



UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CAMPUS DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – PRODUÇÃO VEGETAL

Adriana da Luz Barros Santana

**Detecção de vírus e cultivo *in vitro* de meristemas de
videiras cultivadas no Submédio do Vale do São
Francisco**

Petrolina - PE

2019

Adriana da Luz Barros Santana

Detecção de vírus e cultivo *in vitro* de meristemas de videiras cultivadas no Submédio do Vale do São Francisco

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal do Campus de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Agronomia – Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Nataniel Franklin de Melo.

Petrolina - PE

2019

Santana, Adriana da Luz Barros
S232d Detecção de vírus e cultivo *in vitro* de meristemas de videiras cultivadas no Submédio do Vale do São Francisco / Adriana da Luz Barros Santana. – Petrolina, 2019.

86 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus de Ciências Agrárias, Petrolina - PE, 2019.

Orientador: Prof. Dsc. Nataniel Franklin de Melo.

Referências.

1. Plantas. 2. Plantas - cultivo. 3. Vírus. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 581.4

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CAMPUS DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – PRODUÇÃO VEGETAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

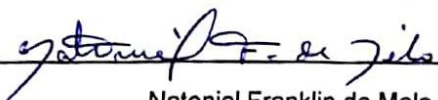
Adriana da Luz Barros Santana

Detecção de vírus e cultivo *in vitro* de meristemas de videiras cultivadas no Submédio do Vale do São Francisco

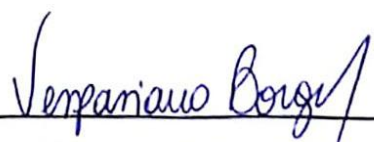
Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Produção Vegetal, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Aprovada em: 12 de Março de 2019.


Banca Examinadora



Nataniel Franklin de Melo,
Doutor em Ciências Biológicas, Embrapa Semiárido



Vespasiano Borges de Paiva Neto,
Doutor em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Vale do São Francisco.



Inez Vilar de Moraes Oliveira,
Doutora em Agronomia, VSF Biotecnologia e Diagnose Vegetal.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Alfa e Ômega, Princípio e Fim, por abençoar-me com vida e renovar minhas forças todos os dias.

À Universidade Federal do Vale do São Francisco por fornecer os meios necessários para a conclusão do Curso.

À Embrapa Semiárido por toda a estrutura e todo o suporte oferecidos.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador, Nataniel Franklin de Melo, por toda orientação e todo apoio, principalmente nos momentos mais difíceis.

À minha família: meus pais, Maria José e Geraldo; meus irmãos Alexsandro, Alessandro, Tiago, Andreane e Anderson; minhas cunhadas Tamires e Necilene; meus sobrinhos, Ian Victor, Natan Levi, Nayla Sophia e Jamerson, fonte de toda minha energia, por serem a essência da minha vida.

Aos meus amigos, Larisse Laranjeira, Bruno Djvan, Pedro Dias, Ivangela Nunes, Jaciara Bispo, que contribuíram significativamente para a realização desse trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Biotecnologia, Francisco, Angela Katiussia e Elenicio por todo apoio.

À todos os funcionários pelo acolhimento, apoio e amizade.

À banca examinadora, Dr. Vespasiano Borges de Paiva Neto e Dr^a. Inez Vilar de Moraes Oliveira, pelas observações e contribuições dadas ao trabalho.

E a todos que não mencionei aqui, mas que de alguma forma contribuíram para minha chegada até aqui e a realização desse trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

A videira é uma espécie cultivada em todo o mundo, estando entre as frutas de maior importância socioeconômica. Entretanto, nas áreas de cultivo, as doenças causadas por vírus são difíceis de serem controladas, além de serem bastante destrutivas. Nesse caso há necessidade de maior eficiência nos métodos de identificação dos vírus e em tecnologias para sua eliminação e obtenção de material propagativo sadio. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a incidência de vírus em videiras cultivadas no Submédio Vale do São Francisco e avaliar o potencial regenerativo de meristemas apicais e nodais cultivados in vitro após termoterapia. Foram realizados testes ELISA em 50 genótipos de videira (29 cultivares para mesa e 21 cultivares para vinho) cultivados no Submédio Vale do São Francisco, como também experimentos com termoterapia, cultivo in vitro de meristemas apicais e nodais, além de avaliações da regeneração de plantas em três fases de cultivo (estabelecimento, três multiplicações e aclimação). Foram detectados seis vírus (GVA, GVB, GLRaV1, GLRaV2, ArMV e GFLV) em 18 cultivares das uvas para mesa e sete vírus (GVA, GVB, GLRaV1, GLRaV2, ArMV, GFLV e GCMV) em 12 das cultivares para vinho. O GVA e o GLRaV-2 apresentaram as maiores porcentagens de infecção, sendo 31% nas uvas de mesa e 28,6% e 33,3% nas uvas de vinho, respectivamente. Houve regeneração de plantas até a fase final do cultivo nas cultivares de mesa Jupiter, Fiesta e Paulistinha, tanto para o cultivo de meristemas apicais quanto para o cultivo de meristemas nodais. Para as cultivares de vinho IAC 138-22 'Máximo' e MuscatNoir observou-se maior eficiência de regeneração a partir dos meristemas apicais, enquanto para os genótipos Barbera, Moscatel Grega e Syrah a partir de meristemas nodais. Os explantes provenientes de meristemas apicais originaram plantas aclimatizadas sem a presença de vírus para as cultivares Jupiter, Fiesta, Paulistinha e IAC 138-22 'Máximo', enquanto para aqueles provenientes de meristemas nodais originaram plantas sem vírus apenas para os genótipos Jupiter, Fiesta e Syrah.

Palavras-chave: Termoterapia; cultivo in vitro; vírus em videira; ELISA; fruticultura

ABSTRACT

The vine is a species cultivated around the world, being among the fruits of greater socioeconomic importance. However, in the growing areas, diseases caused by viruses are difficult to control, and are quite destructive. In this case, there is a need for greater efficiency in virus identification methods and in technologies for their elimination and obtaining of healthy propagating material. The objective of the present work was to evaluate the virus incidence in vines grown in the Submedium of São Francisco Valley and to evaluate the regenerative potential of apical and nodal meristems grown in vitro after thermotherapy. ELISA tests were performed on 50 grape genotypes (29 table cultivars and 21 cultivars for wine) cultivated in the Submedium of São Francisco Valley, as well as experiments with thermotherapy, in vitro cultivation of apical and nodal meristems, as well as evaluations of plant regeneration in three stages of cultivation (establishment, three multiplications and acclimatization). Six viruses (GVA, GVB, GLRaV1, GLRaV2, GLRaV2, ArMV and GFLV) were detected in 18 cultivars of table grapes and seven viruses (GVA, GVB, GLRaV1, GLRaV2, ArMV, GFLV and GCMV) in 12 of the cultivars for wine. GVA and GLRaV-2 presented the highest percentages of infection, 31% in table grapes and 28.6% and 33.3% in wine grapes, respectively. Plants were regenerated until the final stage of cultivation in the Jupiter, Fiesta and Paulistinha table cultivars, both for the cultivation of apical meristems and for the cultivation of nodal meristems. For the wine cultivars IAC 138-22 'Máximo' and Muscat Noir, it was observed a higher regeneration efficiency from the apical meristems, whereas for the Barbera, MoscatelGrega and Syrah genotypes from nodal meristems. Explants from apical meristem originated acclimatized plants without the presence of virus for the cultivars Jupiter, Fiesta, Paulistinha and IAC 138-22 'Máximo', whereas for those originating from nodal meristems they originated plants without virus only for the genotypes Jupiter, Fiesta and Syrah.

Key-words: Thermotherapy; in vitro culture; virus on the vine; ELISA; fruticulture

Lista de figuras

- Figura 1.** Tendência da produção global de uva. Fonte: OIV, 2017 **18**
- Figura 2.** Participação da produção total mundial de uvas por tipo de produto. Fonte: OIV, 2017 **18**
- Figura 3.** Enrolamento-da-folha em vinífera tinta, folha sadia (esquerda) e infectada (direita) (A) e enrolamento-da-folha em vinífera branca, folha sadia (direita) e infectada (esquerda) (B). Foto: Kuhn. Fonte: Kuhn; Fajardo (2003). **22**
- Figura 4.** Colônia da cochonilha algodonosa (*Planococcus citri*), vetora do enrolamento-da-folha, em raiz de videira. Foto: Morandi Filho. Fonte: Kuhn; Fajardo (2003) **23**
- Figura 5.** Malformação infecciosa ou doença dos entrenós curtos: tamanho irregular, desenvolvimento de ramos secundárias (A e B) e ramo sadio (C). Foto: Kuhn (B); Sandoz (A). Fonte: Kuhn; Fajardo (2003); Costa (2005); Sousa (2011) **24**
- Figura 6.** Folhas do porta-enxerto de videira *Rupestris* do Lot afetado pela virose da mancha das nervuras (B) e sadia (A). Foto: Kuhn. Fonte: Fajardo et al. (2003) **24**
- Figura 7.** Corte transversal do tronco de muda de videira (cv. Itália) exibindo engrossamento da casca e reentrâncias típicas das caneluras do tronco (A); Retirando-se a casca, observa-se detalhe do lenho com caneluras (B) e aspecto normal do lenho em videira com tronco sadio (C). Foto: Fajardo. Fonte: Fajardo; Nickel (2003) **25**
- Figura 8.** Planta de videira no campo com folha basal com sintoma (A); detalhe das nervuras necrosadas (B), porta-enxerto R110 afetado pela necrose das nervuras. Foto: Kuhn. Fonte: Fajardo et al. (2003) **26**
- Figura 9.** Sintomas de campo do GCMV. Vírus do mosaico cromático da videira (GCMV): Descoloração amarela brilhante da folhagem mostrada na primavera por uma videira infectada com GCMV. (G.P. Martelli,) **27**
- Figura 10.** Resultado de teste ELISA em amostra de videira com leitura 3h após a reação do substrato paranitrofenilfosfato na placa com complexo antígeno/anticorpo do ArMV (leitara ELISA com filtro 405 nm de comprimento de onda). **28**
- Figura 11.** Plantas de *Solanum lycopersicum* regeneradas de folhas com calos e mantidas em meio MS de Murashigue e Skoog (1962) suplementado com o fitohormônio cinetina (citocinina). Fonte: Coutinho Neto; Silva; Gonçalves (2017). **29**
- Figura 12.** Estacas lenhosas provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Videira da Embrapa Semiárido 18 dias após o plantio em vasos plásticos contendo substrato composto de 25% de vermiculita, 50% de areia fina, e 25% de húmus. **29**
- Figura 13.** Folhas de videira identificadas e armazenadas em sacos plásticos para conservação em ultrafreezer. **33**
- Figura 14.** Processamento da folha de videira para análise de vírus: folha velha

inteira (A) e separação do limbo filiar das nervuras e do pecíolo (B).	33
Figura 15. Material de videira para extração (A): maceração com nitrogênio líquido em almofariz com auxílio de um pistilo e adição (B) e adição de 3 mL de solução do tampão de extração.	34
Figura 16. Placas de Microtitulação 96 Poços (uma para cada vírus). Revestimento das placas com auxílio de micropipeta multicanal (A) e distribuição dos Controles Positivos (B).	35
Figura 17. Aplicação de amostras e controles para o teste ELISA para detecção de vírus em videira. Distribuição dos Controles Positivo e Negativo (A) e distribuição das amostras, placa completa (B).	36
Figura 18. Leitor de microplacas Multiskan Go (Thermo Scientific).	38
Figura 19. Fonte de explantes obtidos a partir de plantas de videira cultivadas em casa de vegetação. Gema apical (A) e gema nodal (B).	39
Figura 20. Inoculação dos explantes (meristemas) de videira em tubo de ensaio. Cortes para separação dos meristemas (A) e inoculados nos tubos (B).	40
Figura 21. Aclimatização das plantas de videira regeneradas a partir do cultivo <i>in vitro</i> de meristemas: potes 165 dias após a inoculação (A) e copos descartáveis com areia e vermiculita (B).	41
Figura 22. Sala de cultivo (ambiente controlado) <i>in vitro</i> de tecidos vegetais do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido.	41
Figura 23. Plantas de uvas para mesa regeneradas a partir do cultivo <i>in vitro</i> de meristemas apicais (segunda multiplicação): A1581 (A), CG 28.467 'Emperatriz' (B) e Fiesta (C).	48
Figura 24. Aspecto geral do estabelecimento do cultivo <i>in vitro</i> de segmentos nodais de cultivares de videira (Moscatel Branca) para vinho/processamento provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Videira da Embrapa Semiárido. Observar a oxidação intensa dos tecidos vegetais. oxidação dos tecidos vegetais.	58
Figura 25. Aspecto geral do estabelecimento do cultivo <i>in vitro</i> de ápices apicais de cultivares de videira (Moscatel Grega) para vinho/processamento provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Videira da Embrapa Semiárido: Observar a formação de calos e vitrificação dos tecidos vegetais.	58
Figura 26. Aspecto geral do estabelecimento do cultivo <i>in vitro</i> de meristemas nodais de cultivares de videira para vinho/processamento provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Videira da Embrapa Semiárido: observar a regeneração de plantas com diferentes aspectos de desenvolvimento, em diferentes ângulos (A) e (B).	61

Lista de tabelas

Tabela 1. Resumo da relação de vírus relatados na literatura, infectando a videira	22
Tabela 2. Cultivares de videira de mesa/processamento provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido	31
Tabela 3. Cultivares de videira de vinho/processamento provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido	32
Tabela 4. Detecção de vírus em cultivares de uva de mesa provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido submetidos ao Teste ELISA	43
Tabela 5. Detecção de vírus em cultivares de uva de vinho provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido utilizando submetidos ao Teste ELISA	44
Tabela 6. Estabelecimento <i>in vitro</i> de videiras para mesa provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas apicais de cultivares de uvas de mesa. Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância	47
Tabela 7. Primeira multiplicação <i>in vitro</i> de videiras para mesa provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas apicais de cultivares de uvas de mesa (45 dias após a inoculação). Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância	49
Tabela 8. Segunda multiplicação <i>in vitro</i> de videiras para mesa provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas apicais de cultivares de uvas de mesa (90 dias após a inoculação). Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância	51
Tabela 9. Terceira multiplicação <i>in vitro</i> de videiras para mesa provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas apicais de cultivares de uvas de mesa (120 dias após a inoculação). Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância	52

Tabela 10. Estabelecimento *in vitro* de videiras para mesa provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas nodais de cultivares de uvas de mesa na inoculação inicial. Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância **53**

Tabela 11. Primeira multiplicação *in vitro* de de videiras para mesa provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas nodais de cultivares de uvas de mesa (45 dias após a inoculação). Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância **54**

Tabela 12. Segunda multiplicação *in vitro* de videiras para mesa provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas nodais de cultivares de uvas de mesa (90 dias após a inoculação). Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância **55**

Tabela 13. Terceira multiplicação *in vitro* de videiras para mesa provenirntes do Banco de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas nodais de cultivares de uvas de mesa (120 dias após a inoculação). Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância **56**

Tabela 14. Estabelecimento multiplicação *in vitro* de videiras para vinho provenirntes do Banco de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM.GEM.) originados a partir de meristemas apicais de cultivares de uvas de vinho na inoculação inicial. Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância **57**

Tabela 15. Primeira multiplicação multiplicação *in vitro* de videiras para vinho provenirntes do Banco de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas apicais de cultivares de uvas de vinho (45 dias após a inoculação). Valores seguidos da mesma letra na

coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância	59
Tabela 16. Segunda multiplicação <i>in vitro</i> de videiras para vinho provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas apicais de cultivares de uvas de vinho (90 dias após a inoculação). Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.	59
Tabela 17. Terceira multiplicação <i>in vitro</i> de videiras para vinho provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas apicais de cultivares de uvas de vinho (120 dias após a inoculação). Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância	60
Tabela 18. Estabelecimento <i>in vitro</i> de videiras para vinho provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas nodais de cultivares de uvas de vinho na inoculação inicial. Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância	60
Tabela 19. Primeira multiplicação <i>in vitro</i> de videiras para vinho provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas nodais de cultivares de uvas de vinho (45 dias após a inoculação). Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância	61
Tabela 20. Segunda multiplicação <i>in vitro</i> de videiras para vinho/processamento provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas nodais de cultivares de uvas de vinho (90 dias após a inoculação). Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância	62
Tabela 21. Terceira multiplicação <i>in vitro</i> de videiras para vinho/processamento provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas nodais de cultivares de	

uvas de vinho (120 dias após a inoculação). Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância	63
Tabela 22. Resultado do teste ELISA para detecção de vírus em plantas originalmente infectadas e regeneradas a partir do cultivo <i>in vitro</i> de meristemas apicais de uvas de mesa, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido	63
Tabela 23. Resultado do teste ELISA para detecção de vírus em plantas originalmente infectadas e regeneradas a partir do cultivo <i>in vitro</i> de meristemas nodais de uvas de mesa provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido	64
Tabela 24. Resultado do teste ELISA para detecção de vírus em plantas originalmente infectadas e regeneradas a partir de meristemas apicais de uvas de vinho provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido	64
Tabela 25. Resultado do teste ELISA para detecção de vírus em plantas originalmente infectadas e regeneradas a partir de meristemas nodais de uvas de vinho provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido	64
Tabela 26. Detecção de vírus em cultivares de uva de mesa provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido o Teste ELISA.....	81
Tabela 27. Detecção de vírus em cultivares de uva de vinho provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido utilizando o Teste ELISA	76
Tabela 28. Estabelecimento, primeira, segunda e terceira multiplicação <i>in vitro</i> de videiras para mesa provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas apicais de cultivares de uvas de mesa. Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância	83
Tabela 29. Estabelecimento, primeira, segunda e terceira multiplicação <i>in vitro</i> de videiras para mesa provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas nodais de cultivares de uvas de mesa. Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância	84
Tabela 30. Estabelecimento, primeira, segunda e terceira multiplicação <i>in vitro</i> de videiras para vinho provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de	

gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas apicais de cultivares de uvas de vinho. Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância

..... 85

Tabela 31. Estabelecimento, primeira, segunda e terceira multiplicação *in vitro* de videiras para vinho provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas nodais de cultivares de uvas de vinho. Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância

..... 86

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1. Videira	18
2.2. As viroses	21
2.3. Teste ELISA (<i>Enzyme-Linked ImmonoSorbent Assay</i>).....	27
2.4. Cultivo <i>in vitro</i>	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1. Coleta do Material para propagação	31
3.2. Coleta do material vegetal	33
3.3. Processamento do Material para extração do RNA.....	33
3.4. Detecção de vírus através do teste ELISA	34
3.5. Cultivo <i>in vitro</i> de meristemas apicais e nodais.....	38
4. RESULTADOS.....	43
4.1. Detecção de vírus	43
4.2. Cultivo <i>in vitro</i> de meristemas	47
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÕES	70
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
8. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	72
9. APÊNDICES	81

1. INTRODUÇÃO

A videira (*Vitis* spp.) é uma frutífera cultivada em todo o mundo, estando entre as frutas de maior importância comercial em termos de valor econômico (REIS; REIS, 2016). No Brasil a cadeia produtiva de frutas é importante para a geração de renda e entrada de divisas, sendo que a produção de uva vem se tornando uma atividade promissora quanto à geração de renda e de trabalho para diversos polos regionais (ALVES et al., 2014). É uma planta arbustiva, trepadeira com ramos longos e flexíveis, pertencendo à família *Vitaceae* e ao gênero *Vitis*, o qual é composto por mais de 60 espécies, cuja distribuição geográfica contempla os continentes asiático, europeu e americano (ALLEWELDT; DETTWEILER, 1994; GIOVANNINI, 1999).

O polo Petrolina-PE/Juazeiro-BA no Submédio do Vale do São Francisco destaca-se como a principal região produtora de uvas finas de mesa (*V. vinifera*) do país, contribuindo com mais de 90% da exportação, sendo em 2013 exportados 43.084.692 quilos de uva, correspondendo a cerca de 99,7% da exportação brasileira (JULIÃO et al., 2017). Ao mesmo tempo, foi estabelecido um outro polo de produção de vinhos finos tropicais, com destaque para produção de vinhos jovens.

O cultivo de videira nesta região, iniciado na década de 70 com a criação dos projetos públicos de irrigação, conta, atualmente, com uma área total de 9.662 ha, dos quais 90% encontram-se em fase produtiva, sendo que, em 2016 foram colhidos 9.493 ha, com uma produção de 305.707 toneladas de uva (IBGE, 2017). O ciclo produtivo da videira com e sem sementes são condicionados, principalmente, ao manejo fitotécnico da cultura que associado às condições edafoclimáticas, propiciam a obtenção de duas safras anuais (SILVA e COELHO, 2010).

Por outro lado, entre as doenças que afetam a cultura da uva, aquelas causadas por vírus são bastante destrutivas, não existindo até o momento medidas curativas que possam ser utilizadas para controlar essas doenças. Já foram relatadas no mundo cerca de 60 espécies de vírus e agentes subvirais para a videira. No Brasil foram detectadas pelo menos 13 espécies de vírus,

dois viróides e duas doenças, possivelmente causadas por vírus, que ainda não possuem agente causal identificado (BASSO et al. 2014).

A legislação brasileira para produção, comercialização e utilização de mudas de videira estabelece normas, através da Portaria Nº 37 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a fim de garantir a identidade e a qualidade física e fitossanitária dessas. As normas abrangem os viveiros e unidades de propagação *in vitro*, e também a planta matriz e as mudas, sendo utilizado um protocolo para diagnose para detecção de nove vírus (*Grapevine leafroll-associated virus* - GLRaV-1, -2, -3, -7; *Grapevine fanleaf virus* - GFLV; *Grapevine fleck virus* - GFkV; *Arabis Mosaic virus* - ArMV; *Grapevine virus A* - GVA e *Grapevine virus B* – GVB), considerados de interesse econômico, assim a certificação das mudas está relacionada ao nível de tolerância para pragas que variam de 0% a 2%.

Os sintomas causados por estes patógenos resultam, geralmente, no declínio de plantas, na redução da longevidade do parreiral, e conseqüentemente, na redução da produção e da qualidade dos frutos. Entre os danos causados por agentes virais em videira, citam-se perdas significativas na produção, alteração na pigmentação e no tamanho de bagas, maturação tardia e irregular dos frutos e redução no teor de sólidos solúveis, redução no enraizamento de bacelos e no pegamento das enxertias, aumento da suscetibilidade do material às injúrias, e até morte de plantas (ATALLAH et al., 2012).

No Brasil, as doenças mais importantes causadas por vírus e relatadas até o momento são: enrolamento da folha ("*Leafroll*"); malformação infecciosa ou doença dos entrenós curtos ("*Fanleaf disease*"); mancha das nervuras ("*Fleck disease*"); lenho rugoso ("*Rugose wood complex*") e necrose das nervuras ("*Vein necrosis disease*") (BARBOSA et al., 2016).

Diversos métodos têm sido desenvolvidos para a detecção e identificação de vírus de plantas. Em videira a diagnose é baseada, principalmente, em resultados obtidos nos testes de campo e nos testes laboratoriais. A diagnose acurada, com a correta identificação do agente causal da doença, assim como a sua distribuição no campo, é essencial para o estabelecimento de medidas eficientes ao seu controle. Por isso, métodos

biológicos [união de tecidos (enxertia) ou por inoculação mecânica], sorológicos ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) (CLARK e ADAMS, 1977) e moleculares RT-PCR – (Transcrição Reversa associada à Reação em Cadeia da Polimerase) (MULLIS et al., 1986) têm sido utilizados na detecção e identificação de vírus em videiras.

A cultura de tecidos vegetais apresenta vantagens em relação ao método tradicional de propagação vegetativa, podendo-se destacar a rapidez no processo de cultivo e a possibilidade de desenvolvimento e manutenção de plantas livres de vírus (PEIXOTO e PASQUAL, 1996; VILLA et al., 2007). No entanto, o sucesso do cultivo está condicionado a diversos fatores que interagem durante o processo, como, por exemplo, o tipo de explante e a espécie vegetal. Na cultura de tecidos vegetais é essencial a utilização de métodos de fitossanidade, como por exemplo, os métodos baseados no uso de termoterapia ou cultura de meristema, associados ou não, principalmente nos processos de certificação de qualidade de mudas, especialmente para clones ou cultivares de alto valor (ALMEIDA et al. 2013).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a incidência de vírus em cultivares de videira cultivadas no Submédio do Vale do São Francisco e avaliar o potencial regenerativo de meristemas apicais e nodais cultivados *in vitro* após termoterapia para obtenção de clones livres de vírus.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Videira

A videira é uma frutífera cultivada em todo o mundo, estando entre as frutas de maior importância comercial em termos de valor econômico (REIS e REIS, 2016). As uvas de mesa recebem grande destaque entre as frutas de maior consumo no mundo, principalmente na forma in natura, com crescente aumento na produção, observando-se taxas anuais de 13% de aumento (LAZZAROTTO e FIORAVANÇO, 2013; REIS e REIS, 2016). A produção da fruta continua aumentando ao longo dos anos (Gráfico 1), com mercado consumidor amplo para a diversidade de produtos derivados da uva (Gráfico 2).

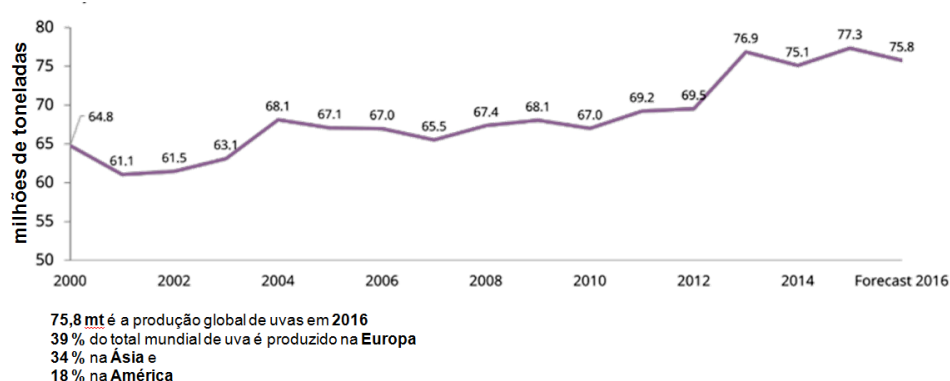


Figura 1. Tendência da produção global de uva. Fonte: OIV, 2017

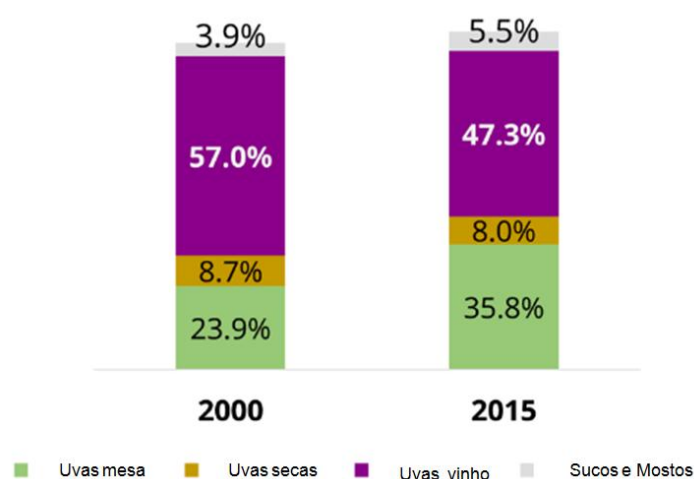


Figura 2. Participação da produção total mundial de uvas por tipo de produto. Fonte: OIV, 2017

A videira pertence à família Vitaceae e ao gênero *Vitis*. O gênero *Vitis* é composto por 108 espécies, sendo a espécie *V. vinifera* L. a que possui maior importância econômica e cultivo mais antigo. É uma planta arbustiva, de caule sarmentoso (com gavinhas), apresenta ramos longos e flexíveis, suas folhas são alternas, simples ou compostas, apresenta inflorescência paniculada (ICKERT-BOND et al., 2014). O gênero *Vitis* possui distribuição geográfica que contempla os continentes asiático, europeu e americano.

Na Ásia as espécies distribuem-se desde a Sibéria até a Indonésia, com 29 espécies descritas. No continente europeu ocorrem apenas duas espécies, *V. vinifera* e *V. silvestris*. No continente americano, com 34 espécies descritas, a ocorrência natural da videira vai desde o Canadá até a Venezuela. Entre as espécies americanas, apenas três apresentam variedades cultivadas: *V. labrusca*, *V. bourquina* e *V. rotundifolia*, sendo que aproximadamente 75% são nativas da América do Norte (ALLEWELDT; DETTWEILER, 1994; GIOVANNINI, 1999).

A viticultura moderna para a produção de vinho expandiu-se ao longo dos anos, sendo o cultivo de videira uma prática que teve início a milhares de anos, atualmente o cultivo de vinhas (*V. vinifera* L.) ocorre em mais de 3,6 milhões de hectares no mundo (OIV, 2016). A diversidade varietal utilizada para a produção de vinho foi significativamente reduzida nas duas últimas décadas e quase metade das áreas vitícolas mundiais são ocupadas por apenas 15 cultivares (ANDERSON, 2014).

Uma vez que as cultivares tradicionais são usadas para produzir a maioria dos vinhos altamente rentáveis, sua substituição por novas cultivares provavelmente não acontecerá no futuro próximo. Um dos maiores problemas da viticultura moderna está relacionado ao fato de que as cultivares de *V. vinifera* L. utilizadas na produção são altamente sensíveis a diferentes pragas e doenças.

Entre as doenças que afetam a cultura da uva, aquelas causadas por vírus são bastante destrutivas, não existindo até o momento medidas curativas que possam ser utilizadas para controlar essas doenças. Já foram relatadas no mundo cerca de 60 espécies de vírus e agentes subvirais para a videira. No Brasil foram detectadas pelo menos 13 espécies de vírus, dois viróides e duas

doenças, possivelmente causadas por vírus, que ainda não possuem agente causal identificado (BASSO et al. 2014).

Os sintomas causados por estes patógenos resultam, geralmente, no declínio de plantas, na redução da longevidade do parreiral, e conseqüentemente, na redução da produção e da qualidade dos frutos. Entre os danos causados por agentes virais em videira citam-se perdas significativas na produção; alteração na pigmentação e no tamanho de bagas, maturação tardia e irregular dos frutos e redução no teor de sólidos solúveis; redução no enraizamento de bacelos e no pegamento das enxertias; aumento da suscetibilidade do material às injúrias e até morte de plantas (ATALLAH et al., 2012).

Diversos fatores influenciam a ocorrência e a severidade destas doenças no parreiral, entretanto, o estado fitossanitário do material propagativo a ser utilizado na produção de mudas e em enxertias é o fator mais importante, considerando-se que a videira é propagada, essencialmente, por propagação vegetativa.

A identificação das doenças causadas por vírus foi inicialmente realizada através da observação dos sintomas manifestados na planta. No entanto, essa metodologia é muitas vezes imprecisa e subjetiva, assim, torna-se pouco consistente para a diagnose da doença, principalmente por ser uma infecção viral, a qual não apresenta sintomas expressivos em curto prazo, podendo levar longos períodos fenológicos ou vários ciclos para expressar-se.

Com isso, a indexação biológica foi o próximo método a ser explorado na identificação de vírus através da exposição do material da planta matriz a um bioindicador, em geral, por meio da enxertia da planta suscetível que apresenta sintomas da presença de vírus (SANKARAN et al., 2010).

Logo após, em resposta à necessidade de maior eficiência e precisão, desenvolveram-se as técnicas sorológicas, através do ensaio ELISA – *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, e também as técnicas moleculares, como o RT-PCR (Transcrição Reversa associada à Reação em Cadeia da Polimerase).

2.2. As viroses

Foram relatadas no mundo cerca de 60 espécies de vírus e agentes subvirais para a videira. No Brasil foram detectadas pelo menos 13 espécies de vírus, dois viróides e duas doenças, possivelmente causadas por vírus, que ainda não possuem agente causal identificado (BASSO et al. 2014).

A legislação brasileira para produção, comercialização e utilização de mudas de videira estabelece normas, através da Portaria Nº 37 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a fim de garantir a identidade e a qualidade física e fitossanitária dessas. As normas abrangem os viveiros e unidades de propagação *in vitro*, e também a planta matriz e as mudas, sendo utilizado um protocolo para diagnose para detecção de nove vírus (*Grapevine leafroll-associated virus* - GLRaV-1, -2, -3, -7; *Grapevine fanleaf virus* - GFLV; *Grapevine fleck virus* - GFkV; *Arabis Mosaic virus* - ArMV; *Grapevine virus A* - GVA e *Grapevine virus B* – GVB), considerados de interesse econômico, assim a certificação das mudas está relacionada ao nível de tolerância para pragas que variam de 0% a 2%.

No Brasil, as doenças mais importantes causadas por vírus em videira e relatadas até o momento são: enrolamento da folha (*Leafroll*); malformação infecciosa ou doença dos entrenós curtos (*Fanleaf disease*); mancha das nervuras (*Fleck disease*); lenho rugoso (*Rugose wood complex*) e necrose das nervuras (*Vein necrosis disease*) (LIMA, 2009).

Essas doenças estão associadas aos seguintes tipos virais: enrolamento da folha (*Grapevine leafroll-associated virus* - GLRaV-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8 e -9); malformação infecciosa ou doença dos entrenós curtos (*Grapevine fanleaf virus* - GFLV); mancha das nervuras (*Grapevine fleck virus* - GFkV); lenho rugoso (*Grapevine virus A* e *Grapevine virus B*) (LIMA e FAJARDO, 2012; CATARINO et al., 2013) e necrose das nervuras (agente causal ainda não identificado) (LIMA, 2009). Alguns desses vírus estão inter-relacionados taxonomicamente pela mesma família ou pelo mesmo gênero (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da relação de vírus relatados na literatura, infectando a videira.

Família	Gênero	Espécies
Bataflexiviridae	Vitivirus	<i>Grapevine virus A (GVA)</i>
		<i>Grapevine virus B (GVB)</i>
Closteroviridae	Ampelovirus	<i>Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1)</i>
	(subgrupo I)	<i>Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3)</i>
	Closterovirus	<i>Grapevine leafroll-associated virus 2 (GLRaV-2)</i>
	Velarivirus	<i>Grapevine leafroll-associated virus 7 (GLRaV-7)</i>
Secoviridae	Nepovirus	<i>Arabis mosaic virus (ArMV)</i>
	(subgrupo A)	<i>Grapevine fanleaf virus (GFLV)</i>
	Nepovirus (subgrupo B)	<i>Grapevine chrome mosaic virus (GCMV)</i>
Tymoviridae	Maculavirus	<i>Grapevine fleck virus (GFkV)</i>

Fonte: Fajardo, 2015. tabela adaptada.

Entre as doenças citadas anteriormente, o enrolamento da folha é a mais disseminada e mais importante da videira, podendo infectar tanto cultivares de copa como cultivares porta-enxerto. As plantas infectadas, quando cultivares tintas, apresentam folhas avermelhadas, permanecendo verdes ao longo das nervuras; enquanto que as cultivares brancas apresentam clorose nas folhas (Figura 1) (LIMA, 2009). Mas em ambos os casos desenvolvem enrolamento, para baixo, nos bordos das folhas, as mesmas tornam-se espessas e quebradiças devido ao acúmulo de carboidratos, em consequência da degeneração do floema (ROWHANI, 2005; LIMA, 2009).

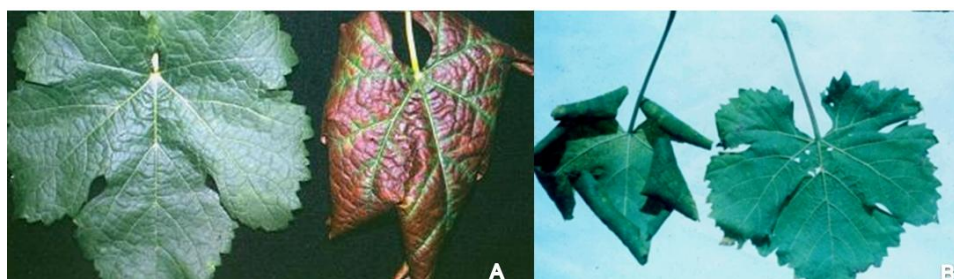


Figura 3. Enrolamento-da-folha em videira tinta, folha sadia (esquerda) e infectada (direita) (A) e enrolamento-da-folha em vinífera branca, folha sadia (direita) e infectada (esquerda) (B). Foto: Kuhn. Fonte: Kuhn; Fajardo (2003).

A disseminação pode ocorrer por meio do material propagativo (propagação vegetativa) e, de modo semipersistente por meio das cochonilhas algodonosas (Família Pseudococcidae) e das cochonilhas de carapaça (Família Coccidae) (Figura 2), por exemplo, para vírus do gênero *Ampelovirus*, GLRaV-1 e -3. Já para vírus do gênero *Closterovirus*, o meio de disseminação semipersistente ocorre por meio dos afídeos, como por exemplo o GLRaV-2 (LIMA, 2009). Nove espécies de vírus estão associadas ao enrolamento, identificados como: *Grapevine leafroll-associated virus* - GLRaV-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8 e -9 (CATARINO et al., 2015).



Figura 4. Colônia da cochonilha algodonosa (*Planococcus citri*), vedora do enrolamento-da-folha, em raiz de videira. Foto: Morandi Filho. Fonte: Kuhn; Fajardo (2003).

A malformação infecciosa ou doença dos entrenós curtos é disseminada por nematoides do gênero *Xiphinema*, em especial as espécies *X. index* e *X. italiae* que podem ser portadores do vírus por até oito meses na ausência de plantas hospedeiras (LIMA, 2009).

Essa doença foi uma das primeiras viroses descritas em videira, cujos sintomas apresentados pelas plantas infectadas podem variar de acordo com a estirpe do vírus (*Grapevine fanleaf virus*), mas, no geral, a doença afeta todos os órgãos da planta. As folhas podem apresentar deformações com distribuição anormal das nervuras e os ramos podem apresentar tamanho irregular (encurtamento dos entre-nós) e super brotação [desenvolvimento de múltiplos ramos secundários em um único nó (gema)] (Figura 3) (FAJARDO, 2015).



Figura 5. Malformação infecciosa ou doença dos entrenós curtos em videira: tamanho irregular, desenvolvimento de ramos secundários (A e B) e ramo sadio (C). Foto: Sandoz (A); Kuhn (B); Sousa (C). Fonte: Kuhn; Fajardo et al. (2003); Costa (2005).

A mancha das nervuras (“*Fleck disease*”) é amplamente relatada em diversos países, onde, em geral, os genótipos porta-enxerto são assintomáticos. Os sintomas associados a essas doença são manchas cloróticas e translúcidas, irregulares, que acompanham a posição das nervuras (Figura 4). Sua propagação esta relacionada apenas com o material propagativo (ramos vegetais) infectados (LIMA, 2009; BASSO et al., 2017).



Figura 6. Folhas do porta-enxerto de videira *Rupestris* do Lot afetado pela virose da mancha das nervuras (B) e sadia (A). Foto: Kuhn. Fonte: Fajardo et al. (2003).

A infecção causada pelos vírus GVA e GVB, entre outros, conhecida como lenho rugoso (“*Rugose wood complex*”) é bastante complexa, pois estão associados quatro doenças com sintomas relacionados a anomalias que aparecem no lenho: intumescimento do caule (‘*Carky bark*’), associada ao GVB; caneluras do tronco de *Rupestris* (‘*Rupestris stem pitting*’), associada ao *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV); acanaladura do lenho de Kober (‘*Kober stem grooving*’), associada ao GVA e acanaladura do lenho de

LN 33 ('LN 33 stem grooving'), o qual ainda não foi identificado o agente causal.

Os sintomas característicos são deformações no cilindro lenhoso da planta e fissuras ao longo do lenho, afetando o fluxo de água e nutrientes (Figura 5), podendo causar também vermelhidão que aparecem nas folhas, ocorre indução de casca na região dos entre-nós, incompatibilidade durante enxertia, brotações tardias, entre outros (LIMA, 2009; BASSO et al., 2017).



Figura 7. Corte transversal do tronco de muda de videira (cv. Itália) exibindo engrossamento da casca e reentrâncias típicas das caneluras do tronco (A); Retirando-se a casca, observa-se detalhe do lenho com caneluras (B) e aspecto normal do lenho em videira com tronco sadio (C). Foto: Fajardo. Fonte: Fajardo; Nickel (2003).

A necrose das nervuras (*“Vein necrosis disease”*) pode ser transmitida através do material propagativo infectado. Essa doença já foi relatada no Brasil, sendo verificada incidência diferenciada nas uvas de vinho, porta-enxertos e uvas comuns, 70,8 %, 46 % e 34,4 %, respectivamente. É conhecida nas principais regiões produtoras de uva do mundo.

Na Itália, por exemplo, foi verificada frequência de até 80 % em clones de videira selecionados nas Regiões Central e Sul (FAJARDO et al., 2003). Os sintomas estão relacionados à morte das nervuras (Figura 6), principalmente as nervuras secundárias e terciárias, mesmo ainda não tendo sido identificado o agente causal, acredita-se que a doença é causada por um vírus (LIMA, 2009).



Figura 8. Planta de videira no campo com folha basal com sintoma (A); detalhe das nervuras necrosadas (B), porta-enxerto R110 afetado pela necrose das nervuras. Foto: Kuhn. Fonte: Fajardo et al. (2003).

O vírus do mosaico cromático (GCMV) causa uma infecção que pode reduzir o vigor das plantas e conseqüentemente matar as videiras. A infecção interfere no metabolismo de nitrogênio das folhas nas plantas infectadas (Jakó et al., 1966), refletindo na alteração do pigmento foliar (Figura 7) e afetando os teores de açúcar (Jakó et al., 1968), pode também diminuir a fixação fotossintética de dióxido de carbono (Pozsár et al., 1969), o que resulta em perdas na colheita que podem chegar a 70% (Lehoczky e Tasnady, 1971).

Os sintomas causados pelo vírus estão associados ao atrofiamento das plantas, diminuição no crescimento e menor vigor. Ocorre mal formação das folhas, com desenvolvimento assimétrico e aparecimento de manchas cloróticas, além disso, os ramos também são afetados, ocorrendo bifurcações, nós duplos, entre outros.

Em alguns casos, a folhagem de um ramo pode apresentar-se descolorida, enquanto que nos demais ramos a coloração normal das folhas permanece conservada. As videiras infectadas, em geral, perdem o vigor progressivamente, levando à baixa fertilidade das gemas para formação dos ramos e frutos e, por fim, morte das plantas (Sarospataki, 1965; Lehoczky, 1966; Martelli et al., 1966). Um isolado do vírus está associado aos sintomas da veia amarela em *Apium graveolens* (Hollings, 1965).



Figura 9. Sintomas de campo do GCMV. Vírus do mosaico cromático da videira (GCMV): Descoloração amarela brilhante da folhagem mostrada na primavera por uma videira infectada com GCMV. (G.P. Martelli),

2.3. Teste ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

Diversos métodos sorológicos e baseados em ácidos nucleicos são utilizados para a detecção de vírus. Entretanto, métodos baseados em ácidos nucleicos como RT-PCR têm limitações para triagem em larga escala devido ao seu alto custo, necessidade de mão de obra qualificada e laboratório bem equipado e com instalações de boa qualidade (FAJARDO et al., 2007; RAI et al., 2018). Por outro lado, métodos sorológicos como ELISA e suas variantes são eficientes e confiáveis, e têm sido amplamente utilizados para triagem rápida e em grande escala de videiras infectadas (ABOU GHANEM-SABANADZOVIC et al., 2012; KUMAR et al., 2015).

O teste ELISA está entre os métodos mais indicados para detecção e identificação de vírus. É um método sorológico baseado na reação anticorpo-antígeno, em que o antígeno é reconhecido por um anticorpo (imunoglobulina) específico, formando o complexo anticorpo-antígeno, associado a propriedades colorimétricas, em que a reação é específica para cada vírus (ENGEL et al., 2010). Esse método é muito sensível, podendo detectar entre 20 a 100 ng de partículas virais com boa precisão, além de apresentar-se como um teste bastante prático, sendo largamente utilizado em muitos estudos de detecção viral em videira.

Tendo em vista que os vírus se distribuem de forma irregular dentro da planta, a coleta do material para uso na detecção de vírus é uma importante etapa. Assim, é necessário considerar o estágio fenológico da planta e o tipo

de tecido a ser coletado, a fim de possibilitar a maior concentração do fitopatógeno no material a ser analisado. Os tecidos coletados, como pecíolos e nervuras, são utilizados como fonte de antígenos para GLRaVs, GVA e GVB, e, para GFLV e GFkV, o material utilizado como fonte de antígeno é a partir de folhas novas (LIMA, 2009). Atualmente, é possível encontrar anticorpos produzidos de forma comercial para diversos vírus, que podem ser adquiridos de forma individual (especificando o vírus) ou o kit com mais de um anticorpo para diferentes vírus.

Os resultados obtidos com o teste ELISA são rápidos, de 24 a 48h, sendo de uma maneira geral as amostras consideradas positivas para a presença de vírus quando o valor da leitura (leitura da absorbância utilizando espectrofotometria com 405 nm de comprimento de onda) é duas vezes superior aquele do extrato da planta sadia (controle negativo) (Figura 7), ou de acordo com o Protocolo do teste utilizado.

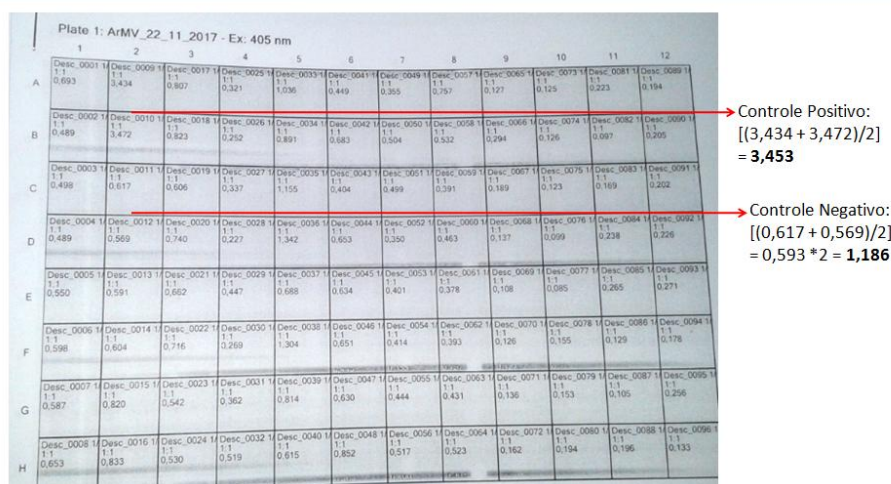


Figura 10. Resultado de teste ELISA em amostra de videira com leitura 3h após a reação do substrato paranitrofenilfosfato na placa com complexo antígeno/anticorpo do ArMV (leitora ELISA com filtro 405 nm de comprimento de onda).

2.4. Cultivo *in vitro*

Levando-se em consideração que a videira é propagada, essencialmente, por propagação vegetativa, que apesar de proporcionar inúmeros benefícios, como a conservação de características genóticas,

apresenta como desvantagem a perpetuação de patógenos, dentre eles, principalmente os vírus (DÓRIA et al., 2011). Assim, em alternativa à propagação vegetativa convencional, a micropropagação, técnica pertencente às práticas de cultura de tecidos vegetais, tem ganhado papel de suma importância na propagação de algumas espécies vegetais.

A cultura de tecidos vegetais apóia-se no fenômeno da totipotência celular, o qual foi descrito no início do século XX por Haberlandt, que possibilitou o desenvolvimento de técnicas de cultivo *in vitro* (BARRUETO CID, 2001). A totipotência das células vegetais baseia-se na capacidade da célula para reproduzir uma planta completa, com todas as características e funções orgânicas da planta original, para tanto, é necessário que se proporcione condições nutricionais e ambientais adequadas (TORRES et al., 1998; KERBAUY, 1999).

A partir do cultivo *in vitro* das células vegetais a totipotência da célula pode ocorrer por meio da organogênese (a diferenciação celular resulta na formação de órgãos) (Figura 8) ou por meio da embriogênese somática (a diferenciação celular resulta no desenvolvimento de embriões (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PERES, 2002).



Figura 11. Plantas de *Solanum lycopersicum* regeneradas de folhas com calos e mantidas em meio MS de Murashigue e Skoog (1962) suplementado com o fitohormônio cinetina (citocinina). Fonte: Coutinho Neto; Silva; Gonçalves (2017).

Na cultura de tecidos vegetais é essencial a utilização de métodos de fitossanidade, como por exemplo, os métodos baseados no uso de termoterapia ou cultura de meristema, associados ou não, principalmente nos

processos de certificação de qualidade de mudas, especialmente para clones ou cultivares de alto valor (ALMEIDA et al. 2013). O estabelecimento de protocolos de micropropagação de espécies lenhosas a partir de explantes oriundos de plantas germinadas *in vitro* é mais viável sob o ponto de vista fisiológico e experimental, devido ao estágio juvenil e capacidade de maior resposta *in vitro*, possibilitando a condução de inúmeros experimentos (GRATAPAGGLIA e MACHADO, 1998). Além disso, a obtenção de explantes assépticos resolve problemas como a dificuldade de desinfestar material vegetal e a baixa resposta morfogênica dos tecidos arbóreos adultos (GRIGOLETTO, 1997).

De modo geral, a micropropagação de videiras consiste no processo de enraizamento de brotações axilares ou adventícias multiplicadas *in vitro*, para a regeneração de plantas inteiras (BIASI et al., 1998). Esse processo possibilita a rápida multiplicação de plantas, a obtenção de plantas-matrizes livres de vírus, a propagação de híbridos e a preservação de germoplasmas de interesse (KRUL e MOWBRAY, 1984).

É possível verificar na literatura que os explantes normalmente utilizados são os segmentos nodais, que possuem apenas uma gema lateral com uma pequena porção dos tecidos adjacentes – caule e pecíolo (GRIBAUDO e FRONDA, 1991; BIASI, et al., 1998; NALI et al., 2008), ápices meristemáticos, constituídos apenas pelos ápice caulinar ou ápice das brotações laterais (CHÉE e POOL, 1982; YU e MEREDITH, 1986) e meristemas, os quais são retirados das gemas (tecido ainda não diferenciado) (PASSOS et al., 1985; TRONCOSO et al., 1988; KORUZA e JELASKA, 1993).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta do Material para propagação

Em julho de 2017 foram coletadas estacas lenhosas de 50 cultivares [29 cultivares de uvas de mesa (Tabela 2) e 21 cultivares de uvas de vinho (Tabela 3)] do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Semiárido da Estação Experimental de Mandacaru em Juazeiro-BA, cujas coordenadas geográficas são 9°24”S, 40°26”O e 365,5 m de altitude. O clima é classificado de acordo com Köeppen, como BswH, que corresponde à região semiárida muito quente. Foram coletadas de quatro a cinco estacas de cada cultivar, cada estaca contendo quatro gemas.

Tabela 2. Cultivares de videira de mesa/processamento provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido.

A1118	Concord Clone
A1581	Feal
IAC 77526 'Aurora'	Fiesta
Beauty Seedless	Flame Seedless
Cardinal	Italia Clone 1
Centennial Seedless	Italia Melhorada
CG 102024 Dacari	July Muscat
CG 28.467 'Emperatriz'	Jupiter
CG 33.716	Loose Perlette
CG 39.915	Muscatel Caillaba
CG 40016 Damarim	Paulistinha
CG 4113	Perlette
CG 87.746	Ruby Seedless
CG 87.908	Saturn
Christmas Rose	

Tabela 3. Cultivares de videira de vinho/processamento provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido.

Alfrocheiro	Moscatel Nazareno
Barbera	Moscato Canelli
Carbenet Franc	Moscatuel CG 102295
Carmenère	Muscat Noir
Colombard	Muscat Saint Vallier
Dawn Seedless	Petit Verdot
IAC 0021-14 Madalena	Rainha
IAC 138-22 (Máximo)	Tinta Roriz
Moscatel BRANCA	Syrah
Moscatel de Hamburgo	Micheli Palieri
Moscatel Grega	

As estacas foram tratadas com solução à base de fungicida em conjunto com um inseticida, para promover a desinfestação do material vegetativo antes do plantio, que foi realizado em vasos plásticos contendo substrato composto de 25% de vermiculita, 50% de areia fina, e 25% de húmus.

Após o plantio os vasos permaneceram em casa de vegetação (Figura 9), pertencente ao Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido em Petrolina-PE, sendo irrigados manualmente uma vez ao dia.



Figura 12. Estacas lenhosas provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Videira da Embrapa Semiárido 18 dias após o plantio em vasos plásticos contendo substrato composto de 25% de vermiculita, 50% de areia fina, e 25% de húmus.

3.2. Coleta do material vegetal

Aos 90 dias após o plantio foram coletadas 6 folhas de cada genótipo (3 folhas basais consideradas folhas velhas e 3 folhas apicais consideradas folhas novas) juntamente com os pecíolos. As mesmas foram identificadas e colocadas em sacos plásticos (Figura 10), ao final da coleta foram levadas ao laboratório de Biotecnologia onde foram armazenadas em Ultrafreezer a $-83\text{ }^{\circ}\text{C}$, para conservação até a realização da extração das amostras.



Figura 13. Folhas de videira identificadas e armazenadas em sacos plásticos para conservação em ultrafreezer.

3.3. Processamento do Material para extração do RNA

As folhas foram cortadas com o auxílio de um bisturi, separando-se o limbo foliar das nervuras (Figura 11).



Figura 14. Processamento da folha de videira para análise de vírus: folha velha inteira (A) e separação do limbo foliar das nervuras e do pecíolo (B).

Após os cortes, o material foi armazenado em sacos de papel, identificados como pecíolo velho (PV) (material correspondente as nervuras mais pecíolos retirados das folhas velhas) e limbo novo (LN) (material correspondente ao limbo foliar retirado das folhas novas) de acordo com o Protocolo do Kit Agritest para o ensaio de ELISA (Fonte: **KIT AGRITEST - PLANT HEALTH MANAGEMENT**).

A primeira etapa do ensaio consistiu na maceração do tecido vegetal em almofariz com auxílio de um pistilo e adição de nitrogênio líquido, logo após, adicionou-se o tampão de extração (TRIS-HCl-37,2 g; TRIS-base-32g; NaCl-8g; PVP MW 24000-20 g; PEG MW 6000-10g; NaN₃-0,2 g; Tween 20-0,5 mL) 3 mL da solução (Figura 12), e homogeneizou-se com o pistilo para, em seguida, filtrar o material com gaze em microtubos tipo Eppendorf de 2 mL identificado de acordo com a respectiva amostra. Ao final o material foi mantido em freezer a -20 °C até a continuação do ensaio.



Figura 15. Material de videira para extração (A): maceração com nitrogênio líquido em almofariz com auxílio de um pistilo e adição (B) e adição de 3 mL de solução do tampão de extração.

3.4. Detecção de vírus através do teste ELISA

Seguindo a ordem da sequência do Protocolo Agritest, 10 placas de Microtitulação 96 Poços Fundo V Estéreis (uma para cada vírus) foram separadas e identificadas de acordo com cada um dos 10 vírus testados (Figura 13).

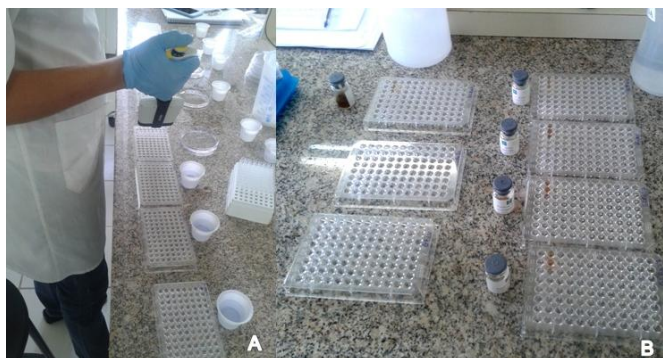


Figura 16. Placas de Microtitulação 96 Poços (uma para cada vírus). Revestimento das placas com auxílio de micropipeta multicanal (A) e distribuição dos Controles Positivos (B).

Seguiu-se o protocolo para o revestimento das placas, de acordo com a recomendação do fabricante para cada tipo ou grupo de vírus, conforme descrito a seguir:

Placa do **GVA**:

I. Revestimento com **proteína A** (foram diluídos 10 μ L da **proteína** em 10 mL da solução de revestimento e distribuídos 100 μ L em cada poço da placa. Após, a placa foi incubada em estufa a 37 °C por 2 h, seguida de 3 lavagens com solução de lavagem pertencente ao kit – PBS; Tween 20;

II. Revestimento com **anticorpo específico** (foram diluídos 10 μ L do **anticorpo** em 10 mL da solução de revestimento e distribuídos 100 μ L em cada poço da placa. Após, a placa foi incubada em over night a 6 °C em geladeira. Em seguida a placa foi lavada 3 vezes com solução de lavagem);

III. Distribuição das amostras (previamente retiradas do freezer para o descongelamento, distribuídos 100 μ L em cada poço da placa), sendo também distribuídos 100 μ L dos Controles Positivo e Negativo (Figura 14), e revestimento com **anticorpo conjugado específico** (10 μ L do **anticorpo específico** em 10 mL da solução de **conjugado** (100 μ L em cada poço da placa). Após, a placa foi incubada em estufa a 37 °C por 2 h, seguida de 3 lavagens com solução de lavagem pertencente ao kit);

IV. Aplicação do **substrato com p-nitrofenilfosfato (PNPP 1 mg/mL)** também distribuídos 100 μ L da solução de PNPP por poço; e

V. leituras e interpretação dos resultados.



Figura 17. Aplicação de amostras e controles para o teste ELISA para detecção de vírus em videira. Distribuição dos Controles Positivo e Negativo (A) e distribuição das amostras, placa completa (B).

Placa do **GVB**:

I. Revestimento com a distribuição dos Controles Positivo e Negativo e das amostras, sendo distribuídos 150 μL por poço (a placa foi incubada em over night a 6 $^{\circ}\text{C}$ em geladeira, seguida de 3 lavagens com solução de lavagem pertencente ao kit);

II. Revestimento com **anticorpo específico** monoclonal (foram diluídos 15 μL do **anticorpo específico** em 15 mL da solução de **conjugado** e distribuídos 150 μL em cada poço da placa. Após, a placa foi incubada em estufa a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 2 h, em seguida a placa foi lavada 3 vezes com a solução de lavagem);

III. Revestimento com **anticorpo específico** (foram diluídos 15 μL do **anticorpo específico** em 15 mL da solução de **conjugado** e distribuídos 150 μL em cada poço da placa. Após, a placa foi incubada em estufa a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 2 h, seguida de 3 lavagens com solução de lavagem pertencente ao kit);

IV. Aplicação do **substrato com p-nitrofenilfosfato (PNPP 1 mg/mL)** também distribuídos 150 μL da solução por poço; e

V. leituras e interpretação dos resultados.

Placa do **GFKV**:

I. Revestimento com **anticorpo específico** (foram diluídos 15 μL do **anticorpo** em 15 mL da solução de revestimento e distribuídos 150 μL em

cada poço da placa. Após, a placa foi incubada em estufa a 37 °C por 2 h, em seguida a placa foi lavada 3 vezes com a solução de lavagem);

II. Distribuição dos Controles Positivo e Negativo e das amostras. Foram distribuídos 150 µL por poço (a placa foi incubada em over night a 6 °C em geladeira, seguida de 3 lavagens com solução de lavagem pertencente ao kit);

III. Revestimento com **anticorpo específico** (foram diluídos 15 µL do **anticorpo específico** em 15 mL da solução de **conjugado** e distribuídos 150 µL em cada poço da placa. Após, a placa foi incubada em estufa a 37 °C por 2 h, em seguida a placa foi lavada 3 vezes com a solução de lavagem);

IV. Revestimento com **anticorpo específico** (foram diluídos 15 µL do **anticorpo específico** em 15 mL da solução de **conjugado** e distribuídos 150 µL em cada poço da placa. Após, a placa foi incubada em estufa a 37 °C por 2 h, seguida de 3 lavagens com solução de lavagem pertencente ao kit);

V. Aplicação do **substrato com p-nitrofenilfosfato (PNPP 1 mg/mL)** também distribuídos 150 µL da solução por poço; e

VI. leituras e interpretação dos resultados.

Placas individuais para **ArMV, GCMV, GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3 e GLRaV-7:**

I. Revestimento com **anticorpo específico** (foram diluídos 15 µL do **anticorpo** em 15 mL da solução de revestimento e distribuídos 150 µL em cada poço da placa. Após, a placa foi incubada em estufa a 37 °C por 2 h, em seguida a placa foi lavada 3 vezes com a solução de lavagem);

II. Distribuição dos Controles Positivo e Negativo e das amostras. Foram distribuídos 150 µL por poço (a placa foi incubada em over night a 6 °C em geladeira, seguida de 3 lavagens com solução de lavagem pertencente ao kit); Revestimento com anticorpo específico;

III. Revestimento com **anticorpo conjugado específico** (foram diluídos 15 µL do **anticorpo específico** em 150 mL da solução de **conjugado** e distribuídos 150 µL em cada poço da placa. Após, a placa foi incubada em

estufa a 37 °C por 2 h, seguida de 3 lavagens com solução de lavagem pertencente ao kit);

IV. Aplicação do **substrato com p-nitrofenilfosfato (PNPP 1 mg/mL)** também distribuídos 150 µL da solução de PNPP por poço; e

V. leituras e interpretação dos resultados.

Para leitura da absorbância utilizou-se um leitor de microplacas Multiskan Go (Thermo Scientific) com 405 nm de comprimento de onda (Figura 15). As amostras com absorbância duas vezes maior que a média dos Controles Negativos foram consideradas como positivas para a presença do vírus.



Figura 18. Leitor de microplacas Multiskan Go (Thermo Scientific).

3.5. Cultivo *in vitro* de meristemas apicais e nodais

Após a identificação das cultivares portadoras de vírus realizou-se a coleta das gemas apicais e nodais, a partir das cultivares cultivadas na casa de vegetação. Para tanto, em janeiro 2018 os ramos desenvolvidos e amadurecidos de todos as cultivares foram podados para proporcionar novas brotações e formar novos ramos, originando mais um ciclo de brotações submetidas à temperatura de 35 ± 2 °C (termoterapia realizada em câmara de crescimento - Fitotron). 60 dias após a poda realizou-se a coleta do material vegetativo (gemas apicais e nodais) para a obtenção dos explantes (para evitar a propagação de patógenos no material, dois dias antes da coleta realizou-se a aplicação de Kasumin a 1% nos vasos - 50 mL, e pulverização nas folhas).

Foram coletadas nove gemas apicais e 18 gemas nodais de cada cultivar, para o estabelecimento (primeira fase do cultivo *in vitro*) (Figura 16). Assim, os tratamentos foram constituídos por diferentes cultivares de videira: 18 cultivares de uvas de mesa/processamento, com três repetições cada, cada repetição com 3 tubos de ensaio para gemas apicais e seis tubos por repetição para as gemas nodais, totalizando 162 explantes de gemas apicais e 324 explantes de gemas nodais; e 12 cultivares de uvas de vinho/processamento, também com três repetições por cultivar, totalizando 108 explantes de gemas apicais e 216 explantes de gemas nodais.



Figura 19. Fonte de explantes obtidos a partir de plantas de videira cultivadas em casa de vegetação. Gema apical (A) e gema nodal (B).

O material coletado foi acondicionado em potes de plástico transparente e fechados com tampa para posterior transporte até o Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido. Em ambiente asséptico (câmara de fluxo laminar) os potes contendo o material foram desinfestados com álcool 70% por 1 minuto; solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% por 20 minutos, sob agitação constante, seguida de três lavagens com água destilada esterilizada.

A obtenção dos explantes foi realizada com o auxílio de tesouras de procedimento e pinça, esterilizados em esterilizador elétrico a 250 °C, através do corte das gemas, retirando-se as partes vascularizadas (com vasos condutores formados), deixando-se apenas o meristema ($\pm 0,5$ mm de tecido) (Figura 17), e após a regeneração as plantas obtidas foram segmentadas e suas porções nodais (0,8 a 1 cm) usadas para novas inoculações nas fases de multiplicação.

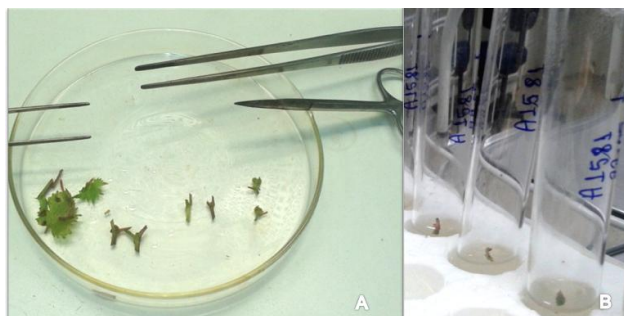


Figura 20. Inoculação dos explantes (meristemas) de videira em tubo de ensaio. Cortes para separação dos meristemas (A) e inoculados nos tubos (B).

O meio de cultura utilizado foi o meio GALZY (1964), suplementado com reguladores de crescimento 6-Benzilaminopurina (BAP) e ácido indolacético (AIA) em fases distintas, estabelecimento e multiplicação, respectivamente. O meio foi distribuído em tubos de ensaio medindo 3,0 cm de diâmetro por 12,0 cm de comprimento, sendo 10 mL de meio de cultura/tubo, que foram esterilizados em autoclave durante 20 minutos a 121 °C e uma atmosfera de pressão (1kg/cm²).

O estabelecimento ocorreu durante 45 dias e a multiplicação foi realizada três vezes com intervalos de aproximadamente 45 dias cada: primeira multiplicação - 45 dias, segunda multiplicação: 90 dias e a terceira multiplicação - 120 dias após a inoculação referencial (estabelecimento). A terceira multiplicação foi realizada em potes de plástico contendo 50 mL de meio de cultura/pote, que foram fechados com tampa própria também de plástico transparente. Nesse caso, foi inoculado um explante (meristema) por tubo de ensaio (estabelecimento e primeira e segunda multiplicação) e 4 explantes por pote (terceira multiplicação).

As etapas do experimento foram organizadas em fases do cultivo *in vitro*: **I** – estabelecimento dos meristemas em meio Galzy (1964), suplementado com 1 mg.L⁻¹ de BAP (os meristemas permaneceram em meio suplementado com BAP por cerca de 20 dias, após esse tempo foram transferidos para tubos com meio suplementado com 2 mg.L⁻¹ de AIA; **II** - 1ª repicagem (multiplicação - segunda fase do cultivo aos 45 dias após a inoculação) em meio Galzy, suplementado com 2 mg.L⁻¹ de AIA; 2ª repicagem – multiplicação em meio Galzy suplementado com 2 mg.L⁻¹ de AIA, 90 dias após a inoculação; 3ª repicagem - multiplicação 120 dias após a inoculação em potes de plástico

contendo 50 mL meio Galzy, suplementado com 2 mg.L^{-1} de AIA, e III aclimatização das plantas regeneradas (165 dias após a inoculação) em copos descartáveis (uma planta por copo) contendo areia e vermiculita na proporção 2:1 (v/v) (Figura 18). Os copos foram fechados com copos descartáveis transparentes perfurados para proporcionar um microclima para as plantas, diminuindo a perda de água por transpiração.

Durante a fase de cultivo *in vitro* os tubos e potes permaneceram em ambiente controlado (Figura 19) sob temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas de luz com lâmpadas brancas fluorescentes e umidade relativa de 80%.



Figura 21. Aclimatização das plantas de videira regeneradas a partir do cultivo *in vitro* de meristemas: potes 165 dias após a inoculação (A) e copos descartáveis com areia e vermiculita (B).



Figura 22. Sala de cultivo (ambiente controlado) *in vitro* de tecidos vegetais do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido.

Foram selecionadas para aclimatização as plantas bem desenvolvidas (com boa formação da parte aérea e da raiz), com número de gemas maior que quatro e deixando-se de 3 a 4 folhas no ápice da planta. Após o período de aclimatização, as plantas sobreviventes foram levadas para a casa de

vegetação, onde permaneceram até a coleta de folhas para verificação da possível presença de vírus após o cultivo *in vitro*.

As plantas foram mantidas em ambiente controlado, sob temperatura de 25 a 27 °C e fotoperíodo de 16 horas de luz com lâmpadas brancas fluorescentes durante 7 dias. Após esse período, foram transferidas para bancada interna do Laboratório de Biotecnologia, permanecendo em temperatura ambiente por mais 7 dias até serem transferidas para a casa de vegetação.

Ao final de cada fase foram contabilizados o número de explantes regenerados, porcentagem de explantes regenerados e número de gemas formadas por explante regenerado. Para a análise estatística, os dados foram transformados em $x^{0.5}$ e os resultados obtidos, quando significativos, tiveram as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade com auxílio do Software Sisvar 5.6.

4. RESULTADOS

4.1. Detecção de vírus

Foram detectadas sete espécies virais nas 50 cultivares analisadas (29 cultivares – uva de mesa e 21 cultivares – uva de vinho). Observou-se reação positiva para a presença de seis vírus (GVA, GVB, GLRaV1, GLRaV2, ArMV e GFLV) em 18 cultivares das uvas de mesa (Tabela 4), sendo nove infecções simples (apenas um vírus infectando a mesma planta) e nove infecções mistas (mais de um vírus infectando a mesma planta). Entre as cultivares de uva de vinho, detectou-se a presença de sete espécies virais (GVA, GVB, GLRaV1, GLRaV2, ArMV, GFLV e GCMV) (Tabela 5), sendo 5 infecções simples e sete infecções com dois ou mais vírus.

Tabela 4. *Detecção de vírus em cultivares de uva de mesa provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido submetidos ao Teste ELISA.

	GVA	GVB	GLRaV1	GLRaV2	GLRaV3	GLRaV7	GFKV	ArMV	GFLV	GCMV
A1118	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1581	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IAC 77526 'Aurora'	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
Beauty Seedless	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Cardinal	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
CG 28.467 'Emperatriz'	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CG 39.915	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CG 87.746	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
Christmas Rose	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
Feal	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
Fiesta	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flame Seedless	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
Italia Melhorada	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Jupiter	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muscatel Caillaba	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Paulistinha	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Perlette	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Ruby Seedless	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-

*Tabela resumida.

Com isso, das cultivares de **uva de mesa** observou-se que 62,1% encontram-se infectados por vírus, sendo deste total 50% com infecção simples e 50% com infecção mista, em que o vírus de maior frequência o **GLRaV2** ocorreu em nove cultivares em infecção mista: quatro cultivares (IAC 77526 'Aurora', Cardinal, CG 87.746 e Flame Seedless) com ArMV e GFLV; uma cultivar (Christmas Rose) com o ArMV e GLRaV1, uma cultivar (Feal) com o ArMV e GVB, duas cultivares: Itália Melhorada e Perlette (com o GFLV) e uma (Ruby Seedless) com o GVA.

O segundo vírus mais frequente observado foi o **GVA** que aparece em oito cultivares (A1118, A1581, CG 28.467 'Emperatriz', Fiesta, Jupiter, Muscatel Caillaba e Paulistinha) em infecção simples e em uma cultivar (Ruby Seedless) em infecção mista com o GLRaV2. Observou-se a presença de **GFLV** em sete cultivares: uma infecção simples na cultivar Beauty Seedless, quatro infecções mistas com GLRaV2 e ArMV nas cultivares: IAC 77526 'Aurora', Cardinal, CG 87.746 e Flame Seedless, e duas infecções mistas como GLRaV2 nas cultivares Itália Melhorada e Perlette.

Tabela 5. *Detecção de vírus em cultivares de uva de vinho provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido utilizando submetidos ao Teste ELISA.

	GVA	GVB	GLRaV1	GLRaV2	GLRaV3	GLRaV7	GFKV	ArMV	GFLV	GCMV
Alfrocheiro	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
Barbera	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-
Carbenet Franc	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Carmenère	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
IAC 138-22 (Máximo)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Moscatel Branca	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Moscatel Grega	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Moscatuel CG 102295	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
Muscat Noir	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muscat Saint Vallier	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
Syrah	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Micheli Palieri	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-

*Tabela resumida

O **ArMV** foi identificado em seis cultivares com infecção mista, sendo quatro (IAC 77526 'Aurora', Cardinal, CG 87.746 e Flame Seedless) com GLRaV2 e GFLV, uma cultivar (Christmas Rose) com GLRaV1 e GLRaV2, e uma cultivar (Perlette) com GVB e GLRaV2. Os vírus com menor frequência observada foram **GLRaV1** (na cultivar Feal, com infecção mista) e **GVB** (na cultivar Ruby Seedless, também com infecção mista).

Para as cultivares de **uva de vinho** observou-se que 57,2% dos genótipos analisados encontravam-se infectados por vírus, sendo deste total 41,7% de infecção simples e 58,3% de infecção mista. Neste caso, o **GLRaV2** foi também o vírus de maior frequência quando comparado com as uvas de mesa, ocorrendo em sete cultivares com infecção mista: três cultivares (Alfrocheiro, Moscatuel CG 102295 e Muscat Saint Vallier) com ArMV e GFLV; uma cultivar (Barbera) com o GVB, ArMV e GFLV; uma cultivar (Cabernet Franc) com ArMV, GFLV e GCMV, uma cultivar (Carmenére) com GLRaV1, ArMV e GFLV, e uma cultivar (Micheli Palieri) com GVA.

Os vírus **GVA**, **GFLV** e **ArMV**, foram identificados em seis cultivares. O GFLV foi observado em três cultivares (Alfrocheiro, Moscatuel CG 102295 e Muscat Saint Vallier) em infecção mista com ArMV e GLRaV2; uma cultivar (Barbera) com o GVB, ArMV e GLRaV2; uma cultivar (Cabernet Franc) com ArMV, GLRaV2 e GCMV e uma cultivar (Carmenére) com GLRaV1, ArMV e GLRaV2. Para o GVA, foram observados cinco cultivares (IAC 138-22 'Máximo', Moscatel Branca, Moscatel Grega, Muscat Noir e Syrah) com infecção simples e uma cultivar (Micheli Palieri) em infecção mista com GLRaV2. Para o ArMV foram observadas três cultivares (ALFROCHEIRO, Moscatuel CG 102295 e Muscat Saint Vallier) em infecção mista com GFLV e GLRaV2; uma cultivar (Barbera) com o GVB, GFLV e GLRaV2; uma cultivar (Cabernet Franc) com GFLV, GLRaV2 e GCMV e uma cultivar (Carmenére) com GLRaV1, GFLV e GLRaV2.

Os vírus de menor frequência observada foram **GLRaV1** (na cultivar Carmenére, em infecção mista), **GVB** (na cultivar Barbera, também em infecção mista), quando comparados com as uvas de mesa, e **GCMV** (na cultivar Cabernet Franc, também em infecção mista).

As cultivares de mesa apresentaram maior porcentagem de infecção (62,1%) que os genótipos para vinho (57,2%), no entanto, as últimas, apresentaram maior porcentagem de infecção mista (58,3%) quando comparadas as uvas de mesa (50%). Das 50 cultivares avaliadas, verificou-se a presença de vírus em 60%, sendo que 28% dos genótipos apresentaram infecção simples e 32% apresentaram infecção mista. O GVA e o GLRaV-2 apresentaram as maiores porcentagens de infecção, 31% nas uvas de mesa e 28,6% e 33,3% nas uvas de vinho. Para o GFLV e ArMV detectaram-se suas presenças em 20,7% e 24,1% nas uvas de mesa e 28,6% de infecção nas uvas de vinho. Os vírus detectados em menores porcentagens foram GVB, GLRaV-1 com 3,4% nas uvas de mesa e 4,8% de infecção nas uvas de vinho, e GCMV com 4,8% somente nas uvas de vinho.

4.2. Cultivo *in vitro* de meristemas

Das 18 cultivares de uvas de mesa utilizadas para obtenção dos explantes do tipo meristemas apicais inoculados em meio de cultura para o cultivo *in vitro*, observou-se capacidade regenerativa em plantas de 10 cultivares (Tabela 6). Dessa forma, somente essas 10 cultivares foram analisadas na fase de estabelecimento (inoculação inicial - citada mais à frente apenas como inoculação), permitindo, assim, que os mesmos, fossem repicados para a multiplicação, fase seguinte do cultivo.

Tabela 6. Estabelecimento *in vitro* de videiras para mesa provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas apicais de cultivares de uvas de mesa. Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

	ESTABELECIMENTO		
	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.
A1118	9	3 c	5 e
A1581	9	3 c	8 e
IAC 77526 'Aurora'	9	0 d	0 f
Beauty Seedless	9	5 b	13 d
Cardinal	9	0 d	0 f
CG 28.467 'Emperatriz'	9	6 b	9 e
CG 39.915	9	9 a	12 d
CG 87.746	9	6 b	12 d
Christmas Rose	9	0 d	0 f
Feal	9	0 d	0 f
Fiesta	9	6 b	30 b
Flame Seedless	9	0 d	0 f
Italia Melhorada	9	0 d	0 f
Jupiter	9	9 a	60 a
Muscatel Caillaba	9	3 c	18 c
Paulistinha	9	9 a	32 b
Perlette	9	0 d	0 f
Ruby Seedless	9	0 d	0 f
TOTAL	162	59	199

As cultivares regeneradas, no entanto, apresentaram aspectos diferentes em relação a quantidade de explantes regenerados e ao número de gemas formados. Visualmente, observou-se o aspecto das folhas e o tamanho entre os entre-nós nas plantas regeneradas, identificando-se diferença entre as cultivares para esses aspectos, sendo que algumas espécies apresentaram plantas bem formadas (com parte aérea e raízes de tamanhos correspondentes), como as cultivares Fiesta e Paulistinha, e outras apresentaram plantas mal formadas (folhas muito pequenas e de aspecto vítreo, além de não desenvolver raízes), como as cultivares A1581 e CG 28.467 'Emperatriz' (Figura 20).

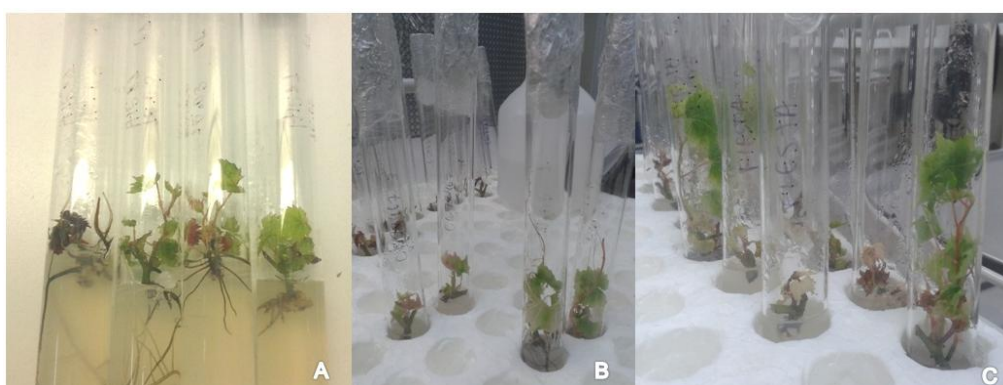


Figura 23. Plantas de uvas para mesa regeneradas a partir do cultivo in vitro de meristemas apicais (segunda multiplicação): A1581 (A), CG 28.467 'Emperatriz' (B) e Fiesta (C).

Foi observado resultado significativamente superior aos demais para as cultivares CG 39.915, Jupiter e Paulistinha que apresentaram maior número de explantes regenerados (9), obtendo-se 100 % de regeneração, seguidas por: CG 28.467 'Emperatriz' (6), CG 87.746 (6), Fiesta (6) e Beauty Seedless (5), observando-se 66,7% de regeneração para as três primeiras, e 55,6% para a última cultivar.

As cultivares A1118, A1581 e Muscatel Caillaba obtiveram três explantes regenerados cada, representando 33,3% de regeneração. As cultivares que não apresentaram regeneração dos explantes inoculados foram: IAC 77526 'Aurora', Cardinal, Christmas Rose, Feal, Flame Seedless, Itália Melhorada, Perlette e Ruby Seedless. Para o número de gemas (nós) formadas, observou-se que a cultivar Jupiter obteve número significativamente maior (60 gemas)

que as demais, seguida das cultivares Fiesta e Paulistinha, que diferem entre si em número de explantes regenerados, mas não diferem em número de gemas formadas tendo 30 e 32 gemas, respectivamente. Em seguida observa-se que CG 87.746 (12 gemas), CG 87.746 (12 gemas) e Beauty Seedless (13 gemas) também não diferem entre si. A1118, A1581 e CG 28.467 'Emperatriz' representam o grupo de cultivares com menor número de gemas formadas, com valores de cinco, oito e nove gemas, respectivamente.

Na primeira multiplicação, que ocorreu 45 dias após a inoculação dos explantes, foram repicados as 10 cultivares regeneradas na fase de estabelecimento. Dessas, observou-se sucesso na multiplicação de nove cultivares (Tabela 7).

Tabela 7. Primeira multiplicação *in vitro* de videiras para mesa provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas apicais de cultivares de uvas de mesa (45 dias após a inoculação). Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

	PRIMEIRA MULTIPLICAÇÃO		
	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.
A1118	5	5 c	10 c
A1581	8	5 c	13 c
Beauty Seedless	13	13 b	28 b
CG 28.467 'Emperatriz'	9	9 c	19 c
CG 39.915	12	6 c	13 c
CG 87.746	12	0 d	0 d
Fiesta	30	18 b	24 b
Jupiter	60	51 a	148 a
Muscatel Caillaba	18	12 b	24 b
Paulistinha	32	15 b	21 b
TOTAL	199	134	300

A cultivar que apresentou maior número de explantes regenerados (51) foi a Jupiter, que representa 85% de regeneração dos 60 explantes inoculados. As cultivares Fiesta, Paulistinha, Beauty Seedless e Muscatel Caillaba não

diferiram entre si em relação ao número de explantes regenerados, cujos valores foram 18, 15, 13 e 12, respectivamente.

No entanto, o número de explantes inoculados após a repicagem de cada um foi diferente, assim, em porcentagem de regeneração observou-se valores diferentes para os mesmos: Fiesta 60% de regeneração de 30 explantes inoculados, Paulistinha 46,9% de regeneração de 32 explantes inoculados, Beauty Seedless 100% de regeneração de 13 explantes inoculados e Muscatel Caillaba com 66,7% de regeneração de 18 explantes inoculados.

Os menores valores (cinco, cinco, nove e seis), de explantes regenerados foram observados nas cultivares A1118, A1581, CG 28.467 'Emperatriz' e CG 39.915, respectivamente, porém, observou-se diferentes valores na porcentagem de regeneração, sendo respectivamente: 100% de regeneração de cinco explantes inoculados, 62,5% de oito explantes inoculados, 100% de nove explantes inoculados e 50% de seis explantes inoculados.

Em relação ao número de gemas formadas, os resultados significativos seguem a mesma sequência das cultivares citadas anteriormente, observando-se para Jupiter 148 gemas formadas, e para Fiesta, Paulistinha, Beauty Seedless e Muscatel Caillaba, 24, 21, 28 e 24 gemas formadas, respectivamente. Os menores valores de gemas formadas foram observados para A1118, A1581, CG 28.467 'Emperatriz' e CG 39.915, com 10, 13, 13 e 19 gemas formadas, respectivamente.

Aos 90 dias após a inoculação ocorreu a segunda multiplicação (repicagem) das nove cultivares regeneradas na fase anterior, das quais, oito apresentaram resultado significativo para o número de explantes regenerados e número de gemas formadas: A1118, A1581, CG 28.467 'Emperatriz', CG 39.915, Fiesta, Jupiter, Muscatel Caillaba e Paulistinha.

Foram inoculados 148 explantes do genótipo Jupiter, o qual apresentou o maior número de explantes regenerados (54) (Tabela 8), no entanto, representou a menor porcentagem (36,5%) de regeneração. A1581, Fiesta, Muscatel Caillaba e Paulistinha apresentaram os seguintes valores de regeneração: 13 (100% de regeneração), 16 (66,7% de regeneração), 15 (62,5% de regeneração) e 18 (85,7% de regeneração), respectivamente. As

cultivares A1118 e CG 39.915, também não diferiram entre si, com 10 (100% de regeneração) e nove (69,3% de regeneração) explantes regenerados, respectivamente.

Tabela 8. Segunda multiplicação *in vitro* de videiras para mesa provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas apicais de cultivares de uvas de mesa (90 dias após a inoculação). Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

SEGUNDA MULTIPLICAÇÃO			
	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.
A1118	10	10 c	22 d
A1581	13	13 b	24 d
Beauty Seedless	28	0 e	0 g
CG 28.467 'Emperatriz'	19	3 d	7 f
CG 39.915	13	9 c	13 e
Fiesta	24	16 b	45 b
Jupiter	148	54 a	172 a
Muscatel Caillaba	24	15 b	37 c
Paulistinha	21	18 b	39 c
TOTAL	300	138	359

O menor número de explantes regenerados foi observado em CG 28.467 'Emperatriz' com três explantes regenerados (15,8% de regeneração).

Aos 120 dias após a inoculação foi realizada a terceira multiplicação (repicagem) com as oito cultivares regeneradas na multiplicação anterior. Observou-se resultado significativo para três cultivares, as quais diferiram entre si para o número de explantes regenerados e número de gemas formadas: Fiesta, Jupiter e Paulistinha. Foram inoculados 160 explantes do genótipo Jupiter, dos quais apenas 24 explantes regeneraram plantas (Tabela 9). Embora seja o maior de regeneração observado, o mesmo representou a menor porcentagem (15% de regeneração). A cultivar Fiesta apresentou 12 explantes regenerados (30% de regeneração) enquanto o menor número de explantes regenerados foi observado em Paulistinha com oito explantes regenerados (25% de regeneração).

Tabela 9. Terceira multiplicação *in vitro* de videiras para mesa provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas apicais de cultivares de uvas de mesa (120 dias após a inoculação). Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

TERCEIRA MULTIPLICAÇÃO			
	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.
A1118	18	0 d	0 d
A1581	20	0 d	0 d
CG 28.467 'Emperatriz'	5	0 d	0 d
CG 39.915	10	0 d	0 d
Fiesta	40	12 b	46 b
Jupiter	160	24 a	76 a
Muscatel Caillaba	30	0 d	0 d
Paulistinha	32	8 c	23 c
TOTAL	315	44	145

Aos 165 dias após a inoculação realizou-se a aclimatização das plantas regeneradas na 3ª repicagem das cultivares Fiesta (12 plantas), Jupiter (24 plantas) e Paulistinha (8 plantas), sendo aclimatizadas: Fiesta - 9 plantas de 12 regeneradas, das quais 3 plantas foram descartadas por apresentarem pouco desenvolvimento: menos de 4 gemas, raízes curtas, aspecto raquítico) em relação as demais; Jupiter - 15 plantas de 24 regeneradas, sendo 9 plantas descartadas por apresentarem as características citadas anteriormente; Paulistinha - 5 plantas de 8 regeneradas, sendo 3 plantas descartadas. Durante o período (7 dias) em que as plantas permaneceram em temperatura ambiente ocorreu o desenvolvimento de alguns fungos oportunistas que foram tratados com aplicação de Kasumin (pulverização nas folhas e no substrato).

Por outro lado, das 18 cultivares de uvas de mesa utilizadas para obtenção dos explantes do tipo meristemas nodais para estabelecimento em meio de cultura para o cultivo *in vitro*, observou-se regeneração do tecido em sete cultivares (Tabela 10). Foi observado resultado significativo para o número de explantes regenerados nas cultivares A1118, A1581 e CG 39.915 (que apresentaram maior número de explantes regenerados), com valores iguais a cinco, seis e seis, representando 27,8%, 33,3% e 33,3% de regeneração, respectivamente.

Tabela 10. Estabelecimento *in vitro* de videiras para mesa provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas nodais de cultivares de uvas de mesa na inoculação inicial. Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

ESTABELECIMENTO			
	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.
A1118	18	5 a	10 c
A1581	18	6 a	12 b
IAC 77526 'Aurora'	18	0 d	0 d
Beauty Seedless	18	0 d	0 d
Cardinal	18	0 d	0 d
CG 28.467 'Emperatriz'	18	2 c	9 c
CG 39.915	18	6 a	9 c
CG 87.746	18	0 d	0 d
Christmas Rose	18	0 d	0 d
Feal	18	0 d	0 d
Fiesta	18	3 b	12 b
Flame Seedless	18	0 d	0 d
Italia Melhorada	18	0 d	0 d
Jupiter	18	4 b	16 a
Muscatel Caillaba	18	0 d	0 d
Paulistinha	18	2 c	8 c
Perlette	18	0 d	0 d
Ruby Seedless	18	0 d	0 d
TOTAL	324	28	76

A cultivar Fiesta apresentou três explantes regenerados e a cultivar Jupiter quatro explantes, de 18 explantes nodais inoculados, iguais a 16,7% e 22,2% de regeneração, enquanto CG 28.467 'Emperatriz' e Paulistinha apresentaram os menores valores de explantes regenerados (dois explantes regenerados para cada cultivar), representando 11,1% de regeneração.

Foram repicadas, na primeira multiplicação (45 dias após a inoculação) as sete cultivares regeneradas na fase de estabelecimento (inoculação inicial - citada apenas como inoculação). Dessas, observou-se regeneração de 100 %

das sete cultivares: A1118, A1581, CG 28.467 'Emperatriz', CG 39.915, Fiesta, Jupiter, e Paulistinha, sendo Jupiter a que apresentou maior número de explantes regenerados (11 explantes), que representa 68,75% de regeneração dos 16 explantes inoculados. As cultivares A1581 e Fiesta não diferiram entre si, sendo nove e oito os números de explantes regenerados, respectivamente. A cultivar CG 28.467 'Emperatriz' apresentou apenas dois explantes regenerados, sendo a cultivar com o menor número de explantes regenerados na primeira multiplicação dos meristemas nodais de uvas de mesa.

Para o número de gemas formadas, observou-se, também, resultado significativo entre as cultivares, observando-se para Jupiter 28 gemas formadas de 11 explantes regenerados (Tabela 11), diferindo significativamente das demais.

Tabela 11. Primeira multiplicação *in vitro* de de videiras para mesa provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas nodais de cultivares de uvas de mesa (45 dias após a inoculação). Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

	PRIMEIRA MULTIPLICAÇÃO		
	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.
A1118	10	5 e	10 d
A1581	12	9 b	23 b
CG 28.467 'Emperatriz'	9	2 e	7 c
CG 39.915	9	7 c	11 c
Fiesta	12	8 b	20 b
Jupiter	16	11 a	28 a
Paulistinha	8	4 d	14 c
TOTAL	76	46	113

Não houve diferença significativa entre as cultivares A1581 e Fiesta, as quais apresentaram 23 e 20 gemas formadas, respectivamente. A cultivar CG 28.467 'Emperatriz' apresentou o menor número de gemas formadas, sendo o valor igual a sete gemas obtidas a partir de dois explantes regenerados.

A segunda multiplicação ocorreu 90 dias após a inoculação, sendo que foram regenerados 100 % das sete cultivares repicadas (Tabela 12). Houve resultado significativo entre as cultivares para número de explantes regenerados e número de gemas formadas, destacando-se o desempenho da cultivar Jupiter com resultados semelhantes aos anteriores.

Tabela 12. Segunda multiplicação *in vitro* de videiras para mesa provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas nodais de cultivares de uvas de mesa (90 dias após a inoculação). Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

SEGUNDA MULTIPLICAÇÃO			
	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.
A1118	10	5 b	6 e
A1581	23	13 a	33 c
CG 28.467 'Emperatriz'	7	5 b	7 e
CG 39.915	11	6 b	7 e
Fiesta	20	14 a	39 b
Jupiter	28	16 a	53 a
Paulistinha	14	6 b	22 d
TOTAL	113	65	167

Para a terceira multiplicação (120 dias após a inoculação) foram repicadas as sete cultivares regeneradas anteriormente. Observou-se regeneração em apenas três dessas cultivares (Tabela 13) com diferença significativa entre as cultivares para número de explantes regenerados e número de gemas formadas, sendo observado os melhores resultados para a cultivar Paulistinha.

A aclimatização das plantas regeneradas na terceira multiplicação ocorreu aos 165 dias após a inoculação: Fiesta (6 plantas), Jupiter (6 plantas) e Paulistinha (8 plantas). Após a seleção das plantas bem desenvolvidas para aclimatização obteve-se: quatro plantas da cultivar Fiesta, três plantas da cultivar Jupiter e cinco plantas da cultivar Paulistinha.

Tabela 13. Terceira multiplicação *in vitro* de videiras para mesa provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas nodais de cultivares de uvas de mesa (120 dias após a inoculação). Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

TERCEIRA MULTIPLICAÇÃO			
	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.
A1118	4	0 c	0 d
A1581	28	0 c	0 d
CG 28.467 'Imperatriz'	5	0 c	0 d
CG 39.915	5	0 c	0 d
Fiesta	32	6 b	15 c
Jupiter	47	6 b	22 b
Paulistinha	16	8 a	33 a
TOTAL	137	20	70

Para as **uvas de vinho** foram inoculados meristemas apicais de 12 cultivares (Tabela 14). Desse total, apenas duas apresentaram regeneração do tecido inoculado: IAC 138-22 (Máximo) e Muscat Noir, não havendo diferença significativa entres as mesmas para o número de explantes regenerados e número de gemas formadas.

Tabela 14. Estabelecimento multiplicação *in vitro* de videiras para vinho provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM.GEM.) originados a partir de meristemas apicais de cultivares de uvas de vinho na inoculação inicial. Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

ESTABELECIMENTO			
	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM.GEM.
Alfrocheiro	9	0 b	0 b
Barbera	9	0 b	0 b
Cabernet Franc	9	0 b	0 b
Carmenere	9	0 b	0 b
IAC 138-22 (Máximo)	9	3 a	9 a
Moscatel Branca	9	0 b	0 b
Moscatel Grega	9	0 b	0 b
Moscatuel CG 102295	9	0 b	0 b
Muscat Noir	9	3 a	10 a
Muscat Saint Vallier	9	0 b	0 b
Syrah	9	0 b	0 b
Micheli Palieri	9	0 b	0 b
TOTAL	108	6	19

Visualmente observou-se oxidação dos tecidos vegetais da maioria das cultivares (Figura 21) impossibilitando a regeneração e posterior repicagem para as fases seguintes de multiplicação, também foi observada a formação de calos e regeneração em algumas cultivares, como a Moscatel Grega, no entanto, as cultivares apresentaram vitrificação e não se desenvolveram (Figura 22).



Figura 24. Aspecto geral do estabelecimento do cultivo *in vitro* de segmentos nodais de cultivares de videira (Moscatel Branca) para vinho/processamento provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Videira da Embrapa Semiárido. Observar a oxidação intensa dos tecidos vegetais. oxidação dos tecidos vegetais.

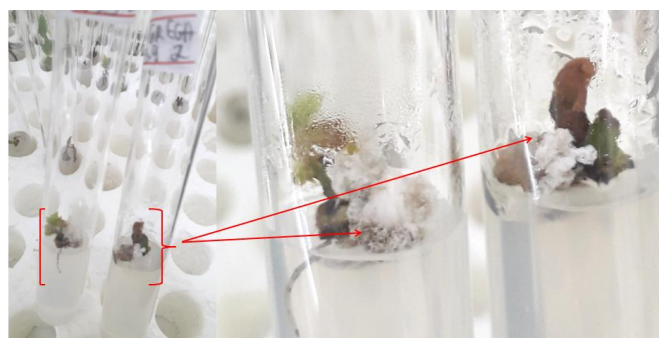


Figura 25. Aspecto geral do estabelecimento do cultivo *in vitro* de ápices apicais de cultivares de videira (Moscatel Grega) para vinho/processamento provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Videira da Embrapa Semiárido: Observar a formação de calos e vitrificação dos tecidos vegetais.

Na primeira multiplicação, que ocorreu 45 dias após a inoculação dos explantes, observou-se diferença significativa para número de explantes regenerados e número de gemas formadas entre as duas cultivares regeneradas no estabelecimento: IAC 138-22 (Máximo) e Muscat Noir (Tabela 15). A cultivar que apresentou maior número de explantes regenerados e número de gemas formadas foi a IAC 138-22 (Máximo), sendo esses quatro e 18, respectivamente.

O número de explantes inoculados após a repicagem de cada cultivar foi semelhante (nove explantes de IAC 138-22 (Máximo) e 10 explantes de Muscat Noir), sendo a maior diferença observada no número de gemas formadas, sendo de 18 para a primeira cultivar e nove para a segunda.

Tabela 15. Primeira multiplicação *in vitro* de videiras para vinho provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas apicais de cultivares de uvas de vinho (45 dias após a inoculação). Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

PRIMEIRA MULTIPLICAÇÃO			
	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.
IAC 138-22 (Máximo)	9	4 a	18 a
Muscat Noir	10	3 b	9 b
TOTAL	19	7	27

Para número de explantes regenerados e número de gemas formadas entre as duas cultivares repicadas na segunda multiplicação, observou-se diferença significativa apenas para número de gemas formadas, observando-se que a cultivar Muscat Noir apresentou resultado próximo ao da cultivar IAC 138-22 (Máximo), sendo 18 e 16 gemas formadas, respectivamente (Tabela 16).

Tabela 16. Segunda multiplicação *in vitro* de videiras para vinho provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas apicais de cultivares de uvas de vinho (90 dias após a inoculação). Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

SEGUNDA MULTIPLICAÇÃO			
	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.
IAC 138-22 (Máximo)	18	5 a	18 a
Muscat Noir	9	4 a	16 b
TOTAL	27	9	34

Aos 120 dias após a inoculação foi realizada a terceira multiplicação (repicagem). Foi observada diferença significativa para número de explantes regenerados. A cultivar IAC 139-22 (Máximo) apresentou o melhor resultado, no entanto, não houve diferença significativa para o número de gemas formadas entre as duas cultivares repicadas (Tabela 17). Foram aclimatizadas duas plantas da cultivar IAC 138-22 (Máximo) e uma planta da cultivar Muscat Noir.

Tabela 17. Terceira multiplicação *in vitro* de videiras para vinho provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas apicais de cultivares de uvas de vinho (120 dias após a inoculação). Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

TERCEIRA MULTIPLICAÇÃO			
	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.
IAC 138-22 (Máximo)	12	2 a	7 a
Muscat Noir	10	1 b	4 a
TOTAL	22	3	11

Por outro lado, foram inoculados meristemas nodais de 12 cultivares de uvas de vinho, dos quais, apenas seis apresentaram regeneração do tecido vegetal (Tabela 18).

Tabela 18. Estabelecimento *in vitro* de videiras para vinho provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas nodais de cultivares de uvas de vinho na inoculação inicial. Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

ESTABELECIMENTO			
	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.
Alfrocheiro	18	0 b	0 c
Barbera	18	4 a	14 b
Cabernet Franc	18	0 b	0 c
Carmenere	18	0 b	0 c
IAC 138-22 (Máximo)	18	8 a	25 a
Moscatel Branca	18	0 b	0 c
Moscatel Grega	18	6 a	18 b
Moscatuel CG 102295	18	0 b	0 c
Muscat Noir	18	8 a	24 a
Muscat Saint Vallier	18	0 b	0 c
Syrah	18	4 a	20 a
Micheli Palieri	18	6 a	28 a
TOTAL	216	36	129

As cultivares apresentaram diferentes aspectos de desenvolvimento entre si, como tamanho das folhas, formação da parte aérea e das raízes, etc. (Figura 23). No entanto, não foi observada diferença significativa para o número de explantes regenerados. Para número de gemas formadas houve diferença significativa, sendo os melhores resultados observados para as cultivares IAC 138-22 (Máximo), Muscat Noir, Syrah e Micheli Palieri.

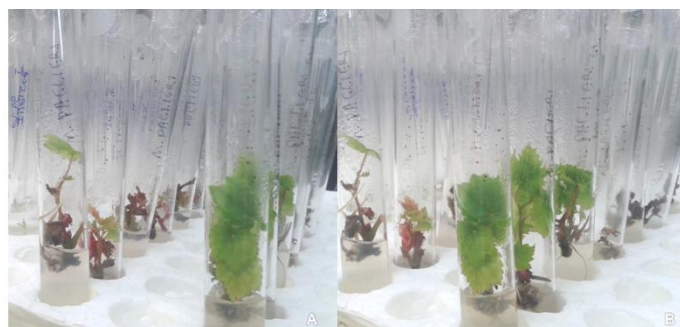


Figura 26. Aspecto geral do estabelecimento do cultivo *in vitro* de meristemas nodais de cultivares de videira para vinho/processamento provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Videira da Embrapa Semiárido: observar a regeneração de plantas com diferentes aspectos de desenvolvimento, em diferentes ângulos (A) e (B).

Foram repicadas na primeira multiplicação (45 dias após a inoculação) as seis cultivares regeneradas na fase de estabelecimento: Barbera, IAC 138-22 (Máximo), Moscatel Grega, Muscat Noir, Syrah e Micheli Palieri (Tabela 19).

Tabela 19. Primeira multiplicação *in vitro* de videiras para vinho provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas nodais de cultivares de uvas de vinho (45 dias após a inoculação). Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

	PRIMEIRA MULTIPLICAÇÃO		
	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.
Barbera	14	6 b	21 c
IAC 138-22 (Máximo)	25	10 a	26 b
Moscatel Grega	18	6 b	17 c
Muscat Noir	24	12 a	29 b
Syrah	20	6 b	24 c
Micheli Palieri	28	14 a	39 a
TOTAL	129	54	156

Todas as cultivares apresentaram regeneração, notando-se diferença significativa entre si para número de explantes regenerados e número de gemas formadas.

As cultivares IAC 138-22 (Máximo), Muscat Noir e Micheli Palieri apresentaram maior número de explantes regenerados, diferindo significativamente das demais. Para número de gemas formadas, a cultivar Micheli Palieri apresentou o melhor resultado.

As seis cultivares repicadas na segunda multiplicação (90 dias após a inoculação) apresentaram regeneração de tecido (Tabela 20). Houve resultado significativo entre as cultivares para número de explantes regenerados e número de gemas formadas.

Observou-se melhor resultado para número de explantes regenerados para as cultivares IAC 138-22 (Máximo) e Micheli Palieri que não diferem entre si, com 14 e 17 explantes regenerados. O menor número de explantes regenerados foi observado nas cultivares Barbera e Moscatel Grega, com quatro e seis explantes regenerados.

Tabela 20. Segunda multiplicação *in vitro* de videiras para vinho/processamento provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas nodais de cultivares de uvas de vinho (90 dias após a inoculação). Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

SEGUNDA MULTIPLICAÇÃO			
	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.
Barbera	21	4 c	19 c
IAC 138-22 (Máximo)	26	14 a	37 a
Moscatel Grega	17	6 c	24 b
Muscat Noir	29	10 b	28 b
Syrah	24	8 b	27 b
Micheli Palieri	39	17 a	42 a
TOTAL	156	59	177

Para a terceira multiplicação (120 dias após a inoculação) foram repicadas as seis cultivares regeneradas anteriormente. Observou-se

Tabela 23. Resultado do teste ELISA para detecção de vírus em plantas originalmente infectadas e regeneradas a partir do cultivo *in vitro* de meristemas nodais de uvas de mesa provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido.

	GVA	GVB	GLRaV1	GLRaV2	ArMV	GFLV
Fiesta	-	-	-	-	-	-
Jupiter	-	-	-	-	-	-
Paulistinha	+	-	-	-	-	-
(%) PORC. DE INFECÇÃO	33,3	0	0	0	0	0

Tabela 24. Resultado do teste ELISA para detecção de vírus em plantas originalmente infectadas e regeneradas a partir de meristemas apicais de uvas de vinho provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido.

	GVA	GVB	GLRaV1	GLRaV2	ArMV	GFLV
IAC 138-22 (Máximo)	-	-	-	-	-	-
Muscat Noir	+	-	-	-	-	-
(%) PORC. DE INFECÇÃO	50,0	0	0	0	0	0

Tabela 25. Resultado do teste ELISA para detecção de vírus em plantas originalmente infectadas e regeneradas a partir de meristemas nodais de uvas de vinho provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido.

	GVA	GVB	GLRaV1	GLRaV2	ArMV	GFLV
Barbera	-	+	-	-	-	-
Moscatel Grega	+	-	-	-	-	-
Syrah	-	-	-	-	-	-
(%) PORC. DE INFECÇÃO	33,3	33,3	0	0	0	0

5. DISCUSSÃO

Detecção de vírus

Estudos sobre a incidência de vírus em videira têm sido realizados em diversos países, verificando-se grande variabilidade na incidência de vírus e existência de relação dependente da espécie viral, do genótipo da videira e da região amostrada. Contudo, normalmente, encontram-se elevados índices de infecção. Catarino et al. (2015) avaliando a incidência de vírus em videiras no Nordeste, verificaram a presença de GVA, GVB, GLRaV-2 e GLRaV-3 em amostras de videiras cultivadas no Vale do Submédio do São Francisco, observando, no entanto, maiores valores de incidência em relação às porcentagens observadas no presente trabalho.

Além disso, esses autores não detectaram a presença do GFLV. Entre as espécies de vírus que atacam a videira, os GLRaV-s representam uma das principais restrições para a produção de uvas, por afetarem principalmente o rendimento das videiras, com redução de produtividade de até 15 a 20 % (MARTELLI, 1993; MARTELLI e BOUND-PADIEU, 2006; RAI et al. 2018).

A infecção causada por vírus pode ser latente (sem manifestação dos sintomas associados a presença de vírus nas plantas) em algumas cultivares, podendo causar prejuízos mesmo assim. Atualmente, realiza-se trabalhos preventivos, principalmente por meio da utilização de material de plantio saudável e também por meio do controle das populações de vetores (ALMEIDA et al., 2013; RAI et al. 2018) para controlar a disseminação de viroses. Em estudos sobre a incidência de vírus no polo vitícola Petrolina-PE/Juazeiro-BA, Fajardo et al. (2002) observaram a presença de GLRaV-1 e GLRaV-3.

No entanto, esses autores não detectaram a presença do GLRaV-2, como observado no presente trabalho, tanto nas cultivares de mesa como nas cultivares de vinho, os mesmos citaram que o GLRaV-2 era ainda ausente nos parrerais brasileiros, considerando essa uma informação não conclusiva, pois diversos estudos afirmam que a distribuição de alguns GLRaV estar restrita a certas regiões e/ou variedades.

Resultado semelhante ao relatado neste trabalho foi observado por NASCIMENTO et al. (2015) que detectaram GVB em quase todas as plantas analisadas, além de GVA, GFkV e GLRaV-2, não sendo observada a presença do GLRaV-3 nas plantas amostradas provenientes de vinhedos comerciais. Esses e outros estudos propiciam conhecimento altamente relevante sobre a incidência de vírus, cultivares suscetíveis e distribuição dos agentes virais, proporcionando informações que possibilitam desenvolver estratégias de controle e manejo das viroses.

Levando-se em conta os avanços na metodologia de detecção de vírus é possível estabelecer uma relação entre a ocorrência desses fitopatógenos em videira e a ocorrência de infecções mistas, que apresenta maior predominância em relação a ocorrência das infecções simples (BASSO et al., 2014). Sendo observado no presente estudo maior predominância de infecção mista apenas para as uvas de vinho, e ocorrência igual para ambas infecções nas uvas de mesa.

Uma informação importante no nosso estudo é a detecção da presença do ArMV em algumas das cultivares de videiras analisadas, sendo esse o primeiro relato para o Brasil. Nesse caso, vale salientar que esse vírus é considerado Praga Quarentenária Ausente (A1) no Brasil, com base na Instrução Normativa Nº 41, de 1º de julho de 2008 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Cultivo *in vitro* de meristemas

Nas últimas décadas foram realizados diversos estudos voltados para o cultivo *in vitro* de videira. No entanto, nota-se nos vários relatos uma grande variação sobre o tipo de explante a ser utilizado e o meio de cultura adequado (CHEE e POOL, 1982; GRAY e FISHER, 1985; LEE & WETZSTEIN, 1990; BIASI et al. 1998; BERND et al. 2007; VILLA et al., 2008; ALIZADEH et al., 2010; SKIADA et al., 2010; CARVALHO-SILVA et al., 2012; ABIDO et al., 2013; DEV et al., 2015), tanto sobre a espécie *V. vinifera* como seus híbridos intra e interespecíficos, assim como outras espécies, como a *V. rotundifolia* (uva Muscadínea), considerada de difícil enraizamento na propagação vegetativa através de estacas (LEE e WETZSTEIN, 1990). Assim, a micropropagação é

considerada uma ferramenta bastante útil na multiplicação tanto da espécie como dos híbridos de videira.

Os resultados encontrados no presente trabalho variam entre as cultivares como também entre as mesmas cultivares e o tipo de explante utilizado. Essa variação nos resultados também tem sido relatada na literatura. Por exemplo, diferenças significativas foram encontradas entre as cultivares e clones de videira relacionadas ao desenvolvimento *in vitro* e produção de biomassa em estudos realizados por Lima da Silva et al. (2000), Moreira (2000), e Borghezán et al. (2003). No entanto, a maioria desses estudos observou resultado ainda limitado. As dificuldades encontradas na multiplicação *in vitro* podem estar relacionadas ao fato de que muitas cultivares utilizadas são híbridos interespecíficos, resultando em certa influência do genótipo no processo de micropropagação.

As respostas morfogenéticas observadas no presente trabalho foram diferentes entre todas as cultivares utilizadas. Por exemplo, verificou-se uma alternância na regeneração e produção de biomassa, com valores diferentes a cada nova fase do cultivo, com variação entre o número de gemas formadas (5 a 60 gemas na primeira fase, e 23 a 46 gemas na última fase) por cultivar e ainda a porcentagem de regeneração variando de 0 % a 100 % de tecido regenerado por cultivar. Outros trabalhos também observaram resultado semelhante, que pode ser associado à influência da cultivar na capacidade de regeneração do tecido (MARTINELLI et al., 1996; PERES et al., 1999; NALI et al., 2008), ou ainda relacionado também ao tipo (meristema apical ou segmento nodal) e forma do explante utilizado (com e sem folhas na repicagem).

Existem também estudos relacionados à influência da composição do meio de cultura, os sais e reguladores, no sucesso do procedimento. Nesse caso, relatam-se ainda, dificuldades no desenvolvimento das brotações obtidas, como observado no presente trabalho, a vitrificação e o pouco desenvolvimento da parte aérea como características observadas durante a condução das multiplicações (MHATRE et al., 2000; ALIZADEH et al., 2010; SKIADA et al., 2010; DEV et al., 2015; PEDRO et al., 2017).

Em um estudo com diferentes espécies, híbridos e cultivares de videira, Gray e Fisher (1985) utilizando meio de cultura MS (1962) modificado,

contendo 5µM de BAP, observaram rápido desenvolvimento dos ápices de videira cultivados. De Carvalho Silva et al. (2012) realizaram trabalho similar ao anterior, utilizando meio de cultura WPM (Lloyd e McCoown, 1980) na fase de estabelecimento e MS e MS reduzido para metade da força dos sais nas fases de multiplicação, suplementados com diferentes reguladores de crescimento, e obtiveram resultados significativos para altura, crescimento percentual, número de gemas e sobrevivência dos explantes durante seis meses de conservação *in vitro*.

Além da composição do meio de cultura, alguns relatos sobre a influência do genótipo como principal fonte de variação da resposta regenerativa *in vitro* são encontrados na literatura. Alizadeh et al. (2010), por exemplo, trabalhando com multiplicação *in vitro* de diferentes porta-enxetos de videira, sendo três deles híbridos, observaram desempenho variado entre eles, indicando que o sucesso da técnica de multiplicação é fortemente dependente do genótipo, o que possibilita a seleção de genótipos com alto desempenho e boa capacidade de adaptação.

A fase de aclimatização, que corresponde a retirada das plantas regeneradas em condições *in vitro* para condições *ex vitro*, também deve ser atentamente observada e estudada. Nesta fase as plantas iniciam os processos bioquímicos e fisiológicos naturais necessários para sua sobrevivência fora do ambiente controlado (luz, umidade relativa e temperatura) ao qual estavam submetidas, sendo retiradas gradativamente das condições artificiais e, a partir daí, iniciando o desenvolvimento do sistema radicular funcional, aumento da absorção de água e nutrientes e aumento da fotossíntese (DEV et al., 2015).

Muitos fatores podem afetar o sucesso dessa transição, o grau de umidade, por exemplo. Assim, em condições de baixa umidade ocorre uma maior perda de água através das folhas quando é inicialmente em baixa porcentagem, sendo o recomendado que os teores de umidade do ambiente durante a aclimatização sejam inicialmente mais elevados, sendo diminuídos gradativamente (MARIN et al., 1998; NORTON e SKIRVIN, 2001; NAS e READ, 2003; BIGGER, 2010).

No nosso trabalho, a metodologia de utilização de recipientes com cobertura (copos plásticos com cobertura transparente contendo furos) foi eficiente para simulação de um ambiente com umidade relativa maior durante o início da aclimatização, pois não foi observada desidratação (murcha) e/ou morte das plantas.

O desenvolvimento de protocolos para cultivo de tecidos de videira para a obtenção de clones idênticos à planta matriz e isentos de doenças representa o sucesso na utilização das técnicas de que envolvem os processos morfogênicos (formação de gemas e raízes - organogênese) ou embriões somáticos (embriogênese).

6. CONCLUSÕES

O teste ELISA foi eficiente na detecção de vírus em videira nas condições desse trabalho, sendo os vírus com maior incidência nas amostras analisadas o GLRaV-2, o GVA, o ArMV e o GFLV, tanto para as cultivares de uva de vinho, quanto nas cultivares de mesa.

O cultivo *in vitro* de meristemas apicais e nodais foi eficiente para regeneração de plantas até a fase final de cultivo nas cultivares de mesa Jupiter, Fiesta e Paulistinha. Para as cultivares de vinho foi eficiente para as cultivares IAC 138-22 'Máximo' e Muscat Noir, a partir dos meristemas apicais, e para os genótipos Barbera, Moscatel Grega e Syrah, a partir de meristemas nodais.

Os explantes originados dos meristemas apicais regeneraram plantas sem a presença de vírus para as cultivares Jupiter, Fiesta, Paulistinha e IAC 138-22 'Máximo', e para os meristemas nodais dos genótipos Jupiter, Fiesta e Syrah.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Faz-se necessário a realização de estudos voltados para identificação do ArMV em cultivares cultivadas em parreirais comerciais, principalmente os mais antigos.

O desenvolvimento de protocolos de cultivo *in vitro* de videira a partir de meristemas, deve ser voltado para cada genótipo, objetivando estabelecer o tipo de explante, o meio de cultura e os reguladores decrescimento mais adequados para o cultivo.

8. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ABIDO A. I. A. et al. *In vitro* Propagation of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Muscat of Alexandria cv. For Conservation of Endangerment. **Middle East Journal Scientific Research**, 13: 328–37, 2013. Disponível em: <[https://www.idosi.org/mejsr/mejsr13\(3\)13/8.pdf](https://www.idosi.org/mejsr/mejsr13(3)13/8.pdf)> Acesso: 04 fev. 2019.

ABOU GHANEM-SABANADZOVIC, N. et al. Genome organization, serology and phylogeny of *Grapevine leafroll-associated viruses* 4 and 6: taxonomic implications. **Virus Res.** 163, 120–128. 2012.

ALIZADEH, M.; SINGH, S. K.; PATEL, V.B. Comparative performance of *in vitro* multiplication in four grape (*Vitis* spp.) rootstock genotypes. **International Journal of Plant Production**. 4: 41–50, 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/228618108_Comparative_performance_of_in_vitro_multiplication_in_four_grape_Vitis_spp_rootstock_genotypes/download> Acesso: 04 fev. 2019.

ALLEWELDT, G.; DETTWEILER, E. The genetic resources of *Vitis*: world list of grapevine collection. 2nd ed. **Gielweilerhof: BAZ IRZ**, 1994.

ALMEIDA, R.P.P. et al. Ecology and management of grapevine leafroll disease. **Frontiers Microbiology**. 94, 1–13. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3633934/>> Acesso em: 29 jan. 2019.

ALVES, G. J. et al. Impacto da regulamentação SPS e TBT nas exportações brasileiras de uva no período de 1995 a 2009. **Revista de Economia Sociologia Rural** [online], vol. 52, n.1, p. 41-60. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-20032014000100003>>. Acesso em 27 de jul. 2017.

ANDERSON, K. Changing varietal distinctiveness of the world's wine regions: evidence from a new global database. **Journal of Wine Economics - JWE** 9, n. 3. p. 249–272. 2014. Disponível em: <<http://www.wine-economics.org/aawe/wp-content/uploads/2014/12/Vol9-Issue03-Changing-Varietal-Distinctiveness-of-the-World%E2%80%99s-Wine-Regions-Evidence-from-a-New-Global-Database.pdf>> Acesso em: 29 jan. 2019.

ATALLAH, S.S. et al. Economic impact of grapevine leafroll disease on *Vitis vinifera* cv. Cabernet Franc in Finger Lakes vineyards of New York. **American Journal Enology and Viticulture**, v. 63, p. 73-79, Mar. 2012.

BARRUETO CID, L. P.; CRUZ, A. R. R. Embriogênese somática em *Coffea arabica* a partir de explantes foliares. In: **SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL**, 2., 1999, Vitória. Anais... Vitória, ES: Consórcio Brasileiro de Pesquisas e Desenvolvimento do Café, 2001. p. 349355. CD-ROM.

BARBOSA, M. A. G. et al. Doenças da videira. **Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2016. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1056826>> Acesso: Março de 2019.

BASSO et al. Avanços e perspectivas no estudo das doenças virais e subvirais em videira com ênfase na realidade brasileira. REVISÃO ANUAL DE PATOLOGIA DE

PLANTAS-RAPP. Passo Fundo-RS, ISSN 0104-0383. Vol. 22, 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Marcos_Fernando_Basso/publication/274458645_Advances_and_prospects_in_the_study_of_viral_and_subviral_diseases_in_grapevine_with_emphasis_on_the_situation_in_Brazil/links/5520e3f90cf2f9c13050c6af.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2018.

BASSO, M. F. et al. GRAPEVINE VIRUS DISEASES:ECONOMIC IMPACT AND CURRENT ADVANCES IN VIRAL PROSPECTION AND MANAGEMENT. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, Vol. 39, n. 1, e-411, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-29452017000104001&script=sci_arttext>. Acesso em: 11 dez. 2018.

BERND, R.B. et al. Micropropagação de porta-enxertos híbridos de *Vitis labrusca* x *Vitis rotundifolia* com resistência à pérola-da-terra (*Eurhizococcus brasiliensis* hempel, hemiptera: margarodidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, p. 350-354, 2007.

BIASI, L.A.; PASSOS, I.R.S.; POMMER, C.V. Micropropagação do porta-enxerto de videira Jales. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.33, n.10, p. 1587-1594, 1998. Disponível em: <<http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/viewFile/5001/7146>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

BIGGER, B. B. Micropropagation and acclimatization of 'Norton' grapevine (*Vitis aestivalis*) University of Nebraska – Lincoln. **Theses, Dissertations, and Student Research in Agronomy and Horticulture**. 16, 2010. Disponível em: <<http://digitalcommons.unl.edu/agronhortdiss/16>> Acesso: 04 fev. 2019.

BORGHEZAN, M. Propagação *in vitro* e parâmetros morfofisiológicos de porta-enxertos de videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 783-789. 2003.

CARVALHO, D. C. et al . Fox grape cv. Bordô (*Vitis labrusca* L.) and grapevine cv. Chardonnay (*Vitis vinifera* L.) cultivated in vitro under different carbohydrates, amino acids and 6-Benzylaminopurine levels. **Brazilian Archives Biology Technology**, Curitiba, v. 56, n. 2, p. 191-201. 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132013000200004&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 10 dez. 2018.

CATARINO, A. M. et al. Incidência de vírus em videiras no Nordeste brasileiro e caracterização molecular parcial de isolados virais locais. **Ciência Rural** [online]. vol.45, n.3, pp.379-385. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782015000300379&script=sci_abstract&lng=pt> Acesso em: 10 de dez. 2018.

CATARINO, A.M. et al. Detection and partial molecular characterization of isolates of Grapevine leafroll-associated virus 4 and Grapevine rupestris vein feathering virus. **Tropical Plant Pathology**, v.38, supl., p.840, 2013.

CHÉE, R.; POOL, R.M. The effects of growth substances and photoperiod on the development of shoot apices of *Vitis* cultured *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.16, n.1, p.17-27, 1982.

CORREIA, N. Clonagem de plantas. **Ciências da Vida e da Terra**. 2011. Disponível em: <<http://cienciasdavidaedaterra25.blogspot.com/2011/10/clonagem-em-plantas.html>> Acesso em: 29 jan. 2019.

COSTA, J. P. N. Vírus do Urticado, ou nó curto da videira. Direcção Regional de Agricultura de Entre-Douro e Minho (DRAEDM). **Ficha Técnica 36**. Jan. 2005. Disponível em: <http://www.drapn.min-agricultura.pt/drapn/conteudos/FICHAS_DRAEDM/Ficha_tecnica_036_2005.pdf> Acesso em: 28 jan. 2019.

De CARVALHO-SILVA, R.; GOMES-LUIS, Z.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Short-term storage *in vitro* and large-scale propagation of grapevine genotypes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 47: 344–50, 2012.

DEV R. et al. Comparative *in vitro* multiplication of somegrape (*Vitis vinifera*) genotypes. **Indian Journal Agricultural Sciences**, 85: 1477–83, 2015. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/284392572_Comparative_in_vitro_multiplication_of_some_grape_Vitis_vinifera_genotypes/download> Acesso: 04 fev. 2019.

DÓRIA, K. M. A. B. V. S.; NOZAKI, D. N.; PAVAN, M. A.; YUKI, V. A.; SAKATE, R. K. Identificação e caracterização de um isolado de Hydrangea ringspot virus em hortênsia no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, n. 2, p. 125-128, 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/sp/v37n2/a07v37n2>> Acesso em: 05 dez. 2018.

ENGEL, E. A. et al. A diagnostic oligonucleotide microarray for simultaneous detection of grapevine viruses. **Journal of virological methods**, v. 163, n. 2, p. 445–51, 2010. Disponível em: <repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/120164/Engel_Esteban.pdf?sequence=1> Acesso em: 05 dez. 2018.

FAJARDO, T. M. V. et al. Detecção de *Closterovirus* em videira e caracterização parcial de um isolado do *Grapevine leafroll-associated virus 3*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 58-64, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/fb/v27n1/8469.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

FAJARDO, T. V. M. Manejo de pragas e doenças. In: **Produção integrada de uva para processamento: manejo de pragas e doenças**. Lucas da Ressurreição Garrido, Alexandre Hoffmann, Samar Velho da Silveira, editores técnicos – Brasília, DF: Embrapa, 2015. v. 4, 85 p.; il. col. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1027860/1/manual4manejocap3.pdf>> Acesso em: 28 jan. 2019.

FAJARDO, T. V. M.; KUHN, G. B.; NICKEL, O. Doenças virais. In: Uva para processamento - Fitossanidade. Série **Frutas do Brasil**, 35. Embrapa Uva e Vinho (Bento Gonçalves, RS). Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 131 p. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Doencas+Virais_uva_fito_000frc0ix0g02wyiv80084arlsjvkvb.pdf> Acesso em: 29 jan. 2019.

FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O. Víroses. In: **Árvore do Conhecimento. Embrapa Uva e Vinho** (Bento Gonçalves, RS). Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. Embrapa Informática Agropecuária. 2003. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/uva_para_processamento/arvore/CONT000g56mkakt02wx5ok0dkla0sd892xiv.html> Acesso em: 29 jan. 2019.

FAJARDO, T.V.M. et al. Expression of *Grapevine leafroll-associated virus 3* coat protein gene in *Escherichia coli* and production of polyclonal antibodies. **Fitopatol. Bras.** 36, 496–500. 2007.

GIOVANNINI, E. **Produção de uvas para vinho, suco e mesa**. Porto Alegre: Renascença, 1999. p. 364.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa - CNPH, 1998. p. 183-260.

GRAY, D. J.; FISHER, L. C. *In vitro* shoot propagation of grape species, hybrids and cultivars. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, 98: 172-174, 1985.

GRIBAUDO, I.; FRONDA, A. Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated *in vitro*. **HortScience**, v.26, n.8, p.1083, 1991. Disponível em: <<http://hortsci.ashspublications.org/content/26/8/1083.full.pdf>> Acesso em: 10 dez. 2018.

GRIGOLETTO, E. R. **Micropropagação de Hancornia speciosa Gomez (Mangabeira)**. 1997, 73 f. Dissertação Mestrado em Botânica, Universidade de Brasília, Brasília.

IBGE (2017) – **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**: Disponível em <<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/1618>> Acesso: 31 de Julho de 2017 às 13:41.

ICKERT-BOND, S.M., GERRATH, J., WEN, J. Gynoecial Structure of Vitales and Implications for the Evolution of Placentation in the Rosids. **International Journal of Plant Sciences** V. 175, nº 9, p. 998–1032. 2014. Disponível em: <www.academia.edu/download/36032727/Ickert-Bond_etal_GynoeciumVitales_IJPS2014.pdf> Acesso em: 05 dez. 2018.

JULIÃO, C. C. B.; BRANCO, D. K. S.; LIMA, J. E. EXPORTAÇÃO DE UVA NO VALE DO SÃO FRANCISCO: UMA ANÁLISE A PARTIR DE VETORES AUTORREGRESSIVOS **Revista Econômica do Nordeste**, Fortaleza. v. 48, n. 2, p. 75-83, abr./jun., 2017. Disponível em: <https://www.bnb.gov.br/projwebren/Exec/artigoRenPDF.aspx?cd_artigo_ren=1705> Acesso em: 28 jan. 2019.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Vol.2. Brasília: EMBRAPA, 1999. p.519-531.

KIT AGRITEST - PLANT HEALTH MANAGEMENT. Disponível em: <<http://www.agritest.it/elisa-buffers-formula>>. Acesso em: 18 jul. 2017.

KORUZA, B.; JELASKA, S. Influence of meristem culture and virus elimination on phenotypical modifications of grapevine (*Vitis vinifera* L., cv. Refosk). **Vitis**. v.32, n.1, p.59-60, 1993. Disponível em: <<https://ojs.openagrar.de/index.php/VITIS/article/view/5179/4965>> Acesso em: 10 dez. 2018.

KUHN, G. B.; FAJARDO, T. V. M. Doenças cusadas por vírus, bactérias e nematóides e medidas de controle. Embrapa Uva e Vinho. **Sistema de Produção**, 4. Jul./2003. Disponível em: <https://www.embrapa.br/uzum/v_enrol_folha.html> Acesso em: 28 jan. 2019.

KUHN, G. B.; FAJARDO, T. V. M. Doenças cusadas por vírus, bactérias e nematóides e medidas de controle. Embrapa Uva e Vinho. **Sistema de Produção**, 4. Jul./2003. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/virus.htm>> Acesso em: 28 jan. 2019.

KUHN, G. B.; FAJARDO, T. V. M. Doenças causadas por vírus, bactérias e nematóides e medidas de controle. Embrapa Uva e Vinho. **Sistema de Produção**, 4. Jul./2003. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/uzum/degenerescencia.html>> Acesso em: 28 jan. 2019.

KUMAR, S.; RAI, R.; BARANWAL, V. K. Development of an immunocapture–reverse transcription–polymerase chain reaction (IC-RT-PCR) using modified viral RNA release protocol for the detection of *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3). **Phytoparasitica** 43, 311–316. 2015.

LAZZAROTTO, J. J.; FIORAVANÇO, J. C.; Tendências e sazonalidades nas exportações e importações brasileiras de uva de mesa. **Informações Econômicas**, v. 43, n. 1, 2013. Disponível em: <<ftp://ftp.sp.gov.br/ftpiea/IE/2013/tec4-0413.pdf>> Acesso em: 28 jan. 2019.

LEE, N.; WETZSTEIN, H.Y. *In vitro* propagation of muscadine grape by axillary shoot proliferation. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mont Vernon, v. 115, n. 2, p. 324-329, 1990.

LIMA DA SILVA, A. et al. Comparative *in vitro* development of five grapevine rootstock varieties and mutants from the cultivar « Gravesac ». **Acta Horticulturae**, v. 528, p. 51-358. 2000.

LIMA, M.F. **Detecção e controle de viroses em videira**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 9 f. Dez. 2009. Disponível em: <http://www.cpatia.embrapa.br:8080/public_eletronica/downloads/CTE90.pdf>. Acesso em: 18 jul. 2017.

LIMA, M.F.; FAJARDO, T.V.M. Doenças causadas por vírus. In: LIMA, M.F.; MOREIRA, F.R.B. Uva de mesa – Fitossanidade. **Série Frutas do Brasil, 14**. Brasília, DF: Embrapa. 2. ed. p.43-58. 2012.

MARIN, J. A.; GELLA, R.; HERRERO, M. Stomatal structure and functioning as a response to environmental changes in acclimatized micropropagated *Prunus cerasus* L. **Annals of Botany**, 62 (6): 663-670, 1998.

MARTELLI, G.P. Graft Transmissible Diseases of Grapevine: Handbook for Detection and Diagnosis. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Rome. 1993.

MARTELLI, G.P., BOUDON-PADIEU, E. Directory of Infectious Diseases of Grapevines and Viroses and Virus-like Diseases of the Grapevine: Bibliographic Report 1998-2004. In : Martelli G.P. (ed.), Boudon-Padieu E. (ed.). Directory of infectious diseases of grapevines and viroses and virus-like diseases of the grapevine: bibliographic report 1998-2004. Bari : **CIHEAM**, 2006. (Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches; n. 55 2006. Disponível em: <<http://ressources.ciheam.org/om/pdf/b55/00800521.pdf>> Acesso em: 29 jan. 2019.

MARTINELLI, L. et al.,. A study on organogenic potential in the *Vitis* genus. **Vitis**, Geneva, NY, v. 35, n. 4, p. 159-161, 1996.

MHATRE, M.; SALUNKHE, C. K.; RAO, P. S. Micropropagation of *Vitis vinifera* L: Towards an improved protocol. **Scientia Horticulture**, 84: 357–63, 2000. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/eea5/1c5118e43a438e1b8472f6e7f937d80d089e.pdf>> Acesso: 04 fev. 2019.

MOREIRA, F.M. **Avaliação morfo-fisiológica e bioquímica do porta-enxerto de videira “Paulsen1103” *in vitro***. 91 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. 2000.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, 15:473-497, 1962.

NALI, L. R.; ALMEIDA, W. A. B.; MELO, N. F. Organogênese *in vitro* de videira. **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v. 20, n. 2, p. 134-139, abr./jun., 2008. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/160142/1/OPB1844.pdf>> Acesso em: 10 dez. 2018.

NAS, M. N.; READ, P. E. Ex Vitro Survival of Hybrid Hazelnut Shoots Produced *In Vitro*. **Acta Horticulturae**, 616: 215-219, 2003.

NASCIMENTO, M. B. et al. Desempenho agrônômico de videiras com e sem sintomas de viroses, e comparação molecular de isolados virais. **Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília**, v.50, n.7, p.541-550, jul. 2015. Disponível em: <<http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/20669>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

NORTON, M. A.; SKIRVIN, R. M. Micropropagation of 'Norton' wine grape. **HortTechnology**, 11(2): 206-208, 2001.

OIV. **World Vitiviniculture Situation**. OIV Statistical Report on World Vitiviniculture. 2016. Disponível em: <<http://www.oiv.int/public/medias/5029/world-vitiviniculture-situation-2016.pdf>>

OIV. **World Vitiviniculture Situation**. OIV Statistical Report on World Vitiviniculture. 2016. Disponível em: <<http://www.oiv.int/public/medias/5479/oiv-en-bilan-2017.pdf>> Acesso em: 10 dez. 2018.

PASSOS, I. R. S. et al. Cultura *in vitro* de meristemas de videira. I. Concentrações do hormônio 6-BA em meio primário. **Bragantia**, v.44, n.1, p.473-479, 1985. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/brag/v44n1/45.pdf>> Acesso em: 10 dez. 2018.

PEDRO, T. S, et al. *In vitro* propagation of *Vitis vinifera* L. cv. 'Monastrell'. **Electronic Journal of Biotechnology** 27, p. 80–83. 2017.

PEIXOTO, P. H. P.; PASQUAL, M. Influência da origem dos explantes na multiplicação e no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de videira. **Ciência e Agrotecnologia**, 20: 293-300. 1996.

PERES, L. E. P. Bases Fisiológicas e Genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biociências & Desenvolvimento**, Brasília, n.25, p. 44 – 48, 2002.

PERES, L. E. P. et al. Effects of auxin-cytokinin and ethylene treatments on the endogenous ethylene and auxin-to-cytokinin ratio related to direct root tip conversion of *Catasetum fimbriatum* Lindl.(Orchidaceae) into buds. **Journal Plant Physiology**, Stuttgart, v. 155, p. 551-555, 1999.

RAI, R. et al. Serological detection of Grapevine leafroll-associated virus 4 in grapevine growing areas of India using polyclonal antiserum raised against the recombinant coat protein. **Crop Protection** 109, 128-135. 2018.

REIS, L. P.; REIS, P. C. M. R. VIABILIDADE ECONÔMICA DO CULTIVO DE UVA IRRIGADA NO MUNICÍPIO DE PETROLINA, PE. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer – Goiânia, v. 13, n. 24. 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Leonardo_Reis7/publication/311482668_VIABILIDADE_ECONOMICA_DO_CULTIVO_DE_UVA_IRRIGADA_NO_MUNICIPIO_DE_PETROLINA_PE/links/5903507aa6fdccd580cff1d1/VIABILIDADE-ECONOMICA-DO-CULTIVO-DE-UVA-IRRIGADA-NO-MUNICIPIO-DE-PETROLINA-PE.pdf> Acesso em: 28 jan. 2019.

ROWHANI, A.; UYEMOTO, J. K.; GOLINO, D.; MARTELLI, G. P. Pathogen testing and certification of *Vitis* and *Prunus* species. **Annual Review of Phytopathology**, [Palo Alto], v. 43, p. 261-278, 2005. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/6fc7/041def01e862a78b744020a051a8a26c1f4c.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

SANKARAN, S.; MISHRA, A.; EHSANI, R.; DAVIS, C. A review of advanced techniques for detecting plant diseases. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 72, p. 1-13, 2010. Disponível em: <www.academia.edu/download/43582906/A_review_of_advanced_techniques_for_dete20160310-15534-xb1fbn.pdf> Acesso em: 05 dez. 2018.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; COSTA, F. H. S. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas: estratégias, princípios e aplicações. In: BARRUETO CID, L. P. (Org.). Cultivo *in vitro* de plantas. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, p. 177-234, 2010.

SILVA, P. C. G.; COELHO, R. C. Caracterização social e econômica da cultura da videira: A viticultura no Submédio do Vale São Francisco Importância econômica e social da videira. **Sistemas de Produção**, 1 – 2a. edição. ISSN 1807-0027 Versão Eletrônica, Embrapa Semiárido, Agosto, 2010. Disponível em: <http://www.cpatosa.embrapa.br:8080/sistema_producao/spuva/Caracterizaca_social_da_%20videira.html> Acesso em: 28 jan. 2019.

SKIADA, F.; GRIGORUADOU, K.; ELEFTHERIO, E. Micropropagation of *Vitis vinifera* L. cv. 'Malagouzia' and 'Xinomavro'. **Cent Eur J Biol**. 6: 839–52, 2010.

SOUSA, S. I. **Vinho Biodinâmico brasileiro da Vinícola Santa Augusta**. Set. 2011. Disponível em: <<http://todovinho.blogspot.com/2011/09/vinho-biodinamico-brasileiro-da.html>> Acesso em: 28 jan. 2019.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da Cultura de Tecidos de Plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Vol.1. Brasília: EMBRAPA, 1998. p.11-20.

TRONCOSO, A. et al. The use of *in vitro* culture and tubular container system to propagate selected grapevine plants for sherry wine production. **Acta Horticulturae**, n.227, p.358-362, 1988. Disponível em: <https://www.actahort.org/books/227/227_65.htm> Acesso em: 10 dez. 2018.

VILLA et al. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de videira 'VR043-43': efeito do ANA e NaCl. **Agrarian**, v.1, n.2, p. 103-11, 2008.

VILLA, F. et al. Efeito de diferentes concentrações de nitrato de cálcio e cloreto de potássio na micropropagação de dois porta-enxertos de videira. **Revista Ceres**, V. 54, n. 311. Jan/Fev 2007. Disponível em: <<http://www.ceres.ufv.br/ojs/index.php/ceres/article/download/3220/1104>> Acesso em: 28 jan. 2019.

YU, D.; MEREDITH, C.P. The influence of explant origin on tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.111, n.6, p.972-975, 1986.

9. APÊNDICES

Tabela 26. Detecção de vírus em cultivares de uva de mesa provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido o Teste ELISA.

	GVA	GVB	GLRaV1	GLRaV2	ArMV	GFLV
A1118	+	-	-	-	-	-
A1581	+	-	-	-	-	-
Aurora = IAC 77526	-	-	-	+	+	+
Beauty Seedless	-	-	-	-	-	+
Cardinal	-	-	-	+	+	+
Centennial Seedless	-	-	-	-	-	-
CG 102024 Dacari	-	-	-	-	-	-
CG 28.467 'Emperatriz'	+	-	-	-	-	-
CG 33.716	-	-	-	-	-	-
CG 39.915	+	-	-	-	-	-
CG 40016 Damarim	-	-	-	-	-	-
CG 4113	-	-	-	-	-	-
CG 87.746	-	-	-	+	+	+
CG 87.908	-	-	-	-	-	-
Christmas Rose	-	-	+	+	+	-
Concord Clone	-	-	-	-	-	-
Feal	-	+	-	+	+	-
Fiesta	+	-	-	-	-	-
Flame Seedless	-	-	-	+	+	+
Italia Clone 1	-	-	-	-	-	-
Itália Melhorada	-	-	-	+	-	+
July Muscat	-	-	-	-	-	-
Jupiter	+	-	-	-	-	-
Loose Perlette	-	-	-	-	-	-
Muscatel Caillaba	+	-	-	-	-	-
Paulistinha	+	-	-	-	-	-
Perlette	-	-	-	+	-	+
Ruby Seedless	+	-	-	+	-	-
Saturn	-	-	-	-	-	-
INFECÇÃO (%)	31.0	3.4	3.4	31.0	20.7	24.1

Tabela 27. Detecção de vírus em cultivares de uva de vinho provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido utilizando o Teste ELISA

	GVA	GVB	GLRaV1	GLRaV2	ArMV	GFLV	GCMV
Alfrocheiro	-	-	-	+	+	+	-
Barbera	-	+	-	+	+	+	-
Cabernet Franc	-	-	-	+	+	+	+
Carmenère	-	-	+	+	+	+	-
Colombard	-	-	-	-	-	-	-
Dawn Seedless	-	-	-	-	-	-	-
IAC 0021-14 Madalena	-	-	-	-	-	-	-
IAC 138-22 (Máximo)	+	-	-	-	-	-	-
Moscatel Branca	+	-	-	-	-	-	-
Moscatel de Hamburgo	-	-	-	-	-	-	-
Moscatel Grega	+	-	-	-	-	-	-
Moscatel Nazareno	-	-	-	-	-	-	-
Moscato Canelli	-	-	-	-	-	-	-
Moscatuel CG 102295	-	-	-	+	+	+	-
Muscat Noir	+	-	-	-	-	-	-
Muscat Saint Vallier	-	-	-	+	+	+	-
Petit Verdot	-	-	-	-	-	-	-
Rainha	-	-	-	-	-	-	-
Tinta Roriz	-	-	-	-	-	-	-
Syrah	+	-	-	-	-	-	-
Micheli Palieri	+	-	-	+	-	-	-
INFECÇÃO (%)	28.8	4.8	4.8	33.3	28.6	28.6	4.8

Tabela 28. Estabelecimento, primeira, segunda e terceira multiplicação *in vitro* de videiras para mesa provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas apicais de cultivares de uvas de mesa. Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

	ESTABELECIMENTO			PRIMEIRA MULTIPLICAÇÃO			SEGUNDA MULTIPLICAÇÃO			TERCEIRA MULTIPLICAÇÃO		
	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.
A1118	9	3 c	5 e	5	5 c	10 c	10	10 c	22 d	18	0 d	0 d
A1581	9	3 c	8 e	8	5 c	13 c	13	13 b	24 d	20	0 d	0 d
IAC 77526 'Aurora'	9	0 d	0 f	0	0 d	0 d	0	0 e	0 g	0	0 d	0 d
Beauty Seedless	9	5 b	13 d	13	13 b	28 b	28	0 e	0 g	0	0 d	0 d
Cardinal	9	0 d	0 f	0	0 d	0 d	0	0 e	0 g	0	0 d	0 d
CG 28.467 'Emperatriz'	9	6 b	9 e	9	9 c	19 c	19	3 d	7 f	5	0 d	0 d
CG 39.915	9	9 a	12 d	12	6 c	13 c	13	9 c	13 e	10	0 d	0 d
CG 87.746	9	6 b	12 d	12	0 d	0 d	0	0 e	0 g	0	0 d	0 d
Christmas Rose	9	0 d	0 f	0	0 d	0 d	0	0 e	0 g	0	0 d	0 d
Feal	9	0 d	0 f	0	0 d	0 d	0	0 e	0 g	0	0 d	0 d
Fiesta	9	6 b	30 b	30	18 b	24 b	24	16 b	45 b	40	12 b	46 b
Flame Seedless	9	0 d	0 f	0	0 d	0 d	0	0 e	0 g	0	0 d	0 d
Itália Melhorada	9	0 d	0 f	0	0 d	0 d	0	0 e	0 g	0	0 d	0 d
Jupiter	9	9 a	60 a	60	51 a	148 a	148	54 a	172 a	160	24 a	76 a
Muscatel Caillaba	9	3 c	18 c	18	12 b	24 b	24	15 b	37 c	30	0 d	0 d
Paulistinha	9	9 a	32 b	32	15 b	21 b	21	18 b	39 c	32	8 c	23 c
Perlette	9	0 d	0 f	0	0 d	0 d	0	0 e	0 g	0	0 d	0 d
Ruby Seedless	9	0 d	0 f	0	0 d	0 d	0	0 e	0 g	0	0 d	0 d
TOTAL	162	59	199	199	134	300	300	138	359	315	44	145
C.V. (%)	-	24.4	18.7	-	25.9	12.9	-	21.3	10.0	-	27.3	14.1

Tabela 29. Estabelecimento, primeira, segunda e terceira multiplicação *in vitro* de videiras para mesa provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas nodais de cultivares de uvas de mesa. Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

	ESTABELECIAMENTO			PRIMEIRA MULTIPLICAÇÃO			SEGUNDA MULTIPLICAÇÃO			TERCEIRA MULTIPLICAÇÃO		
	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.
A1118	18	5 a	10 c	10	5 e	10 d	10	5 b	6 e	4	0 c	0 d
A1581	18	6 a	12 b	12	9 b	23 b	23	13 a	33 c	28	0 c	0 d
IAC 77526 'Aurora'	18	0 d	0 d	0	0 f	0 e	0	0 c	0 f	0	0 c	0 d
Beauty Seedless	18	0 d	0 d	0	0 f	0 e	0	0 c	0 f	0	0 c	0 d
Cardinal	18	0 d	0 d	0	0 f	0 e	0	0 c	0 f	0	0 c	0 d
CG 28.467 'Emperatriz'	18	2 c	9 c	9	2 e	7 c	7	5 b	7 e	5	0 c	0 d
CG 39.915	18	6 a	9 c	9	7 c	11 c	11	6 b	7 e	5	0 c	0 d
CG 87.746	18	0 d	0 d	0	0 f	0 e	0	0 c	0 f	0	0 c	0 d
Christmas Rose	18	0 d	0 d	0	0 f	0 e	0	0 c	0 f	0	0 c	0 d
Feal	18	0 d	0 d	0	0 f	0 e	0	0 c	0 f	0	0 c	0 d
Fiesta	18	3 b	12 b	12	8 b	20 b	20	14 a	39 b	32	6 b	15 c
Flame Seedless	18	0 d	0 d	0	0 f	0 e	0	0 c	0 f	0	0 c	0 d
Itália Melhorada	18	0 d	0 d	0	0 f	0 e	0	0 c	0 f	0	0 c	0 d
Jupiter	18	4 b	16 a	16	11 a	28 a	28	16 a	53 a	47	6 b	22 b
Muscatel Caillaba	18	0 d	0 d	0	0 f	0 e	0	0 c	0 f	0	0 c	0 d
Paulistinha	18	2 c	8 c	8	4 d	14 c	14	6 c	22 d	16	8 a	33 a
Perlette	18	0 d	0 d	0	0 f	0 e	0	0 c	0 f	0	0 c	0 d
Ruby Seedless	18	0 d	0 d	0	0 f	0 e	0	0 c	0 f	0	0 c	0 d
TOTAL	324	28	76	76	46	113	113	65	167	137	20	70
C.V. (%)	-	28.4	21.4	-	17.3	16.6	-	24.1	10.4	-	31.4	14.1

Tabela 30. Estabelecimento, primeira, segunda e terceira multiplicação *in vitro* de videiras para vinho provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas apicais de cultivares de uvas de vinho. Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

	ESTABELECIMENTO			PRIMEIRA MULTIPLICAÇÃO			SEGUNDA MULTIPLICAÇÃO			TERCEIRA MULTIPLICAÇÃO		
	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.
Alfrocheiro	9	0 b	0 b	0	0 c	0 c	0	0 b	0 c	0	0 c	0 c
Barbera	9	0 b	0 b	0	0 c	0 c	0	0 b	0 c	0	0 c	0 c
Carbenet Franc	9	0 b	0 b	0	0 c	0 c	0	0 b	0 c	0	0 c	0 c
Carmenère	9	0 b	0 b	0	0 c	0 c	0	0 b	0 c	0	0 c	0 c
IAC 138-22 (Máximo)	9	3 a	9 a	9	4 a	18 a	18	5 a	18 a	12	2 a	7 a
Moscatel Branca	9	0 b	0 b	0	0 c	0 c	0	0 b	0 c	0	0 c	0 c
Moscatel Grega	9	0 b	0 b	0	0 c	0 c	0	0 b	0 c	0	0 c	0 c
Moscatuel CG 102295	9	0 b	0 b	0	0 c	0 c	0	0 b	0 c	0	0 c	0 c
Muscat Noir	9	3 a	10 a	10	3 b	9 b	9	4 a	16 b	10	1 b	4 a
Muscat Saint Vallier	9	0 b	0 b	0	0 c	0 c	0	0 b	0 c	0	0 c	0 c
Syrah	9	0 b	0 b	0	0 c	0 c	0	0 b	0 c	0	0 c	0 c
Micheli Palieri	9	0 b	0 b	0	0 c	0 c	0	0 b	0 c	0	0 c	0 c
TOTAL	108	6	19	19	7	27	27	9	34	22	3	11
C.V. (%)	-	29.6	23.1	-	26.1	19.7	-	28.3	24.1	-	31.4	33.5

Tabela 31. Estabelecimento, primeira, segunda e terceira multiplicação *in vitro* de videiras para vinho provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Número de explantes inoculados (NUM. EXP. INO.), número de explantes regenerados (NUM. EXP. REG.) e número de gemas formadas (NUM. GEM.) originados a partir de meristemas nodais de cultivares de uvas de vinho. Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

	ESTABELECIMENTO			PRIMEIRA MULTIPLICAÇÃO			SEGUNDA MULTIPLICAÇÃO			TERCEIRA MULTIPLICAÇÃO		
	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.	NUM. EXP. INO.	NUM. EXP. REG.	NUM. GEM.
Alfrocheiro	18	0 b	0 c	0	0 c	0 d	0	0 d	0 d	0	0 c	0 d
Barbera	18	4 a	14 b	14	6 b	21 c	21	4 c	19 c	12	6 a	26 a
Carbenet Franc	18	0 b	0 c	0	0 c	0 d	0	0 d	0 d	0	0 c	0 d
Carmenère	18	0 b	0 c	0	0 c	0 d	0	0 d	0 d	0	0 c	0 d
IAC 138-22 (Máximo)	18	8 a	25 a	25	10 a	26 b	26	14 a	37 a	28	0 c	0 d
Moscatel Branca	18	0 b	0 c	0	0 c	0 d	0	0 d	0 d	0	0 c	0 d
Moscatel Grega	18	6 a	18 b	18	6 b	17 c	17	6 c	24 b	16	4 b	18 b
Moscatuel CG 102295	18	0 b	0 c	0	0 c	0 d	0	0 d	0 d	0	0 c	0 d
Muscat Noir	18	8 a	24 a	24	12 a	29 b	29	10 b	28 b	20	0 c	0 d
Muscat Saint Vallier	18	0 b	0 c	0	0 c	0 d	0	0 d	0 d	0	0 c	0 d
Syrah	18	4 a	20 a	20	6 b	24 c	24	8 b	27 b	20	3 b	8 c
Micheli Palieri	18	6 a	28 a	28	14 a	39 a	39	17 a	42 a	34	0 c	0 d
TOTAL	216	36	129	129	54	156	156	59	177	177	13	52
C.V. (%)	-	25.9	26.4	-	20.3	16.1	-	21.7	11.5	-	22.7	15.5