

Recebido em 21 de Novembro de 1972

Melhoramento da videira — Aplicação de radiações ⁽¹⁾

pelo

Professor MIGUEL PEREIRA COUTINHO
da Cadeira de Botânica Agrícola

1 — INTRODUÇÃO

A importância que o míldio da videira continua a apresentar em Portugal e o volume dos encargos resultantes dos tratamentos fitosanitários, justificam ainda o interesse do problema da «obtenção de plantas resistentes à *Plasmopora*».

A maioria dos «esquemas» de melhoramento em curso, estabelecidos com este objectivo, está baseada nos métodos clássicos de selecção clonal, hibridação, sementeira «em massa», etc.

No entanto, no caso presente, a indução à mutabilidade justifica-se especialmente: pela escassês de «fontes de resistência» na *Vitis vinifera* L.; por existirem, em relação a outras espécies, fenómenos de ligamento, embora não absoluto, entre genes de resistência e genes responsáveis por características enológicas desfavoráveis; e pela natureza poligénica desta resistência, no tipo de «mancha foliar reduzida» correspondente a um tipo de *resistência horizontal*.

Tem sido complexo o estudo da natureza genética do mecanismo de resistência das videiras ao míldio, visto que é habitualmente a análise do comportamento das plantas, perante as diferentes raças

(1) Comunicação apresentada ao XXX Congresso Luso-Espanhol para o Progresso das Ciências (Murcia, 1972). Integrada num «Proj. Investig.» do IAC.

do fungo, que permite detectar os genes do hospedeiro que intervêm nesse mecanismo; na *Plasmopora viticola*, embora se admita a sua existência, até hoje não foram determinadas nenhuma raças que tivessem patogenicidade diferente, apenas se distinguindo as descritas por caracteres morfológicos e biométricos (Grüzel, 1960; Rafaila & David, 1962).

Sabe-se no entanto que existem *Vitaceas* em que a penetração do utrículo germinativo do zoósporo ou o desenvolvimento inicial do micélio provoca nas células ostiolares ou circunvizinhas, como reacção, a formação de necroses estomáticas ou peristomáticas, correspondentes a um fenómeno de hipersensibilidade.

Porém, este caracter é monofactorial dominante (N), sendo a videira europeia homozigótica recessiva (*nn*) em relação a essa característica (Boubals, 1959; Suryal, 1965).

Nas videiras já seleccionadas, quer provenientes de hibridações intraespecíficas, quer de grainha de *Vitis vinifera* irradiada com raios X ou com *neutrões*, a resistência traduz-se por manchas foliares de infecção, de área reduzida, de contorno geralmente poligonal, correspondendo a uma limitação oferecida pelo estereoma das nervuras. (Coutinho, 1964).

Se a humidade ambiente é elevada e a temperatura não muito baixa, formam-se conidióforos, mas geralmente em menor número e menos esporulados.

Desde que o estado higrométrico seja baixo, os tecidos infectados secam e formam-se «manchas limitadas», de ordinário fracamente revestidas ou até desprovidas de conidióforos e conídeos.

Nas formas descritas do tipo *Vinifera*, que é aliás fortemente heterozigótica, a resistência à *Plasmopora* é de natureza quantitativa, polifactorial, sendo por isso muito influenciada pelas condições ecológicas e evidenciando o possível interesse de procurar micromutações, consideradas mais frequentes, que as macromutações e provocando menores distúrbios no genómio.

Com este objectivo, em 1966, este método foi incluído no «programa» de Melhoramento da Videira em relação à resistência ao míldio que desde há muito iniciámos.

Nas primeiras aplicações foram utilizados os raios X, produzidos num acelerador «Von Graaff», em montagem horizontal, por electrões projectados num alvo de ouro espesso. Embora na quase totalidade dos trabalhos de irradiação da videira tivessem sido usadas estacas, procurando-se a mutação de gomo, tivemos interesse no nosso caso

em empregar grainha, para procurar ampliar pela irradiação a variabilidade resultante da segregação correspondente à sua heterozigocidade.

Utilizámos também a aplicação de raios γ , recorrendo a uma «bomba de Co⁶⁰», com sete tipos de dose, de 1000 a 10.000 rads. No entanto, deficiências verificadas na semente fornecida impediram-nos de aproveitar esse ensaio.

Empregámos finalmente *neutrões*, tendo a irradiação sido feita no reator do «Laboratório de Física», da Junta de Engenharia Nuclear, de Portugal.

No transporte das amostras para junto do núcleo do reator foi usado o sistema pneumático. O reator trabalhava a uma potência de 20 KV, admitindo-se que o espectro de cisão era representado pelo fluxo de neutrões rápidos sendo a dose, expressa em Rads, calculada a partir da fórmula de *Hurst*.

Nesta breve *comunicação* apresentamos resumidamente os resultados obtidos com a aplicação de raios X e de *neutrões*, na semente de videira, considerando particularmente os aspectos de *germinação da semente, percentagem de plantas cloróticas e plantas seleccionadas como resistentes*.

2 — GERMINAÇÃO DA GRAINHA

Na percentagem de germinação da grainha irradiada, em doses baixas, notou-se um curioso efeito de *estímulo* o que, aliás, recentemente se reconheceu ser de relativa frequência e corresponder a processos muito diversos. (Caldera, 1971; Zelles, Ernst & Tiffe, 1971; etc.).

De facto, em batateira, tomateiro, morangueiro, beterraba, soja, alguns cereais e várias outras plantas têm sido mencionados fenómenos de estímulo: na produção, na germinação de sementes, na radicação, etc. Estes efeitos são, por vezes, de difícil «reprodução» e a dose de estímulo varia de alguns a milhares de rads, conforme a sensibilidade do processo à irradiação.

O estudo destes efeitos positivos de estímulo não só têm o maior interesse para o melhor conhecimento do mecanismo de radiações ionisantes nos sistemas biológicos, como até praticamente, nos próprios aumentos de produção. Para o nosso caso, tem um interesse grande no aspecto prático, pois dada a percentagem relativamente baixa da germinação da grainha e o tempo longo desse processo, o

efeito de estímulo é uma condição favorável sempre que no melhoramento da videira se pretende recorrer à propagação seminal.

A grainha tratada, cuja humidade na altura da irradiação oscilava entre 12 a 13 %, foi semeada em caixas de vegetação, com terra, turfa e areia, sendo as observações e contagens, efectuadas com intervalos de cerca de uma semana, iniciadas 1 1/2 a 2 meses após a sementeira.

Nas aplicações de raios X, em semente das cultivares *Fernão Pires* e *Vital*, verificou-se um aumento na percentagem de germinação, com as doses de 500 a 5000 rads, estímulo que foi particularmente acentuado no caso de *Fernão Pires* a 500 rads.

Doses superiores a 5000 rads provocam sempre redução ou até inibição completa, como se reconhece no *Quadro* seguinte:

QUADRO I

Cultiva- res	Repetições	Tratamentos				
		A 500	B 1000	C 5000	D 10 000	Testemunha
FERNÃO PIRES	I	55,1	39,5	25,4	24,4	33,5
	II	57,3	35,9	30,3	27,6	31,8
	III	59,4	37,1	24,2	25,7	35,1
	IV	58,6	38,3	28,1	29,9	30,4
	Med.	57,6(**)	37,7(*)	27,0(*)	26,9(**)	32,7
VITAL	I	—	31,5	19,8	12,9	21,3
	II	—	25,1	20,6	18,1	17,9
	III	—	28,1	22,7	14,4	19,2
	IV	—	27,3	25,3	15,8	16,8
	Med.	—	28,0(**)	22,1	15,3	18,8

(*) Significativo ao nível de 5 %, no teste «t» em relação à testemunha.

(**) Significativo ao nível de 1 %, no teste «t» em relação à testemunha.

O efeito da irradiação da grainha com neutrões, é mais irregular e muito variável com a cultivar tratada e com as condições do material.

Nas mesmas duas castas referidas (*Fernão Pires* e *Vital*) todas as doses aplicadas, incluindo as mais baixas (200 e 600 rads) provo-

caram geralmente fenómenos de inibição (graf. 1 e 2), mas noutras cultivares, como por exemplo *Santarém*, a germinação foi estimulada pelas doses de 200 e 600 rads, estímulo que foi mesmo muito acentuado (Quadro II) nas sementes do clone C. 27, obtido a partir dum cruzamento «*Jaen* × *Azal Branco*» e já seleccionado como resistente:

QUADRO II

Repetições	Tratamentos			
	A 600	B 1000	C 2000	Testemunha
I	70,1	49,8	—	31,7
II	64,7	56,0	—	28,5
III	65,8	55,2	—	30,8
IV	69,4	51,4	—	33,4
Mi	67,5(**)	53,1(*)	—	31,1

(*) Significativo ao nível de 5%, no teste «t» em relação à testemunha.

(**) Significativo ao nível de 1%, no teste «t» em relação à testemunha.

Encontraram-se também algumas diferenças em relação aos resultados obtidos nos vários anos com a mesma cultivar, mas geralmente pouco acentuadas.

Embora seja difícil pelo seu carácter aliatório a comparação dos resultados, podemos considerar que a *Eficiência biológica relativa* (RBE), no que diz exclusivamente respeito à germinação da semente é cerca de 5 vezes maior nos neutrões do que nos raios X.

3 — PERCENTAGEM DE PLANTAS CLORÓTICAS

No âmbito do estudo dos efeitos fisiológicos das radiações, foi determinada a percentagem de plantas cloróticas dado que, em certas condições, é frequente ser essa uma das consequências prejudiciais da irradiação. As contagens só podem ser feitas nas primeiras observações, visto que a quantidade reduzida de reservas da semente faz com que tais plantas morram rapidamente.

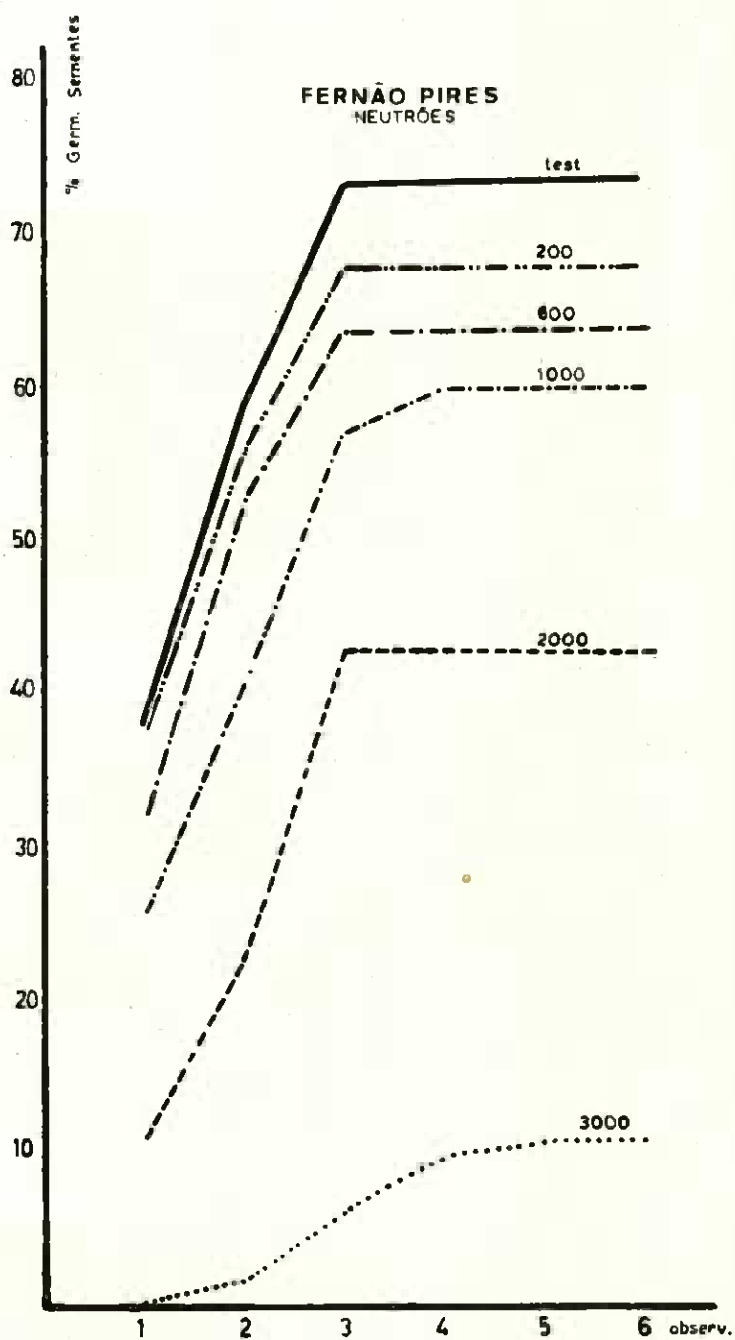


Fig. 1 — Germinação da semente tratada com neutrões

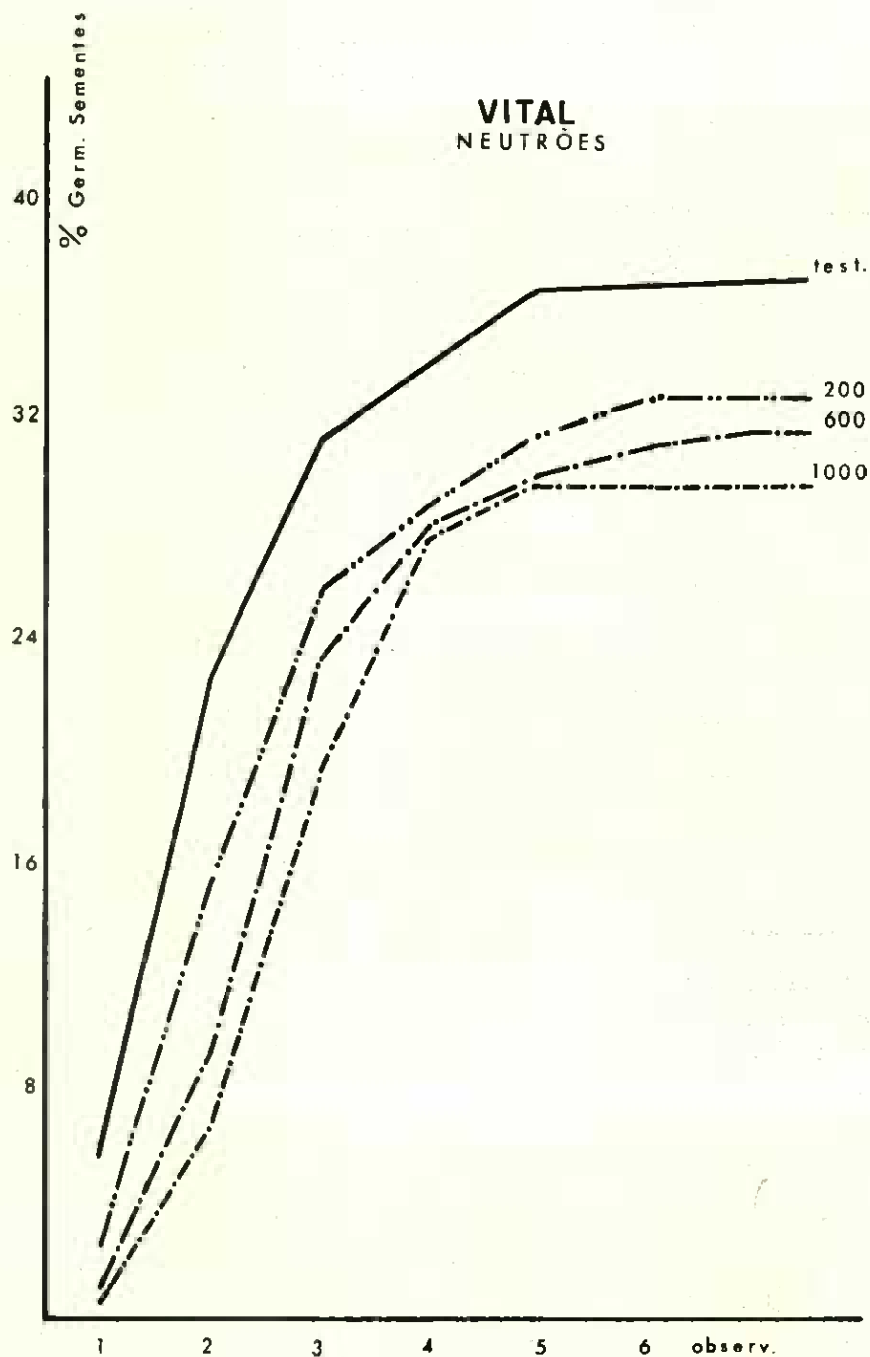


Fig. 2 — Germinação da semente tratada com neutrões

No Quadro III, reúnem-se os resultados que foram obtidos nas cultivares Fernão Pires, Vital e Tinta Miúda, tratadas com raios X e neutrões:

QUADRO III

Radiações	Doses (Rads)	% de plântulas cloróticas		
		Fernão Pires	Vital	Tinta miúda
Raios X	500	2,9		
	1 000	3,4	3,9	
	5 000	2,8	3,7	
	10 000	3,2	2,9	
	20 000	—	—	
	Testem.	2,6	2,8	
Neutrões	200	1,6		0,2
	600	1,9		0,5
	1 000	1,4		0,7
	2 000	1,1		0,3
	3 000	1,7		0,2
	Testem.	1,5		0,3

A análise destes resultados mostra não haver, entre as várias «doses», diferenças significativas, as quais porém já se verificam entre as diversas cultivares, pelo que se considera dever tratar-se mais dum fenómeno genético relacionado com factores recessivos de letalidade do que de efeitos da irradiação.

4 — SELECÇÃO DE PLANTAS RESISTENTES

De acordo com o critério atrás anunciado, a selecção das plantas, provenientes de semente irradiada, baseou-se no tipo da mancha foliar de infecção, observada depois de ataques naturais do mildio e confirmada após duas inoculações de apuramento.

No final das selecções efectuadas em 1970, sobre videiras provenientes das selecções preliminares de 1967 e 1969, foram apuradas 6 plantas: N.º 4, 6 e 8 (Vital com 1000 rads); N.º 57 (Fernão Pires com 5000 rads); N.º 703 (Fernão Pires com 500 rads) e N.º 777 (Fernão Pires com 2000 rads).

Estas plantas foram observadas durante 1971, com resultados que se encontram resumidos no *Quadro IV*:

QUADRO IV

Datas	Videiras					
	4	6	8	57	703	777
5 Maio	++		++	++	++	++
31 Maio	++/-		++	++	++	++
7 Junho	-		++		++	++
15 Junho	-	++	++	-	++	++
5 Julho	-	-	++	-	++	++
16 Julho	-	-	++	-	++	++

- Fraca resistência.

++ Resistente (mancha limitada).

5 — CONCLUSÕES

De acordo com os resultados que apresentámos poderemos já tirar as seguintes conclusões:

- a) A aplicação de radiações na semente de videira, em especial em doses baixas, e relativamente aos raios X, provocou, com frequência, um efeito de estímulo na germinação da grainha, menos frequente ou inexistente no caso dos neutrões que, pelo conjunto das condições analisadas, se mostram de menor interesse para este tipo de trabalho, pelo que dispomos já de uma instalação apropriada de raios X, no Gabinete de Botânica do I. S. A.

- b) O aparecimento de plântulas cloróticas na sementeira de grainha, parece ser um mecanismo genético intrínseco de factores letais recessivos e evidenciado pela propagação seminal duma planta heterozigótica.
- c) Provenientes de grainha irradiada foram já seleccionadas 3 videiras pela sua resistência à *Plasmopora viticola*, cujo interesse se admite.
- d) Os resultados obtidos parecem suficientes para demonstrar o interesse da aplicação de radiações, particularmente dos raios X, nalguns aspectos particulares do melhoramento da videira.

RESUMO

O míldio continua a ser a mais importante doença criptogâmica das vinhas portuguesas e por isso reveste-se do maior interesse o melhoramento genético da videira, no aspecto particular da resistência à *Plasmopora viticola*.

Como essa resistência, traduzida por manchas limitadas de infecção foliar, é uma característica regulada por um sistema poligénico, a indução à mutabilidade é considerada vantajosa; assim, no nosso programa de «obtenção de videiras resistentes», iniciado desde há muito pelos métodos clássicos (selecção clonal, hibridação e sementeira em massa) incluímos, desde 1966, o tratamento de grainhas e estacas com raios X e neutrões.

Na presente nota relatam-se os resultados obtidos quanto à percentagem de germinação da grainha, à percentagem de plantas cloróticas e ao apuramento de plantas resistentes ao míldio.

- Em diversas cultivares, a aplicação de radiações, especialmente de raios X, em doses baixas, provocou um efeito de estímulo traduzido por um aumento da percentagem de germinação da grainha.
- O aparecimento de plântulas cloróticas não parece ser devido ao efeito das radiações, mas resultar dum mecanismo intrínseco dessas videiras.
- Pelo conjunto das condições analisadas, os raios X mostram-se, para este caso, mais vantajosos do que os neutrões.
- Já foram seleccionadas pela sua resistência à *Plasmopora*, algumas videiras provenientes de grainha irradiada, cujo interesse se admite.

SYNOPSIS

The application of X-Ray and neutron on vine breeding

As the downy mildew is still the most important cryptogamic vine disease in Portugal, the vine breeding in relation to resistance to *Plasmopora viticola* is a problem of the greatest interest.

This resistance, in a genetic basis, is a polyfactorial character, the reason why induced mutation was considered very useful; so, in our vine breeding programme concerning resistance, we began to use since 1966 the irradiation of the grape seeds and stoks with X-Ray and Neutron, instead of the conventional methods (clonal selection intraspecific crossing and mass sowing) employed previously.

This note reports some effects of X-Ray and Neutron application on the *percentage of seed germination, proportion of chlorotic plants and resistance to downy mildew*:

- In some varieties, specially in applying X-Ray, the irradiation with low doses produced increase in the percentage of the seed germination.
- Any correlation was observed between chlorotic seedlings and radiation intensity, but there were differences between varieties.
- In our experiments X-Ray were more useful than Neutron.
- Some resistance plants, coming from the irradiated grape seed, were selected. These results, based on leaf tissue reaction to the fungus, are preliminary, but we think that they are of interested for breeding.

RESUME

L'application des Rayons X et des neutrons dans l'amélioration de la vigne

Au Portugal, le mildiou est encore la maladie cryptogamique la plus importante de la vigne.

Ainsi, l'amélioration génétique de la vigne, en ce qui concerne la résistance à la *Plasmopora*, est un problème d'un intérêt toujours actuel.

Cette résistance, traduite par des taches limitées d'infection sur les feuilles, est un caractère polyfactorielle ce qui justifie l'intérêt de la mutagenèse expérimentale. En conséquence, depuis 1966, nous avons inclus l'application des Rayons X e des neutrons parmi les méthodes employées dans notre programme d'amélioration, initié depuis longtemps avec des méthodes classiques (sélection clonale, hybridation intraspécifique et semis en masse).

Dans cette communication on presente les résultats obtenus sur: pourcentage de la germination des pépins, pourcentage des plantes chlorotiques e sélection des plantes résistantes au mildiou.

- Dans quelques «cultivars», l'irradiation des semences, particulièrement par des doses reduites de Rayons X, a donné une augmentation de la pourcentage de germination.
- On n'a pas trouvé quelque corrélation parmi les «seedlings» chlorotiques et les doses d'irradiation; on peut admettre que le phénomène est du a des facteurs génétiques.
- Dans nos essais, les Rayons X ont donné des résultats plus favorables que les neutrons.
- Il y a déjà quelques plantes sélectionnées par sa résistance à la *Plasmopora*, qui proviennent de semence irradiée, dont l'intérêt on peut admettre.

BIBLIOGRAFIA

- BOUBALS, D. — Contribution à l'étude des causes de la résistance des Vitacees du mildiou de la vigne et de leur mode de transmission héréditaire. *Ann. Amél. Plantes*. 1:5-233 (1959).
- CALDERA, P. G. — Gamma Stimulation on Maize. *Stimulation Newsletter*. 2:5-10 (1971).
- COUTINHO, M. P. — Some Vine clones resistant to *Plasmopora*. *Vitis*. 4:341-346 (1964).
- GRUNZEL, H. — Studies on Biological differentiation of Downy mildew of vines (*Plasmopora viticola*). *Phytopath.* 39 (2):149-194 (1960).
- RAFAILA, C. & DAVID, Z. — Morphology modifications in the sporangia and sporangiohores of *Plasmopora viticola* in relation to vine varieties and environmental conditions. *Lucr. Grad. Bot. Buc.* 2:983-992 (1961/62).
- SURYAL, G. F. — On the inheritance of resistance in vines to mildew. *Vest. Sel'Skhoz. Nauk.* 4:137-143 (1965).
- ZELLES, L., ERNST, D. W. & TIFFE, H. W. — Stimulation of germination of *Pinus sylvestris* pollen by radiation. *Stimulation Newsletter*. 2:54-56 (1977).