvimento de embriões resgatados na obtenção de plantas em cruzamentos entre genitores apirenos de videira, utilizando dois métodos de cultivo *in vitro* de sementes-traço. No método 1 (M1), as sementes-traço foram cultivadas 60 dias em meio-de-cultura ER e no método 2 (M2) 60 dias em ER, mais 30 dias em meio-de-cultura MS. O estágio de desenvolvimento do embrião foi identificado no final destes períodos, quando do resgate e transferência para meio-de-cultura WP. Quatro tipos de embriões foram identificados: globular, cordiforme, torpedo e indefinido. O estágio globular foi encontrado com maior frequência, levando à obtenção de maior número de plantas, mesmo tendo apresentado menor capacidade de gerar plantas. A maior eficiência em gerar plantas foi obtida com o estágio torpedo. No M2, ocorreu maior número de embriões germinados e de plantas desenvolvidas. Como o estágio de desenvolvimento do embrião influencia na obtenção de plantas, o resgate de embriões em estágio mais avançado do seu desenvolvimento leva a tem maior capacidade de gerar plantas. Portanto, uso de técnicas que favoreçam o resgate de embriões mais desenvolvidos pode aumentar o número de plantas obtidas.

Termos para indexação: estenoespermocarpia, meios-de-cultura, resgate de embriões, *Vitis* sp.

EMBRYO GROWTH STAGES ON PLANT OBTENTION FROM CROSSES BETWEEN SEEDLESS GRAPE PARENTS

ABSTRACT – It was investigated the effect of the growth stage of rescued embryos on plant obtention from crosses between seedless grape parents. Two methods for *in vitro* culture were compared. Method 1 (M1): seed traces were cultured 60 days in ER culture medium. Method 2 (M2): procedure of M1 followed by additional 30 days in MS culture medium. The stage of embryo growth was established at the end of this period, when the embryos were rescued and transferred to WP culture medium. Four classes of embryo stages were identified: globular, heart, torpedo and undefined. The globular stage, the most frequently found, produced the largest quantity of recovered plants, though it had the lowest capacity of originating plants. The torpedo stage was the most efficient in producing plants. M2 promoted the largest amount of germinated embryos and recovered plants. As the embryo growth stage affects the plant obtention, the rescue of embryos in an advanced growth stage promotes a higher capacity of producing plants. Therefore the use of techniques that favour the rescuing of embryos in an advanced growth stage can increase the obtention of plants.

Index terms: stenospermocarpy, culture media, embryo rescue, *Vitis* sp.

INTRODUÇÃO

Grande parte dos programas de melhoramento genético, direcionados ao lançamento de cultivares de uva de mesa apirenas, ou sem sementes, realizam cruzamentos diretos entre genitores apirenos estenoespermocárpicos, resultando em 40 a 80% de descendência apirena (Ramming, 1990). A estenoespermocarpia em uva tem determinação genética e é caracterizada pela formação de sementes-traço no fruto, geralmente imperceptíveis na degustação. Neste sistema, o desenvolvimento do fruto depende da fertilização e formação do embrião, mas o desenvolvimento da semente não se completa devido ao aborto do embrião e degeneração do endosperma (Stout, 1936). O aborto do embrião pode ocorrer em períodos

variáveis pós-fertilização. Na maioria das cultivares avaliadas por Emershad *et al.* (1989), foi observado o início deste processo na oitava semana após a polinização.

A utilização da estenoespermocarpia no melhoramento genético da videira implica o uso de técnicas de cultura de tecidos, capazes de prevenir o aborto do embrião e de promover seu desenvolvimento até a obtenção da planta. A cultura de tecidos tem uma história recente em *Vitis* sp., e o resgate de embriões, em hibridações entre genótipos apirenos, pode ser destacado como a mais significativa contribuição da cultura de tecidos para o melhoramento genético da uva de mesa (Mullins, 1990). O resgate de embriões em videiras estenoespermocárpicas foi primeiramente sugerido por Ramming (1983) e foi somente a partir de estudos desenvolvidos nos Estados Unidos e em Israel

1 (Trabalho 231/2000). Recebido: 20/10/2000. Aceito para publicação: 30/08/2001. Projeto CNPq/BIOEX, Embrapa Uva e Vinho e Cooperativa Agrícola Mista dos Produtores da Região de Jales Ltda.

2 Eng.-Agr. M.Sc. Bolsista DTI CNPq/BIOEX.

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

4 Eng.-Agr. M.Sc. Embrapa Uva e Vinho.

que a técnica passou a ser amplamente utilizada (Emershad & Ramming, 1984; Spiegel-Roy *et al.*, 1985).

A maioria dos grupos de pesquisa que utiliza o resgate de embriões *in vitro*, mede a eficiência da técnica através da proporção de plantas obtidas a partir das sementes-traço resultantes de cruzamentos entre genitores apirenos. Eficiências da ordem de 2 a 15% podem ser encontradas na literatura como uma função das variações na técnica utilizada (Spiegel-Roy *et al.*, 1985; Bouquet & Davis, 1989; Ponce *et al.*, 1998; Amaral *et al.*, 2000). O ponto crítico desta técnica é o estágio de desenvolvimento do embrião no momento da retirada da semente-traço. Segundo Ramming (1990), embriões muito pequenos, formados por 4 a 50 células, e em estádios iniciais de desenvolvimento, como o globular, são difíceis de cultivar diretamente em meio-de-cultura. Neste contexto, e para propiciar o desenvolvimento dos embriões até estádios mais promissores ao resgate *in vitro*, foi desenvolvida a cultura de sementes-traço (Ramming, 1983). Nessa técnica, o embrião continua o processo de desenvolvimento dentro de seu ambiente mais favorável, no interior da semente (Gray & Purohit, 1991) e tem a oportunidade de atingir a maturação mesmo depois do início da degeneração do endosperma, que geralmente ocorre 25 dias após a antese (Ledbetter & Ramming, 1989).

Observa-se que raros são os trabalhos que abordam este tema, apesar da sua importância na obtenção de plantas a partir de cruzamentos entre videiras apirenas. Assim sendo, realizou-se este trabalho com o objetivo de determinar o efeito do estágio de desenvolvimento de embriões resgatados sobre o êxito na obtenção de plantas de videira, em cruzamentos entre genitores estenospermocárpicos, utilizando dois métodos de cultivo *in vitro* de sementes-traço.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Uva e Vinho, em Bento Gonçalves-RS, utilizando-se de semente-traço provenientes de 12 cruzamentos entre videiras apirenas, efetuados em outubro de 1996. Os cachos foram colhidos oito semanas após a polinização, sendo as bagas esterilizadas com álcool etílico 70% (volume/volume), por um minuto, e hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo), por 5 minutos. Foram extraídas 1.445 sementes-traço, em capela de fluxo laminar, e cultivadas *in vitro*, utilizando-se de dois métodos: M1- 60 dias em meio-de-cultura ER (Emershad & Ramming, 1984) semi-sólido com 0,65% de ágar, 6,0% de sacarose, 0,3% de carvão ativado; e M2- 60 dias de cultivo conforme referido em M1, seguido de 30 dias em meio-de-cultura MS (Murashigie & Skoog, 1962) semi-sólido com 0,65% de ágar, 3,0% de sacarose, 0,3% de carvão ativado. O cultivo das sementes-traço foi realizado em sala-de-crescimento com controle de temperatura ($26 \pm 2^\circ\text{C}$) e na ausência de luz.

Concluído o tempo de cultura *in vitro*, as sementes-traço foram dissecadas para extração dos embriões em capela de fluxo laminar, com auxílio de microscópio estereoscópico e instrumentos cirúrgicos. No momento da abertura das sementes-traço para o resgate, os embriões obtidos foram classificados, em escala crescente, quanto ao estágio de desenvolvimento, como globulares, cordiformes e torpedos (Figura 1), conforme

Cutter (1987). Embriões sem formato definido, ou atípicos, foram classificados como indefinidos. Imediatamente após a classificação, cada embrião foi cultivado em tubo-de-ensaio (25x120 mm) individual, contendo meio-de-cultura Woody Plant (WP), de Lloyd & McCown (1986), com 0,65% de ágar, 3,0% de sacarose, 0,3% de carvão ativado e suplementado com 2 mL de uma solução a 1 μM de 6-Benzilaminopurina (BAP) para cada 1 L de meio-de-cultura. O cultivo dos embriões foi estabelecido em sala-de-crescimento com controle de temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), fotoperíodo de 16 horas de luz e luminosidade de 400 W/m^2 , produzida por lâmpadas fluorescentes do tipo extra luz-do-dia (PHILIPS®) e gro-lux (SYLVANIA®) na proporção 4:2, respectivamente.

As plantas com pelo menos 5 folhas e vigoroso sistema radicular foram consideradas, pelo seu desenvolvimento, aptas para iniciar o processo de aclimatização, sendo, portanto, computadas como plantas obtidas. Foi efetuado o teste de qui-quadrado para verificar se o estágio de desenvolvimento do embrião no momento do resgate influencia ou não a obtenção de plantas. Empregou-se o teste para cada método de cultivo utilizado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de qui-quadrado permitiu verificar a influência significativa do estágio de desenvolvimento do embrião sobre a obtenção de plantas nos dois métodos de cultivo utilizados ($\chi^2 = 17,05$, $p < 0,05$ em M1 e $\chi^2 = 8,79$, $p < 0,02$ em M2). Foi detectada a predominância de embriões globulares (79%) quando se utilizou o método de cultivo de sementes-traço M1 e dos tipos globular (52%) e torpedo (44%) em M2. Por outro lado, foram muito baixas as frequências de embriões do tipo cordiforme (3%, tanto em M1 como em M2) e daqueles considerados indefinidos (1-55% e 1%) para os respectivos métodos de cultivo utilizados (Tabela 1). Quanto à capacidade de germinação dos embriões, ficou evidente a superioridade do tipo torpedo pelos altos valores obtidos em M1 (63%) e em M2 (85%) (Tabela 1).

Os percentuais de plantas obtidos estimam a probabilidade de sua ocorrência em cada estágio de desenvolvimento do embrião nos diferentes métodos de cultivo. Com a finalidade de desdobramento do teste qui-quadrado, esses valores serviram como indicadores do estágio de desenvolvimento do embrião mais apropriado para iniciar o processo de resgate *in vitro*. Assim, quanto à capacidade de germinação dos embriões, ficou evidente a superioridade do tipo torpedo pelos altos valores obtidos em M1 (63%) e em M2 (85%) (Tabela 1). No entanto, quanto à probabilidade de gerar plantas, ficaram em destaque os estádios cordiforme em M1 (63%) e torpedo em M2 (57%). Foi constatado também que o maior número de plantas obtido a partir de embriões globulares (87, somando os dois métodos de cultivo) é uma função da predominância deste estágio de maturação no momento do resgate e não uma consequência da sua capacidade de gerar plantas, expressas por probabilidades de 20% em M1 e 38% em M2.

Considerando-se, contudo, os valores obtidos nos dois métodos de cultivo, observa-se a alta capacidade de gerar plantas dos embriões cordiformes e torpedos, indicando permite que estádios mais avançados de desenvolvimento do embrião são

mais adequados para os métodos de resgate *in vitro* utilizados. O estágio cordiforme, apesar da alta capacidade de formar plantas, pode ser considerado menos expressivo que o torpedo em consequência da sua baixa frequência de ocorrência, em qualquer dos métodos de cultivo. Desta forma, em função dos dois fatores analisados, ocorrência e capacidade de gerar plantas, o embrião do tipo torpedo pode ser considerado como o estágio mais promissor.

O fato de aqueles embriões que se encontram em estádios de desenvolvimento mais avançados, serem mais eficientes em gerar plantas, pode estar relacionado com as menores exigências em balanço nutricional dos meios-de-cultura, em tempo de permanência em cultura e em controle ambiental do cultivo *in vitro*. Isto vem ao encontro do preconizado por Ramming (1990) que se referiu à necessidade de meios mais complexos quanto menor e mais imaturo o embrião e de uma simulação *in vitro* das condições encontradas no interior da semente. Da mesma forma, Raghavan (1976) distinguiu duas 2 fases no desenvolvimento do embrião, com necessidades diferenciadas para o cultivo *in vitro*. Na primeira, heterotrófica, as exigências para o desenvolvimento do embrião seriam maiores e, na segunda, autotrófica, o embrião se caracterizaria pelo formato cordiforme e por não depender mais de fontes exógenas de reguladores de crescimento.

Como resultado geral do resgate de embriões, em diferentes estádios de desenvolvimento e métodos de cultivo *in vitro*, foram obtidas 163 plantas a partir de 501 embriões resgatados de 1.445 sementes-traço (Tabela 2). Os dois diferentes métodos de cultivo das sementes-traço utilizados para verificar

a influência do estágio de desenvolvimento do embrião no resgate *in vitro* apresentaram diferenças significativas quanto ao número de plantas obtidas ($\chi^2 = 12,78$, $p < 0,01$). A superioridade do M2 ficou caracterizada pelas proporções de plantas formadas por sementes-traço cultivadas (plantas/ sementes) e de plantas formadas por embriões resgatados (plantas/embriões), as quais podem ser adotadas como índices de eficiência da técnica de resgate de embriões. Neste sentido, o índice médio de eficiência de 14,5% para plantas/sementes, obtido com M2, e que superou o de 8,4% obtido com M1, pode ser atribuído ao período adicional de 30 dias em cultura das sementes-traço no meio MS. Esta diferença observada entre os dois métodos representa uma provável melhoria da técnica e caracteriza a vantagem de adoção do M2 na rotina laboratorial.

Os métodos de cultivo *in vitro* de sementes-traço também propiciaram respostas diferenciadas quanto à germinação dos embriões (Tabela 2). Ao fazer esta análise, verificou-se maior germinação em M2, que contemplou maior período de cultivo *in vitro*, representando a permanência do embrião imaturo no interior da semente por mais trinta dias, vindo a beneficiar o seu desenvolvimento, mais do que o resgate antecipado para o meio de cultura WP (M1), quando a maioria dos embriões ainda se encontra num estágio precoce de desenvolvimento, conforme indicado na Tabela 1. A partir destes estudos, pode-se sugerir que adaptações nas técnicas de cultivo de sementes-traço e de resgate de embriões, que venham a aumentar a frequência de embriões em estádios de maturação mais avançados, como o torpedo, podem incrementar a eficiência de obtenção de videiras apirenas.

TABELA 1 - Frequências observadas e relativas (%) de embriões, embriões germinados e plantas obtidas em dois métodos de cultivo *in vitro*.

Método de cultivo	Estádio do embrião	Embriões		Embriões germinados*		Plantas	
		Total	(%) ¹	Total	(%) ²	Total	(%) ²
M1 (762 sementes)	Globular	225	79	90	40	45	20
	Cordiforme	8	3	5	63	5	63
	Torpedo	38	13	24	63	14	37
	Indefinido	15	5	1	7	0	0
Total		286		120		64	
M2 (683 sementes)	Globular	112	52	71	63	42	38
	Cordiforme	6	3	2	33	2	33
	Torpedo	94	44	80	85	54	57
	Indefinido	3	1	2	67	1	33
Total		215		155		99	

*Embriões que desenvolveram dois cotilédones e radícula.

¹Percentual do total de embriões em cada método.

²Percentual do total de embriões obtidos no respectivo estágio, em cada método.

TABELA 2 - Frequências observadas e relativas (%) de sementes, embriões, embriões germinados e plantas obtidas em dois métodos de cultivo *in vitro*.

Método de cultivo	Frequência observada				Frequência relativa (%)				
	Sementes	Embriões	Embriões germinados	Plantas	Embriões/ sementes	Embriões germinados/ embriões	Plantas/ sementes	Plantas/ embriões	Plantas/ embriões germinados
M1	762	286	120	64	37,5	42,0	8,4	22,4	53,3
M2	683	215	155	99	31,5	72,1	14,5	46,0	63,9
Total	1445	501	275	163					

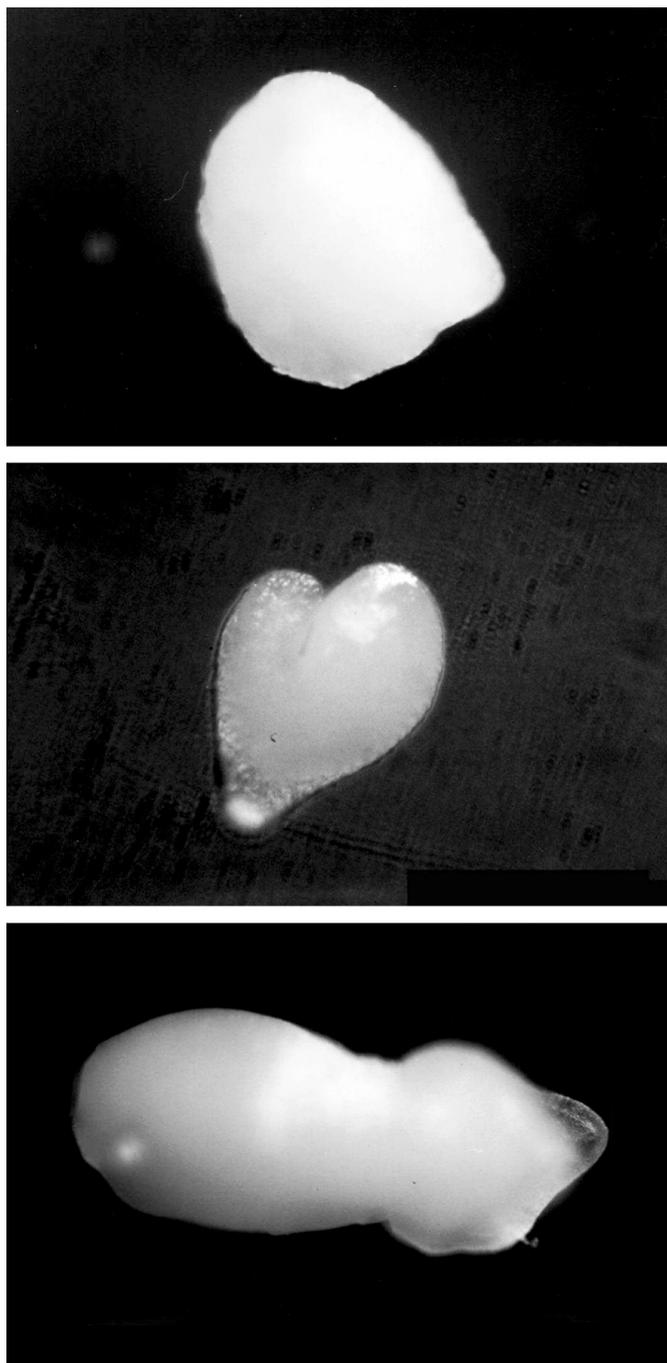


FIGURA 1 - Estádios de desenvolvimento dos embriões de videira (de cima para baixo): globular, cordiforme e torpedo.

CONCLUSÕES

- 1- O estágio de desenvolvimento do embrião, no momento do resgate *in vitro*, tem efeito sobre a obtenção de plantas.
- 2- Quanto mais avançado o estágio de desenvolvimento do embrião, maior é a sua capacidade de gerar plantas *in vitro*.
- 3- O maior tempo de permanência do embrião, em cultivo *in vitro* de sementes-traço, favorece o desenvolvimento do embrião até estádios mais promissores para o resgate.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq/BIOEX o suporte financeiro para a execução do trabalho, aos Técnicos Agrícolas Valtair Comachio e Roque Zílio e à Bolsista Maria Luiza Milani, pelo auxílio na execução deste trabalho, à Técnica de Laboratório Iraci Sinski, pelas fotografias, e ao Pesquisador Carlos Alberto Ely Machado, pelo tratamento computacional das fotografias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, A.L.do; OLIVEIRA, P.R.D.de; CAMARGO, U.A.; CZERMAINSKI, A.B.C. Eficiência da técnica de resgate de embriões na obtenção de híbridos entre cultivares apirênicas de videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, p. 176-180, 2000.

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.

CUTTER, E.G. **Anatomia Vegetal. Órgãos**. 2. ed. São Paulo: Editora Rocca, 1987. v. 2, cap. 8, 336p.

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 stenospermic genotypes of *Vitis vinifera* L. **American Journal of Botany**, Bronx, New York, v. 76, p. 397-402, 1989.

GRAY, D.J.; PUROHIT, A. Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Marhashtra, India, v. 10, p. 33-61, 1991.

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.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologie Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

PONCE, M.T.; AGUERO, C.B.; GREGORY, M.T.; TIZIO, R. Factors affecting performance of stenospermic grape embryo rescue technique. In: SYMPOSIUM INTERNACIONAL SUR LA GÉNÉTIQUE Et l' AMELIORATION DE LA VIGNE, 7., 1998,

Montpellier. **Proceedings...**

RAGHAVAN, V. **Experimental embryogenesis in vascular plants**. London: Academic Press, 1976. 603 p.

RAMMING, D.W. Embryo culture. In: MOORE, J.N.; JANICK, J. (Ed.) **Methods in fruit breeding**. West Lafayette, Indiana: Purdue University Press, 1983. cap. 9, p. 136-144.

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. 68p. (Technical Bulletin, 238).