



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**



HUGO LEONARDO COELHO RIBEIRO

**INCIDÊNCIA, VARIABILIDADE MOLECULAR DE VÍRUS E
CULTIVO *IN VITRO* DE MERISTEMAS DE VIDEIRAS
CULTIVADAS NO SUBMÉDIO DO VALE DO SÃO
FRANCISCO**

HUGO LEONARDO COELHO RIBEIRO

**INCIDÊNCIA, VARIABILIDADE MOLECULAR DE VÍRUS E
CULTIVO *IN VITRO* DE MERISTEMAS DE VIDEIRAS
CULTIVADAS NO SUBMÉDIO DO VALE DO SÃO
FRANCISCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito para obtenção do título de Doutor em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Dr. Nataniel Franklin de Melo

FEIRA DE SANTANA – BA
2016

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

Ribeiro, Hugo Leonardo Coelho

R369i Incidência, variabilidade molecular de vírus e cultivo *in vitro* de meristemas de videiras cultivadas no Submédio do Vale do São Francisco / Hugo Leonardo Coelho Ribeiro. – Feira de Santana, 2016.

78 f. : il.

Orientador: Nataniel Franklin de Melo.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2016.

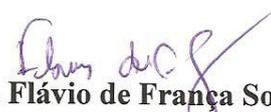
1. Videira – Cultivo *in vitro* – Vale do São Francisco. 2. Vinicultura – Vírus – Disseminação. I. Melo, Nataniel Franklin, orient. II. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

CDU: 663.25

BANCA EXAMINADORA


Profa. Dra. Adriana Rodrigues Passos
Universidade Estadual de Feira de Santana


Dra. Rafaela Priscila Antonio
Embrapa Semiárido


Dr. Flávio de França Souza
Embrapa Semiárido


Prof. Dr. Manoel Abilio de Queiróz
Universidade do Estado da Bahia


Dr. Nataniel Franklin de Melo
Embrapa Semiárido
Orientador e Presidente da Banca

Feira de Santana – BA

2016

*Dedico à minha amada esposa Jusciêne, pelo amor,
compreensão, carinho e paciência durante essa jornada.*

AGRADECIMENTOS

Ao Deus vivo, por me dar a razão de viver e pela Sua presença constante em minha vida;

Aos meus pais, Hugo Ribeiro e Ilma Ribeiro, e minhas irmãs Andréa, Ilma e Valéria, pelo amor, apoio e carinho;

Ao meu orientador, Nataniel Franklin de Melo, pela oportunidade, paciência e compromisso empenhado durante toda a pesquisa e pelo aprendizado que obtive durante todo o tempo em que permaneci sob sua orientação;

Aos colegas de turma, pelas conversas animadas nos intervalos das aulas e pelo auxílio durante as atividades;

A Ângela Katiussia, uma pessoa maravilhosa e dedicada ao trabalho, a qual não poupou esforço ao me auxiliar durante os trabalhos no laboratório e também pela sua amizade;

Aos colegas de laboratório, pelo apoio durante as pesquisas e pelo companheirismo: Eiryane, Maiany, Carla, Socorro, Lívia, Jéssica, Danilo, seu Francisco e todos que colaboraram – Muito obrigado!

Ao amigo Edmilson Dantas, pela amizade e pelas conversas animadoras durante os intervalos;

A Elenício, pela grande ajuda durante as coletas em campo e os experimentos;

À FAPESB, pela concessão da bolsa de estudos;

À Embrapa Semiárido, por todo o apoio e confiança que me foi concedida durante toda a minha carreira acadêmica.

Obrigado!

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”. (Claude Lévi-Strauss)

RESUMO GERAL

A videira é cultivada em vários países, sendo as bagas o produto principal com diversos usos, como uvas frescas, sucos e vinhos. A vitivinicultura é uma atividade econômica importante no Brasil, destacando-se o polo Petrolina, PE/Juazeiro, BA no Submédio do Vale do São Francisco (SVSF), como a principal região produtora de uvas finas de mesa do país. A multiplicação de mudas de videira é feita principalmente por propagação vegetativa, facilitando a difusão de patógenos, sendo uma das principais fontes de disseminação dos vírus. No presente estudo, objetivou-se avaliar a incidência dos vírus *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1), *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRV-3), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), e *Grapevine fleck virus* (GFkV), através da detecção por Double Antibody Sandwich ELISA (DAS-ELISA), em parreirais do SVSF, em seis municípios, localizados nos estados da Bahia e Pernambuco, como também analisar a capacidade regenerativa e desenvolvimento *in vitro* de 13 diferentes clones tropicais de videira obtidos pelo cultivo de meristemas apicais e de gemas axilares, e por fim, analisar a variabilidade dos fragmentos do gene da capa proteica (CP) do vírus do enrolamento da folha de cultivares de videiras tropicais do Vale do São Francisco. Das 490 amostras avaliadas, 320 são cultivares para mesa com e sem sementes, 94 para vinho e 76 de porta-enxertos. Infecções causadas por vírus foram detectadas em 79,4% das amostras. O GLRaV-3 foi o vírus mais disseminado, seguido por GVA, GFkV, GLRaV-1 e GFLV, respectivamente. Infecção mista foi detectada em 153 amostras. Cultivares para vinho, uvas finas de mesa e porta-enxertos apresentaram porcentagem total de infecção de 93,2%, 52,6% e 31,9%, respectivamente. Para a capacidade regenerativa e desenvolvimento *in vitro*, foram analisadas a porcentagem de regeneração, altura, e os números de gemas, raízes e folhas produzidas, bem como o comprimento dos segmentos internodais, aos 30, 60 e 90 dias de cultivo em meio de cultura 'MS' e 'Galzy', respectivamente. Das 13 cultivares testadas, quatro foram regeneradas com porcentagem variando entre 7% e 47%. A ocorrência de diferenças significativas entre as cultivares revelaram respostas distintas ao longo do tempo. 'Cabernet Sauvignon' apresentou a melhor resposta de regeneração de plantas partindo de meristema apical e de gemas axilares. 'IAC-572' destacou-se com as maiores médias de altura e números de gemas e de folhas aos 30, 60 e 90. Para determinar a variabilidade do gene da CP, amostras de 28 cultivares de videiras do BAG da Embrapa Semiárido com presença e ausência dos sintomas da doença foram analisadas por Transcriptase Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR). De todas as amostras para GLRaV -1, -2 e -3, zero, 10 e 19 apresentaram infecção, respectivamente, sendo que oito apresentaram infecção mista. Observou-se alta e baixa identidade entre os isolados obtidos com isolados brasileiros e estrangeiros para ambos os vírus, encontrando-se divergência genética do gene da CP em alguns isolados. 13 isolados não apresentaram homologia significativa com outros isolados do presente estudo e disponíveis no GENBANK, para GLRaV-3.

Palavras-chave: Levantamento. Sorologia. Regeneração. Meristema. RT-PCR. Capa proteica.

ABSTRACT

The vine is grown in many countries, the berries being the main product with many uses, such as fresh grapes, juices and wines. The wine industry is an important economic activity in Brazil, highlighting the pole Petrolina, PE / Juazeiro, BA in sub middle of San Francisco Valley (SSFV), as the main producing region of fine table grapes in the country. The multiplication of vine cuttings is done mainly by vegetative propagation, facilitating the spread of pathogens, one of the main sources of the spread of the virus. This study aimed to evaluate the incidence of *Grapevine virus A virus* (GVA), *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1), *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRV-3), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) and *Grapevine fleck virus* (GFkV) by detecting by Double Antibody Sandwich ELISA (DAS-ELISA) in grapevines of SSFV in six municipalities located in the states of Bahia and Pernambuco, as well as analyze the regenerative capacity and *in vitro* development of 13 different tropical clones of vine obtained by cultivation of apical meristems and axillary buds, and finally, to analyze the variability of the fragments of the protein coat (PC) gene of the virus winding the sheet cultivars of tropical vines of the San Francisco Valley. Of the 490 samples evaluated, 320 are cultivars for table with and without seeds, 94 for wine and 76 rootstocks. Infections caused by viruses were detected in 79.4% of samples. The GLRaV-3 was the most widespread viruses, followed by GVA GFkV, GLRaV-1 and GFLV, respectively. Mixed infection was detected in 153 samples. Cultivars wine, fine table grapes and rootstocks showed total percentage of 93.2% infection, 52.6% and 31.9%, respectively. For the regenerative capacity and development *in vitro*, we analyzed the percentage of regeneration time and the numbers of buds, roots and leaves produced as well as the length of the internodal segments 30, 60 and 90 days of cultivation in culture medium 'MS' and 'Galzy', respectively. Of the 13 cultivars tested, four were regenerated with a percentage ranging between 7% and 47%. The occurrence of significant differences among cultivars showed different responses over time. 'Cabernet Sauvignon' presented the best regeneration response starting from apical meristem and axillary buds. 'IAC-572' stood out with the highest average height and bud and leaf numbers 30, 60 and 90. To determine the variability of the CP gene, samples of 28 BAG vines cultivars of the Embrapa Semiarid with and without of disease symptoms were analyzed by reverse transcriptase and polymerase chain reaction (RT-PCR). Of all the samples GLRaV -1, -2 and -3, zero, 10 and 19 presented infection, respectively, and eight had mixed infection. There was a high and low identity between isolates obtained from Brazilian and foreign isolated for both viruses, finding genetic divergence of the CP gene in some isolates. 13 isolates showed no significant homology with other isolates in the present study and available on GENBANK, to GLRaV-3.

Keywords: Survey. Serological. Regeneration. Meristem. RT-PCR. Protein coat.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	01
Referências	05
CAPÍTULO I - INCIDÊNCIA DE CINCO VÍRUS EM VIDEIRAS CULTIVADAS NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO	07
1.1 Introdução	10
1.2 Material e métodos	11
1.3 Resultados	12
1.4 Discussão	14
1.5 Conclusão	17
Referências	17
CAPÍTULO II - CAPACIDADE REGENERATIVA DE TECIDOS MERISTEMÁTICOS E MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE VIDEIRAS CULTIVADAS NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO	25
2.1 Introdução	28
2.2 Material e métodos	29
2.3 Resultados e Discussão	31
2.3.1 Regeneração <i>in vitro</i> de plantas a partir de meristemas	31
2.3.2 Análise do desenvolvimento <i>in vitro</i> dos genótipos	33
2.4 Conclusão	35
Referências	36
CAPÍTULO III - DETECÇÃO E VARIABILIDADE DO GENE DA PROTEÍNA CAPSIDIAL DO GLRaV -1, -2 E -3 DE DIFERENTES CULTIVARES DE VIDEIRAS CULTIVADAS NO VALE DO SÃO FRANCISCO	42
3.1 Introdução	45
3.2 Material e métodos	48
3.3 Resultados e Discussão	50
3.3.1 Detecção molecular de GLRaV -1, -2, e -3	50
3.3.2 Análise das sequências obtidas	53
3.3.3 GLRaV-2	53
3.3.4 GLRaV-3	55
3.4 Conclusão	58
Referências	58
CONCLUSÃO GERAL	78

INTRODUÇÃO GERAL

O cultivo da videira (*Vitis* spp.) é uma atividade econômica importante no Brasil, destacando-se o polo Petrolina, PE/Juazeiro, BA no Submédio do Vale do São Francisco, como a principal região produtora de uvas finas de mesa do país. Nessa região são cultivadas, principalmente, as espécies *Vitis vinifera* L. (origem européia) e *Vitis labrusca* L. (origem americana), ocupando uma área próxima de 10.000 ha (IBGE, 2013) e responsável por cerca de 90% das exportações.

As condições edafoclimáticas desta região, associados às práticas de manejo e a irrigação, favorecem o cultivo da videira, permitindo duas safras anuais (LEÃO, SOARES e RODRIGUES, 2009). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2013, a produção de uva no país foi de 1,45 mil toneladas, ocupando uma área de aproximadamente 82 mil ha.

Atualmente a micropropagação tem sido uma das ferramentas mais utilizadas para dar suporte ao desenvolvimento científico e econômico para várias culturas alimentícias no mundo todo. Não sendo diferente com a cultura da videira, a necessidade do uso dessa ferramenta vem aumentando devido a sua importância tanto na distribuição de materiais de propagação sadio quanto na manutenção de Banco Ativos de Germoplasma (BAG) e, também, servindo de apoio a outros programas de pesquisa, inclusive na região do Submédio do Vale do São Francisco, por representar alto potencial produtivo e haver carência de estudos nesse sentido (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PINHAL et al., 2011).

Entretanto, para aplicação da micropropagação, são necessários estudos específicos voltados para a cultivar de interesse. Isto implica em atividades que elucidem as melhores formas de produzir material propagativo *in vitro* de forma mais eficiente, com a finalidade de reduzir o tempo de desenvolvimento vegetativo. Essas práticas irão permitir aumentar a eficiência das etapas que vão desde o estabelecimento da cultura *in vitro* até seu enraizamento, culminando com a aclimatização da microplanta (BASTOS et al., 2007).

Na cultura de tecidos, um dos grandes problemas que afetam o uso da micropropagação é a variabilidade genética entre diferentes cultivares da mesma espécie, resultando na baixa eficiência dos protocolos aplicados. A melhor combinação de um meio de cultura para videiras depende da cultivar, havendo necessidade de um mesmo protocolo sofrer variações na sua composição, tanto na concentração dos nutrientes quanto na presença de fitorreguladores. Por isso torna necessário realizar pesquisas em plantas nas condições *in vitro*, visando determinar diferenças no desenvolvimento de diferentes cultivares em resposta

a determinado meio de cultura (IBÁÑEZ, VALERO, MORTE, 2005; SKIADA, GRIGORIADOU, ELEFTHERIOU, 2010).

O uso de meristema apical como fonte de explante na micropropagação na cultura da videira é amplamente utilizado, não só pela confiabilidade genética do material a ser propagado, mas principalmente pela produção de clones livres de vírus (PASSOS, SONDAHL, RIBEIRO, 1985). De acordo com Grout (1990) e reportado por Panattoni e Triolo (2010), a razão de se originar novas plantas livres de viroses a partir de meristemas é devido ao fato dos mesmos se encontrarem dispersos no floema e o tecido meristemático não possuir tecido vascular diferenciado, assim não permitindo o trânsito dos vírus no meristema, mantendo-o sadio. Alternativamente, o uso desta técnica em conjunto com a termoterapia, aumentam as chances de se obter maior quantidade de materiais sadios com maior confiabilidade (BARÁNEK et al., 2009), e mesmo que os vírus não sejam eliminados, a alta temperatura diminui sua replicação, evitando que infectem novos brotos formados durante o procedimento (PANATTONI e TRIOLO, 2010).

Apesar dessa técnica ser bastante promissora, é apenas uma medida profilática. Atualmente não existe tratamento curativo para viroses das espécies cultivadas de *V. vinifera* e *V. labrusca*. Uma vez que a planta esteja infectada no campo, é impossível eliminar os vírus por métodos tradicionais como os usados para outros patógenos como fungos, bactérias, dentre outros (ANDRET-LINK et al., 2004).

No Brasil, as viroses ocorrem em praticamente todas as regiões vitícolas e a incidência, em muitas dessas regiões, em cultivares americanas e europeias, é bastante expressiva (BASSO et al., 2010). A presença desses patógenos causa vários prejuízos ao cultivo da videira, dentre os quais, reduções no rendimento e na qualidade das uvas, redução da vida útil do vinhedo e, dependendo da severidade da infecção, pode comprometer totalmente a produção e até causar a morte da planta (LIMA et al., 2009).

Já foram relatadas em vários países em torno de 70 espécies virais na cultura da videira, embora nem todas apresentem importância econômica (NAIDU et al., 2014). Segundo Lima (2009), no Brasil, foram detectados dez tipos de vírus, sendo estes estirpes do *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV-1, -2, -3, -5 e -6), *Grapevine virus A e B* (GVA e GVB), *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV), *Grapevine fleck virus* (GFkV) e *Grapevine fanleaf virus* (GFLV). Além da disseminação por meio do material propagativo, o GFLV pode ser transmitido por nematóides do gênero *Xiphinema*. Espécies do gênero *Ampelovirus* (GLRaV-1 e -3, -5, -9) e *Vitivirus* (GVA e GVB) são também disseminados por

cochonilhas do algodão (Família Pseudococcidae) e de carapaça (Família Coccidae). Geralmente, neste tipo de transmissão, os insetos são contaminados quando estes se alimentam de planta infectada, porém não há relatos de infecção por inoculação mecânica e ferramentas de poda, dentre outros (FAJARDO; NICKEL; EIRAS, 2011; LIMA, 2009).

Segundo Tsai et al. (2008) o vírus do enrolamento da folha é uma doença que atinge os parreirais das principais regiões vitícolas do globo, sendo considerado como uma das doenças virais mais destrutivas em videiras e responsável por 10 a 70% de perdas na produção de uva (WALKER et al., 2007). Sabe-se que o complexo do enrolamento da folha é composto por até nove vírus sorologicamente distintos. Com exceção do GLRaV-2, o qual pertence ao gênero Closterovirus, os demais (GLRaV-1 a 9) pertencem ao gênero Ampelovirus (MARTELLI et al., 2002), embora todos pertençam à família Closteroviridae (AL RWAHNIH et al., 2013).

O sintoma mais característico da doença causada pelo complexo de vírus do enrolamento é a presença de mosaico no limbo foliar e a epinastia dos bordos da folha, no qual giram para baixo. Esses sintomas podem ser observados precocemente e com relativa facilidade em folhas das variedades de *Vitis vinifera* tintas e brancas. Nas viníferas tintas, o limbo toma uma coloração vermelho-violácea, permanecendo verde o tecido ao longo das nervuras principais, embora em plantas muito afetadas a coloração violeta-avermelhada possa atingir todo o tecido foliar. Nas viníferas brancas infectadas, o limbo apresenta uma leve coloração amarelo-pálida (KUHN; NICKEL, 1998). A virose responsável pelo enrolamento da folha (GLRaV-1 a -9) é uma das mais importantes, podendo infectar tanto cultivares de copa quanto de porta-enxerto (LIMA, 2009). Nesse caso, como geralmente a videira é multiplicada por propagação vegetativa para comercialização, a ocorrência de infecção latente potencializa a disseminação desses vírus. Isso favorece a ocorrência de doenças complexas, pelo acúmulo de várias estirpes virais em um mesmo indivíduo (MARTELLI, 2009).

Facilmente, as viroses podem passar despercebidas, ou seja, sem apresentar sintomas visivelmente perceptíveis. Essa expressão diferencial de sintomas na videira podem variar em função das condições ambientais, do estágio fenológico da planta, da fertilidade do solo e, principalmente, devido à combinação envolvendo a cultivar hospedeira e a estirpe viral (BASSO et al, 2010). Considerando as principais viroses da videira, dentre elas o enrolamento da folha e lenho rugoso, verifica-se uma escala gradativa de expressão de sintomas, partindo das cultivares americanas e híbridas, as quais não exibem sintomas de determinadas viroses

ou estas não são características ou facilmente perceptíveis, até as cultivares viníferas, que normalmente expressam os sintomas com evidência (KOVACS et al., 2001).

Segundo LIMA (2009), diversos métodos têm sido desenvolvidos para a detecção e identificação de vírus de plantas. A diagnose de doenças virais em videira é baseada principalmente, em resultados obtidos nos testes de campo e nos testes laboratoriais. Isso acontece porque a sintomatologia apresentada por plantas enfermas no campo pode ser complexa, envolvendo diversos agentes virais e não ser característica de uma doença em particular, tendo que considerar, também, a ocorrência de infecção latente.

Uma das técnicas mais indicadas para diagnose de viroses pelos programas de certificação é a sorológica, uma metodologia baseada na reação anticorpo-antígeno denominada “ELISA” (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (ENGEL et al., 2010).

O método ELISA é baseado no princípio básico da sorologia, onde o antígeno é reconhecido por um anticorpo (imunoglobulina) específico, formando o complexo anticorpo-antígeno, associado a propriedades colorimétricas. É uma técnica bastante sensível, detectando entre 20 a 100 ng de partículas virais com boa precisão, sendo a reação específica para a virose em questão, e sendo mais eficiente quando comparado à indexação biológica que demanda meses para gerar resultados (ENGEL et al., 2010).

O método molecular de detecção de vírus em planta, conhecido como Transcrição Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR), é altamente sensível, rápido, versátil e confiável, sendo uma ferramenta poderosa na detecção de vírus. Para a realização deste método, parte da sequência do genoma do vírus a ser detectada, precisa ser conhecida para dar origem aos oligonucleotídeos que são utilizados na reação. A RT-PCR tem como objetivo transcrever e amplificar o fragmento do genoma do vírus estudado. Os fragmentos de DNA gerados podem ser visualizados em um gel de agarose corado com brometo de etídeo, sob luz ultravioleta, dentre outros métodos de visualização (FAJARDO; NICKEL; EIRAS, 2011; LIMA et al., 2009).

A RT-PCR pode auxiliar no desenvolvimento de trabalhos voltados para o melhoramento genético de plantas, visando selecionar genótipos resistentes a determinados patógenos virais, partindo do pressuposto da ausência dos vírus em questão nos genótipos estudados. O mesmo tem sido empregado com eficiência para a identificação de vírus causadores de doenças em videiras (BASSO et al., 2010; BERTAZZON e ANGELINI, 2004; RADAELLI et al., 2009).

Apesar de haver vários relatos investigando diferenças nas respostas de cultivares de videira micropropagadas em diferentes tipos de meios de cultura e fitorreguladores, bem como a caracterização biológica e molecular de vírus que infectam essa cultura, faltam estudos mais específicos em materiais cultivados sob as condições do semiárido tropical.. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi quantificar a ocorrência dos principais vírus que incidem nos parreirais instalados em diferentes locais na região do Submédio do Vale do São Francisco, assim como também avaliar genótipos de videiras que possibilitem o cultivo asséptico *in vitro*, e caracterizar os vírus do complexo do enrolamento da folha GLRaV- 2 e 3, através do gene da capa proteica, que infectam importantes genótipos cultivados na região em questão.

REFERÊNCIAS

- AL RWAHNIH, M. et al. Association of a DNA virus with grapevines affected by red blotch disease in California. **Phytopathology**, v. 103, n. 10, p. 1069–76, 2013.
- ANDRET-LINK, P. et al. Grapevine fanleaf virus: still a major threat to the grapevine industry. **Journal of Plant Pathology**, v. 86, n. 3, p. 183-1952, 2004.
- BARÁNEK, M. et al. DNA-methylation changes in grapevine somaclones following in vitro culture and thermotherapy. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 101, n. 1, p. 11–22, 2009.
- BASSO, M. F. et al. Detecção e identificação molecular de vírus associados a videiras sintomáticas e assintomáticas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 11, p. 2249–2255, 2010.
- BASTOS, L. P. et al. Cultivo in vitro de mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p.1122-1124, 2007.
- 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.
- FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O.; EIRAS, M. Detecção e caracterização molecular dos genes da proteína capsidial de ilarvírus e ampelovírus que infectam fruteiras temperadas. **Ciência Rural**, v. 41, n. 1, p. 5–9, 2011.
- GROUT, B. W. W. Meristem-tip culture for propagation and virus elimination. In: HALL, R.D. (Ed.), *Methods in Molecular Biology*. **Human Press Inc**. Totowa, vol. 111, 1990, p. 115–125.
- 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: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p. 99-169.
- IBÁÑEZ, A.; VALERO, M.; MORTE, A. Establishment and in vitro clonal propagation of the spanish autochthonous table grapevine cultivar Napoleon - an improved system where proliferating cultures alternate with rooting ones. **Anal. Biol.** n. 27, p. 211-220, 2005

- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento sistemático da produção agrícola. 2012. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda>>. Acesso em: 06 abril 2014.
- LEÃO, P. C. de S.; SOARES, J. M.; RODRIGUES, B. L. **Principais cultivares**. In: LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M. A. Viticultura no semiárido brasileiro. Embrapa, Brasília, 2009. p.150-214.
- LIMA, M. F. **Deteção e controle de viroses em videiras**. Circular Técnica, n. 90, p. 1-9, 2009.
- LIMA, M. et al. Genomic study and detection of a new variant of Grapevine rupestris stem pitting associated virus in declining California pinot noir grapevines. **Journal of Plant Pathology**, v. 91, n. 1, p. 155–162, 2009.
- KOVACS, L. et al. Latent infection by leafroll agent GLRaV- 3 is linked to lower fruit quality in French-American hybrid grapevines Vidal blanc and St. Vincent. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.52, p. 254-259, 2001.
- KUHN, J. B.; NICKEL, O. Viroses e sua importância na viticultura brasileira. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v. 19, n. 194, p. 85-91, 1998.
- MARTELLI, G. P. et al. The family Closteroviridae revised. **Archives of Virology**, v. 147, p. 2039-2044, 2002. MARTELLI, G.P. **Grapevine virology highlights 2006-09**. In: Meeting of international council of viruses and virus diseases of grapevine. Dijon, France. ICVG, 2009. n. 16 p.15-23. NAIDU, R. et al. Grapevine leafroll: a complex viral disease affecting a high value fruit crops. **Plant Dis**, v. 98, n. 9, p. 1172–1185, 2014.
- PANATTONI, A.; TRIOLO, E. Susceptibility of grapevine viruses to thermotherapy on in vitro collection of Kober 5BB. **Scientia Horticulturae**, v. 125, n. 1, p. 63–67, maio 2010.
- PASSOS, I.; SONDAHL, M.; RIBEIRO, I. 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.
- PINHAL, H. F. et al. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7, p. 1136–1142, 2011.
- RADAELLI, P. et al. Variabilidade do gene da proteína capsidial de três espécies virais que infectam videiras no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, p. 297-305, 2009.
- SKIADA, F.; GRIGORIADOU, K.; ELEFThERIOU, E. Micropropagation of *Vitis vinifera* L. cv. 'Malagouzia' and "Xinomavro". **Central European Journal of Biology**, v. 5, n. 6, p. 12–14, 2010.
- TSAI, C. W. et al. Transmission of Grapevine leafroll-associated virus 3 by the Vine Mealybug (*Planococcus ficus*). **Phytopathology**, v. 98, n. 10, p. 1093-1098, 2008. Walker, A. R. et al. White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *Plant Journal*, v. 49, p.772–785, 2010.

**CAPÍTULO I - INCIDÊNCIA DE CINCO VÍRUS EM VIDEIRAS CULTIVADAS NO
SEMIÁRIDO BRASILEIRO**

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a incidência de cinco vírus em parreirais do Submédio do Vale do São Francisco. Um total de 490 amostras foi coletado nos municípios de Lagoa Grande, Petrolina e Santa Maria da Boa Vista, em Pernambuco e Casa Nova, Juazeiro e Sento Sé, na Bahia. Neste levantamento, foram avaliadas 320 amostras de videiras para mesa com sementes ('Benitaka', 'Brasil' e 'Itália') e sem sementes ('Catalunha', 'Marroo Seedless', 'Superior Seedless' e 'Thompson Seedless'), 94 para vinho ('Alicante Bouschet', 'Cabernet Sauvignon', 'Merlot', 'Moscato Canneli', 'Petit Syrah' e 'Seibel') e 76 de porta-enxertos ('Courdec-1613', 'Harmony', 'IAC-313', 'IAC-572', 'IAC-766', '420-A', '101-14', 'Paulsen 1103', e 'SO4'). A análise foi realizada por meio do teste DAS-ELISA para detecção dos vírus GLRaV-3, GVA, GFkV, GLRaV-1, e GFLV. Infecções causadas por vírus foram detectadas em 79,4% das amostras analisadas. GLRaV-3 foi o vírus mais disseminado (79,4% das amostras), seguido por GVA (23,3%), GFkV (5,3%), GLRaV-1 (2%) e GFLV (1,6%). Foi detectado em 153 plantas, dentre elas, variedades de vinho, mesa e porta-enxerto a presença de mais de um tipo de vírus. Cultivares de videiras para vinho, uvas finas de mesa, e porta-enxertos apresentaram infecção de 93,2%, 52,6% e 31,9%, respectivamente. Este é o primeiro estudo extensivo de detecção de vírus em videiras cultivadas no semiárido brasileiro.

Palavras-chave: Levantamento. *Vitis* sp., Viroses. Sorologia.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the incidence of five virus in vineyards of the sub middle of the San Francisco Valley. A total of 490 samples were collected in the municipalities of Lagoa Grande, Petrolina and Santa Maria da Boa Vista state Pernambuco and Casa Nova, Juazeiro and Sento Sé state of Bahia. In this survey, were evaluated 320 samples of vines for table with seeds (Benitaka, Brazil and Italy) and seedless (Catalonia, Marroo Seedless, Seedless Superior and Thompson Seedless), 94 for wine (Alicante Bouschet, Cabernet Sauvignon, Merlot, Moscato Canneli , Petit Syrah and Seibel) and 76 rootstocks (Courdec-1613, Harmony, IAC-313, IAC-572, IAC-766, 420-a, 101-14, Paulsen 1103, and SO4). The analysis was performed by DAS-ELISA for detection of GLRaV-3 virus, GVA, GFkV, GLRaV-1, and GFLV. Infections caused by viruses were detected in 79.4% of samples. GLRaV-3 was the most widespread viruses (79.4% of samples), followed by GVA (23.3%), GFkV (5.3%) GLRaV-1 (2%) and GFLV (1.6%). It was detected in 153 plants, including varieties of wine, table and rootstock the presence of more than one type of virus. Cultivar vines for wine, fine table grapes and rootstocks showed infection of 93.2%, 52.6% and 31.9%, respectively. This is the first extensive study of virus detection in vines grown in the Brazilian semiarid.

Keywords: Survey. *Vitis* sp., Virus diseases. Serology.

1.1 INTRODUÇÃO

O polo Petrolina-PE/Juazeiro-BA no Submédio do Vale São do Francisco destaca-se como a principal região produtora de uvas finas de mesa (*Vitis vinifera* L.) do Brasil, contribuindo com mais de 90% das exportações brasileiras dessa frutífera. O cultivo de videira nesta região, iniciado na década de 70 com a criação dos projetos públicos de irrigação, contou com uma área total de 10.000 ha, dos quais 90%, encontram-se em fase produtiva (IBGE, 2013). Os ciclos produtivos das uvas de mesa com e sem sementes são condicionados, principalmente, ao manejo fitotécnico da cultura que associado às condições edafoclimáticas do semiárido brasileiro, propiciam a obtenção de duas safras anuais (LEÃO et al., 2009).

Por outro lado, entre as doenças que afetam a cultura da uva, aquelas causadas por vírus são difíceis de serem controladas, além de serem bastante destrutivas. 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 (CATARINO et al., 2015).

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 bachelos e no pegamento das enxertias; aumento da suscetibilidade do material às injúrias e até morte de plantas, sendo os vírus *Grapevine leafroll associated virus-1* e *-3* (GLRaV-1 e -3), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) e *Grapevine fleck virus* (GFkV) os mais citados (KUHN, 1989; KUHN, 1992A; KUHN, 1992B; MARTELLI, 2009; PACIFICO et al., 2011; 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.

No Submédio do Vale do São Francisco, a incidência de sintomas característicos de pelo menos cinco viroses em cultivares de copa para mesa e para vinho foi estimada entre 15 e 55%, determinadas apenas pela visualização da presença de sintomas (HEGEDUS, 1992). Entretanto, estas observações não foram acompanhadas por avaliações por meio da indexação em plantas indicadoras, testes sorológicos e/ou moleculares, resultando em dados pouco consistentes e inconclusivos para a região. Algumas identificações de vírus em amostras

coletadas de parreirais desta região têm sido realizadas nestes últimos anos, por meio de testes sorológicos e da reação em cadeia da polimerase - PCR (KUHN et al. 2000; DIANESE et al., 2005; RAMALHO et al., 2011; CATARINO et al., 2015). Entretanto, apesar da identificação de infecções causadas por vírus em plantas de cultivares para mesa e para vinho, estes estudos não refletem a real situação sanitária de parreirais da região, considerando-se que apenas um número limitado de amostras foi analisado. Há carência de informações geradas por meio da realização de levantamentos sistemáticos, abrangentes, e que representem o real estado fitossanitário das videiras desta região, com relação às doenças de origem viral. Estes resultados visam, principalmente, a orientar os produtores para a importância da utilização de material propagativo sadio na produção de mudas e em enxertias e, assim, diminuir a disseminação destes patógenos.

Dessa forma, foi investigado a incidência dos vírus GLRaV-1, GLRaV-3, GVA, GFkV e GFLV em parreirais do Submédio do Vale São do Francisco por meio do teste DAS-ELISA (*double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay*).

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de videiras com idade variando entre um e 20 anos, exibindo ou não sintomas característicos de vírus, foram coletadas em parreirais comerciais de três municípios do estado de Pernambuco, sendo Lagoa Grande (87) (Latitude 08°59'49"S e Longitude 40°16'19"W), Petrolina (241) (Latitude 09°23'55"S e Longitude 40°30'03"W) e Santa Maria da Boa Vista (5) (Latitude 08°48'28"S e Longitude 39°49'32"W) e de três municípios do estado da Bahia, sendo Casa Nova (26) (Latitude 09°09'43"S e Longitude 40°58'15"W), Juazeiro (124) (Latitude 09°24'42"S e Longitude 40°29'55"W) e Sento Sé (7) (Latitude 09°44'45"S e Longitude 41°53'07"W), entre os anos de 2005 e 2013 (Tabela 1).

Um total de 490 amostras de videira foram coletados no período compreendido entre o final da fase vegetativa, produção, até a fase de repouso e, também de mudas em viveiros. Na avaliação foram incluídas 320 amostras de plantas de sete cultivares de copa de uvas para mesa, sendo quatro com sementes ('Benitaka', 'Brasil' e 'Itália') e quatro sem sementes ('Catalunha', 'Marroo Seedless', 'Superior Seedless' e 'Thompson Seedless'), 94 amostras de seis cultivares de copa para vinho ('Alicante Bouschet', 'Cabernet Sauvignon', 'Merlot', 'Moscato Canneli', 'Petit Syrah' e 'Seibel') e 76 amostras de nove cultivares para porta-enxerto ('Courdec 1613', 'Harmony', 'IAC-313', 'IAC-572', 'IAC-766', '420-A', '101-14',

‘Paulsen 1103’ e ‘SO4’) (Tabela 1). A coleta foi realizada aleatoriamente no parreiral, sendo que o número de plantas fontes das amostras variou de acordo com o número de plantas disponíveis no parreiral para cada cultivar, em cada município. Cada amostra foi constituída por pelo menos cinco folhas das posições basal e apical do ramo. O material, após a coleta, foi acondicionado em sacos de plástico em recipiente de isopor contendo gelo. Os testes sorológicos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido, Petrolina-PE.

As amostras foram analisadas por meio do teste sorológico DAS-ELISA (*double antibody sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay*), de acordo com Clark & Adams (1977). Os testes foram realizados utilizando-se antissoros policlonais (Biorad/Sanofi, França) contra cinco vírus: *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1), *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRV-3), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), e *Grapevine fleck virus* (GFkV), segundo as recomendações do fabricante. Antes do processamento das amostras, dois tipos de tecidos foram individualizados: pecíolos e nervuras, fonte de antígeno para a detecção do GLRV-1, GLRV-3 e GVA, e limbo foliar para detecção do GFkV e GFLV.

As placas de microtitulação foram cobertas com 200 µL de IgG diluído 1:1000 em tampão de revestimento (Na₂CO₃/NaHCO₃ 0,05 M, pH 9,6) e incubadas a 37 °C por 2 h. No preparo do antígeno, as amostras, após congelamento em nitrogênio líquido, foram maceradas em almofariz com auxílio de um pistilo, em tampão de extração [Tris-HCl 0,5M pH 8,2; NaCl 0,8%; PVP 40000 2% (p:v); PEG 6000 1% (p:v); Tween-20 0,05% (v:v)] na proporção 1:6 (p:v). Alíquotas de 200 µL de extrato foliar foram depositadas nas cavidades das placas, com posterior incubação a 4° C por 24 h. Os controles positivos e negativos para cada um dos vírus testados foram fornecidos pelo fabricante dos antissoros (Biorad/Sanofi, França). O conjugado (anticorpo + fosfatase alcalina) diluído 1:1000 em tampão de conjugado foi adicionado às placas, na quantidade de 200 µL/cavidade, seguido de incubação à 37° C por um período de 2 h. Alíquotas de 200 µL do substrato da enzima (*p*-nitrofenil fosfato; 1 mg L⁻¹) dissolvido em tampão (dietanolamina 10%, pH 9,8) foram adicionados às cavidades, sendo as placas mantidas na ausência de luz à temperatura ambiente. Após cada um dos períodos de incubação, as placas foram lavadas três vezes com 1x PBS Tween, pH 7.4 (20 mM NaH₂PO₄; 140 mM NaCl; 0,5% Tween-20).

A absorbância foi lida a 405 nm em leitora de placas (Tecsan Sunrise, Áustria). Foi considerada como positiva a amostra cujo valor da absorbância foi igual a pelo menos duas

vezes o valor do controle negativo. Adotaram-se duas repetições por amostra, sendo que cada uma foi constituída por duas cavidades em uma mesma placa.

1.3 RESULTADOS

Do total de 490 amostras coletadas, 79 % foram positivas para um ou mais dos antissoros testados (Tabela 1). Segundo os resultados dos testes sorológicos, a porcentagem média de infecção nos parreirais avaliados dos municípios do estado da Bahia foi 61,5 % em Casa Nova, 79,8 % em Juazeiro, e 71,4 % em Sento Sé, enquanto que no estado de Pernambuco estes níveis foram de 78,2 % em Lagoa Grande, 80,9 % em Petrolina, e de 100 % em Santa Maria da Boa Vista (Figura 1).

A incidência total de vírus entre cultivares para mesa foi de 87,5 %, sendo 97 % em cultivares com sementes, e de 71,2 % em cultivares sem sementes. A porcentagem de infecção para videiras com sementes variou de 91 % para Benitaka, a 100 % para Brasil e Itália. Para as uvas sem sementes, estes valores foram de 69,2 % para Thompson Seedless, 71,4 % para Catalunha, 71,6 % para Superior Seedless, e 72,7 % para Marroo Seedless (Figura 2).

Em cultivares para vinho, infecções causadas por vírus foram detectadas em 88,3 % das amostras testadas. Verificou-se que 25 % das videiras Alicante Bouschet, 96,2 % de Cabernet Sauvignon, 84,4 % de Petit Syrah e 100 % de Moscato Canneli, Merlot e Seibel foram positivas para um ou mais dos antissoros testados (Figura 3).

Em porta-enxertos verificou-se que a incidência média de infecção por vírus foi de 31,6 %. Estas porcentagens foram de 6 % para SO4, 20 % para IAC-766, 27,3 % para IAC-313, e 100 % para os genótipos Courdec 1613, Harmony e IAC-572 (Figura 4). Plantas das cultivares Paulsen 1103, 420-A e 101-14 testaram negativo para os antissoros considerados neste trabalho.

Os maiores valores de incidência de vírus observados foram para o GLRaV-3, seguido pelo GVA. Os vírus GFkV, GLRaV-1 e GFLV foram detectados em apenas 26, 10 e 8 amostras, respectivamente (Tabela 1).

A presença de infecção mista, com a ocorrência de mais de um tipo de vírus em uma mesma planta, foi verificada em 155 videiras. O GLRaV-3 foi o de maior incidência, seguido pelas infecções por GVA, GLRaV-1, GFLV e GFkV. Em apenas duas amostras do porta-enxerto IAC-766, verificou-se a ocorrência de três vírus (GLRaV-3, GLRaV-1 e GFkV)

em uma mesma planta. À exceção do GLRaV-3 e do GFLV detectados em infecção simples em 234 e 3 amostras, respectivamente, os demais vírus, GLRaV-1, GVA e GFkV, ocorreram apenas em infecção mista.

Do total de 94 videiras para vinho analisadas, em 56 amostras verificou-se apenas o GLRaV-3, enquanto que nas demais 27 amostras verificou-se a presença de GLRaV-3 e GLRaV-1 ou GLRaV-3 e GFkV. As amostras das cultivares Moscato Canneli e Merlot estavam infectadas com GFkV e GLRaV-3, respectivamente (Tabela 1).

As amostras das cultivares de porta-enxerto foram positivas para um ou mais dos seguintes vírus: GLRaV-3 (24 amostras), GLRaV-1 (duas amostras), GFLV (oito amostras) e GFkV (quatro amostras) (Tabela 1). Todas essas amostras testaram negativas contra o antissoro para o GVA. A presença de mais de um tipo de vírus foi constatada em nove amostras. Duas plantas de IAC-766 apresentaram infecção por GLRaV-1, GLRaV-3 e GFkV e, em sete plantas do porta-enxerto Harmony, detectou-se a infecção por GLRaV-3 e GFkV (duas amostras) e GLRaV-3 e GFLV (cinco amostras).

1.4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com os testes sorológicos para os cinco vírus (GLRaV-3, GLRaV-1, GVA, GFkV e GFLV) realizados em parreirais de uva para mesa com e sem sementes, vinho e em porta-enxertos na região do Submédio do Vale do São Francisco, revelaram que 387, das 490 amostras analisadas, estavam infectadas com pelo menos um dos vírus avaliados. A incidência foi maior em cultivares para vinho e para mesa do que em porta-enxertos. Considerando-se estas informações, alguns pontos podem ser destacados no presente estudo: (a) a alta incidência de vírus detectada nas amostras coletadas; (b) a alta incidência dessas doenças em uvas para vinho e para mesa; (c) a baixa incidência em porta-enxertos; (d) a prevalência de GLRaV-3 e de GVA; (e) a detecção de GFkV; (f) a baixa incidência de GLRaV-1 e GFLV.

De acordo com a porcentagem de videiras positivas para infecção por município, verificou-se uma incidência média menor nos parreirais amostrados do estado da Bahia em relação àqueles de Pernambuco, apesar dessa diferença ser pequena (Figura 2). Neste último, vale ressaltar que o número de amostras coletadas em áreas de Santa Maria da Boa Vista (apenas cinco videiras), não é representativo para este município. As altas porcentagens de amostras positivas detectadas nestas áreas sugerem que a disseminação destes patógenos

nestes parreirais ocorreu provavelmente via material propagativo infectado, que se constitui no principal, e também no mais frequente e eficiente mecanismo de disseminação de vírus em videira.

Entretanto, o estado sanitário das cultivares de porta-enxertos foi diferente, considerando-se que apenas 31,6 % das plantas testadas estavam infectadas e que nenhuma infecção foi detectada em videiras dos porta-enxertos 420-A, 101-14 e Paulsen 1103.

As amostras analisadas foram coletadas em períodos do ano nos quais o título viral nas plantas foi adequado à detecção por meio de testes sorológicos. Neste caso, as amostras utilizadas como fonte de antígeno foram representativas, mesmo considerando que a localização da maioria dos vírus que infectam videiras seja limitada ao floema ou sofrem variações sazonais com distribuição irregular na planta. Entretanto, estes fatores, aparentemente, não tiveram influência na detecção dos vírus avaliados, considerando-se a peculiaridade do clima no Semiárido tropical brasileiro, com predominância de temperaturas médias em torno de 25°C, o que permite o cultivo da videira durante todo o ano. Considerando a consistência dos resultados obtidos, pode-se afirmar que o teste ELISA foi adequado, sensível e eficiente na detecção do GLRaV-1, GLRaV-3, GVA, GFLV e GFkV.

O GLRaV-3 foi o vírus mais frequente e, portanto, o mais disseminado nos parreirais estudados (Tabela 1). Verificou-se a prevalência do GLRaV-3 em amostras de uvas para mesa, vinho e em porta-enxertos. Em contraste, o GLRaV-1 foi detectado em apenas 2 % das plantas. Considerando-se as videiras avaliadas, a incidência de GLRaV-3 nas amostras dos parreirais avaliados do estado da Bahia foram menores em relação ao Pernambuco. A prevalência de GLRaV-3 em comparação ao GLRaV-1 verificada neste trabalho, também tem sido constatada tanto no Brasil como em outros países produtores (ZIMMERMANN et al., 1990; MILKUS; GOODMAN, 1990; WILCOX et al., 1998; MACKENZIE; JOHNSON; WARNER, 1996; FAJARDO et al., 2002; AHMED et al., 2004; BITTENCOURT et al., 2009; KOMOROWSKA et al., 2014; CATARINO et al., 2015). Nos trabalhos destes autores, vírus como o GLRaV-3 foram detectados em valores que algumas vezes superam mais de 90 % das amostras.

O GLRaV-3 é um dos vírus mais severos associados ao enrolamento da folha da videira. Esta doença ocorre também em parreirais de outras regiões produtoras do Brasil. No estado de São Paulo, por exemplo, o GLRaV-3 foi relatado com incidência de 78,1 % e 32,9 % na maioria das cultivares de copa e porta-enxertos, respectivamente (KUNIYUKI; COSTA, 1987). O vírus ocorre também em parreirais dos estados de Goiás, Minas Gerais, Paraná e

Santa Catarina (KUNIYUKI, 1981). No Rio Grande do Sul, observou-se que nas cultivares americanas (*V. labrusca*) e híbridas estes vírus encontram-se de forma latente (KUHN, 1992a).

O GVA foi detectado em 23,3 % das plantas, enquanto que o GFkV e o GFLV foram menos frequentes. A detecção do GFkV ocorreu em uma cultivar de uva para mesa, duas cultivares viníferas e duas cultivares para porta-enxerto (Tabela 1). No Brasil, este vírus ocorre em parreirais dos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Pernambuco (KUHN, 1992a; KUNIKYUKI et al., 2002; CATARINO et al., 2015). Em diversos países produtores, o GFkV faz parte de programas de seleção sanitária, devido a sua alta ocorrência em cultivares de copa e porta-enxerto inclusive, em muitos casos, com ocorrência de forma latente (MARTELLI et al., 2002; KUHN; FAJARDO, 2002). A infecção por GFLV foi detectada apenas em cultivares de porta-enxerto (Tabela 1, Figura 5).

A detecção dos vírus no semiárido brasileiro confirma relatos anteriores (FAJARDO et al., 2002; DIANESE et al., 2005; KUHN et al., 2000; RAMALHO et al., 2006, CATARINO et al., 2015). Entretanto, nos trabalhos destes autores, apenas amostras coletadas de videiras adultas haviam sido testadas. No presente estudo, amostras coletadas em viveiros, de plantas na fase de mudas, também foram coletadas e a sua análise revelou a presença de infecção viral. Estes resultados sugerem que o material propagativo utilizado na produção de mudas foi originado de plantas-matrizes que, apesar de aparentemente sadias e de não exibirem sintomas característicos de infecções causadas por vírus, estavam infectadas com estes patógenos, resultando, em muitos casos, em mudas sintomáticas. Diante disso, pode-se concluir que a disseminação desses vírus no Submédio do Vale do São Francisco está ocorrendo por meio de material propagativo infectado utilizado em mudas, que é a principal e a mais frequente forma de disseminação destes patógenos. É importante ressaltar a importância de testes diagnósticos como a sorologia, os testes moleculares e os biológicos com a indexação em plantas indicadoras, na seleção de videiras sadias a serem utilizadas como plantas-matrizes, fonte de material propagativo, visando à redução na disseminação desses patógenos e propiciando a comercialização de mudas livres de vírus.

Os resultados apresentados por este trabalho sobre a detecção e a importância dos vírus aqui estudados, mostram a fragilidade em que a cultura da videira se encontra na região do Submédio do Vale do São Francisco. Dessa forma, os resultados abrem precedentes para a realização de trabalhos voltados para o melhoramento genético de videiras, considerando a existência de cultivares de porta-enxertos testadas negativas para a presença dos cinco tipos

de vírus aqui analisados. Nesse sentido, o presente estudo pode também servir de suporte para a seleção dessas cultivares para estratégias de melhoramento, afim de se obter novas cultivares de videiras produtivas e resistentes às viroses aqui estudadas.

Entretanto, considerando-se a atual inexistência de medidas de controle curativo para as doenças de origem viral, a melhor estratégia é a prevenção. A aquisição de mudas livres de vírus a serem utilizadas no estabelecimento de novos parreirais é a primeira medida a ser tomada para evitar a entrada desses agentes em novas áreas e, reduzir, assim, a sua disseminação via material propagativo infectado. Na produção de mudas livres de vírus, a seleção sanitária e a realização de testes periódicos em plantas-matrizes, doadoras de material propagativo, constitui-se em uma das principais medidas de prevenção. A detecção de vírus em plantas assintomáticas ou aparentemente sadias, verificada neste trabalho, caracteriza a presença de infecção latente e indica a importância da realização dos testes diagnósticos para detecção de vírus.

1.5 CONCLUSÃO

Houve elevada infecção por viroses em videiras nos parreirais do Submédio do Vale do São Francisco, principalmente para o vírus GLRaV-3, que apresentou maior incidência, seguido de GVA, GFkV, GLRaV-1 e GFLV, respectivamente. A presença de infecção mista foi detectada, sendo que a infecção de videiras cultivadas na região estudada ocorre principalmente por reprodução vegetativa.

REFERÊNCIAS

- AHMED, H. M. H.; DIGIARO, M.; MARTELLI, G. P. Viruses and virus diseases of grapevine in Egypt. *Bulletin OEPP/EPPO*, v. 34, p. 395-398, 2004.
- ATALLAH S. S.; GÓMEZ, M. I.; FUCHS, M. F.; MARINSON, T. E. Economic impact of grapevine leafroll disease on *Vitis vinifera* cv. Cabernet franc in Finger Lakes vineyards of New York. *Am J Enol Vitic*, v. 63, p. 73-79, 2012.
- BITTENCOURT, S.; SIMÕES, A. M. A.; PEREIRA, A. M. N. Identificação de vírus em videiras nas Ilhas do Pico e Terceira (Açores). *Revista de Ciências Agrárias*, v. 32, p. 14-22, 2009.
- CATARINO, A. M. et al. Incidência de vírus em videiras no Nordeste brasileiro e caracterização molecular parcial de isolados virais locais. *Ciência Rural*, v. 45, p. 379-385, 2015.

- CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, v. 34, p. 475-483, 1977.
- DIANESE, E. de C. et al. Variability of the 3' terminal of the polymerase gene of *Grapevine leafroll-associated virus 3* isolates from Vale do São Francisco, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 173-176, 2005.
- FAJARDO, T. V. M. et al. Detecção de Closterovirus em videira e caracterização parcial de um isolado de *Grapevine leafroll-associated virus 3*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 58-64, 2002.
- HEGEDUS, L. Relatório de atividades 1989-1992. CODEVASF, Petrolina, Pernambuco, Brasil, pp 95, 1992.
- IBGE. (2013) Levantamento sistemático da produção agrícola. 2013. Internet Resource: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda> acesso em: 28 set 2014.
- KOMOROWSKA, B.; BERNIAK, H.; GOLIS, T. Detection of Grapevine Viruses in Poland. **J Phytopathol**, v. 162, p. 326-331, 2014.
- KUHN, G. B.; FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O. Viroses da videira identificadas na região do Submédio São Francisco no polo vitícola Petrolina/Juazeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 442-443, 2000.
- KUHN, G. B. Efeitos causado pelo vírus do enrolamento da folha da videira na cultivar Cabernet Franc. **Fitopatologia Brasileira**, p. 14 v. 280-283, 1989.
- KUHN, G. B. 1992. Principais vírus e doenças consideradas de origem viral que ocorrem nos vinhedos do Rio Grande do Sul. Internet Resource: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/79699/1/cir16.pdf>. Acesso em: 16 set 2012.
- KUHN, G. B. Intumescimento dos ramos da videira (corky bark) doença constatada no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, p. 399-406, 1992b.
- KUHN, G. B.; FAJARDO, T. V. M. 2003. Uvas Viníferas para processamento em regiões de clima temperado. In: Protas JF da S. (eds) Doenças causadas por vírus, bactérias e nematóides e medidas de controle. Internet Resource: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/virus.htm>. Acesso em: 24 jul 2010.
- KUNIYUKI, H. et al. Identificação sorológica do vírus do mosaico das nervuras da videira no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 635-638, 2002.
- KUNIYUKI, H. Viroses da videira no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p. 300-301, 1981.
- KUNIYUKI, H.; COSTA, A. S. Incidência de vírus da videira em São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 12, p. 240-245, 1987.
- LEÃO, P. C. de S.; SOARES, J. M.; RODRIGUES, B. L. Principais cultivares. In: LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M. (eds). 2009. A Viticultura no semiárido brasileiro. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, pp 150-214.
- MACKENZIE, D. J.; JOHNSON, R. C.; WARNER, C. Incidence of four important viral pathogens in Canadian vineyards. **Plant Disease**, v. 80, p. 955-958, 1996.

- MARTELLI, G. P. et al. Maculavirus, a new genus of plant viroses. **Arch Virol**, v. 147, p.1847-1853, 2002.
- MARTELLI, G. P. Grapevine virology highlights 2006-09. Extended abstracts 16th Meeting of International Council of Viruses and Virus Diseases of Grapevine. Dijon, Borgonha, France, pp. 15-23.
- MILKUS, B. N.; GOODMAN, R. N. A survey of Missouri vineyards for the presence of five frappe viruses. **A J Viticulture**, v. 50, p. 133-134, 1990.
- PACIFICO, D. et al. Quantitation of Grapevine leafroll associated virus-1 and -3, Grapevine virus A, Grapevine fanleaf virus and Grapevine fleck virus in field-collected *Vitis vinifera* L. "Nebbiolo" by real-time reverse transcription-PCR. **J V Methods**, v. 172, p. 1-7, 2011.
- RAMALHO, E. D. et al. Detecção por RT-PCR de GVA e GVB em videiras da região do Vale do São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 241, 2011.
- WILCOX, W. F.; JIANG, Z-Y; GONSALVES, D. Leafroll virus is common in cultivates American grapevines in western New York. **Plant Disease**, v. 82, p. 1062, 1998.
- ZIMMERMANN, D. et al. Characterization and serological detection of four closterovirus-like particles associated with leafroll disease of grapevine. **J Phytopathol**, v. 130, p. 205-218, 1990.

Tabela 1. Classificação comercial (Tipo), cultivar, número de amostras avaliadas por DAS-ELISA, e incidência de *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1), *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine fleck virus* (GFkV) e *Grapevine fanleaf virus* (GVFL) em 23 cultivares de videiras cultivadas no Submédio do Vale do São Francisco (Petrolina, 2016).

Tipo	Cultivar	amostras	GLRaV-1	GLRaV-3	GVA	GFkV	GFLV
Mesa (com sementes)	Benitaka	67		61	61*		
	Brasil	48		48	45*		
	Itália	87		87			
Mesa (sem sementes)	Catalunha	14		10			
	Marroo Seedless	11		8			
	Superior Seedless	67		48			
	Thompson Seedless	26		18	8*	3*	
Vinho	Alicante Bouschet	4	1	1*			
	Cabernet Sauvignon	26		25		5*	
	Merlot	2		2			
	Moscato Canneli	14		14		14*	
	Petit Syrah	45	7*	38			
	Seibel	3		3			
Porta-enxerto	IAC-313	11		3			
	101-14	4					
	420-A	9					
	Courdec 1613	2					2
	Harmony	7		7		2*	5*
	IAC-572	12		12			
	IAC-766	10	2	2*		2*	
	Paulsen 1103	4					
	SO4	17					1
TOTAL		490	10	387	114	26	8
(%)		-	2	79	23,3	5,3	1,6

* plantas com infecção mista por mais de um vírus

Infecção por município

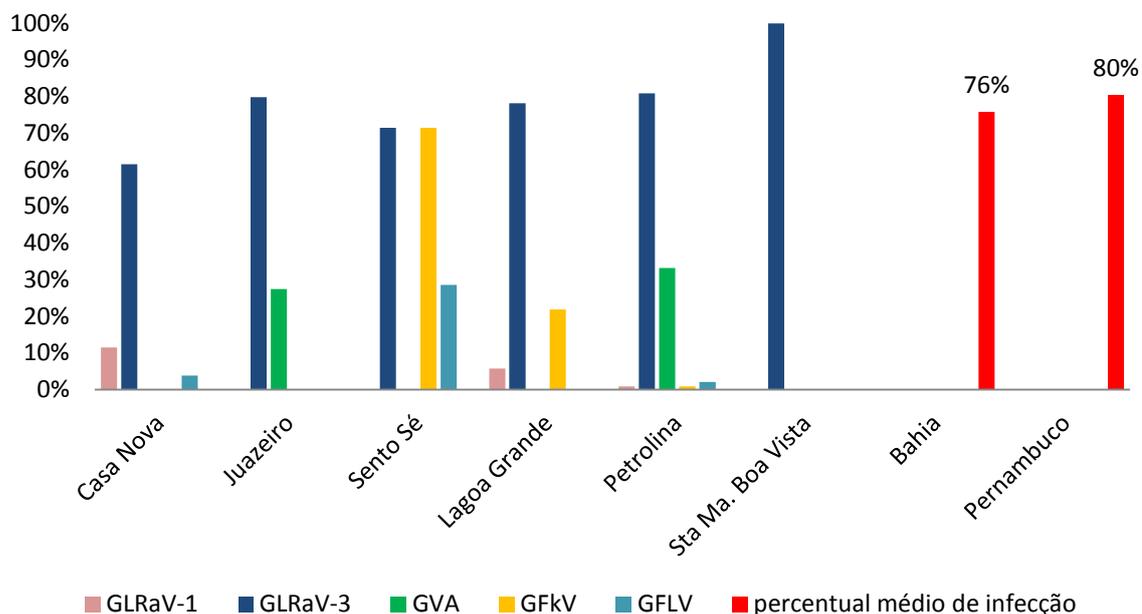


Figura 2. Incidência de infecção por município e por estado, dos vírus *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1), *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine fleck virus* (GFkV) e *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), utilizando-se o teste DAS-ELISA (Petrolina, 2016).

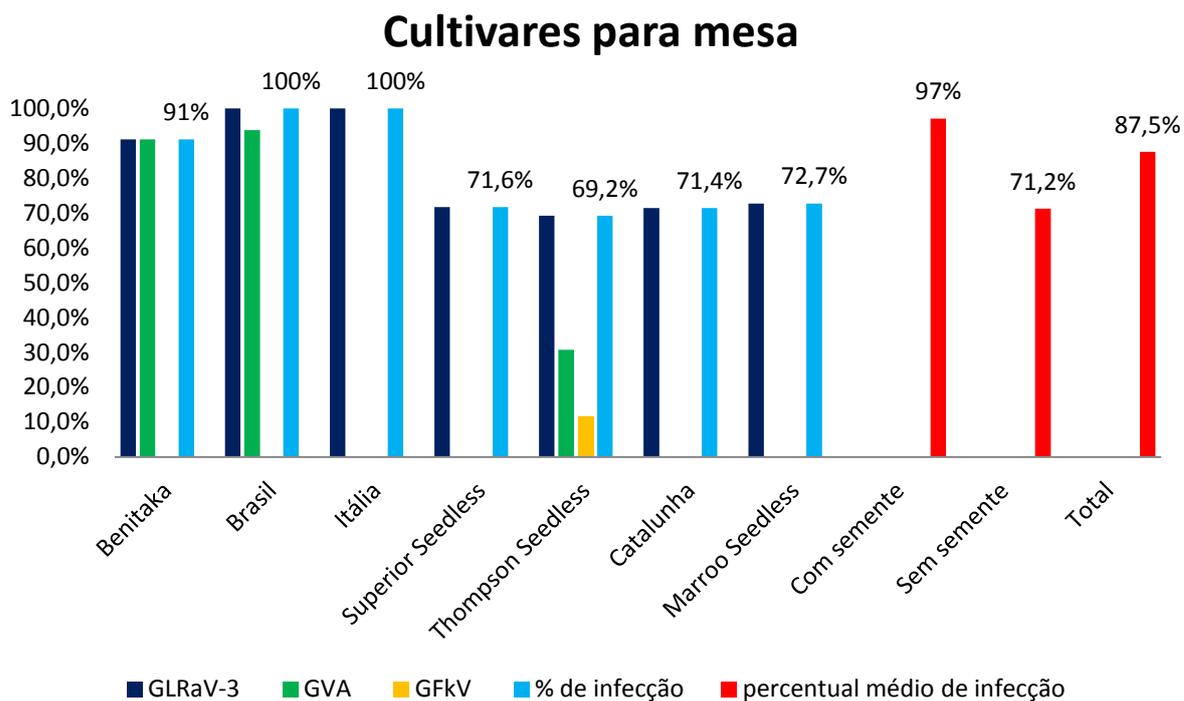


Figura 3. Avaliação de 320 amostras de videiras para mesa, coletadas em parreirais do Submédio do Vale do São Francisco, Brasil, para presença de *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1), *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine fleck virus* (GFkV) e *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), utilizando-se o teste DAS-ELISA (Petrolina, 2016).

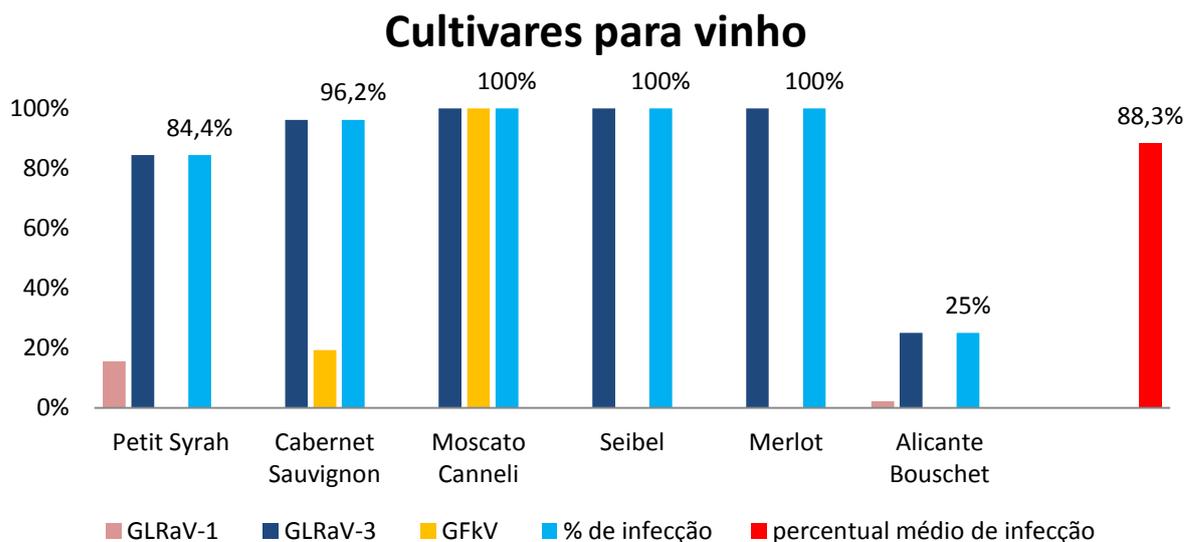


Figura 4. Avaliação por DAS-ELISA de 94 amostras de videiras para vinho coletadas no Submédio do Vale São Francisco utilizando-se os antissoros contra *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1), *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine fleck virus* (GFkV) e *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) (Petrolina, 2016).

Cultivares para porta-enxerto

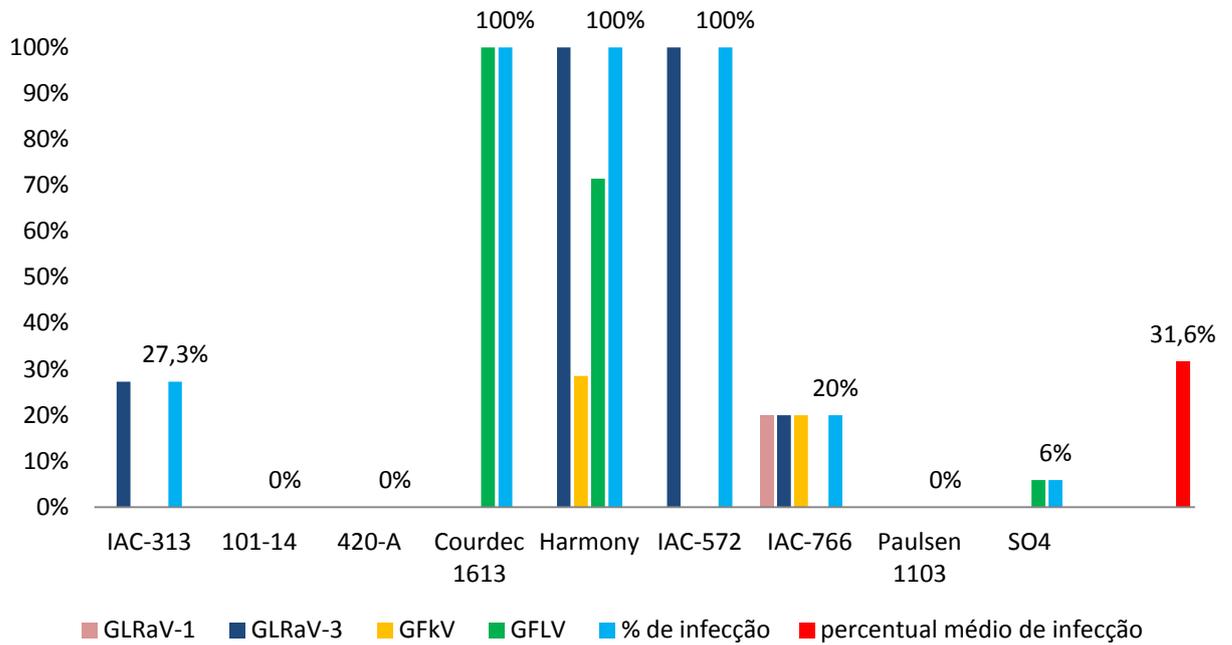


Figura 5. Avaliação de 76 amostras de plantas de cultivares de uva para porta-enxerto, coletadas no Submédio do Vale do São Francisco, ao *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1), *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine fleck virus* (GFkV) e *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), através de DAS-ELISA (Petrolina, 2016).

**CAPÍTULO II - CAPACIDADE REGENERATIVA DE TECIDOS
MERISTEMÁTICOS E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE VIDEIRAS CULTIVADAS
NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO**

RESUMO

Objetivou-se nesse trabalho avaliar a capacidade regenerativa e o desenvolvimento *in vitro* de diferentes clones tropicais de videira obtidos pelo cultivo de meristemas apicais e de gemas axilares. Para isso, bachelos de 13 clones tropicais foram plantados em substrato esterilizado e após 30 dias de plantio foram submetidas à termoterapia ($37\pm 1^\circ\text{C}$) durante 35 dias. Meristemas de ápices caulinares e de gemas axilares de brotos obtidos na termoterapia foram desinfestados e cultivados em meio de cultura 'MS', sendo mantidos no escuro por cinco dias. Logo após foram transferidos para o meio de cultura 'Galzy', analisando-se a porcentagem de regeneração, a altura, e os números de gemas, raízes e folhas produzidas, bem como o comprimento dos segmentos internodais, aos 30, 60 e 90 dias de cultivo. Das 13 cultivares avaliadas, foram regeneradas as cultivares 'Cabernet Sauvignon', 'IAC-572', 'Isabel' e 'Superior x Thompson', com porcentagem de regeneração variando entre 7 e 47%. A ocorrência de diferenças significativas entre as cultivares revelaram respostas distintas ao longo do tempo. A cultivar 'Cabernet Sauvignon' foi a que apresentou melhor resposta de regeneração de plantas a partir de meristema apical e meristema de gemas axilares. A cultivar 'IAC-572' destacou-se com as maiores médias de altura e números de gemas e de folhas aos 30, 60 e 90 dias de cultivo.

Palavras-chave: Ápice meristemático. Gema axilar. Termoterapia. Regeneração *in vitro*. Micropropagação.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the regenerative capacity and the *in vitro* development of different tropical vine clones obtained by cultivation of apical meristems and axillary buds. For this, bachelos of 13 tropical clones were planted in sterile substrate and 30 days after planting, they were subjected to thermotherapy (37 ± 1 ° C) for 35 days. Meristems Apical and axillary buds sprouts obtained in thermotherapy were disinfected and grown in the middle of the culture medium 'MS', being kept in the dark for five days. Immediately after they were transferred to the middle of the culture 'Galzy', analyzing the percentage of regeneration, the height and the numbers of buds, roots and leaves produced as well as the length of the internodal segments 30, 60 and 90 days cultivation. Of the 13 cultivars evaluated, were regenerated only the cultivars 'Cabernet Sauvignon', 'IAC-572', 'Isabel' and 'Superior x Thompson' with regeneration percentage ranging between 7 and 47%. The occurrence of significant differences among cultivars showed different responses over time. The cultivar 'Cabernet Sauvignon' presented the best plant regeneration response from apical meristem and axillary buds. The 'IAC-572' stood out with the highest average height and bud and leaf numbers 30, 60 and 90 days of cultivation.

Key words: Apex meristem. Axillary bud. Thermotherapy. Regeneration *in vitro*. Micropropagation.

2.1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a viticultura ocupa atualmente uma área próxima de 83mil hectares com produção aproximada de 1,47 milhões de toneladas, da qual 57,1% são destinadas ao processamento e o restante ao consumo *in natura*. Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco, Paraná, Santa Catarina, Bahia e Minas Gerais são os principais estados produtores, sendo Pernambuco o segundo maior produtor, com produção aproximada de 224.758 t/ano, com destaque para a região do Submédio do Vale do São Francisco (IBGE, 2013).

A fruticultura é uma atividade que vem se expandindo ao longo dos anos no Submédio do Vale do São Francisco, influenciando pequenos, médios e grandes agricultores da região a se dedicarem ao cultivo da videira, tornando-se uma das atividades de maior geração de empregos e renda (LEÃO, 2002). Devido o alto potencial que a região apresenta na produção de uvas finas de mesa e processamento, o cultivo *in vitro* de cultivares de videiras comerciais se mostra necessário para o amplo desenvolvimento da cultura na região, dando suporte na obtenção de centenas ou milhares de mudas sadias e certificadas (FENG et al., 2012; SKIADA et al., 2013).

O uso da biotecnologia na micropropagação de videira (*Vitis* spp.) destaca-se na obtenção de material vegetativo com qualidade fitossanitária, na rápida propagação e na obtenção de plantas livres de vírus (MORAIS et al., (2014), principalmente pelo cultivo de meristemas apicais associado à técnica da termoterapia (PANATTONI; TRIOLO, 2010; SHATNAWI; ANFOKA; SHIBLI, 2011; SILVA et al., 2013; WANG et al., 2002). Existe uma grande variedade de genótipos cultivados das espécies de *Vitis vinifera* L. (origem europeia) e *Vitis labrusca* L. (origem americana), inclusive variedades de porta-enxertos, havendo necessidade de estudos das plantas cultivadas *in vitro*, visando avaliar seu desempenho em campo (MORAIS et al., 2014).

Para a manipulação *in vitro* visando produção em larga escala, um dos pré-requisitos é um meio de cultura equilibrado. Os meios nutritivos utilizados para a cultura de tecidos de plantas fornecem substâncias essenciais para o crescimento e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento (PÉROS, TORREGROSA, BERGER, 1998). No entanto, as exigências nutricionais para o crescimento ótimo do tecido vegetal *in vitro* variam com a espécie, estágio de desenvolvimento, com o órgão de onde foi removido, com o tipo de explante e cultivar utilizada (GALZY, HAFFNER, COMPAN, 1990). Dessa forma, é

importante avaliar as diferenças entre genótipos num meio de cultura, visando melhorar o estabelecimento, multiplicação e enraizamento de cada um, associados às técnicas de micropropagação, há necessidade da utilização de reguladores de crescimento, como as citocininas, sendo de fundamental importância no subcultivo da videira, devido à indução de brotação no explante, havendo vários relatos sobre seus efeitos na planta (CARVALHO et al., 2011; COLETTI; MARTINS, 2008; LU, 2005; MACHADO et al., 2006; PASSOS; SONDAHL; RIBEIRO, 1985; SHATNAWI; ANFOKA; SHIBLI, 2011). Porém, o uso de altas concentrações desses fitorreguladores pode causar variação somaclonal, via formação de calos, provocando também hiperidricidade e dificuldade na regeneração de plantas. Alternativamente, pode-se utilizar segmentos nodais contendo gemas como fonte de explante em meio de cultura sem citocinina (CARVALHO et al., 2013; DZAZIO et al., 2002; JASKANI; ABBAS; KHAN, 2008; MUKHERJEE et al., 2010).

Skiada, Grigoriadou e Eleftheriou (2010), ao testarem duas cultivares de videira em seis tipos de meio de cultura, observaram que o desempenho da cv. ‘Malagouzia’ foi melhor em meio ‘Galzy’, apresentando melhor taxa de regeneração, maior vigor e folhas bem desenvolvidas. Já para a cv. ‘Xinomavro’, o meio de cultura ‘QL-MS’ foi o mais adequado, produzindo mudas mais vigorosas, apresentando segmentos internodais mais longos. Cavagnaro et al. (2006) ao avaliarem caracteres como área foliar, número de folhas, comprimento do caule e peso da matéria seca do caule, raiz e planta, relataram melhor desempenho de quatro cultivares argentinas em relação a três cultivares europeias em meio de cultura ‘Galzy’, com duas concentrações diferentes de sais. Gray e Benton (1991) avaliando três cultivares de videiras em meio de cultura ‘MS’ contendo 5 μ M de BAP, reportaram melhor taxa de enraizamento para a cv. ‘Welder’, não diferindo significativamente da cv. ‘Carlos’, mas sendo ambas superiores a cv. ‘Jumbo’.

Para o cultivo em condições tropicais, alguns estudos vêm sendo conduzidos para obtenção de clones e melhoramento genético de variedades europeias e americanas que sejam adaptadas às condições do semiárido brasileiro, sem o auxílio da micropropagação. Nesse caso, algumas cultivares de copa (Itália, Red Globe), porta-enxertos (IAC-572, SO4), e híbridos de videiras com e sem sementes (Sugraone, Thompson Seedless, Crimson Seedless) têm sido selecionadas e já são cultivadas graças a esses estudos (LEÃO; CRUZ; MOTOIKE, 2011; LEÃO, 2002). Entretanto, são poucas as pesquisas voltadas para o estabelecimento e avaliação do cultivo *in vitro* desses novos materiais, visando melhorar as estratégias de sua manutenção, e buscando aprimorar o estudo da variabilidade entre cultivares produzidas via

micropropagação. O objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade de regeneração e desenvolvimento *in vitro* em diferentes clones tropicais de videira, mediante o cultivo de meristemas provenientes de ápices e de gemas caulinares.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 15 estacas lenhosas com quatro gemas de 13 clones tropicais de cultivares de videiras cultivadas no semiárido brasileiro, mantidos nos campos experimentais da Embrapa Semiárido, situados em Petrolina-PE e Juazeiro-BA. As cultivares selecionadas foram os porta-enxertos ‘Harmony’, ‘IAC-313’, ‘IAC-572’, ‘IAC-766’, ‘Paulsen-1104’ e ‘SO4’; Uvas para mesa ‘Híbrido Superior x Thompson Seedless’, ‘Thompson Seedless’ e ‘Superior Seedless’; Uva para suco ‘Isabel’ e ‘BRS Cora’; e Uva para vinho ‘Cabernet Sauvignon’ e ‘Syrah’. As estacas foram desinfestadas com Kasumin (Hokko Chemical Industry LTDA) 1% e logo após plantadas em sacos plásticos para mudas (21,5cm x 14cm) contendo substrato composto de 25% de vermiculita, 25% de areia fina lavada, 25% de pó de casca de coco e 25% de húmus, previamente autoclavado por 50 minutos, e foram mantidas em casa de vegetação, sendo a irrigação realizada manualmente duas vezes por semana.

Após 30 dias, as mudas foram submetidas à termoterapia com temperatura média de 37 ± 1 °C durante 35 dias em estufa. A irrigação foi feita manualmente com pisseta, duas vezes por semana.

Meristemas apicais (grupo 1) e duas a três gemas axilares de brotos novos (grupo 2), obtidos na termoterapia, foram desinfestados com álcool 70% por um min, hipoclorito de sódio 30% por 20 min, e enxaguados com água destilada e esterilizada por três vezes. Primórdios foliares com tamanho entre 0,5 a um mm foram excisados em câmara de fluxo laminar com auxílio de um microscópio estereoscópio, sendo cultivados em meio de cultura ‘MS’ (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 30 g de sacarose, 5 g de ágar, e reguladores de crescimento BAP (4,44 μ M), GA3 (0,3 μ M) e AIB (0,05 μ M). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,9, sendo distribuído em tubos de ensaio (30 x 120 mm) e lacrados com papel alumínio e filme PVC. Os explantes foram mantidos no escuro por cinco dias a uma temperatura de 25 ± 2 °C a fim de reduzir a oxidação fenólica. Os explantes foram transferidos para uma sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo ‘luz do dia’, com intensidade luminosa de $46 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Os explantes sobreviventes foram transferidos para o meio de cultura ‘Galzy’ (GALZY, 1964) contendo 30 g de sacarose, 5 g de ágar e regulador de crescimento AIA (0,84 μM), com pH ajustado para 5,9, posteriormente foram distribuído em tubos de ensaio (30 x 120 mm) e lacrados com papel alumínio e filme PVC, mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo ‘luz do dia’, com intensidade luminosa de $46 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Dos explantes obtidos e multiplicados foram realizadas avaliações aos 30, 60 e 90 dias quanto ao desenvolvimento dos clones, sendo registrados: i) comprimento da parte aérea em mm da base até o ápice caulinar (ALTURA); ii) número de gemas axilares (NGEMAS); iii) número de raízes NR; iv) número de folhas (NF); e v) comprimento dos segmentos internodais (CSIN), sendo que para as avaliações de dados métricos foi utilizado paquímetro digital de 6” (Zaas Precision®).

A porcentagem de sobrevivência dos explantes obtidos de ápices meristemáticos e gemas axilares foi calculada pela fórmula:

$$P_{\text{ercentagem}} = \frac{n^{\circ} \text{plantas regeneradas} \times 100}{n^{\circ} \text{meristemas ou gemas inoculados}}$$

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 12 repetições, consistindo em um explante por repetição. Os dados gerados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Apenas os dados de contagem para a variável número de raiz foram transformados para $\sqrt{x+1}$. Os pressupostos do modelo, tais como homogeneidade e normalidade dos resíduos, foram verificados através do teste de Bartlett (BARTLETT, 1937) e Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965), respectivamente. Os dados foram processados com o auxílio do software R versão 3.2.9 (R Core Team, 2015).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Regeneração *in vitro* de plantas a partir de meristemas

Os resultados obtidos em relação ao cultivo *in vitro* de meristemas provenientes de ápices e gemas axilares são mostrados na Tabela 1. Observa-se que para as 13 cultivares testadas foram obtidos 83 explantes de ápices meristemáticos (grupo 1) e 159 explantes de gemas axilares (grupo 2), totalizando 242 explantes. O maior número de explantes obtidos a partir de gemas axilares em comparação aos obtidos através de ápices meristemáticos é

devido à utilização de duas a três gemas para cada ápice meristemático provenientes da termoterapia.

O número de meristemas apicais obtidos na termoterapia e inoculados *in vitro* foi maior para os clones das cultivares ‘IAC-572’, ‘Superior x Thompson’ e ‘BRS Cora’, com 14, 13 e 11 meristemas, respectivamente (Tabela 1). Essa característica pode estar relacionada à origem híbrida, ou a melhor adaptação desses genótipos ao clima mais quente, como no caso do semiárido, resultando na formação de meristemas apicais mais viáveis após a termoterapia. Entretanto, para as demais cultivares esse número variou entre um e sete meristemas apicais obtidos.

Em relação aos meristemas provenientes de gemas axilares, foram obtidos maiores quantidades para as cultivares de porta-enxerto ‘Harmony’ (23), ‘IAC-766’ (21) e ‘IAC-572’ (18), seguido pela cultivar de uva para vinho ‘Cabernet Sauvignon’ (17) (Tabela 1). Sob cultivo em campo, estas cultivares possuem maior vigor vegetativo, apresentando várias ramificações ao longo da parte aérea da planta e, conseqüentemente, maior número de gemas axilares (BORGHEZAN et al., 2003).

Quatro das 13 cultivares foram estabelecidas *in vitro*, obtendo-se sucesso na regeneração de plantas nos clones ‘Cabernet Sauvignon’, ‘Isabel’, ‘IAC-572’ e ‘Superior x Thompson’ (Tabela 1). Nesse caso, o estresse causado pelo uso da termoterapia associado ao pequeno tamanho dos meristemas isolados, resultou na oxidação de vários explantes, sendo essa uma das limitações do emprego dessa metodologia (BARÁNEK et al., 2009).

Em relação aos meristemas isolados de ápices, a cultivar ‘Isabel’ obteve maior porcentagem de plantas regeneradas (20%), seguida de ‘Cabernet Sauvignon’ (16,6%), ‘Superior x Thompson’ (15,4%) e ‘IAC-572’ (7,14%) (Tabela 1). Para os meristemas isolados de gemas axilares, a cultivar ‘Cabernet Sauvignon’ obteve a maior porcentagem de plantas regeneradas (47,06%), seguida de ‘Superior x Thompson’ (16,6%) e do porta-enxerto ‘IAC-572’ (11,11%; Tabela 1). Os demais materiais vegetais apresentaram intensa oxidação, provavelmente resultante do metabolismo de cada genótipo e/ou pela injúria provocada durante a manipulação para remoção dos primórdios foliares no processo de isolamento dos meristemas (MHATRE et al., 2000).

Quando comparadas com as outras três cultivares, as porcentagens de regeneração do clone ‘IAC-572’ foram as mais baixas para ambos os grupos de explantes, apesar desse genótipo possuir características como boa rusticidade, adaptabilidade e capacidade de enraizamento (LEÃO; SOARES; RODRIGUES, 2009) (Tabela 1). Diferenças na capacidade

de regeneração *in vitro* de plantas a partir de meristemas de diferentes genótipos têm sido relatadas. Dantas et al. (2002), por exemplo, avaliando cinco cultivares de *Pyrus* spp., relataram morte de até 80,4% de explantes meristemáticos por oxidação na variedade ‘Carrick’ e 39,2% para ‘Packham’s’, enquanto houve pouca perda para as cultivares ‘Red Bartlett’, ‘Housui’ e ‘Século XX’ (0 a 3,4%). Baptista et al. (1993), ao avaliarem o cultivo de ápices meristemáticos de sete cultivares de copa de videira, obtiveram 16% de plantas regeneradas. Passos, Sondahl e Ribeiro (1985), avaliando doses de BAP para o cultivo *in vitro* de ápices meristemáticos da cultivar ‘A Dona’, obtiveram apenas cinco explantes regenerados de um total de 282 inoculados (1,77%), demonstrando a dificuldade de estabelecimento *in vitro* de alguns genótipos de videira. No presente experimento, além de 4,44 μM de BAP, a adição de 0,3 μM de GA_3 e 0,05 μM de AIB, no meio de cultura, pode ter influenciado positivamente para o desenvolvimento dos explantes. Segundo Jaskani, Abbas e Khan (2008) as giberelinas estimulam a divisão e o alongamento celular, promovendo o crescimento de órgãos vegetais. Já as auxinas estão envolvidas na regulação de processos fisiológicos, dentre estes a indução da diferenciação vascular, podendo, também, suprir as necessidades de meristemas isolados quando adicionada ao meio de cultura (RIBEIRO et al., 2006).

2.3.2 Análise do desenvolvimento *in vitro* dos genótipos

Os resultados obtidos para o desenvolvimento *in vitro* das quatro cultivares de videira, obtidas a partir do cultivo de meristemas e posterior multiplicação dos explantes, mostraram uma interação significativa ($p < 0,01$) entre os fatores cultivar (‘IAC-572’, ‘Superior x Thompson’, ‘Isabel’ e ‘Cabernet Sauvignon’) e épocas de avaliação (30, 60 e 90 dias) para as variáveis altura, número de gemas, número de folhas e número de raiz. Neste caso, ao longo do tempo, foi observado um aumento significativo dos valores médios das variáveis mensuradas para todas as cultivares, obtendo-se as maiores altura, números de gemas e folhas aos 90 dias de cultivo. No caso da variável número de raiz as médias não apresentaram diferenças significativas para as cultivares ‘Isabel’ e ‘Cabernet Sauvignon’ dos 30 aos 90 dias, ‘Superior x Thompson’ entre 60 e 90 dias e ‘IAC-572’ entre 30 e 60 dias (Tabela 2).

Aos 60 e 90 dias foram observadas diferenças significativas nas médias das alturas das quatro cultivares. A cultivar IAC-572 apresentou as maiores médias observadas ao longo dos 90 dias, seguida de ‘Superior x Thompson’, ‘Isabel’ e ‘Cabernet Sauvignon’, aos

60 dias, e ‘Cabernet Sauvignon’, ‘Superior x Thompson’ e ‘Isabel’, aos 90 dias, respectivamente (Tabela 2).

Em relação ao número de gemas, a cultivar ‘IAC-572’ foi a que apresentou a maior média aos 30 dias, apresentando diferença significativa em relação às médias das outras três cultivares analisadas. Entretanto não houve diferença significativa entre as médias de ‘IAC-572’ e ‘Superior x Thompson’, aos 60 dias e entre ‘IAC-572’ e ‘Cabernet Sauvignon’, aos 90 dias e entre ‘Isabel’ e ‘Cabernet Sauvignon’ aos 60 dias (Tabela 2). Aos 60 dias, apesar de ‘Superior x Thompson’ apresentar média significativamente superior à ‘Cabernet Sauvignon’, esta agregou maior média de número de gemas aos 90 dias, superando ‘Superior x Thompson’ e ‘Isabel’. A cultivar ‘IAC-572’ apresentou melhor resposta ao meio de cultura utilizado ao longo do tempo, já ‘Cabernet Sauvignon’ demonstrou melhor resposta aos 90 dias de subcultivo. As quatro cultivares testadas responderam ao meio de cultura e regulador de crescimento utilizados no presente estudo, demonstrando eficiência quanto à resposta para a variável número de gemas quando comparadas a outros estudos. Carvalho et al. (2011) ao avaliarem a cultivar ‘Merlot’, obtiveram uma média máxima de 0,7 gemas por explante aos 60 dias de cultivo em meio MS/2 dosado com 2,5 μ M de TDZ. Em um experimento conduzido por Dantas et al. (2002), foi observado um número médio de 0,1 a 3,2 gemas por explante aos 30 dias de cultivo de cultivares de *Pyrus* spp. (‘Carrick’, ‘Packham’s’, ‘Red Bartlett’, ‘Housui’ e ‘Século XX’). As gemas axilares formadas durante o desenvolvimento do explante é de suma importância na cultura de tecidos vegetal, sendo um dos órgãos mais utilizados na micropropagação para obtenção de novos clones de espécies vegetais (DZAZIO et al., 2002; GRIBAUDO; FRONDA, 1991).

Em relação ao número de folhas, as cultivares ‘IAC-572’ e ‘Cabernet Sauvignon’ apresentaram valores médios significativamente superiores aos 90 dias em comparação às outras cultivares, apresentando uma média em torno de 17 folhas por explante (Tabela 2).

Para a variável número de raiz as cultivares ‘Cabernet Sauvignon’ e ‘Isabel’ apresentaram médias iguais e significativas de 2 a 2,3 raízes por explante, dos 30 aos 90 dias, enquanto que ‘IAC-572’ e ‘Superior x Thompson’ apresentaram médias de 1,6 a 1,8 raízes por explante (Tabela 2). Valores médios semelhantes foram encontrados por outros autores. Ayub et al. (2010), ao avaliarem a cultivar de videira ‘Bordô’, após 30 dias de cultivo *in vitro*, obtiveram valores médios de 1,5 raízes por explante em meio de cultura ‘Galzy’, e 2,3 raízes por explante em meio de cultura ‘MS/2’, ambos sem reguladores de crescimento. Já Carvalho et al. (2011), ao testar a cultivar ‘Merlot’, em meio tipo ‘MS/2’, observaram após 60 dias de

cultivo, valores médios de 3,2 raízes por explante em meio de cultura com 2,5 μM de BAP, e 0,1 raízes por explante com 0,1 μM de TDZ.

O enraizamento de plantas *in vitro* é de suma importância durante o início da aclimatização, sendo uma característica altamente dependente do genótipo da videira, apresentando respostas preferencialmente em meio de cultura sem regulador de crescimento ou suplementado com auxina (ROUBELAKIS-ANGELAKIS; ZIVANOVITC, 1991; DZAZIO et al., 2002). No presente estudo, as quatro cultivares testadas apresentaram enraizamento.

De uma maneira geral, a cultivar 'IAC-572' apresentou maiores valores médios de altura aos 30, 60 e 90 dias, entretanto, observou-se que, para o número de gemas e número de folhas, aos 60 e 90 dias, foram formados grupos distintos, sendo que aos 60 dias as cultivares 'IAC-572' e 'Superior x Thompson' apresentaram médias significativamente iguais entre si e superiores às médias observadas de 'Cabernet Sauvignon' e 'Isabel'. Já aos 90 dias, não houve diferença significativa entre as médias de 'IAC-572' e 'Cabernet Sauvignon', sendo estas superiores às médias de 'Superior x Thompson' seguida de 'Isabel' (Tabela 2).

Para a variável comprimento dos segmentos internodais não houve interação significativa ($p > 0,05$) pelo teste F dentro do fator cultivar x tempo; por outro lado foi observada interação significativa ($p < 0,01$) pelo teste F entre épocas de avaliação (Tabela 3). Pode-se notar que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias aos 60 e 90 dias para as quatro cultivares analisada (Tabela 3). Esses resultados indicam que não houve ganho significativo no comprimento dos segmentos internodais nesse intervalo de tempo, porém houve ganho significativo na média da variável em questão apenas dos 30 aos 60 dias de cultivo.

Finalmente, as diferentes respostas de crescimento e desenvolvimento analisadas no presente trabalho, confirmam a necessidade de avaliar constantemente diferentes genótipos, em resposta a um mesmo tipo de meio de cultura e iguais concentrações de reguladores de crescimento.

2.4 CONCLUSÕES

As cultivares 'IAC-572', 'Superior x Thompson', 'Isabel' e 'Cabernet Sauvignon' responderam positivamente a termoterapia e ao cultivo de meristemas apicais e de gemas axilares, nos dois meios de culturas utilizados, sendo que a cultivar 'Cabernet Sauvignon' foi

a que apresentou melhor resposta de regeneração de plantas a partir dos explantes aqui testados. A cultivar ‘IAC-572’ se destacou por apresentar as maiores médias de altura, números de gemas e de folhas ao longo dos 90 dias de cultivo.

REFERÊNCIAS

- AYUB, R. A. et al. Indução de multibrotação in vitro em videira cv. Bordô. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 3, p. 675–681, 2010.
- BAPTISTA, C. R. et al. Obtenção de clones livres de vírus de sete variedades de videira através da cultura de meristema em São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v.19, p. 96-98, 1993.
- BARÁNEK, M. et al. DNA-methylation changes in grapevine somaclones following in vitro culture and thermotherapy. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 101, n. 1, p. 11–22, 2009.
- BARTLETT, M. S. Properties of sufficiency and statistical test. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 160, p. 268-282, 1937.
- BORGHEZAN, M. et al. Propagação in vitro e avaliação de parâmetros morfológicos de porta-enxertos de videira. **PAB**, v. 38, n. 7, p. 783-789, 2003.
- CARVALHO, D. C. de; SILVA, A. L. L. DA; TANNO, M. P. G. N. Organogênese a partir de segmentos foliares e internodais de videira cv. Merlot. **Ciência Agrotécnica**, v. 35, n. 1, p. 108–114, 2011.
- CARVALHO, D. C. de. et. Fox Grape cv. Bordô (*Vitis labrusca* L.) and Grapevine Chardonnay (*Vitis vinifera* L.) Cultivated in vitro under Different Carbohydrates, Amino Acids and 6-Benzylaminopurine Levels. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 56, n. 2, p. 191–201, 2013.
- CAVAGNARO, J. B.; PONCE, M. T.; J., G.; CIRRINCIONE, M. A. Argentinean cultivars of *Vitis vinifera* grow better than European ones when cultured in vitro under salinity. **Biocell**, v. 30, n. 1, p. 1–7, 2006.
- COLETTO, L. S.; MARTINS, C. R. Micropropagação de porta-enxerto de videira paulsen 1103 “in vitro”, com diferentes concentrações de citocinina. **FZVA**, v. 15, n. 1, p. 102–108, 2008.
- DANTAS, A. et al. Estabelecimento e multiplicação in vitro de cultivares de *Pyrus* spp. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 8, n. 1, p. 19–23, 2002.
- IBGE (2013) – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>>. Acesso em: 13 out. 2014.
- Feng, C. et al. Production of Pathogen-Free Horticultural Crops by Cryotherapy of In Vitro-Grown Shoot Tips. *Protocol*, v. 994, p. 463-482, 2012.
- GALZY, R. Technique de thérapie des virus de la vigne. **Annales des Epiphyties**, v. 15, p. 245- 256, 1964.
- GALZY, R.; HAFFNER, V.; COMPAN, D. Influence of three factors on the growth and nutrition of grapevine microcuttings. **Journal of Experimental Botany**, v.41, n. 224, p 295-301, 1990.

- GRAY, D. J.; BENTON, C. M. *In vitro* micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (*Vitis rotundifolia*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 27, n. 1, p.7-14, 1991.
- GRIBAUDO, I; FRONDA, A. Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated in vitro. **HortScience**, v. 26, n. 8, p. 1083, 1991.
- JASKANI, M.; ABBAS, H.; KHAN, M. Effect of growth hormones on micropropagation of *Vitis vinifera* L. cv. Perlette. **Pak. J. Bot.**, v. 40, n. 1, p. 105–109, 2008.
- LEÃO, P. C. de S. Comportamento de cultivares de uva sem sementes no Submédio São Francisco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 734–737, 2002.
- LEÃO, P. C. de S.; CRUZ, C. D.; MOTOIKE, S. Y. Genetic diversity of table grape based on morphoagronomic traits. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 1, p. 42–49, 2011.
- LEÃO, P. C. de S.; SOARES, J. M.; RODRIGUES, B. L. Principais cultivares. In: LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M. **A Viticultura no semiárido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2009. p.150-214.
- LU, M. C. Micropropagation of *Vitis thunbergii* Sieb. et Zucc., a medicinal herb, through high-frequency shoot tip culture. **Scientia Horticulturae**, v. 107, n. 1, p. 64–69, 2005.
- MACHADO, M. P. et al. Multiplicação in vitro do porta-enxerto de videira VR043-43. **Ciência Agrotécnica**, v. 30, n. 4, p. 648–655, 2006.
- MHATRE, M.; SALUNKHE, C.; RAO, P. Micropropagation of *Vitis vinifera* L: towards an improved protocol. **Scientia Horticulturae**, v. 84, n. 3-4, p. 357–363, 2000.
- MORAIS, A. R. de. et al. Estimação do tamanho de parcela para experimento com cultura de tecidos em videira. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 113–124, 2014.
- MUKHERJEE, P. et al. In vitro propagation of a grape rootstock, deGrasset (*Vitis champinii* Planch.): Effects of medium compositions and plant growth regulators. **Scientia Horticulturae**, v. 126, n. 1, p. 13–19, 2010.
- MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15:473- 497, 1962.
- PANATTONI, A.; TRIOLO, E. Susceptibility of grapevine viruses to thermotherapy on in vitro collection of Kober 5BB. **Scientia Horticulturae**, v. 125, n. 1, p. 63–67, 2010.
- PASSOS, I.; SONDAHL, M.; RIBEIRO, I. 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.
- PÈROS, J. P.; TORREGROSA, L.; BERGER, G. Variability among *Vitis vinifera* cultivars in micropropagation, organogenesis and antibiotic sensitivity. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. 319, p. 171-179, 1998.
- R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- RIBEIRO, M. et al. Efeitos do AIB E GA3 na micropropagação de *Zantedeschia aethiopica*. **Revista Ceres**, v. 53, n. 309, p. 568–573, 2006.
- ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A.; ZIVANOVITC, S. B. A new culture medium for in vitro rhizogenesis of grapevine (*Vitis* spp.) genotypes. **HortScience**, v. 26, n. 12, p. 1551-1553, 1991.

- SHAPIRO, S. S; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, p. 591-611, 1965.
- SHATNAWI, M. et al. Clonal propagation and cryogenic storage of virus-free grapevine (*Vitis vinifera* L.) via meristem culture. **Turk J Agric**, v. 35, p. 173–184, 2011.
- SILVA, A. M. F. et al. LIMPEZA CLONAL DE MUDAS DE VIDEIRA INFECTADAS. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 35, n. 1, p. 316–319, 2013.
- SKIADA, F. G. et al. Elimination of *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) from two *Vitis vinifera* cultivars by in vitro chemotherapy. *European Journal of Plant Pathology*, v. 135, p. 407-414, 2013. SKIADA, F.; GRIGORIADOU, K.; ELEFThERIOU, E. Micropropagation of *Vitis vinifera* L. cv. 'Malagouzia' and "Xinomavro". **Central European Journal of Biology**, v. 5, n. 6, p. 12–14, 2010.
- WANG, Q. et al. Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) embryogenic cell suspensions by encapsulation-dehydration and subsequent plant regeneration. **Plant Science**, v. 162, p. 551–558, 2002.

Tabela 1. Número, percentual de regeneração e total de explantes inoculados de plantas obtidas a partir do cultivo *in vitro* de dois tipos de meristemas obtidos de clones tropicais de videiras submetidas à termoterapia. NMI- número meristemas de ápices caulinares inoculados (Grupo 1); NGI - número de meristemas de gemas axilares inoculados (Grupo 2); NPR – número e percentagem de plantas regeneradas (Petrolina, 2016).

	NMI	NPR (%)	NGI	NPR (%)	Total
<u>Porta-enxertos</u>					
IAC-313	4	0	6	0	10
IAC-572	14	1 (7,14)	18	2 (11,11)	32
IAC-766	7	0	21	0	28
Paulsen 1104	6	0	11	0	17
Harmony	4	0	23	0	27
SO4	6	0	12	0	18
<u>Uvas para mesa</u>					
Superior x Thompson	13	2 (15,4)	6	1 (16,66)	19
Superior Seedless	3	0	10	0	13
Thompson Seedless	3	0	11	0	14
<u>Uvas para vinho</u>					
Cabernet Sauvignon	6	1 (16,6)	17	8 (47,06)	23
Syrah	1	0	2	0	3
<u>Uvas para suco</u>					
BRS Cora	11	0	12	0	23
Isabel	5	1 (20,0)	10	0	15
Total	83	5 (6,02)	159	11 (6,92)	242

Tabela 2. Desenvolvimento *in vitro* de quatro clones de cultivares de videira (*Vitis* spp.) cultivadas no Submédio do Vale do São Francisco, em função da interação com três épocas de avaliação (Petrolina, 2016).

Variável	Dias	Cultivar								CV(%)
		IAC572		Superior x Thompson		Isabel		Cabernet Sauvignon		
Altura (mm)	30	23,8	a C	17	b C	9,6	c C	11,7	c C	18,16
	60	56,17	a B	47,36	b B	33,11	c B	28,04	d B	
	90	100,58	a A	64,94	c A	57,22	d A	76,23	b A	
Nº de Gemas	30	4,71	a C	3,27	b C	2	c C	2,25	bc C	7,58
	60	9,03	a B	8,17	a B	5,6	b B	5,31	b B	
	90	14,7	a A	11,8	b A	10,15	c A	13,86	a A	
Nº de Folhas	30	4,17	a C	3,6	ab C	3,4	ab C	2,52	b C	9,64
	60	8,9	a B	8,2	a B	5,06	c B	6,32	b B	
	90	17,25	a A	13,1	b A	8,4	c A	16,48	a A	
Nº de Raízes	30	1,6	b B	1,61	b B	2	a A	2,01	a A	11,69
	60	1,62	b B	1,74	b A	2,1	a A	2,19	a A	
	90	1,84	b A	1,84	b A	2,1	a A	2,32	a A	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Valores médios para comprimento do segmento internodal (CSIN), em mm, em plantas de quatro cultivares de videiras provenientes do cultivo de meristemas (Petrolina, 2016).

Cultivares	Épocas de avaliação			CV(%)
	30	60	90	
IAC-572	4.5 b	6 a	6.1 a	16.31
Superior x Thompson	3 b	5 a	5.4 a	
Cabernet Sauvignon	3.1 b	4 a	5.0 a	
Isabel	3.8 b	5 a	5.8 a	

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**CAPÍTULO III - DETECÇÃO E VARIABILIDADE DO GENE DA PROTEÍNA
CAPSIDIAL DO GLRaV-1, -2 E -3 DE DIFERENTES CULTIVARES DE VIDEIRAS
NO VALE DO SÃO FRANCISCO**

RESUMO

O Submédio do Vale do São Francisco é responsável por boa parte da produção de uvas finas do país, além de produzir uvas para processamento, gerando emprego e renda. O enrolamento da folha, causado pelo complexo viral GLRaV, no qual possui elevada variabilidade genética, tem causado perdas significativas na produção de uvas na maioria dos países viticultores, o que tem preocupado produtores e pesquisadores da área dessa região. Objetivou-se nesse trabalho avaliar a variabilidade dos fragmentos do gene da capa proteica do GLRaV-1, -2 e -3, de cultivares de videiras cultivadas no Submédio do Vale do São Francisco. Folhas de 28 variedades de videiras do BAG da Embrapa Semiárido com presença e ausência dos sintomas do enrolamento da folha foram coletadas, utilizando-se folhas de plantas saudáveis como controle negativo. Os produtos da RT-PCR foram sequenciados e analisados. Das 28 cultivares analisadas para GLRaV-1, -2 e -3, zero, 10 e 19 apresentaram infecção, respectivamente para cada estirpe viral, sendo que oito apresentaram infecção mista. Observou-se alta e baixa identidade entre os isolados obtidos em relação aos isolados caracterizados do Brasil, Itália, África do Sul, EUA, China, Chile e Portugal, para ambos os vírus, apresentando divergência genética do gene da CP em alguns isolados, sendo que 13 isolados de GLRaV-3 não apresentaram homologia significativa com outros isolados do presente estudo e disponíveis no GENBANK. Os dados gerados nesse estudo comprovam a elevada existência de divergência genética nesses vírus, contribuindo para a compreensão dos tipos, bem como sobre suas prováveis origens.

Palavras-chave: *Vitis*. Virose. Sequenciamento. RT-PCR.

ABSTRACT

The sub middle of San Francisco Valley is responsible for much of the production of fine grapes of the country, in addition to producing grapes for processing, generates jobs and income. The winding of the sheet caused by the viral complex GLRaV, which has high genetic variability has caused significant losses in the production of grapes in most winegrowers countries, which has concerned producers and researchers of the region. This work aimed to evaluate the variability of the fragments of the protein coat gene GLRaV-1, -2 and -3, of grapevines cultivars in of sub middle of San Francisco Valley. Leaves of 28 varieties of vines of the BAG of the Embrapa Semiárid with and without symptoms of leaf roll were collected, using leaves of healthy plants as negative control. RT-PCR products were sequenced and analyzed. Of the 28 cultivars analyzed for GLRaV-1, -2 and -3, zero, 10 and 19 presented infection, respectively for each viral strain, and eight had mixed infection. There was a high and low identity between isolates obtained in relation to the characterized isolates from Brazil, Italy, South Africa, USA, China, Chile and Portugal, for both viruses, presenting genetic divergence of the CP gene in some isolated, and 13 isolates that GLRaV-3 showed no significant homology with other isolates in the present study and available in GENBANK The data generated in this study confirm the high existence of genetic divergence in these viruses, contributing to the understanding of the types, as well as its likely origins.

Keywords: Vitis. Virus diseases. Sequencing. RT-PCR.

3.1 INTRODUÇÃO

A vitivinicultura, sendo uma das atividades econômicas mais importantes no Submédio do Vale do São Francisco, gera emprego e renda, tanto no campo, quanto na agroindústria. Essa região se destaca pela elevada produção de uvas ao longo de todo o ano, sendo isso possível graças ao clima semiárido, onde é registrada temperatura média anual entre 23 °C a 27 °C, associada a forte insolação, com umidade relativa próxima de 50% (ANGELOTTI et al., 2014; MOURA et al., 2009)

As doenças virais continuam sendo uma das principais ameaças à qualidade e rendimento da produção dos parreirais em todo o mundo. Até o momento, já foram relatadas 70 espécies virais distintas que infectam a videira, além de várias estirpes específicas de algumas espécies definidas (MARTELLI, 2009; MONIS et al., 2010; NAIDU et al., 2014). Cinco doenças principais foram relatadas como sendo de origem viral, apesar de ainda não estarem devidamente identificadas: enação da videira (Grapevine enation), mosqueado de verão da videira (Grapevine summer mottle), mosaico das nervuras da videira (Grapevine vein mosaic), necrose das nervuras da videira (Grapevine vein necrosis) e acanaladura do lenho de LN 33 (LN 33 stem grooving). Destacam-se, entre os vírus que infectam a videira, aqueles que pertencem às famílias Closteroviridae, Secoviridae, Betaflexiviridae e Tymoviridae (MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006).

Apesar de existir inúmeras espécies relatadas e definidas como viroses de videiras, nem todas apresentam importância econômica impactante, pois depende da região geográfica de incidência, do tipo de cultivar de videira e da estirpe viral (BASSO et al., 2010).

Segundo Radaelli et al. (2009), no Brasil, já foram detectados GLRaV-1, -2, -3, -5 e -6, porém os vírus GLRaV-2 e GLRaV-3 são considerados os mais importantes dentre os vírus do complexo do enrolamento, por apresentarem maior incidência e também pelos danos induzidos às plantas (MARTELLI et al., 2002; FAJARDO et al., 2003).

O GLRaV-1 possui um genoma de tamanho aproximado de 19.5 kb, embora apenas cerca de 12,394 nucleotídeos de um isolado australiano estão disponíveis no GenBank (AF195822) (ALABI et al. 2011). Com base na sequência disponível, o genoma está organizado em 10 sequências de leitura aberta (ORFs), com cada codificação ORF de proteínas diferentes com diversas funções. O GLRaV-1 é a única dentre as estirpes do GLRaVs em que o vírus possui duas cópias divergentes do gene da CP (HABILI; KOMÍNEK; LITTLE, 2007). Além de se propagar através de plantio de mudas infectado e

por porta-enxertos, o GLRaV-1 também pode ser transmitida por várias espécies de cochonilhas. Plantas infectadas por essa estirpe podem apresentar sintomas característicos do enrolamento da folha (ALABI et al. 2011).

O GLRaV-2 é um dos vírus que está associado a sintomas de incompatibilidade de enxertia e declínio de novos vinhedos (ABOU GHANEM-SABANADZOVIC et al., 2000; MARTELLI et al., 2002; BERTAZZON, ANGELINI, 2004; MENG et al., 2005). Possui partículas alongadas e flexuosas, genoma de RNA fita simples e senso positivo, com 16.494 nucleotídeos (nt) organizados em oito fases abertas de leituras (ORFs, “open reading frame”) sendo mecanicamente transmissível (ABOU GHANEM et al., 1998; MENG et al., 2005; BEUVE et al., 2007).

O GLRaV-3 possui partículas alongadas e flexuosas de cerca de 1800-2100 nm de comprimento por 12 nm de diâmetro com genoma composto de RNA fita simples, senso positivo com 18.498 nt organizados em 13 ORFs (LING et al., 1997; MARTELLI et al., 2002; NAIDU et al., 2014). É a estirpe melhor caracterizada dentre os vírus do complexo do enrolamento da folha. Não há relatos de transmissão mecânica, disseminando-se naturalmente nos vinhedos pela transmissão, de forma semi-persistente, por algumas espécies de pseudococcídeos e coccídeos (BOTTON et al., 2003).

De acordo com a literatura, os vírus apresentam grande capacidade de exibirem variabilidade genética, pois são patógenos que estabelecem longos períodos de processo infeccioso durante o ciclo de vida do hospedeiro, e durante esse processo, está altamente propenso a erros na replicação do seu genoma e deficiências nos mecanismos de reparo do RNA (PROSSER et al., 2007).

A grande variabilidade genética revelada por algumas espécies virais que infectam a videira tem dificultado a geração de ferramentas moleculares universais de detecção e identificação (BERTAZZON; ANGELINI, 2004). Tais informações servem de base para priorizar a importância do estudo de variabilidade genética viral. Mesmo que diversas espécies já tenham sido identificadas e caracterizadas no Brasil e em outros países, em diferentes genótipos de videiras, ainda há carência de trabalhos de caracterização molecular mais amplos, podendo aumentar e melhorar o conhecimento destes patógenos, além de facilitar o desenvolvimento de ferramentas para diagnóstico mais sensível e preciso (BEUVE et al., 2007).

A RT-PCR é uma ferramenta molecular poderosa, permitindo ao pesquisador amplificar cadeias de cDNA sintetizados com oligonucleotídeos específicos, usando como

molde o RNA que deseja analisar. No caso dos vírus do complexo do enrolamento da folha da videira, a detecção via RT-PCR é altamente precisa, mostrando-se uma das formas mais seguras de indexação de mudas micropropagadas, aclimatizadas e, até mesmo de vinhedos já estabelecidos (BERTAZZON; ANGELINI, 2004; DOVAS; KATIS, 2003).

Contudo, devido à probabilidade de modificações na estrutura do RNA viral ser ampla, existe a possibilidade de haver mutações pontuais no seu genoma, principalmente quando a mesma estirpe de uma espécie viral infecta diversas cultivares, possibilitando essas mutações. Essas diferenças na estrutura do seu genoma podem apresentar diferenças nos sintomas da planta por grau de severidade, podendo até mesmo permanecer assintomático, o que facilita sua transmissão devido à falsa impressão de que a planta está sadia.

Alabi et al. (2011) ao investigar a diversidade genética de isolados de GLRaV-1 com base em segmentos das regiões HSP70, CP, CPd2 e ORF's 2 (*open reading frame*), observaram diversidade inter e intra-isolados nas sequências do CPd2 e HSP70, além de eventos de recombinação que foram revelados entre as sequências HSP70, CP, e ORF9. Observaram ainda pressões de seleção que atuam em cada uma das quatro regiões genômicas, concluindo na análise filogenética das quatro sequências estudadas do genoma, a ocorrência de segregação dos isolados de GLRaV-1 em três grandes clados e uma falta de agrupamento claramente definida por origem geográfica. Divergência genética também foram encontrados por Rubio et al. (2013) para GLRaV-2 e Wang et al. (2011) para GLRaV-3.

Análises mais detalhadas são necessárias para determinar o quão diferentes essas viroses são. O objetivo desse trabalho foi analisar a variabilidade genética dos fragmentos do gene da capa proteica (CP) dos vírus do complexo do enrolamento da folha de videira, GLRaV-1, GLRaV-2 e GLRaV-3 obtidos de videiras tropicais cultivadas do Submédio do Vale do São Francisco.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas folhas de 28 acessos de videiras com presença e ausência dos sintomas dos vírus GLRaV-1, -2 e -3 (Tabela 1), do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido, situadas no Campo Experimental de Mandacaru, em Juazeiro, BA. Folhas de plantas sadias das cultivares “Isabel” (IS), “IAC-572” (IA) e “Cabernet Sauvignon” (CS), obtidas pelo processo de termoterapia e de regeneração de meristemas através da cultura de tecidos e mantidas *in vitro* em sala de crescimento do Laboratório de Biotecnologia da

Embrapa Semiárido, foram utilizadas como controle negativo. Amostras de folhas dos 28 acessos de videiras coletadas em campo e das cultivares controle negativo foram analisadas do seguinte modo: Extração de RNA em duas etapas: 1) Cortes de folhas de cada acesso (amostras derivadas do campo) e folhas inteiras (*plantas in vitro*) foram maceradas com nitrogênio líquido em almofariz, logo após foi adicionado 3 uL de tampão de extração (pH 8,0), coletado com auxílio de um chumaço de gaze previamente esterilizado em autoclave (120°C / 40 min) e seu conteúdo foi transferido para micro tubos de 2 mL, conservando-o em ultra freezer a -80°C). Para o isolamento do dsRNA foi utilizado o kit de extração de RNA viral NucleoSpin (Macherey-Nagel®). A eficácia da extração e isolamento do RNA foi verificada através da corrida das amostras em gel de agarose 0,8%, preparado com tampão TBE 0,5X (pH 8,0), corados com brometo de etídio e visualizado em transluminador sob luz UV.

As reações de síntese do cDNA via PCR foram conduzidas, com algumas modificações, conforme metodologias descritas por Sambrook, Russel (2001) e Fajardo et al. (2000), no qual consistiram, para todas as amostras de: 4 µl de RNA, 1 µl de oligonucleotídeo antisense (10 µM) (Tabela 2), 5 µl de água autoclavada, incubando-se a 94°C por 5 min, e, posteriormente, adicionando-se: 5 µl de tampão da enzima RT 5X, 1 µl de dNTP (2,5 mM), 1 µl de enzima transcriptase reversa M-MLV (200 U/µl, Ludwig biotecnologia®), 1 µl de inibidor de RNase (40 U/µl, Ludwig biotecnologia®) e 7 µl de água autoclavada. Na sequência, a reação foi incubada a 37°C por uma hora. As reações de PCR consistiram de: 10 µl de cDNA, 5 µl de tampão da enzima TaqDNA polimerase 10X, 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM), 5 µl de dNTP (2,5 mM), 1 µl de cada oligonucleotídeo senso e antisense (10 µM) (Tabela 2), 0,5 µl de Taq DNA polimerase (5 U/µl, Ludwig biotecnologia®) e 26 µl de água autoclavada. As reações foram submetidas a uma desnaturação inicial (94°C por 5 min) em banho-maria seguida por 35 ciclos de amplificação: desnaturação (94°C / 50 seg), pareamento (50°C / 50 seg) e extensão (72°C / 1 min), além de uma extensão final (72°C / 7 min). Para os fragmentos menores que 500 pb, a extensão foi 72°C por 50 seg. conforme descrito por Basso et al. (2010). Os produtos da RT-PCR das amostras, em conjunto com DNA Ladder de 1kb (USB-Affymetrix®) foram corridos em géis de agarose a 1,2% (Figura 1 e 2) preparado com tampão TBE 0,5X (pH 8,0), corados com brometo de etídio e visualizado em transluminador sob luz UV.

Para o sequenciamento das amostras, antes foi utilizado o kit comercial HiYield™ Gel/PCR DNA mini Kit (Real Genomics®) para a purificação dos produtos da PCR. Cada

amostra foi quantificada com o auxílio de DNA λ (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo. As amostras purificadas e quantificadas foram sequenciadas.

O “basecall” e remoção das pontas e dos vetores das sequências de nucleotídeos (nt) obtidos foram realizados com o auxílio do programa Phred versão 0.020425.c ($P \geq 99,99\%$) (EWING et al., 1998). Para a construção dos “contigs” para as sequências contendo os “primers” “forward” e “reverse” foi utilizado o software CAP3 (HUANG; MADAN, 1999). Os alinhamentos múltiplos das sequências parciais de nucleotídeos dos isolados obtidos dos genes dos vírus GLRaV-2 e -3 obtidos no presente trabalho (Tabela 3), e de sequências dos genes homólogos de isolados brasileiros e estrangeiros (Tabela 4) disponíveis no banco de dados do NCBI (GENBANK) foram realizadas no software UGENE, pelo método MAFFT (OKONECHNIKOV; GOLOSOVA; FURSOV, 2012).

Para as comparações entre as sequências de nucleotídeos (nt) e aminoácidos deduzidos (aad) entre os isolados obtidos no presente trabalho com isolados brasileiros e estrangeiros (Tabela 4), utilizou-se o programa BLASTn e BLASTp do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

As análises filogenéticas foram realizadas para as sequências de nt, utilizando-se o software Mega 6.0 (TAMURA et al., 2013). As árvores filogenéticas foram construídas por meio de análise de máxima parcimônia com “bootstrap” de 2000 replicações, e para a formação do grupo externo foram utilizadas sequências disponíveis no GenBank da espécie GVA para GLRaV-2 e da espécie GLRaV-5 para GLRaV-3.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Detecção molecular de GLRaV -1, -2, e -3

No presente estudo, das 28 cultivares testadas para o complexo viral *grapevine leafroll associated virus* -1, -2 e -3, nenhuma amostra apresentou infecção por GLRaV-1, 10 amostras apresentaram infecção por GLRaV-2 (Figura 1, Tabela 1) e 19 amostras apresentaram infecção positiva para GLRaV-3 (Figura 2, Tabela 1), sendo que oito cultivares apresentaram infecção mista para GLRaV-2 e -3 (Figura 1, 2, Tabela 1). Geralmente o título viral se apresenta em baixas concentrações em plantas de videira, ainda podendo haver flutuações com o seu estágio fenológico, principalmente durante o verão, quando o título de alguns vírus presente em plantas de videira é menor (BOSCIA et al., 1992; ENGEL et al.,

2010). Entretanto, a extração de RNA a partir das amostras se mostrou eficiente, o qual possibilitou a obtenção de ácidos nucleicos íntegros, com boa qualidade, pureza e concentração suficientes para as reações de RT-PCR, se mostrando específico e sensível para os objetivos desse trabalho.

A ausência de detecção para GLRaV-1 está relacionada, principalmente, à ausência do vírus na planta, pois existe pouca ou nenhuma prevalência desse vírus em videiras do Submédio do Vale do São Francisco (FAJARDO et al., 2002). Relatos de infecção por GLRaV-1 (dentre outras viroses) em amostras de videiras cultivadas no Submédio do Vale do São Francisco (Petrolina/Juazeiro) foram reportados por Fajardo et al. (2002) onde 12,9 % (8/62) das amostras testadas por testes sorológicos apresentaram infecção. Apesar da pouca incidência desse vírus na região, estudos mais aprofundados devem ser conduzidos no sentido de elucidar com maior precisão a sua diversidade, distribuição e formas de disseminação.

Pode-se observar que apenas seis cultivares apresentaram sintomas do enrolamento da folha (Tabela 1), sendo que todas estavam infectadas com GLRaV-3 confirmadas por RT-PCR, e destas, apenas três apresentaram infecção por GLRaV-2 (Figura 2, 3, Tabela 1). Observa-se, ainda, que das 10 cultivares infectadas com GLRaV-2, em apenas duas (cv. 'Ruby Cabernet' e 'Alfrocheiro') não foi detectada infecção mista (GLRaV-2 e -3), não apresentando sintomas do enrolamento da folha. De acordo com esses resultados, os sintomas apresentados por plantas de videira são verificados apenas nas cultivares infectadas por GLRaV-3, podendo estas apresentarem infecção com outras espécies do complexo do enrolamento da folha, que não foram determinados no presente estudo. Cinco, das seis cultivares que apresentaram os sintomas são da espécie *Vitis vinifera* L. Videiras dessa espécie geralmente são mais susceptíveis a doenças (RICARDO et al., 2005), inclusive ao enrolamento da folha, podendo demonstrar os sintomas com maior severidade.

Das 21 cultivares infectadas, 15 não apresentaram sintomas (Tabela 1). De acordo com Catarino et al. (2015), plantas de videiras assintomáticas para GLRaV, assim como as sintomáticas, são susceptíveis aos danos causados pelos vírus do enrolamento da folha. Com base nessa informação, Kovacs et al. (2001) observaram em plantas assintomáticas e sintomáticas decréscimo no peso médio da baga (5 a 7%), no teor de sólidos solúveis totais (2 a 6%) e aumento da acidez titulável do mosto (5 a 14%). Basso et al. (2010) observaram redução de cerca de 3,0 graus Brix das bagas originadas de plantas infectadas, em relação a plantas sadias. Relatos semelhantes foram obtidos nos trabalhos de Lee et al. (2009a, 2009b).

A ausência dos sintomas está relacionada ao genótipo, sendo as cultivares viníferas as mais susceptíveis, seguidas de cultivares americanas e logo após cultivares de porta-enxertos. Estas geralmente não apresentam sintomas, como é observado nas cvs. de porta-enxerto IAC-572 e SO4 (Tabela 1), o que compromete seriamente a multiplicação de material propagativo, já que as cultivares comerciais de videira são necessariamente enxertadas em cultivares de porta-enxerto, podendo estas estarem infectadas, mesmo não apresentando os sintomas. Segundo Martelli (2012), os vírus GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GVA, GVB, GRSPaV, GFkV e GRVFV são transmissíveis por plantas de porta-enxerto.

O GLRaV-2 foi detectado em cerca de 36% (10/28) das cultivares analisadas (Tabela 1, Figura 2), índice superior ao relatado por Catarino et al. (2015), cuja infecção foi determinada, via qRT-PCR, em 2% das 51 amostras coletadas em vinhedos comerciais situados no Submédio do Vale do São Francisco. No entanto Fajardo et al. (2002) não detectaram infecção por GLRaV-2 em nenhuma das 62 amostras testadas por ELISA. Nesse sentido, é provável determinar que, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo e com os relatados pelos autores supracitados, houve um aumento na disseminação de GLRaV-2, ou ocorrência isolada do vírus na área onde foi avaliada. Entretanto, há também a possibilidade das técnicas utilizadas no presente estudo ter contribuído com uma melhor precisão na detecção dessa virose, presente em videiras cultivadas na região estudada. Em relação à detecção de GLRaV-3, as análises demonstraram infecção em 19 das 28 cultivares de videira analisadas (67,9%), revelando a prevalência desse vírus quando comparado ao GLRaV-2 (Tabela 1, Figura 3). O GLRaV-3 é um dos vírus mais estudados na maioria dos países que cultivam e exploram comercialmente a videira (FIORE et al., 2011; GOUVEIA et al., 2011; LIU et al., 2013; VOLPE et al., 2010; WANG et al., 2011), e está associado ao declínio e morte das plantas da maioria dos vinhedos em todo o mundo (KLAASSEN et al., 2011; NAIDU et al., 2014; WANG et al., 2011). Geralmente, o GLRaV-3 apresenta infecção mista com vírus do mesmo complexo, podendo também apresentar-se isoladamente no hospedeiro (NAIDU et al., 2014), e ao apresentar sintomas na planta, este é caracterizado pelo enrolamento dos bordos da folha para baixo, sendo que em cultivares tintas, o limbo apresenta cor vermelho-rosa com nervuras permanecendo verdes. Todavia em cultivares de bagas claras, a sintomatologia pode apresentar-se mascarada, pois a identificação dos sintomas pode ficar comprometida sendo apenas determinada pelo enrolamento dos bordos das folhas sem nenhuma ou pouca alteração na coloração das mesmas, além disso, o avaliador pode determinar falso positivo/negativo, caso a planta mimetize os sintomas do GLRaV por estar

exposto a estresses bióticos e/ou abióticos (COOMBE, McCARTHY, 2000; MARTELLI, 2014; NAKANO; NAKAUNE; KOMAZAKI, 2003).

Os resultados obtidos neste estudo mostram a fragilidade em que o cultivo da videira no semiárido brasileiro se encontra, auxiliando no planejamento de novas estratégias de controle e manejo destas doenças. Neste sentido, este trabalho revela informações relevantes quanto à presença do GLRaV em cultivares exploradas comercialmente e até mesmo a selecionar materiais livre de vírus que possuem caracteres agronômicos de interesse para aplicações no melhoramento genético e desenvolvimento de novas cultivares resistentes ou tolerantes. No presente estudo foi analisado cultivares para mesa, processamento, e porta-enxertos, sendo híbridos interespecíficos, viníferas e americanas.

3.3.2 Análise das sequências obtidas

No total, foram analisadas 25 sequências parciais, sendo nove para GLRaV-2 e 16 para GLRaV-3 (Tabela 3). Todas as sequências foram comparadas entre si, formado por dois grupos distintos: um pelas cultivares infectadas com GLRaV-2 e outro pelas infectadas com GLRaV-3. Dois isolados de cada grupo (Tabela 3) foram selecionados e comparados com sequências de regiões genômicas homólogas de outros isolados disponibilizados no NCBI (GENBANK). Todas as comparações foram realizadas através dos aminoácidos deduzidos (aad) e identidade de nucleotídeos (nt). Desta última, foram geradas árvores filogenéticas para análises.

3.3.3 GLRaV-2

Foi verificado que entre os nove isolados analisados do grupo, a maioria apresentou identidade de nt abaixo dos 90% (Tabela 5), variando entre 74,6-89,4%. Dentre estes isolados, o que apresentou menor identidade com os demais foi o obtido pela isolado 'Red Globe' com identidades de nt variando entre 74,6-78,8%. Essa variação nas identidades de diferentes isolados da mesma espécie viral pode ocorrer devido à interação patógeno-hospedeiro, causando mudanças de alguns pares de bases dos genes, inclusive o da CP (BEUVE et al., 2007; DIANESE et al., 2005; OSMAN et al., 2007). Alta identidade de nt entre os isolados também foi observado, chegando a 99,44%. Para aad foi observada alta

identidade para todos os isolados analisados, exceto para 'Red Globe', com identidades variando entre 85,11-92,96%.

Apesar da maioria das identidades de nt analisados apresentarem valores abaixo dos 90%, esses resultados não refletiram na homologia entre os isolados nos aminoácidos deduzidos (aad), a qual foram elevadas, com exceção aos valores observados para 'Red Globe', na qual foi observado baixa identidade em comparação com as demais (Tabela 5). Basso et al. (2010), ao avaliarem isolados de GLRaV-2 do Rio Grande do Sul, com base no fragmento do gene da CP das cultivares de videiras Isabel (IS3) e Cabernet Sauvignon (CS2), encontraram alta identidade de nt e aad sendo 98,8 e 97,8%, respectivamente. Ainda, nesses mesmos trabalhos e com base no fragmento da proteína HSP70 do isolado CS1, os autores relataram maior identidade de nt com um isolado estrangeiro (94,8%) e baixa com outros isolados (74-75,2%), sendo que para estes a identidade entre aad variou de 82,3% a 85,3%, resultado semelhante aos encontrados no presente estudo para o isolado "Red Globe".

Na análise filogenética, foi observada a formação de três grupos distintos (Figura 4), sendo que o I e o II apresentaram maior proximidade, ambos distantes do III, formado por apenas um representante, o isolado da cultivar 'Red Globe'. Estes resultados mostram a variação genética que ocorre no gene associado à CP de GLRaV-2, mesmo em isolados obtidos a partir de plantas contaminadas cultivadas em uma mesma área. Este isolado ('Red Globe') provavelmente é uma variante de GLRaV-2 diferente da presente nas outras cultivares analisadas. Radaelli et al. (2009) ao analisarem isolados virais de GLRaV-2 de cultivares de videira de mesma procedência, observaram alta homologia (98,9%) entre os isolados L/I e SE, ambos apresentando uma variação de identidade considerada baixa entre 89,2 e 89,4% com o isolado M/C, respectivamente. Esses mesmos isolados apresentaram-se em clados distintos na análise filogenética, sendo que L/I e SE compõem um dado grupo e o isolado M/C pertencente a outro grupo.

A Tabela 6 apresenta as identidades entre dois isolados obtidos no presente estudo, ISRA (Isaura) e SYRS (Syrah RS) comparados a outros isolados brasileiros (CS2 - HM059035; IS3 - HM358050) e estrangeiros (H4 - AY697863; 93/955 - NC_007448; PN - AF039204) caracterizados para GLRaV-2. Foi observada elevada homologia de nt entre os isolados ISRA e SYRS com CS2 e IS3, com valores entre 98,66 a 99,20% em ambos os casos. O mesmo foi observado para a identidade de aad que ficou entre 97,58% e 99,19%. Os isolados CS2 e IS3 foram obtidos e analisados por Basso et al. (2010), de videiras mantidas em campo experimental em Bento Gonçalves (RS), e apresentaram alta homologia de nt e aad

com os isolados obtidos e analisados no presente estudo. Provavelmente esses isolados de GLRaV-2 migraram pelos estados produtores de uva através de mudas ou estacas de porta-enxerto infectadas não certificadas.

Pela análise filogenética das sequências de nt obtidas, pôde-se verificar a formação de dois grupos (Figura 5), sendo o grupo I composto pelos isolados ISRA, CS2, IS3, SYRS e H4, seguido pelo agrupamento II, composto pelo isolado-tipo 93/955 e pelo isolado PN, que diferiu do grupo I em 85,44–88,24%, conforme a Tabela 6. No agrupamento I o isolado H4, cuja homologia variou entre 92,18-92,72% em relação aos outros quatro isolados brasileiros do mesmo grupo, foi descrito por Abou Ghanem-Sabanadzovic et al. (2000), como sendo uma variante biológica do GLRaV-2, distinto de outros isolados transmitidos mecanicamente do mesmo vírus, devido a diferenças nas reações em hospedeiras herbáceas e diferença na sequência do gene CP. Os resultados observados (Tabela 6, Figura 5) confirmam a alta identidade entre os isolados brasileiros, ao passo que revelam diferenças peculiar (H4) e elevada (93/955 e PN) com isolados da Itália, África do Sul e Estados Unidos.

Segundo dados do Vitis International Variety Catalogue (VIVC) a cultivar ‘Isaura’ tem origem no Brasil, desenvolvida pelo Instituto Agrônomo de Campinas (MG), sendo nomeada inicialmente por ‘IAC 506-33’, obtida através de um cruzamento interespecífico de videiras europeias (EGER 2 x MUSCAT OTTONEL). A cultivar ‘Syrah RS’ também de origem brasileira é resultado de cruzamento intraespecífico de *V. vinifera*. Sabe-se que a interação entre patógeno/hospedeiro, principalmente quando se trata de vírus, pode ocasionar variações nos genes do patógeno devido a respostas diferenciadas ocasionadas pelos hospedeiros de variedades diferentes, podendo causar mudanças pontuais de nucleotídeos no genoma (RUBIO et al., 2013). Devido a alta homologia entre os isolados ISRA e SYRS e também com CS2 e IS3, define-se que a estirpe que infecta estas cultivares de videira sejam as mesmas e provavelmente de mesma procedência.

3.3.4 GLRaV-3

Dos 16 isolados sequenciados, 13 apresentaram uma identidade de nt entre 99,15–100%, sendo que em relação aos aad, pôde-se observar que não houve variação, apresentando 100% de homologia entre todos os isolados (Tabela 7). Os 13 isolados não apresentaram homologia com os isolados ‘Merlot’, ‘Isaura’ e ‘Superior Seedless’. Estes, todavia,

apresentaram identidades elevadas entre si de 99,40 – 99,80% de nt e de 98,20% a 99,40% de aad (Tabela 8).

Não foi observada homologia significativa para nt pelo BLASTn (NCBI) em nenhum dos isolados apresentados na Tabela 7 com outros isolados disponíveis no GENBANK, apesar do mesmo identificá-los e confirmá-los como sendo GLRaV-3. Foi observado nos alinhamentos dos 13 isolados com ‘Grenache’, ‘Isaura’ e ‘Superior Seedless’ e também com isolados disponíveis no GENBANK que houve formação de alguns ‘gaps’ ao longo das sequências (Figura 6).

Esse fato pode estar relacionado a trocas de bases no gene da CP do vírus, podendo ocasionar mudanças na síntese das proteínas que a compõe, apesar dessa ocorrência possuir limitações. Segundo Moreira et al. (2004) a CP é uma proteína estrutural, assim, fatores evolutivos poderiam restringir as variações que seriam deletérias para essa espécie viral. Alterações nestas proteínas poderiam resultar na perda da capacidade de interação com vetores ou fatores da planta hospedeira, sendo que o GLRaV-3 tem como única hospedeira natural, a videira, restringindo ainda mais essas alterações (CATARINO et al., 2015). No entanto, segundo Alabi et al., (2011) e Rubio et al., (2013) vírus de RNA é muito propenso a variações genéticas, evolução e adaptação, sendo que vários fatores moldam a estrutura genética e a diversidade dos vírus pertencentes à família Closteroviridae: i) a recombinação entre variantes de sequências divergentes gerando novos genótipos, desempenhando um papel importante na evolução de alguns vírus desta família; ii) a interação entre as estirpes do vírus ou entre diferentes vírus presentes em infecções mistas podem alterar o acúmulo de estirpes; iii) mudanças no hospedeiro ou a transmissão do vírus por insetos vetores podem induzir alterações nas populações virais, devido a seleção positiva de variantes com maior interação patógeno-hospedeiro ou aptidão patógeno-vetor; iv) ocorrência de deriva genética devido à seleção aleatória de sequências variantes devido ao efeito gargalo nas populações, associado ao processo de transmissão.

O gene da CP do GLRaV-3 possui 941 bases, inicia-se na posição 13848 e termina em 14789, em relação ao isolado-tipo descrito por Bester et al. (2012) com 18498 bases, sendo que as sequências dos isolados ‘Syrah RS’ e ‘Sauvignon Blanc’, ambos sequenciados parcialmente (Tabela 3), com cerca de 86% do total do gene, encontraram-se na faixa que compreende o gene da capa proteica.

Turturo et al. (2005) observaram que 15% de 45 isolados de GLRaV-3 foi composto por uma recombinação de duas ou mais variantes do gene da proteína de

revestimento. Ainda ao realizar estimativas da diversidade genética e análises filogenéticas, foi revelada uma possível existência de videiras com infecções mistas por variantes com sequências divergentes, mostrando, em alguns casos, possíveis eventos de recombinação. Além do mais, as diferenças na diversidade genética e restrições existentes no RNA dependente de RNA polimerase (RdRp), da proteína de choque térmico (HSP70) e do gene da proteína de revestimento (CP) analisados no estudo acima mencionado, indica uma maior variabilidade no gene da CP (TURTURO et al., 2005).

Para a análise filogenética entre os isolados obtidos, pode-se observar a formação de dois agrupamentos distintos (Figura 7): o primeiro sendo composto pelos 13 isolados citados na Tabela 7, e o segundo composto pelos isolados ‘Merlot’, ‘Isaura’ e ‘Superior Seedless’ (Tabela 8). Os dois grupos definem bem a divergência confirmada na pouca homologia encontrada entre ambos os grupos.

Em relação ao gene parcial da proteína capsidial do GLRaV-3 com 809 nucleotídeos e 269 aminoácidos deduzidos obtido a partir das amostras ‘MRT’ e ‘SupS’, foi observada alta identidade de nt com os isolados brasileiros, ‘RC-PE’, ‘PET-1’, ‘PET-2’, ‘PET-3’ (99,29-99,72%) e estrangeiros ‘Daw’ ‘GP18’ e ‘CI766’ (99,13-99,86%), entretanto foi observado menor homologia com os isolados brasileiros ‘PET-4’, e ‘IS2’ (91,36-92,83%) e estrangeiros ‘3-15’ e ‘TN2’ (92,21-92,83%) (Tabela 9). Para os aad foi observada variações entre os isolados ‘MRT’ e ‘SupS’ com os demais, apresentando valores de identidade entre 79,15 a 99,15%, sendo que os menores valores de homologia foram observados em comparação com os isolados ‘PET-4’, ‘IS2’ e ‘3-15’.

Porcentagens de identidades de nt semelhantes aos obtidos no presente estudo foram observados por Catarino et al. (2015), ao comparar um isolado de GLRaV-3 obtido no município de Petrolina-PE (RC-PE) aos isolados PET-1, PET-2, PET-3, PET-4 e IS2, variando entre 92,6 e 99,7%. Variabilidade desse vírus no Brasil foi verificada por Basso et al. (2010) e Fajardo et al. (2007), este último verificando um isolado obtido no Submédio do Vale do São Francisco.

Estes resultados demonstram uma possível falta de correlação com a origem geográfica, já que houve baixa e alta identidade com isolados brasileiros e estrangeiros, respectivamente, de origens distintas. Entretanto esta possibilidade não pode ser refutada. Os dados apresentados no presente estudo estão de acordo com Fajardo et al. (2007) e Turturo et al. (2005), os quais demonstraram alta e baixa identidades entre os isolados estudados com outros disponíveis no GENBANK.

A análise filogenética demonstrada na Figura 8 mostra a formação de dois grupos com 100 % de bootstrap. Pode-se observar no grupo I que há uma elevada homologia entre os isolados que o compõe (Tabela 9), estando presentes os isolados analisados no presente estudo, a saber ‘MRT’ e ‘SupS’. O mesmo pode ser observado no grupo II, estando presentes dois isolados brasileiros (‘PET-4’ e ‘IS2’), um dos Estados Unidos (‘3-15’) e outro de Portugal (‘TN2’). Todavia entre os isolados que compõem esses dois grupos, há uma baixa identidade (Figura 7, Tabela 9). Os isolados ‘3-15’ e ‘MRT’ de GLRaV-3 foram obtidos da cultivar ‘Merlot’, o primeiro proveniente de vinhedos de Napa Valley, Califórnia (EUA) (WANG et al., 2011) e o segundo de plantas permanentes do BAG da Embrapa Semiárido localizado em Juazeiro, Bahia (BR). Apesar do mesmo vírus ser detectado em plantas da mesma cultivar, foi observado que estes isolados apresentaram identidade de 92,83% de nt e 82,53% de aad, demonstrando a variabilidade que o GLRaV-3 pode apresentar em um mesmo tipo de hospedeiro, estando localizado em um mesmo local ou distante. Wang et al. (2011) encontraram diferenças genéticas entre isolados obtidos de plantas da cv. ‘Merlot’ cultivadas em diferentes vinhedos da Califórnia. O isolado estudado por estes autores apresentou identidade de 100% para nt e aad com o isolado ‘TN2’ de Portugal.

Assim como a *Vitis* spp., as viroses dessa espécie que ocorrem no Brasil são exóticas, pois cultivares de videiras cultivadas no país foram introduzidas a partir de variedades americanas como cultivares e híbridos de *Vitis labrusca*, sendo porta-enxertos e de processamento (ex. ‘Isabel’), e de países europeus como França e Itália, principalmente cultivares de *V. vinifera* (CATARINO et al., 2015). No Brasil, essas cultivares, também, foram redistribuídas pelos estados vitivinicultores em forma de materiais propagativos e mudas, ocorrendo, também, a disseminação das viroses, sendo os do complexo do enrolamento da folha (GLRaV) uma das principais, pois sua disseminação ocorre principalmente por materiais propagativos contaminados (MOREIRA et al., 2004). Dessa forma, as viroses analisadas, no presente estudo, possivelmente, possuem as mesmas origens, apesar de haver diferenças de homologia com alguns isolados brasileiros, como explicados anteriormente.

Tanto a detecção, quanto a determinação da diversidade genética das viroses de videira no Brasil têm grande importância para o amplo desenvolvimento da vitivinicultura. As viroses GLRaV-2 e -3, ainda, representam alto impacto negativo na produção de uva e derivados. Os resultados obtidos no presente estudo contribuem para aumentar os

conhecimentos sobre os níveis de divergência genética que ocorrem nestes vírus que infectam videiras cultivadas na região do Submédio do Vale do São Francisco.

4. CONCLUSÃO

A maioria das cultivares analisadas apresentaram infecção pelo complexo do enrolamento da folha, apresentando maior incidência para GLRaV-3 e menor para GLRaV-, ocorrendo infecção mista em oito cultivares. Existe a ocorrência de isolados de GLRaV-3 com elevada divergência genética nos isolados analisados, sendo que para GLRaV-2, houve baixa e alta identidade entre os isolados estudados. Os dados gerados nesse estudo indicam a elevada divergência genética que esses vírus podem apresentar em cultivares de videiras cultivadas no Submédio do Vale do São Francisco.

REFERÊNCIAS

- ABOU GHANEM-SABANADZOVIC, N. et al. Properties of a new isolate of grapevine leafroll-associated virus 2. **Vitis**, v. 39, n. 3, p. 119–121, 2000.
- ALABI, O. J. et al. Grapevine leafroll-associated virus 1 occurs as genetically diverse populations. **Phytopathology**, v. 101, p. 1446-1456, 2011.
- ANGELOTTI, F. et al. Mudanças Climáticas e o Cenário de Ocorrência do Míldio e do Oídio da Videira no Submédio do Vale do São Francisco. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2014. (Embrapa Semiárido. Documentos, 260). Disponível em: <https://www.embrapa.br/semiario/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1004199/mudancas-climaticas-e-o-cenario-de-ocorrencia-do-mildio-e-do-oidio-da-videira-no-submedio-do-vale-do-sao-francisco>. Acesso: abr 2016.
- BASSO, M. F. et al. Detecção e identificação molecular de vírus associados a videiras sintomáticas e assintomáticas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 11, p. 2249–2255, 2010.
- BERTAZZON, N.; ANGELINI, E. Advances in the detection of Grapevine leafroll-associated virus 2 variants. **Journal of Plant Pathology**, v. 86, n. 4, p. 283-290, 2004.
- BESTER, R.; MAREE, H. J.; BURGER, J. T. Complete nucleotide sequence of a new strain of grapevine leafroll-associated virus 3 in South Africa. **Archives of virology**, v. 157, n. 9, p. 1815–9, 2012.
- BEUVE, M.; SEMPÉ, L.; LEMAIRE, O. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detecting Grapevine leafroll-associated virus 2 variants in grapevine. **Journal of virological methods**, v. 141, p. 117- 124, 2007.
- BOTTON, M. et al. Vetor encoberto, cochonilhas algodonasas em uva. **Revista Cultivar Hortalças e Frutas**, v. 7, p. 28-29, 2003.

- BOSCIA, D. et al. Production, characterization and use of monoclonal antibodies to grapevine virus A. **Archives of Virology**, v. 127, p. 185-194, 1992.
- CATARINO, A. de M. et al. Incidência de vírus em videiras no Nordeste brasileiro e caracterização molecular parcial de isolados virais locais. **Ciência Rural**, v. 45, n. 3, p. 379–385, 2015.
- COOMBE, B. G.; McCARTHY, M. G. Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. **Aust. J. Grape Wine Res**, v. 6, p. 131-135, 2000.
- DIANESE, É. D. C. et al. Variability of the 3' terminal of the polymerase gene of Grapevine leafroll-associated virus 3 isolates from Vale do São Francisco, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 173–176, 2005.
- DOVAS, C. I.; KATIS, N. I. A spot nested RT-PCR method for the simultaneous detection of members of the Vitivirus and Foveavirus genera in grapevine. **Journal of Virological Methods**, v. 170, p. 99-106, 2003.
- Embrapa Uva e Vinho. Viroses da videira no Brasil. Artigos Técnicos on line. 2010. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/viticultura/viroses.html>>. Acesso em: 28 maio. 2015.
- 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.
- EWING, B. et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.
- FAJARDO, T. V. M. et al. Expression of Grapevine leafroll-associated virus 3 coat protein gene in Escherichia coli and production of polyclonal antibodies. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 6, p. 496–500, 2007.
- FAJARDO, T.V.M. et al. Caracterização parcial de um isolado do Grapevine fanleaf virus. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 505-511, 2000.
- FAJARDO, T. V. M. 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.
- FAJARDO, T. V. M.; KUHN, G. B.; NICKEL, O. Doenças virais. In: FAJARDO, T. V. M. (Ed.). Uva para processamento - Fitossanidade. Brasília, Embrapa Informações Tecnológicas, 2003. p. 45- 62.
- FIORE, N. et al. Grapevine viruses in the Atacama region of Chile. **J Phytopathol**, v. 159, p. 743–750, 2011.
- GOUVEIA, P. et al. Five phylogenetic groups identified in the coat protein gene of grapevine leafroll-associated virus 3 obtained from Portuguese grapevine varieties. **Archives of virology**, v. 156, n. 3, p. 413–20, 2011.
- HABILI, N.; KOMÍNEK, P.; LITTLE, A. Grapevine leafroll-associated virus 1 as a common grapevine pathogen. **P Viruses**, v. 1, p. 63-68, 2007.
- KLAASSEN, V. A. et al. Vitis californica and Vitis californica × Vitis vinifera Hybrids are Hosts for Grapevine leafroll-associated virus-2 and -3 and Grapevine virus A and B. **Plant Disease**, v. 95, p. 657–665, 2011.
- KOVACS, L. G. et al. Latent infection by leafroll agent GLRaV-3 is linked to lower fruit

- quality in French-American hybrid grapevines Vidal blanc and St. Vincent. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 52, p. 254-259, 2001.
- KUHN, G. B. Intumescimento dos ramos da videira (“corky bark”), doença constatada no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 4, p. 399-406, 1992.
- HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program, **Genome Research**, v. 9, p. 868-877. 1999.
- LEE, J. et al. Influence of grapevine leafroll associated viruses (GLRaV-2 and -3) on the fruit composition of Oregon Vitis vinifera L. cv. Pinot noir: Phenolics. **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 889–896, 2009a.
- LEE, J. et al. Influence of grapevine leafroll associated viruses (GLRaV-2 and -3) on the fruit composition of Oregon Vitis vinifera L. cv. Pinot noir: Free amino acids, sugars, and organic acids. **Food Chemistry**, v. 117, n. 1, p. 99–105, 2009b.
- LING, K. S. et al. The coat protein gene of Grapevine leafroll-associated closterovirus 3: cloning, nucleotide sequencing and expression in transgenic plants. **Archives of Virology**, v. 142, n. 6, p. 1101-1116, 1997.
- LIU, M. H. et al. Occurrence of grapevine leafroll-associated viruses in China. **Plant Disease**, v. 97, p. 1339-1345, 2013.
- MARTELLI, G. P. **Grapevine virology highlights 2006-09**. In: MEETING OF INTERNATIONAL COUNCIL OF VIRUSES AND VIRUS DISEASES OF GRAPEVINE, 16., 2009, Dijon, France. Extended abstracts... Dijon:ICVG, 2009. p.15-23.
- MARTELLI, G.P. **Grapevine virology highlights 2010-2012**. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUS AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE, 17., 2012, Davis, USA. Proceedings... Davis: ICVG, 2012. p.13-31
- MARTELLI, G. P. Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. **J. Plant Pathol.**, v. 96, p. 1-136, 2014.
- MARTELLI, G. P. et al. The family Closteroviridae revised. **Archives of Virology**, v. 147, p. 2039-2044, 2002.
- MARTELLI, G. P.; BOUDON-PADIEU, E. Directory of infectious diseases of grapevines. International centre for advanced mediterranean agronomic studies. **Options Méditerranéennes**, n. 55, p. 59-75, 2006.
- MENG, B.; LIN, C.; GOSZCZYNSKI, D. E.; GONSALVES, D. Genome sequences and structures of two biologically distinct strains of Grapevine leafroll-associated virus 2 and sequence analysis. **Virus Genes**, v. 31, n. 1, p. 31-41, 2005.
- MONIS, J.; CONSTABLE, F.; HABIL, N. Avances en el estudio de enfermedades de la vid provocadas por virus. **Revista Enología**, v. 7, p. 1-8, 2010.
- MOREIRA, A. E. et al. Caracterização do gene da proteína capsidial do Grapevine virus A em videiras afetadas pela acanaladura do lenho de Kober no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 205–208, 2004.
- MOURA, M. S. B. de; TEIXEIRA, A. H. de C.; SOARES, J. M. Exigências climáticas. In: SOARES, J. M.; LEAO, P. C. de S. (Ed.). A vitivinicultura no Semiárido brasileiro. Brasília,

DF: Embrapa Informação Tecnológica; Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2009. cap. 2, p. 37-69.

NAIDU, R. et al. Grapevine leafroll: a complex viral disease affecting a high value fruit crops. **Plant Dis.**, v. 98, n. 9, p. 1172–1185, 2014.

NAKANO, M.; NAKAUNE, R.; KOMAZAKI, S. **Mealybug transmission of grapevine viruses in Japan**. Page 218 in: Proc. XIV Int. Counc. Study Viruses Virus-Like Dis. Grapevine. Locorotondo (Bari), Italy, 2003.

OKONECHNIKOV, K.; GOLOSOVA, O.; FURSOV, M. **Unipro ugene: a unified bioinformatics toolkit. Bioinformatics**. Oxford, Englan, nº 28, p. 1166–1167. 2012.

OSMAN, F. et al. Real-time RT-PCR (TaqMan) assays for the detection of Grapevine Leafroll associated viruses 1-5 and 9. **Journal of Virological Methods**, v. 141, n. 1, p. 22–29, 2007.

PROSSER, S. W.; GOSZCZYNSKI, D. E.; MENG, B. Molecular analysis of double-stranded RNAs reveals complex infection of grapevines with multiple viruses. **Virus Research**, v. 124, n. 1, p. 151-159, 2007.

RADAELLI, P. et al. Variabilidade do gene da proteína capsidial de três espécies virais que infectam videiras no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 5, p. 297–305, 2009.

RICARDO, P. et al. Análise da diversidade genética por AFLP e identificação de marcadores associados à resistência a doenças em videira. **Rev. Bras. Frut.**, v. 4, n. 3, p. 454–457, 2005.

RUBIO, L.; GUERRI, J.; MORENO, P. Genetic variability and evolutionary dynamics of viruses of the family Closteroviridae. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1–15, 2013.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 999p.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TURTURO, C. et al. Genetic variability and population structure of grapevine leafroll-associated virus 3 isolates. **J. Gen. Virol.**, v. 86, p. 217–224, 2005.

VOLPE, M. L. et al. Incidence of Grapevine leafroll associated viruses -1, -2, and -3 in Mendoza vineyards. **Trop. Plant Pathol.**, v. 35, p. 377-380, 2010.

WALKER, A. R. et al. White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. **Plant J.**, v. 49, p. 767-959, 2007.

WANG, J. et al. Genetic diversity in the 3' terminal 4.7-kb region of grapevine leafroll-associated virus 3. **Phytopathology**, v. 101, n. 4, p. 445–50, 2011.

Tabela 1: Lista das 28 amostras coletadas de acessos de videira do BAG da Embrapa Semiárido, com presença ou ausência de sintomas, detecção, e sequências analisadas.

ID	Variedade	Sintoma	RT-PCR		Sequências analisadas*	Uso	Espécie		
			GLRaV-2	GLRaV-3					
3	Isaura	+	+	+	++	Mesa	Híb. interespecífico		
9	Niágara Rosada			+	+				
20	Beni Fuji			+					
28	BRS Linda			+	+				
24	IAC 572			+	+	Porta-enxerto			
25	SO4			+	+				
10	Moscato Embrapa					Processamento			
13	Branca Salitre								
15	Ângelo Pirovano			+		Mesa			
17	Superior Seedles			+	+				
23	Dawn Seedless		+	+	++				
26	Red Globe		+	+	++				
1	Grenache					<i>Vitis vinifera L.</i>			
2	Merlot	+		+	+				
4	Carignane								
5	Syrah RS		+	+	++				
7	Souzão	+		+	+				
8	Campanário	+	+	+	++				
11	Grand Noir							Processamento	
12	Ruby Cabernet		+		+				
14	Cabernet Sauvignon	+	+	+	++				
18	Bordô	+		+					
19	Alfrocheiro		+		+				
21	Sauvignon Banc			+	+				
22	Deckrot								
27	Moscato Caneli								
16	Isabel		+	+	+			Proc. e mesa	<i>Vitis labrusca L.</i>
6	Eumelan 394		+	+	++	-	-		
Total			6	10	19	25			

* +: amostra única sequenciada; ++: amostras sequenciadas para os dois vírus.

Tabela 2. *Primers* específicos utilizados para detecção viral por RT-PCR.

Vírus	Oligonucleotídeos	Sequência 5'-3'	Orientação	Fragmento amplificado	Referência
GLRaV-1	GLRaV-1_v	ATGGCTAGCGTTATATCTCAAA	Senso	969 (CP)	Basso et al. (2010)
	GLRaV-1_r	TTACACCTTAAGCTCGCTAGTA	Antisenso		
GLRaV-2	V2CPf	CTAGTCTAAATGGTGTCGA	Senso	431 (CPm, parcial)	Bertazzon, Angelini (2004)
	V2CPr2	TTCAGAGAGCTTCGGGCAAG	Antisenso		
GLRaV-3	LR3 8504v	ATGGCATTGAACTGAAATT	Senso	942 (CP)	Fajardo et al. (2007)
	LR3 9445c	CTACTTCTTTTGCAATAGTT	Antisenso		

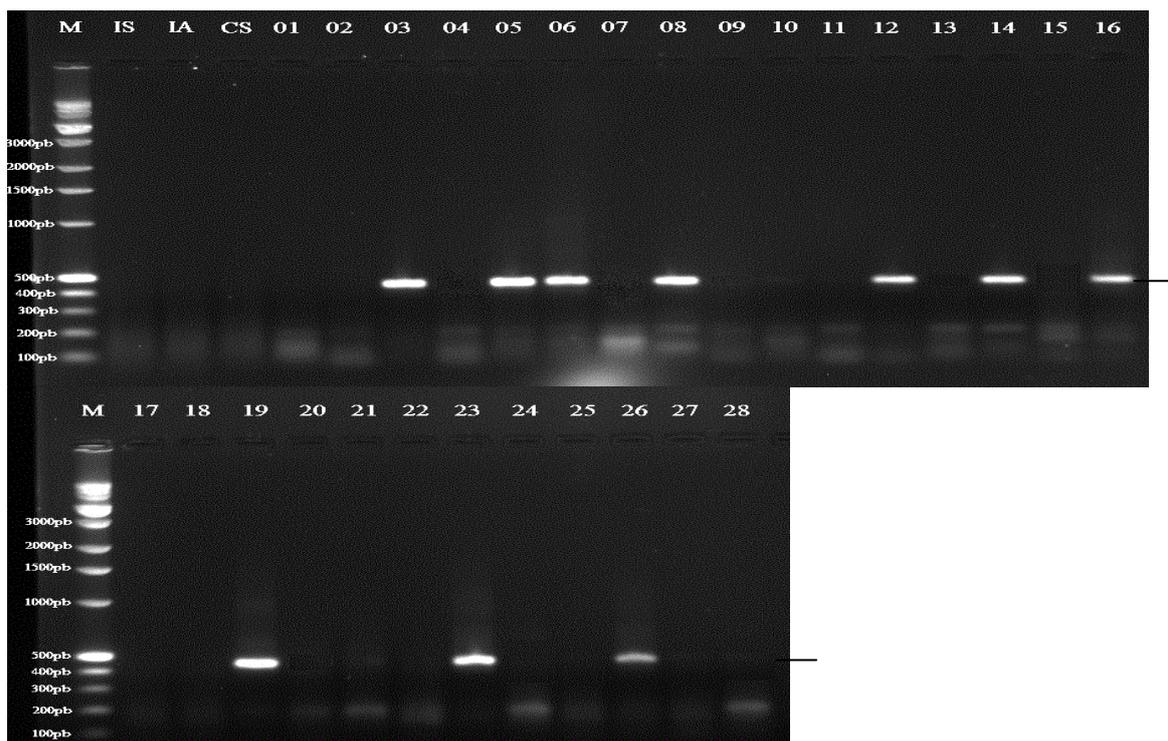


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da RT-PCR de amostras indexadas para GLRaV-2. M: marcador DNA Ladder 1 kb; Plantas sadias: IS – cv. Isabel, IA – cv. IAC-572, CS – cv. Cabernet Sauvignon; 1 a 28.

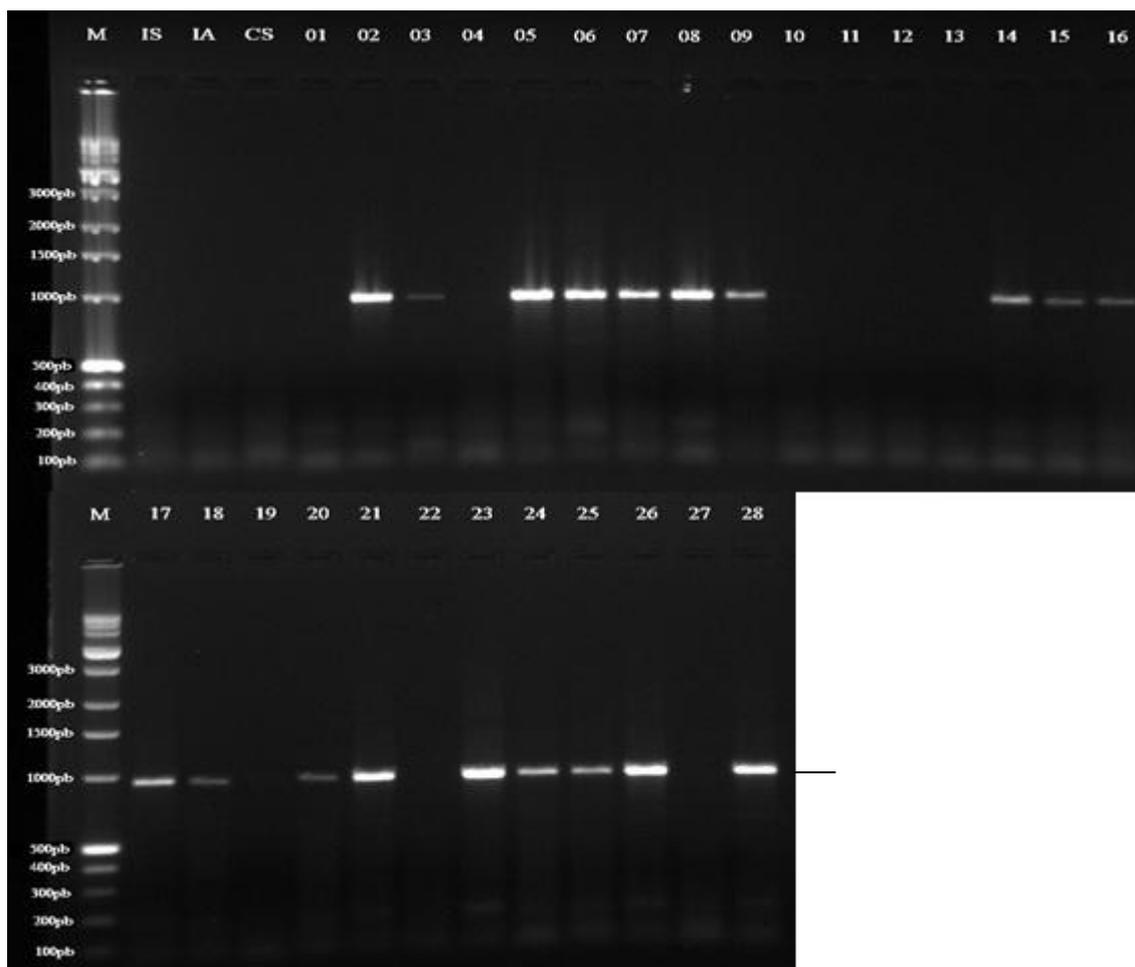


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da RT-PCR de amostras indexadas para GLRaV-3. M: marcador DNA Ladder 1 kb; Plantas sadias: IS – cv. Isabel, IA – cv. IAC-572, CS – cv. Cabernet Sauvignon; 1 a 28.

Tabela 3. Relação das variedades que tiveram as sequências analisadas para cada vírus, o tamanho da sequência obtida para cada um e as sequências dos isolados selecionados para análises de comparação com outros isolados disponíveis no GENBANK.

ID	Variedade	Tamanho (nt)		Selecionados
		GLRaV-2 (431)	GLRaV-3 (942)	
2	Merlot			809 MRT
3	Isaura	374		497 ISRA
5	Syrah RS	375		820 SYRS
6	Eumelan 394	217		654
7	Souzão			704
8	Campanário	369		704
9	Niágara Rosada			545
12	Ruby Cabernet	300		
14	Cabernet Sauvignon	372		777
16	Isabel			498
17	Superior Seedles			706 SupS
19	Alfrocheiro	374		
21	Sauvignon Banc			819
23	Dawn Seedless	300		753
24	IAC 572			496
25	SO4			508
26	Red Globe	294		761
28	BRS Linda			793

Tabela 4. Relação dos isolados brasileiros e estrangeiros para cada vírus utilizados nas análises de similaridade e filogenia.

Vírus	País	Identificação	Acesso no Genbank
GLRaV-2	Brasil	CS2	HM059035
		IS3	HM358050
	Itália	H4	AY697863
	África do Sul	93/955	NC_007448
	EUA	PN	AF039204
GLRaV-3	Brasil	PET-1	DQ680141
		PET-2	DQ680142
		PET-3	DQ062152
		PET-4	AY753208
	China	RC-PE	KJ704369
		IS2	HM059034
	China	Daw	DQ119574
	África dos Sul	GP18	EU259806
	Chile	CI766	EU344893
	EUA	3-15	HQ130290
Portugal	TN2	HQ401019	

Tabela 5. Identidade (%) das sequências de nt (abaixo da diagonal) e de aad (acima da diagonal) do gene parcial (217-375 pb) da proteína capsidial entre diferentes isolados obtidos no presente estudo para GLRaV-2.

	Isaura	Syrah RS	Eumelan-394	Campanário	Ruby Cabernet	Cabernet Sauvignon	Alfrocheiro	Dawn Seedless	Red Globe
Isaura	-	99,16	98,59	100	94,95	100	99,16	97,92	86,17
Syrah RS	98,89	-	97,18	99,16	93,94	99,16	98,32	96,88	85,11
Eumelan-394	88,94	88,48	-	98,59	100	98,59	98,59	100	92,96
Campanário	99,16	99,16	89,40	-	94,95	100	99,16	97,92	86,17
Ruby Cabernet	87,54	87,05	97,42	87,90	-	94,95	94,95	98,68	86,49
Cabernet Sauvignon	99,16	99,44	88,94	99,44	87,41	-	99,16	97,92	86,17
Alfrocheiro	94,38	94,38	87,56	94,94	84,85	94,66	-	97,92	86,17
Dawn Seedless	87,93	87,59	97,64	88,62	96,49	87,93	88,28	-	87,23
Red Globe	75,70	75,35	78,80	76,06	74,66	75,70	78,49	75,35	-

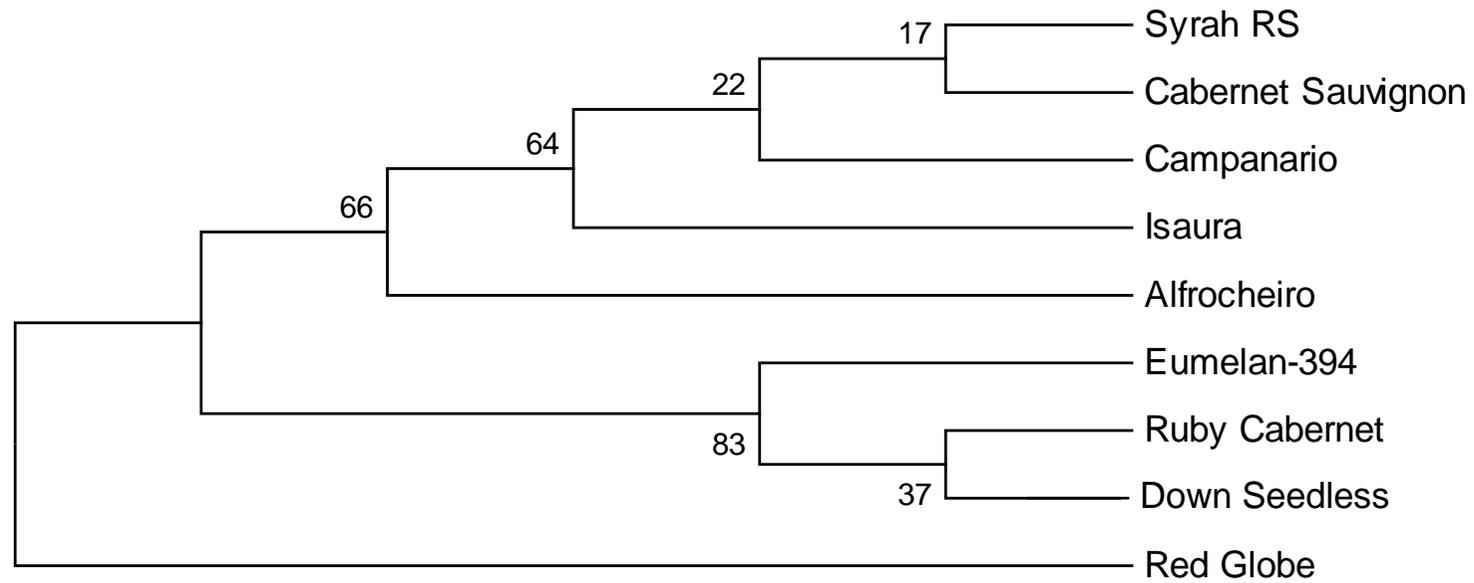


Figura 4. Árvore filogenética por máxima parcimônia baseada nas sequências parciais de nucleotídeos do gene da proteína capsidial dos isolados de GLRaV-2. Valores de porcentagem de “bootstrap” estão mostrados nos ramos. As barras indicam número de substituições de nucleotídeos por sítio (5 = 0,005).

Tabela 6. Identidade (%) das sequências de nt (abaixo da diagonal) e de aad (acima da diagonal) dos genes parciais (374-375pb) da proteína capsidial dos diferentes isolados de GLRaV-2.

	ISRA	SYRS	CS2	IS3	H4	93/955	PN
ISRA		99,19	98,39	99,19	95,16	95,97	96,77
SYRS	98,93	-	97,58	98,39	94,35	95,16	95,97
CS2	98,66	98,66	-	98,39	93,55	94,35	96,77
IS3	99,20	99,20	98,93	-	94,35	95,16	96,77
H4	92,45	92,45	92,18	92,72	-	93,55	93,55
93/955	87,13	86,86	86,60	87,13	85,44	-	100
PN	88,24	87,97	87,67	88,24	88,17	100	-

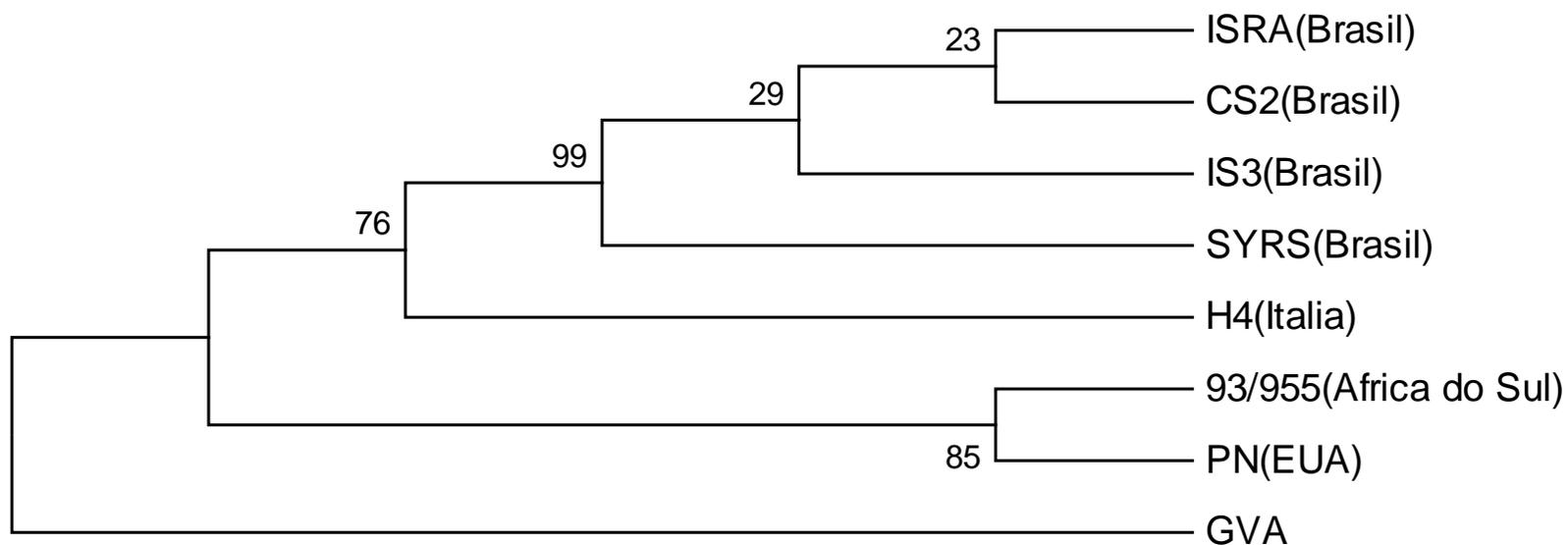


Figura 5. Árvore filogenética por máxima parcimônia baseada nas sequências parciais de nucleotídeos do gene da proteína capsidial dos isolados de GLRaV-2. Valores de porcentagem de “bootstrap” estão mostrados nos ramos. As barras indicam número de substituições de nucleotídeos por sítio (20 = 0,02). Para o grupo externo da árvore foi utilizado a espécie tipo do gênero *Grapevine virus A* (GVA, *Vitivirus*, Genbank: HM358052).

Tabela 7. Identidade (%) das sequências de nt (abaixo da diagonal) e de aad (acima da diagonal) dos genes parciais (497-706 pb) da proteína capsidial entre diferentes isolados obtidos no presente estudo para GLRaV-3.

	PtS	394	SZ	CP	NgRa	CS	Isb	SB	DS	572	SO4	RG	BRS
PtS	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
394	99,78	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
SZ	99,57	99,36	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
CP	99,78	99,57	99,78	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100
NgRa	99,78	99,57	99,36	99,57	-	100	100	100	100	100	100	100	100
CS	99,36	99,15	99,78	99,57	99,15	-	100	100	100	100	100	100	100
Isb	99,78	99,57	99,78	100	99,57	99,57	-	100	100	100	100	100	100
SB	100	99,78	99,57	99,78	99,78	99,36	99,78	-	100	100	100	100	100
DS	100	99,78	99,57	99,78	99,78	99,36	99,78	100	-	100	100	100	100
572	99,78	99,57	99,36	99,57	99,57	99,15	99,57	99,78	99,78	-	100	100	100
SO4	100	99,78	99,57	99,78	99,78	99,36	99,78	100	100	99,78	-	100	100
RG	99,78	99,57	99,78	100	99,57	99,57	100	99,78	99,78	99,57	99,78	-	100
BRS	99,78	99,57	99,36	99,57	99,57	99,15	99,57	99,78	99,78	100	99,78	99,57	-

PtS: Syrah RS; E. 394: Eumelan-394; SZ: Souzao; CP: Campanário; NgRa: Niágara Rosada; CS: Cabernet Sauvignon; Isb: Isabel; SB: Sauvignon Blanc; DS: Dawn Seedless; 572: IAC-572; RG: Red Globe; BRS: BRS Linda.

Tabela 8. Identidade (%) das sequências de nt (abaixo da diagonal) e de aad (acima da diagonal) dos genes parciais (497-809 pb) da proteína capsidial entre diferentes isolados obtidos no presente estudo para GLRaV-3.

	Merlot	Isaura	Superior Seedless
Merlot	-	98,2	98,8
Isaura	99,4	-	99,4
Superior Seedless	99,6	99,8	-

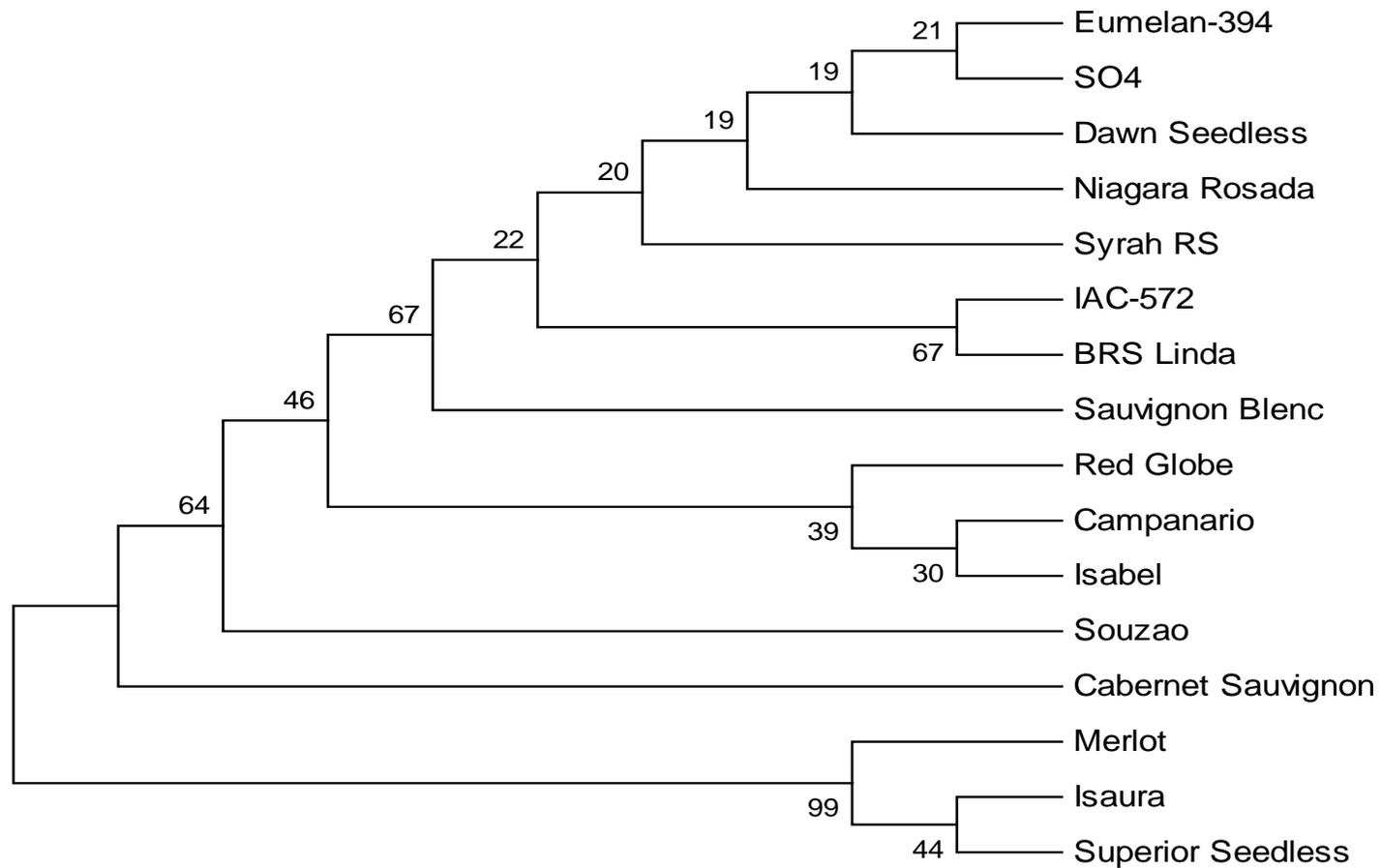


Figura 7. Árvore filogenética por máxima parcimônia baseada nas sequências parciais de nucleotídeos do gene da proteína capsidial dos isolados de GLRaV-3. Valores de porcentagem de “bootstrap” estão mostrados nos ramos. As barras indicam número de substituições de nucleotídeos por sítio (50 = 0,05).

Tabela 9. Identidade (%) das sequências de nt (abaixo da diagonal) e de aad (acima da diagonal) do gene parcial (706-809 pb) da proteína capsidial entre diferentes isolados de GLRaV-3.

	MRT	SupS	RC-PE	PET1	PET2	PET3	PET4	IS2	Daw	3-15	GP18	CI766	TN2
MRT	-	98,30	98,14	98,88	98,88	98,88	82,53	80,30	97,77	82,53	98,51	97,40	95,32
SupS	99,29	-	98,30	99,15	99,15	98,72	81,70	79,15	98,72	81,70	99,57	98,30	94,89
RC-PE	99,38	99,43	-	99,26	99,26	98,51	83,64	81,41	98,14	87,36	98,88	97,77	95,32
PET1	99,63	99,72	99,75	-	100	99,26	83,64	81,41	98,88	83,64	99,63	98,51	95,32
PET2	99,51	99,58	99,63	99,88	-	99,26	83,64	81,41	98,88	83,64	99,63	98,51	94,89
PET3	99,63	99,58	99,51	99,75	99,63	-	87,36	80,67	98,14	82,90	98,88	97,77	95,32
PET4	92,83	92,35	93,20	93,20	93,08	92,95	-	94,80	82,90	96,28	83,27	82,90	97,87
IS2	91,97	91,36	92,34	92,34	92,21	92,09	97,65	-	80,67	97,77	81,04	80,67	97,87
Daw	99,26	99,58	99,38	99,63	99,51	99,38	92,95	92,09	-	82,90	99,26	98,14	95,32
3-15	92,83	92,35	93,20	93,20	93,08	92,95	98,39	99,01	92,95	-	83,27	82,90	100
GP18	99,51	99,86	99,63	99,88	99,75	99,63	93,08	92,21	99,75	93,08	-	98,88	96,60
CI766	99,13	99,43	99,26	99,51	99,38	99,26	92,95	92,09	99,38	92,95	99,63	-	95,32
TN2	92,21	92,35	92,63	92,63	92,49	92,49	98,16	98,87	92,35	100	92,49	92,35	-

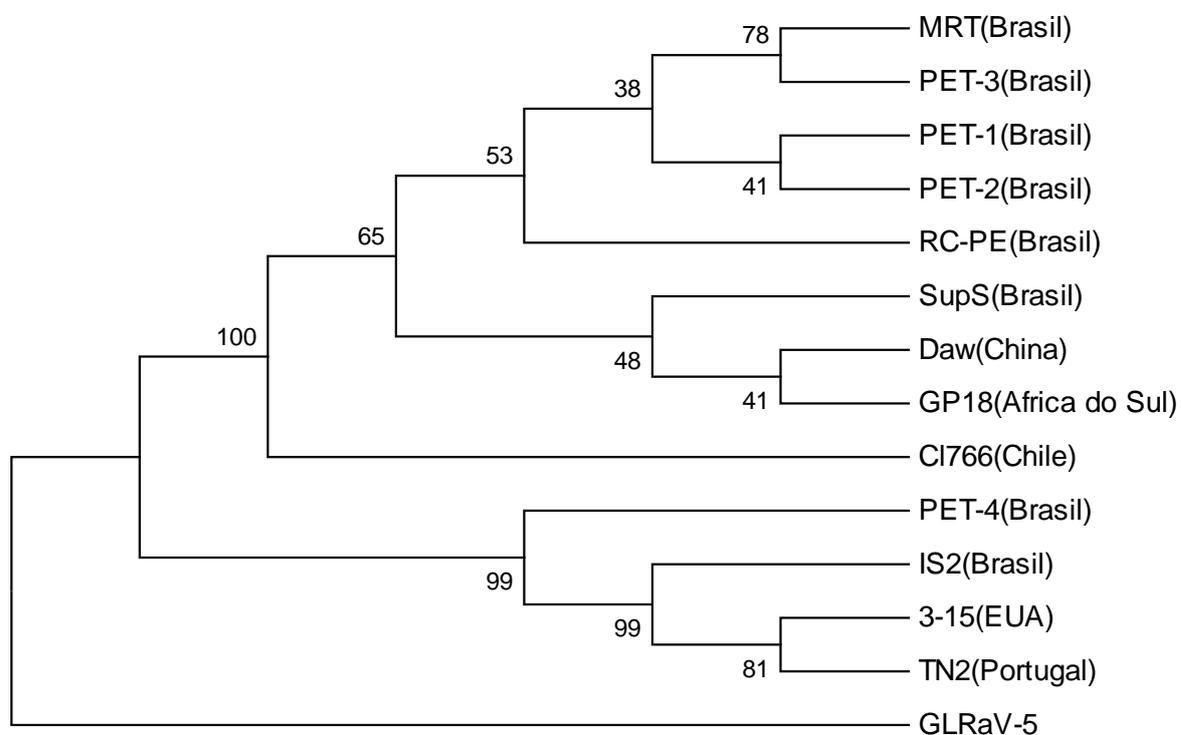


Figura 8. Árvore filogenética por máxima parcimônia baseada nas sequências parciais de nucleotídeos do gene da proteína capsidial dos isolados de GLRaV-3. Valores de porcentagem de “bootstrap” estão mostrados nos ramos. As barras indicam número de substituições de nucleotídeos por sítio ($5 = 0,05$). Para o grupo externo da árvore foi utilizado a espécie tipo do gênero *Grapevine leafroll associated-virus 5* (GLRaV-5, *Ampelovirus*, Genbank: JQ619076).

CONCLUSÃO GERAL

O GLRaV-3 foi o vírus mais disseminado, seguido por GVA, GFkV, GLRaV-1 e GFLV, respectivamente, sendo encontrada infecção mista foi detectada em 153 amostras. Cultivares para vinho, uvas finas de mesa e porta-enxertos apresentaram porcentagem total de infecção de 93,2%, 52,6% e 31,9%, respectivamente. Das 13 cultivares testadas para cultivo *in vitro* de meristemas apicais e gemas axilares, quatro foram regeneradas com porcentagem variando entre 7% e 47%. A ocorrência de diferenças significativas entre as cultivares, durante a avaliação de desenvolvimento dos explantes, revelaram respostas distintas ao longo do tempo. ‘Cabernet Sauvignon’ apresentou a melhor resposta de regeneração de plantas partindo de meristema apical e de gemas axilares. ‘IAC-572’ destacou-se com as maiores médias de altura e números de gemas e de folhas aos 30, 60 e 90. Quanto à detecção do vírus do enrolamento da folha, de todas as amostras para GLRaV -1, -2 e -3, zero, 10 e 19 apresentaram infecção, respectivamente, sendo que oito apresentaram infecção mista. Observou-se alta e baixa identidade entre os isolados obtidos com isolados brasileiros e estrangeiros para ambos os vírus, encontrando-se divergência genética do gene da CP em alguns isolados, sendo que 13 isolados não apresentaram homologia significativa com outros isolados do presente estudo e disponíveis no GENBANK, para GLRaV-3.