



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ORGANOGENESE *IN VITRO* E DIAGNOSE VIRAL EM
VIDEIRAS CULTIVADAS NO VALE DO SÃO FRANCISCO**

LUIZ RONALDO NALI

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

OUTUBRO -2004

**ORGANOGENESE *IN VITRO* E DIAGNOSE VIRAL EM
VIDEIRAS CULTIVADAS NO VALE DO SÃO FRANCISCO**

LUIZ RONALDO NALI

Engenheiro Agrônomo

Universidade Estadual Paulista “UNESP”, Faculdade de Ciências Agrônômicas de
Botucatu, 1987

Dissertação submetida à Câmara de Ensino de
Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade
Federal da Bahia como requisito parcial para
obtenção do Grau de Mestre em Ciências Agrárias,
Área de Concentração: Fitotecnia.

**Orientador: Prof. Dr. Weliton Antonio Bastos de
Almeida**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2004

FICHA CATALOGRÁFICA

N171 1	<p data-bbox="634 993 1344 1161">Nali, Luiz Ronaldo Organogênese <i>in vitro</i> e diagnose viral em videiras cultivadas no Vale do São Francisco / Luiz Ronaldo Nali. - Cruz das Almas, BA, 2004. 67 f.: il.</p> <p data-bbox="634 1199 1344 1262">Dissertação (Mestrado) – Escola de Agronomia. Universidade Federal da Bahia, 2004.</p> <p data-bbox="634 1304 1344 1430">1. Uva-organogênese 2. Uva-regulador do crescimento-Brasil-Vale do São Francisco. 3. Videira-Elisa-vírus. I. Universidade Federal da Bahia, Escola de Agronomia II.Título.</p> <p data-bbox="1081 1440 1325 1472">CDD 20 ed. 634.8</p>
-----------	---

AGRADECIMENTOS

A DEUS, queridos pais (Antonio e Izabel) e família (Magna, Matheus e Thyago).

Ao Prof. Weliton Antonio Bastos de Almeida, pela orientação, respeito e amizade.

A professora Ana Cristina Loyola pelo carinho e atenção.

Ao Pesquisador Nataniel Franklin de Melo, pela co-orientação, apoio e atenção.

A Escola de Agronomia de Cruz das Almas pela oportunidade.

A Embrapa Semi-árido por fornecer as instalações e recursos para realização das pesquisas.

Aos colegas e funcionários que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO	01
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
Capítulo 1	
ORGANOGENÊNESE <i>IN VITRO</i> EM VIDEIRAS CULTIVADAS NO VALE DO RIO SÃO FRANCISCO.....	36
Capítulo 2	
DIAGNOSE DE VIROSES POR DAS-ELISA EM VIDEIRAS CULTIVADAS NO VALE DO RIO SÃO FRANCISCO.....	50
CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
ANEXOS	65

ORGANOGENESE *IN VITRO* E DIAGNOSE VIRAL EM VIDEIRAS CULTIVADAS NO VALE DO RIO SÃO FRANCISCO

Autor: Luiz Ronaldo Nali

Orientador: Prof. Dr. Weliton Antonio Bastos de Almeida

RESUMO: A vitivinicultura é uma das principais atividades do agronegócio irrigado do Vale do rio São Francisco. A aplicação de técnicas de cultura de tecidos em genótipos superiores, com certificação fitossanitária, constitui em importante medida para a sustentabilidade da atividade. Dessa forma, estudou-se a resposta organogênica *in vitro*, como pré-requisito para futuros trabalhos de transferência genética. Explantes de folhas com pecíolo, originados de brotações axilares *in vitro*, de sete cultivares de videira, foram induzidos em meio de cultura NN, suplementado com reguladores de crescimento. A avaliação da porcentagem de explantes com regeneração adventícia (PER) e índice de regenerantes por explante (IR/E) foi realizada 75 dias após a inoculação dos explantes. Para o índice de regenerantes por explante foi utilizado um sistema de notas. A porcentagem de explantes regenerativos variou de 0%, na cultivar Benitaka e no controle, até 50% na cultivar Thompson Seedless. As cultivares com taxas acima de 7 regenerantes por explante foram: Petit Shiraz (15,0 µM BAP + 0,1 µM ANA) e Red Globe (10,0 µM BAP + 0,1 µM ANA). Para certificação fitossanitária de genótipos, aplicaram-se testes diagnósticos DAS-ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) visando avaliar sua eficiência na detecção de vírus em videiras cultivadas em condições tropicais de altas temperaturas. Foram investigadas a presença dos vírus *Grapevine leafroll virus 1* (GLRaV-1), *Grapevine leafroll virus 3* (GLRaV-3), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) e *Grapevine fleck virus* (GFkV) em quatro cultivares de videira. Foi detectada a presença de GLRaV-3 nas cultivares Benitaka (80%), Superior Seedless (60%) e Itália (40%) em amostras de pecíolo + nervuras de folhas adultas. Foi detectado GVA nas cultivares Superior Seedless (40%), IAC-313 (40%) e Benitaka (20%) em amostras de pecíolo + nervuras de folhas adultas, lâmina de folhas adultas e pecíolo + nervuras de folhas jovens, respectivamente. Foi detectado GFLV (20%) na cultivar Benitaka, em amostras pecíolo + nervura de folhas adultas. Não foram detectados GLRaV-1 e GFkV.

Palavras-chave: Vitis, organogênese, reguladores de crescimento, ELISA, vírus.

IN VITRO ORGANOGENESIS AND VIRAL DIAGNOSIS IN GRAPEVINE ON SAN FRANCISCO RIVER VALLEY

Author: Luiz Ronaldo Nali

Adviser: DSc. Weliton Antonio Bastos de Almeida

ABSTRACT: The viticulture is an important economical activity in the irrigated agriculture of the São Francisco river Valley. The application of tissue culture technic on certified free selects genotypes of viruses are important for the sustentability of the activity. *In vitro* organogenesis was studied as requisite for future investigations for genetic transformation studies. Explants of leaves with petiole, originated from *in vitro* axillary shoots, of seven grapevines cultivars, were induced in culture medium NN, supplemented with growth regulators. The evaluation was carried out 75 days after explant inoculation analyzing the percentage of explants with adventitious regeneration and rate of regeneration per explant. A note system was used for the rate of regeneration per explant. The percent of explant regeneration varied from 0%, in Benitaka cultivar and the control, up to 50%, in Superior Seedless cultivar. The cultivars with rate more than 7 regenerants per explants were: Petit Shiraz (15,0 μ M de BAP + 0,1 μ M ANA) and Red Globe (10,0 μ M de BAP + 0,1 μ M ANA). For certified free selects genotypes of viruses, diagnostic test DAS-ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) was used aiming to evaluate its efficiency to detect virus in grapevine under tropical conditions of high temperatures. In this case, were investigated the presence of *Grapevine leafroll virus 1* (GLRaV-1), *Grapevine leafroll virus 3* (GLRaV-3), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) and *Grapevine fleck virus* (GFkV) in four grapevine cultivars. The presence of GLRaV-3 in Benitaka (80%), Superior Seedless (60%) and Itália (40%) cultivars was detected in samples of petiole and leaf veins of adult leaves. The presence of GVA in Superior Seedless (40%), IAC-313 (40%) and Benitaka (20%) cultivars were detected in samples of petiole and leaf veins of adult leaves, lamina of adult leaf and petiole and leaf veins of young leaves. The presence of GFLV in Benitaka (20%) was detected in samples of petiole and leaf veins of adult leaves. It was not detected GLRaV-1 and GFkV.

Key words: Vitis, organogenesis, growth regulators, ELISA, virus.

INTRODUÇÃO

A videira é cultivada em mais de 60 países, com área aproximada de 7,6 milhões de ha e produção de 64,3 milhões de toneladas. Os maiores produtores mundiais em milhões de toneladas no ano de 2002 foram: Itália (7,4), França (6,8), Estados Unidos (6,7) e Espanha (5,9). Dos países da América do Sul, destacam-se: Argentina, Chile e Brasil, com produções anuais de 2,4 milhões de toneladas, 1,7 milhão de toneladas e 1,1 milhão de toneladas, respectivamente (FAOSTAT, 2004). Cerca de 80% da produção mundial de uva é destinada para vinhos ou produtos derivados de vinho. Os 20% restantes da produção compreendem uvas de mesa, uvas passa, sucos e geléias (Mullins, 1990).

A produção brasileira de uva, no ano de 2002, foi de aproximadamente 1,1 milhão de toneladas, apresentando um aumento de produção de 64% em relação ao ano de 1996. No Brasil, a região Sul apresenta a maior área plantada (46.182 ha), seguida pelo Sudeste (13.102 ha) e Nordeste (6.097 ha) (Agrianual 2004). Na região Nordeste destaca-se, como principal pólo vitivinícola, a região do Sub Médio do Vale do Rio São Francisco, situado na zona semi-árida, abrangendo no estado de Pernambuco os municípios de Petrolina, Lagoa Grande e Santa Maria da Boa Vista e no estado da Bahia os municípios de Juazeiro, Curaçá, Sobradinho, Sento Sé e Casa Nova (Leão & Possídeo, 2000)

O incremento em área e produção de uvas tornam atualmente o Vale do Rio São Francisco uma região de alta taxa de crescimento desta cultura à nível de Brasil. A região representa aproximadamente 95% das exportações nacionais de uvas finas para mesa, desempenhando importante papel sócio-econômico.

Além disso, destacam-se importantes projetos no setor vitivinícola, com o objetivo de em cinco anos produzir o equivalente à metade do vinho nacional, ou seja, mais de 30 milhões de litros de vinhos finos por ano (Anuário Brasileiro da Fruticultura, 2004).

Entre as variedades de uva mais cultivadas na região, destacam-se as finas para mesa, originárias de castas européias e americanas (Itália, Red Globe, Benitaka, Superior Seedless, Crimson Seedless e Thompson Seedless) e as variedades para vinho (Petit Shiraz, Cabernet Sauvignon, Merlot e Alicante Bouchet). Devido à especificidade climática desta região, as vinhas apresentam comportamento fisiológico diferenciado caracterizado pela precocidade de produção e possibilidade de produzir praticamente o ano todo (Silva & Correia, 2000). Por outro lado, as principais limitações da cultura são a carência de variedades sem sementes adaptadas à região (Camargo et al., 1997), aliado à suscetibilidade a doenças e presença de áreas significativas implantadas com material sem certificação fitossanitária (Melo, 2004 comunicação pessoal).

Considerando-se a diversidade ambiental da área de ocorrência natural das videiras (Centro Euroasiático, Centro Asiático e Centro Americano), fica evidente a riqueza do germoplasma da espécie, indicando ampla capacidade de adaptação a diferentes condições de clima e solo. Enquanto algumas espécies, como *V. vinifera* e *V. labrusca*, apresentam características de alta qualidade de frutos para fins específicos, outras contêm genes de resistência ou tolerância a diferentes fatores bióticos (doenças e pragas) e abióticos (condições extremas ou adversas de clima e solo) (Alleweldt et al., 1990).

O melhoramento genético convencional, de uma forma geral e especialmente, no caso da videira, tem sido um instrumento importante na busca de produtividade e qualidade, visando a adaptação a condições ambientais diversas, redução do uso de produtos químicos por meio da resistência a pragas e doenças e adaptação a novos sistemas de cultivo e à mecanização (Terra et al., 1993).

Apesar do grande potencial genético das espécies muscadíneas, tais como *V. rotundifolia* como fonte de resistência a doenças e pragas, torna-se difícil, através da genética convencional, estabelecer híbridos estáveis e férteis com o uso de parentais com 38 e 40 cromossomos (Krul & Mowbray, 1984). Por

outro lado, a utilização de métodos não convencionais (transferência gênica, cultura de embriões, fusão de protoplastos, mutagênese) têm sido propostos com o objetivo de acelerar os ganhos genéticos em videira (Bouquet,1989; Meredith,1996). Assim, o desenvolvimento de protocolos de regeneração *in vitro* e a descoberta, manutenção e acessibilidade de genes de interesse para programas de melhoramento são passos fundamentais para o estabelecimento de novos produtos (Torregrosa & Bouquet, 1996).

A utilização da transformação genética em plantas permite a introdução de características agronômicas favoráveis sem alterar o fenótipo do material, necessitando para isso o desenvolvimento de sistemas *in vitro* para regeneração de plantas. No entanto, o uso de *Agrobacterium* para transferência de genes em videira é utilizado apenas para poucos genótipos que apresentam tecidos com competência embriogênica (Pêros et al., 1998). Vale salientar que a produção de calos embriogênicos é laboriosa, sendo que o fenótipo das plantas regeneradas pode sofrer alterações (Mezetti et al., 2002). Recentemente, a utilização da técnica de transformação por biobalística foi relatada por Kikkert et al. (1996), e pode ser utilizada em conjunto com organogênese somática a qual é obtida para um número maior de cultivares. Por outro lado, Mezetti et al. (2002), desenvolveram um protocolo eficiente baseado em regeneração via organogênese e transferência genética.

Ressalta-se também, que a grande demanda por novos plantios na região do sub-médio São Francisco, acarreta muitas vezes, na utilização de fontes não certificadas de material genético isento de vírus, possibilitando a disseminação desses patógenos através da enxertia e estaquia. Nesse caso, alguns dos principais problemas ocasionados pelas doenças viróticas são a diminuição da vida útil dos vinhedos e a crescente redução do peso, qualidade e características bioquímicas dos frutos, levando à inviabilidade econômica da produção (Kuhn, 1992; Castellano et al., 1983).

Sabe-se, portanto, que o domínio da aplicação dos processos morfogênicos é importante para o desenvolvimento de sistemas eficientes de regeneração, visando sua utilização como ferramenta para os programas de melhoramento genético em videiras. Por outro lado, a aplicação da técnica de detecção de viroses por DAS-ELISA possibilita uma rápida diagnose de

infecções virais em videiras cultivadas na região, além de servir como ferramenta para certificação em programas de sanitização *in vitro* de genótipos superiores.

Assim, o presente trabalho, desenvolvido em parceria entre a Escola de Agronomia da UFBA, em Cruz das Almas-BA, e a Embrapa Semi-Árido, em Petrolina-PE, procurou estabelecer um processo de organogênese *in vitro* e a utilização de teste diagnóstico DAS-ELISA, em videiras cultivadas no Vale do rio São Francisco. Dessa forma procurou-se estabelecer uma interação de técnicas de cultura de tecidos para fins de melhoramento, com testes de certificação de genótipos para fins fitossanitários.

MORFOGÊNESE *IN VITRO* EM VIDEIRA

A morfogênese pode ser conceituada como o processo decorrente da divisão de massas celulares, e posterior diferenciação celular limitada a uma rota específica (Christianson,1985). Sistemas multicelulares, com intensidades variadas de determinação, podem adquirir novas competências através da ação de sinais químicos (reguladores de crescimento), que ativam seletivamente determinados grupos de genes (epigênese), ocorrendo a formação de calos, gemas e/ou embriões (Segura,1993).

O processo de diferenciação celular reflete, em última análise, o efeito de pelo menos três grupos de fatores. O primeiro é o fator genético, que incorpora o estoque de potencialidades podendo ser expressas durante o desenvolvimento; o segundo fator está representado pelas características originadas durante a ontogênese e, por último, existem as características cuja expressão dependem apenas do ambiente (Kerbaudy, 1999).

A morfogênese *in vitro* pode ser realizada por duas vias: organogênese ou embriogênese somática. A organogênese relaciona-se com a obtenção de eixos caulinares monopolares, originados de gemas neoformadas, podendo ser direta ou indireta. No primeiro caso, a partir de um explante primário ocorre a formação de um eixo caulinar a partir de gemas apicais, laterais ou axilares. No segundo caso ocorre a desdiferenciação do explante, resultando na formação de calos que são agregados celulares desorganizados ocorrendo a indução e proliferação

de gemas adventícias (Segura,1993). Embriogênese é o termo usualmente empregado para designar o processo pelo qual células haplóides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (Williams & Maheswaran, 1986).

Segundo Reisch et al. (1989), existem três estágios no desenvolvimento das gemas adventícias: estágio 1, onde ocorre formação rudimentar de meristema apical; estágio 2, onde ocorre presença de primórdios foliares, e estágio 3, onde ocorre alongamento da axis das gemas adventícias para formação de brotos.

A cultura de tecidos tem contribuído significativamente para o estudo da morfogênese *in vitro*, tendo como desafio a definição de protocolos mais adequados para a divisão e diferenciação celular de cada genótipo, e por último a obtenção de plantas idênticas àquela de onde a célula ou conjunto de células foi retirado. Os processos morfogenéticos, como formação de gemas, raízes ou embriões somáticos, constituem-se em conhecimentos indispensáveis para o desenvolvimento de áreas da bioquímica, fisiologia e genética de plantas (Ramalho & Santos, 1990).

Organogênese somática *in vitro* tem sido descrita em diversas culturas (Nehra et al., 1989, Morales et al., 1999, Almeida et al., 2002). Em morangueiro (*Fragaria x ananassa* cv. Redcoat), Nehra et al. (1989) desenvolveram um método eficiente de regeneração direta de brotos, através do uso de discos foliares inoculados em meio MS, suplementado com 10 μM de BAP e 10 μM de AIA. Concluíram também que a regeneração de brotos não dependia da luz, porém que baixas intensidades luminosas da ordem de 12,5 $\mu\text{mols}^{-1}\text{m}^{-2}$ aumentavam a regeneração.

Para otimização do processo de organogênese *in vitro* e regeneração de plantas de *Citrus sinensis* e *Citrus limonia*, Almeida et al. (2002), utilizaram segmentos de epicótilo cultivados em meio MT (Murashige & Tucker, 1969), suplementado com 25 gL^{-1} de sacarose. A combinação de 1,0 mgL^{-1} de BAP, utilizada na fase de indução de brotações e 1,0 mgL^{-1} de IBA, utilizada na fase de enraizamento, permitiu regeneração de plantas com bom índice de enraizamento nas variedades de laranjas “Natal”, “Valência” e “Hamlin”. A

utilização de 0,5-2,5 mgL⁻¹ de BAP na fase de indução de brotações, com 1,0 mgL⁻¹ de IBA na fase de enraizamento, assegurou regeneração de plantas com alto índice de enraizamento para o limão “Cravo”.

Trabalhos com macieira mostraram que o regulador de crescimento BAP é essencial para a indução de brotações (Dunstan et al., 1985; Arello et al., 1989). O efeito do BAP e TDZ (thidiazuron) na calogênese e organogênese em internódios de macieira cultivar Gala RW1, foi relatado por Morales et al. (1999). Neste trabalho, internódios provenientes de cultivo *in vitro*, foram inoculados em meio MS e mantidos em condição de escuro por três semanas. Posteriormente foram colocados em intensidade luminosa de 1500-2000 lux e fotoperíodo de 16 horas. Os melhores tratamentos foram: 5 µM de BAP, quando se obteve 10 brotos/explante ou 39 gemas/explante e BAP + AIB (5 µM), que originou em média 5,6 brotos/explante ou 20 gemas/explante.

Estudos de cultura de tecidos em videira primeiramente obtiveram calogênese ou enraizamento *in vitro* e foram relatados por Fallot (1954), Pelet et al. (1959) e Galzy (1969). O primeiro relato de formação de gemas adventícias foi feito por Favre (1977), onde plantas foram regeneradas a partir de tecidos foliares de vinhas híbridas interespecíficas (*Vitis riparia* x *Vitis rupestris*) e de tecidos foliares da cultivar de *V. vinifera*, “Prodigiosa” (“Bicane” x “Poete Matabon”).

A regeneração de videiras, através de organogênese *in vitro*, foi descrita a partir de diferentes explantes, tais como folhas contendo pecíolo (Péros et al., 1998), lâmina foliar (Martinelli et al., 1996), pecíolos (Tang & Mullins, 1990), segmentos internodais (Rajasekaran & Mullins, 1981) e brotos proliferativos (Mezetti et al., 2002). Entretanto, pecíolos têm sido mais regenerativos que lâminas (Stamp et al., 1990; Baydar, 2000), bem como a orientação adaxial das folhas sobre o meio de cultura tem apresentado melhores índices de regeneração adventícia (Péros et al., 1998; Nehra et al., 1989).

O tipo e concentração de reguladores de crescimento utilizados em meio de cultura *in vitro* são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos, sendo as auxinas e citocininas os mais utilizados (Caldas et al., 1999). A formação de raiz, parte aérea e calo é regulada pela disponibilidade e interação dessas duas

classes de reguladores de crescimento (Skoog & Miller, 1957). Ressalta-se também a importância dos fatores intensidade luminosa, temperatura de incubação, tipo de meio de cultura (Regner & Romann, 1994), estágio fenológico da matriz doadora (Roubelakis-Angelakis & Katsirdakis, 1990) e do genótipo (Péros et al., 1998).

O desenvolvimento de um eficiente protocolo de organogênese em videira foi relatado por Stamp et al. (1990). Explantes de folha contendo pecíolo, das cultivares French Colombard e Thompson Seedless foram inoculados com a face abaxial sobre meio NN (Nitsch & Nitsch, 1969) com 2 mgL^{-1} de BAP, em condição de intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$. Após 3 semanas da inoculação, apresentaram 96% de explantes com brotos adventícios. As folhas mais jovens, excisadas lateralmente (1-8 mm comprimento) foram mais responsivas que folhas mais velhas. Os brotos enraizaram com alta frequência em meio MS contendo 1 mgL^{-1} de AIA e produziram plantas morfológicamente normais.

Em Singh & Brar (1993) a utilização das auxinas ANA e 2,4-D em combinação com as citocininas BAP e cinetina em meio MS sob luz, produziram diferentes tipos de calos em distintos explantes (folhas jovens, ápice caulinar, segmentos nodais e internodais) de videira cultivares Thompson Seedless e Perlette. Todos os tratamentos com exceção de 2,4-D produziram calos. O meio contendo auxinas produziu calos friáveis de cor branco-creme para verde que se tornaram amarronzados e necrosaram com 4-6 semanas após subcultura. Este resultado está em conformidade com o obtido por Krul & Worley (1977). Já o meio contendo citocininas produziu calos nodulares verdes e calos compactos.

Dentre os trabalhos que obtiveram sucesso na produção de brotos organogênicos, a utilização da citocinina BAP variou em concentração de $4,4 \mu\text{M}$ a $13,2 \mu\text{M}$ isolada ou associada com a auxina ANA ($0,05 \mu\text{M}$ a $0,1 \mu\text{M}$). Para Clog et al. (1990), a concentração de BAP requerida para formação de calos organogênicos depende do tempo de cultivo *in vitro* no qual o explante foi retirado, sendo que quanto menor o tempo de cultivo do explante, menor deverá ser a concentração de BAP utilizada.

A influência do genótipo na organogênese foi relatada por Martinelli et al. (1996). Seguindo o protocolo de Stamp et al. (1990), uma população de explantes homogêneos foi estabelecida através de brotos oriundos de

segmentos nodais. Após 40 dias, folhas jovens foram excisadas na região do pecíolo e inoculadas em $\frac{1}{2}$ MS suplementado com BAP e ANA. Explantes foram incubados no escuro por 10 dias, sendo logo após colocados em penumbra. A eficiência de regeneração foi monitorada pela porcentagem de folhas apresentando regeneração durante um período de 80 dias. Organogênese direta foi principalmente observada na superfície cortada do pecíolo, algumas vezes nas veias centrais. Calogênese precedeu organogênese em *Vitis armata*, *Vitis simpsonii* e *Sultana moscato*. Destas, *V. armata* foi a mais regenerativa (59%), porém “Cabernet Franc”, “Chardonnay” e “Riesling” apresentaram também resultados relevantes (48%, 43% e 28%, respectivamente). De qualquer maneira, “Cabernet Sauvignon” falhou na regeneração.

Alta variabilidade de regeneração adventícia também foi observada por Péros et al. (1998), entre 20 cultivares de *Vitis*, com valores de porcentagem de regeneração de 1,7% a 62,8%, com média de 36,7% e coeficiente de variação de 47%. Os seis melhores genótipos, com média acima de 50% de regenerantes foram: “Carignam”, “Alicante Bouschet”, “Merlot”, “Cabernet Sauvignon”, “Petit Shiraz” e “Grenache”. Não houve correlação entre a porcentagem de regeneração de explantes e a capacidade de micropropagação das variedades medida pelo número de nós. Neste trabalho, explantes foliares *in vitro* foram obtidos através de microestacas inoculadas em meio $\frac{1}{2}$ MS, suplementado com 5 μM de BAP, 2 mgL^{-1} de glicina e sacarose a 20 gL^{-1} , sendo solidificado com agarose a 8 gL^{-1} e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Após 4 a 5 semanas as microestacas desenvolveram brotos pequenos com folhas diminutas. Foram retiradas duas folhas mais desenvolvidas por microestaca, cortadas transversalmente e inoculadas com sua face adaxial em meio NN (Nitsch & Nitsch, 1969) suplementado com 10 μM de benzilaminopurina e 0,1 μM de ácido naftalenoacético. As culturas foram incubadas em condição de escuro durante as primeiras duas semanas e depois levadas para condição de luz. A porcentagem de explantes regenerando órgãos adventícios, como por exemplo folhas, gemas e brotos foram avaliados de 4 a 5 semanas após a inoculação.

Na mesma linha, Baydar (2000) avaliou o efeito de genótipos, fonte de explante (pecíolo e lâmina) e meios de cultura (MS e NN) na formação de brotos adventícios em videira. O explante pecíolo cultivado em meio MS (Murashige &

Skoog, 1962) com 2 mgL^{-1} de BAP obteve 34,7% a 56% de brotos adventícios, enquanto que para lâmina, este índice variou de 18,7% a 22,7%. Já para o meio NN os resultados foram de 16% a 34,7% para pecíolos e 8% a 14% para lâminas. Os genótipos analisados apresentaram diferentes resultados de formação de brotos adventícios, confirmando a influência do clone no resultado final.

O efeito do genótipo sobre a organogênese também foi observado em outras espécies lenhosas (Almeida et al., 2002). Por outro lado, organogênese *in vitro* tem sido obtida tanto em meio MS (Singh & Brar, 1993) , MS/2 (Martinelli et al., 1996; Kwon et al., 2000), como em meio NN (Stamp et al., 1990; Singh & Brar, 1993) e meio LS (Regner & Romann, 1994), existindo uma alta correlação positiva entre meio de cultura e genótipo (Baydar, 2000) .

Recentemente, foram desenvolvidos por Mezzetti et al. (2002) um sistema organogênico eficiente, através do uso de explantes de brotos proliferativos. A técnica consiste na utilização *in vitro* de brotos proliferativos que são cultivados a cada 30 dias em presença crescente de BAP ($4,4 \mu\text{M}$; $8,8 \mu\text{M}$; $13,2 \mu\text{M}$). Nesse caso, a cada transplante é realizada a excisão do ápice caulinar, sendo que, após três meses, verifica-se a produção de massas de tecido meristemático. Seções de tecidos preparados pelo corte de massas meristemáticas, apresentaram alta competência meristemática e regenerativa, sendo que com 4 semanas ocorreu a produção de um grande número de brotos adventícios (em torno de 20 por seção). Após o primeiro ano de cultivo em campo, as plantas apresentaram-se fenotipicamente homogêneas e altamente semelhantes às plantas controle.

Por outro lado, plantas obtidas com diferentes métodos de regeneração apresentaram forte pigmentação por antocianina, reduzido vigor, lobulação foliar e albinismo (Rajasekaran & Mullins, 1979; Rajasekaran & Mullins, 1983; Franks et al., 1998).

DIAGNOSE DE VIROSES EM VIDEIRA

O termo vírus pode ser definido como um grupo de uma ou mais moléculas de ácido nucléico (DNA ou RNA), normalmente encapsulada em uma capa ou

capas de proteína ou lipoproteína, sendo capaz de organizar sua replicação somente na presença de células hospedeiras (Matthews, 1991).

A relação bibliográfica de trabalhos enfocando viroses em videira iniciou-se em 1965 sob a coordenação do International Council for the Study of Viruses and Virus-Like Diseases of the Grapevine (ICVG) (Caudwell, 1965; Caudwell et al., 1972; Hewitt & Bovey, 1979; Bovey & Martelli, 1986; Bovey, 1997).

As viroses que atacam a videira estão amplamente disseminadas pela vitivinicultura mundial (Bovey & Martelli, 1986). No último “meeting” da ICVG realizado em 2003 na Itália, foram relatadas viroses na Argentina (Gracia et al., 2003), Ucrânia (Muljukina et al., 2003), Grécia (Dovas et al., 2003), Irã (Habibi et al., 2003), Itália (Zorloni et al., 2003), Portugal (Santos et al., 2003), Espanha (Padilha et al., 2003), Egito (Ahmed et al., 2003), República Checa (Kominek et al., 2003), França (Vigne et al., 2003), Turquia (Digiario et al., 2003), Alemanha (Ipach et al., 2003), Chile (Engel et al., 2003) e Nova Zelândia (Bonfiglioli et al., 2003).

No Brasil, já foram relatadas os vírus do enrolamento da folha da videira (*Grapevine leafroll virus 1 e 3*); folha em leque ou dos entre-nós curtos da videira (*Grapevine fanleaf virus*); lenho rugoso da videira (*Grapevine rugose wood*), mosaico das nervuras (*Grapevine fleck virus*), entre outras (Kuniyuki, 2003). As viroses acarretam a diminuição da vida útil dos vinhedos e a crescente redução do peso, qualidade e características bioquímicas dos frutos, levando a inviabilidade econômica da produção (Castellano et al., 1983; Kuhn, 1992).

De maneira geral, o diagnóstico da infecção viral em vegetais pode ser realizado por 3 vias: (a) *Métodos Biológicos*, onde a detecção do agente patogênico é realizada através de inoculação mecânica ou enxertia em plantas indicadoras; (b) *Métodos Moleculares*, com a revelação da seqüência de ácidos nucleicos específicos do genoma do agente patogênico e (c) *Métodos Imunológicos*, através da detecção de moléculas imunogênicas sintetizadas pelo vírus (Zambolim, 1999).

Os testes clássicos de indexação biológica utilizam em nível de campo plantas indicadoras sadias sobre as quais é enxertado material a ser testado. Os sintomas podem ser observados num período médio de 18 meses. As indicadoras mais testadas no Brasil e em outros países são as variedades de *Vitis vinifera*

Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Gamay, Mission e Pinot Noir e o híbrido LN-33 (Kuniyuki, 2003).

Segundo Kassemeyer et al. (1997), a otimização do processo de indexação pode ser realizada através de enxertia verde em casa de vegetação, o que propiciou a detecção de *leafroll*, *fleck*, *corky bark*, *vein mosaic* e *vein necrosis* em menos de 2 a 3 meses, comparado com pelo menos duas estações com indexação em nível de campo. Por outro lado, uma detecção segura de *stem pitting* e *stem grooving* em casa de vegetação somente é possível após 8-12 meses.

Os testes moleculares baseiam-se na hibridização de ácidos nucléicos e na reação em cadeia da polimerase (PCR). Na hibridização molecular são utilizadas membranas e sondas com seqüência de nucleotídeos complementares aos agentes procurados, para detecção de DNA (Southern blot) e RNA (Northern blot). Essas sondas podem ser encomendadas comercialmente, obtidas via síntese de cDNA (DNA complementar) ou, ainda, pela marcação de DNA viral obtido pela reação de PCR. Conhecendo-se pelo menos parte da seqüência do agente viral de interesse é possível o diagnóstico via PCR, processo automatizado de amplificação cíclica, em termocicladores, do agente de interesse e, visualização do DNA amplificado através de eletroforese. A IC-PCR (PCR com imunocaptura) utiliza-se da captura de antígenos existentes na amostra, com anticorpos específicos, previamente à PCR (Zambolim, 1999).

Os métodos imunológicos são baseados na reação específica entre um antígeno e um anticorpo. O anticorpo é uma imunoglobulina que animais de sangue quente produzem em resposta à introdução em seu organismo de uma substância estranha (antígeno) que, no caso de vírus, é principalmente a proteína da capa por se tratar da proteína viral mais abundante (Edward, 1996). A marcação enzimática destes anticorpos foi adaptada à detecção dos agentes fitopatogênicos com uma grande sensibilidade, dando origem aos testes de ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, Clark & Adams, 1977). Uma enzima conjugada a um anticorpo (peroxidase ou fosfatase alcalina), reage com um substrato incolor para originar um produto colorido (colorimetria) ou uma emissão de luz (quimioluminescência), permitindo assim evidenciar a presença ou ausência do antígeno.

As diferentes variantes do teste ELISA são baseadas em procedimentos de conjugação direta ou indireta do anticorpo utilizado. No ELISA direto, o antígeno imobilizado é detectado com a ajuda do anticorpo específico marcado. No caso do ELISA indireto, o antígeno reage com um anticorpo específico, não conjugado, o qual será detectado com a ajuda de uma proteína marcada, que pode ser proteína A ou outra obtida em espécie diferente daquela utilizada para obtenção do anticorpo específico. A escolha do protocolo dependerá da disponibilidade dos reagentes e do tipo de pesquisa ou do controle a ser efetuado (Clark & Adams, 1977; Edwards & Cooper, 1985).

Atualmente o teste ELISA é aplicado para 13 patógenos na cultura da videira. Entre os laboratórios que fazem diagnose para vírus, mais de 50% fazem detecção para *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) e *Grapevine leafroll associated virus 1 e 3* (GLRaV-1, -3), sendo também duas vezes mais usado do que métodos baseados em PCR para *GLRaV-6* e *Grapevine Fleck virus* (GFkV) (Nolasco, 2003). Entretanto, a detecção sorológica de vitivirose, em geral, e *leafroll associated virus* em porta-enxertos americanos, é mais trabalhosa devido à baixa concentração viral e a distribuição desuniforme pela planta. Uma otimização do teste ELISA foi desenvolvida por Gugerli (2000) com a utilização de anticorpos monoclonais e a troca do substrato cromático (p-nitrofenil-fosfato) pelo substrato quimioluminescente 1,2 dioxethane (LUMINO-ELISA). Este procedimento aumentou a sensibilidade do teste em 10 vezes. De qualquer maneira, muitos anticorpos policlonais não servem para o LUMINO-ELISA, devido à baixa especificidade-alvo, havendo também a necessidade de se ter um leitor de luminescência, já que a emissão de luz é fraca para detecção do olho humano.

A doença do enrolamento das folhas da videira (*Grapevine leafroll associated virus*) é a principal doença viral e de ampla distribuição em todo mundo. Gugerli et al. (1984) procederam à purificação e caracterização sorológica de virions de filamentos longos do primeiro *leafroll associated virus* (GLRaV-1). Atualmente, foram detectados pelo menos nove entidades virais, sorologicamente distintas, associadas com essa doença de múltiplas faces (GLRaV-1 a -9). O último suposto vírus associado com leafroll é o GLRaV-9, primeiramente caracterizado na Califórnia (Alkowni et al., 2002).

Os GLRaVs foram primeiramente definidos no gênero *Closterovirus* da família *Closteroviridae*, porém, com o acúmulo de informações moleculares, foi

proposto uma nova classificação (Martelli et al., 2002). Assim, *GLRaV- 1 a 5* e *GLRaV-9* passam para o gênero *Ampelovirus*. *GLRaV-2* permanece no gênero *Closterovirus*. *GLRaV-6 a 8* permanecem em discussão.

No final da estação de produção da videira, o sintoma mais característico de *GLRaV* é o enrolamento das bordas da folha para baixo, apresentando-se com coloração amarelada ou avermelhada, dependendo da cultivar, sendo que as nervuras principais permanecem verdes. De um modo geral, a planta apresenta menor desenvolvimento, verificando-se na época da colheita uma redução do teor de açúcar e coloração de cultivares vermelhas e pretas (Kuhn, 1989).

Os danos causados por *GLRaV* variam em função da variedade e isolado viral, verificando-se em variedades severamente atacadas redução de 42% no número de cachos, de 63% na produção e de 65% no vigor, além do decréscimo no teor de açúcares redutores da uva (Kuhn, 1989). Da mesma forma, a produção de frutos de baixa qualidade em híbridos assintomáticos franco americanos foi atribuído a infecção latente por *GLRaV-3* (Kovacs et al., 2001).

Na Itália, clones de Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon e Merlot, infectados com *GLRaV-3*, foram comparados com plantas sadias demonstrando uma considerável perda de produção, devido ao reduzido peso e número de cachos por videira. Os parâmetros qualitativos, controlados através da amostragem de bagas após a maturação mostraram que os teores de sólidos solúveis e antocianina foram sempre menores em vinhas infectadas, enquanto a acidez titulável foi alta, principalmente com relação ao ácido málico (Borgo, 1991; Borgo et al., 2003). Por outro lado, em Portugal, vinhas locais cultivadas em climas mais quentes e infectadas por *GLRaV-3*, apresentaram redução menos acentuada em produtividade (Magalhães et al., 1997).

No Brasil, já foi constatada a ocorrência de *GLRaV-1*, *GLRaV-2*, *GLRaV-3* e *GLRaV-6* (Kuniyuki et al., 2003) associados ao floema de videiras infectadas. Em parreirais do Estado de São Paulo, sua incidência foi de 8,3% para *GLRaV-1*; 25,6% para *GLRaV-2* e 88% para *GLRaV-3* (Kuniyuki et al. 2002). Em quatro estados do Brasil foi detectado *GLRAV-6*, especialmente nas cultivares Cardinal (100%) e Red Globe (40%) (Kuniyuki, 2003). No Rio Grande do Sul, constatou-se que, nas cinco cultivares tintos de vinho mais plantados, próximo de 100% das plantas apresentavam sintomas da virose (Kuhn, 1992).

A disseminação de “leafroll” ocorre principalmente através de plantas infectadas. A presença de vetores em algumas regiões vitícolas, e sua ligação com a transmissão de “leafroll” não está esclarecida (Borgo & Michielini, 2000). De qualquer maneira, vetores principalmente da espécie *Pseudococcus* sp. têm sido reportados como capazes de transmitir alguns GLRaVs (Golino et al., 1995; Petersen & Charles, 1997; Sforza et al., 2003).

A utilização de plantas saudáveis é a medida mais importante para prevenir os danos ocasionados por “leafroll”. Os melhores resultados são obtidos quando seleções sanitárias e genéticas são conduzidas ao mesmo tempo com o objetivo de se propagar somente clones livres de viroses nocivas (Mannini, 2000). A rápida retirada de plantas doentes constitui em importante medida em parreirais onde ocorre a disseminação natural da doença (Pietersen et al., 2003).

Para determinar a distribuição do antígeno viral associado com a doença do enrolamento das folhas (GLRaV) em videiras, durante a estação de crescimento, Teliz (1987) aplicou o teste sorológico ELISA direto. Para isso, utilizou amostras de folhas, flores, frutos, gavinhas, garfos e tecidos radiculares, coletadas com intervalos de 10-15 dias a partir da brotação das gemas. Os botões florais e raízes novas foram os primeiros órgãos a apresentar detecção de antígenos. O autor postula que durante o período de dormência o vírus permanece no floema das estacas e raízes. Porém, quando o crescimento vegetativo é reiniciado este se move para os botões florais e raízes novas. A partir do estágio de pleno florescimento até desenvolvimento de bagas, os antígenos virais são detectados principalmente em folhas basais e intermediárias. Pouco antes do início de amolecimento até a colheita todas as folhas apresentaram detecção positiva para *GLRaV*.

Outra doença de ampla distribuição nas regiões vitícolas é o *Grapevine fanleaf virus (GFLV)*, correspondente à doença conhecida como “court-noué”, “degénérescence infectieuse” ou “panachure” na França, “arricciamento” ou “mosaico giallo” na Itália, “urticado” em Portugal e “reisigkrankheit” na Alemanha (Bovey & Martelli, 1992). *Grapevine fanleaf virus* é membro do grupo *nepovirus*, com partículas isométricas em torno de 30nm de diâmetro e genoma bipartido composto por uma fita simples de RNA de duas espécies funcionais (RNA1 e RNA2 com pesos moleculares de 1,4 e 2,4 x 10⁶), sendo a sua proteína um polipeptídeo com peso molecular de 54.000.

O complexo do vírus é constituído por pelo menos 3 estirpes, que são distinguidas através da sintomatologia: (a) folha em leque ou malformação infecciosa (“infectious malformation”), que pode causar uma malformação foliar semelhante a um leque semi-aberto; (b) mosaico amarelo (yellow mosaic) ocorrendo amarelecimento de folhas, brotos, gavinhas e inflorescências; (c) faixa das nervuras (veinbanding) (Kuniyuki, 2003).

Uma vasta literatura (Walter & Martelli, 1996) confirma os efeitos nocivos do *GFLV* sobre a produtividade com redução de 20% a 90% dependendo da cultivar e das condições ambientais, embora fortes reduções de produtividade tragam benefícios na qualidade dos vinhos (Mannini et al., 1994).

Na Itália a cultivar vinífera Nebbiolo foi testada experimentalmente sob duas condições: infectada por *GFLV*+*GFkV* e sem *GFLV*+*GFkV*. Observaram-se dramáticas diferenças em vigor vegetativo (área foliar, comprimento das brotações, peso da poda) e produtividade (20-50%), em favor de plantas livres de vírus (Mannini, 1994; Mannini et al., 1994).

A produção de bacelos de porta-enxertos foi severamente reduzida devido ao *GFLV* (Credi & Balbini, 1996), como também o crescimento e enraizamento de vinhas propagadas *in vitro* (Barba et al., 1993; Gonzáles et al., 1995). Plantios novos de videiras são rapidamente reinfectedos e degeneram completamente antes da primeira colheita. A desinfecção do solo por fumigação apresenta eficiência limitada e passageira, sendo atualmente abandonada devido ao seu impacto negativo sobre o meio ambiente. Paralelamente, ainda não é uma realidade a utilização de porta-enxertos interespecíficos com resistência para *GFLV* (Pfeiffer et al., 2003).

Grapevine fanleaf virus tem sido observado no Brasil desde 1970, em alguns vinhedos do Estado de São Paulo, afetando o porta-enxerto Traviú (*V. riparia* x *V. rupestris* x *V. cordifolia*), com uma incidência de 4,5% (Kuniyuki et al., 1994). Do mesmo modo, a ocorrência de *GFLV* na região Vitícola do Rio Grande do Sul aparentemente é baixa, sendo que os prejuízos variam com a intensidade da infecção, raça do vírus e cultivar afetada. Nos ramos é comum a presença de entre-nós curtos; nós duplos e bifurcação (Kuhn, 1992). Os sintomas aparecem na primavera, persistem durante a estação de crescimento, mas freqüentemente desaparecem no verão (Martelli, 1993).

ELISA é o teste mais rotineiramente utilizado para detectar GFLV, devido principalmente à sua capacidade de processar grande número de amostras, rapidez dos resultados e baixo custo. Por outro lado, a sensibilidade desta técnica não é sempre satisfatória, devido à distribuição desuniforme do vírus em tecidos hospedeiros e a variação sazonal de sua concentração (Bovey et al., 1980; Nolasco, 2003).

Para Bouyahia et al. (2003), a metodologia de amostragem constitui o maior fator limitante na sensibilidade do ELISA para detecção do *GFLV* e em menor importância os reagentes (ELISA kits, tampões de extração) e técnicas de extração. Este autor sugere que, para otimizar o teste ELISA, devem ser considerados os seguintes fatores no preparo das amostras: (a) a existência de distribuição desuniforme de GFLV entre diferentes partes da videira; (b) presença de gradiente viral em brotações herbáceas, com significativo aumento das folhas basais para as apicais; (c) em estacas lenhosas o vírus é mais concentrado em internódios basais do que apicais; (d) maior concentração viral próximo às margens das folhas do que pecíolos; (e) A concentração viral nas folhas varia com a estação do ano, sendo que o melhor período de amostragem de folhas, é provavelmente dois meses após o início das brotações; (f) folhas sintomáticas apresentam maior concentração viral e o uso de várias folhas da mesma planta, ao invés de apenas uma, reduz consideravelmente o risco de obter uma reação falsa negativa.

Por outro lado, a cultura *in vitro* de meristemas ou ápices caulinares, combinada com termoterapia, é uma importante ferramenta para redução de *fanleaf degeneration* em novos parreirais. Videiras livres do vírus, quando plantadas em solos livres de nematóides ou em solos com populações de vetores não virulíferos, permanecem saudáveis para a vida produtiva do vinhedo, homogêneas em morfologia e produtividade (Pearson & Goheen, 1994).

Desde seu primeiro relato, há 40 anos atrás, o lenho rugoso da videira (*Grapevine rugose wood*) tem representado uma das mais desafiadoras doenças infecciosas em videira. Segundo Minafra et al. (2000), ocorrem alterações no lenho (caneluras, acanaladuras, intumescências) que variam em intensidade de acordo com a combinação copa e porta-enxerto. Os sintomas da doença podem aparecer tanto em porta-enxertos e copas de pé franco ou combinados (Martelli, 1993; Martelli et al., 1994). A produtividade, enraizamento e brotação são

reduzidos, ocorrendo o declínio e morte em poucos anos após o plantio (Martelli, 1993).

De qualquer maneira, os danos não são sempre evidentes em videiras cultivadas em climas frios, sendo às vezes até negligenciáveis (Reynolds et al., 1997; Mannini et al., 1994). De outro lado, a presença de *rugose stem pitting* em videiras da cultivar Refozk, na Eslovênia, determinaram redução de produção e morte de videiras após 8 anos do plantio (Tomazic et al., 2003).

O lenho rugoso da videira (*Grapevine rugose wood*) é o nome dado a um complexo de pelo menos quatro doenças caracterizados por anomalias no lenho, que podem ser distinguidas através de respostas diferenciais nos indicadores *Vitis rupestris*, LN 33 e Kober 5BB (Garau et al., 1987). Estas doenças são:

(a) Cascudo ou lenho estriado (*Rupestris stem pitting*), que apresenta sintomas característicos nas cultivares Itália, Rubi e Benitaka. A casca do tronco torna-se espessa, quebradiça e fendilhada, não se destacando facilmente do lenho. No lenho ocorre estrias ou caneluras (“pittings”), que são depressões rasas e alongadas (Kuniyuki, 2003).

(b) Fendilhamento cortical (Corky bark). Ocorre intumescimento e rachadura de brotos novos, acompanhado pelo frágil desenvolvimento da parte aérea e pequenas caneluras no lenho, podendo apresentar amarelecimento e avermelhamento em folhas (Kuniyuki, 2003).

(c) Acanaladura do lenho de Kober (*Kober stem grooving*). Plantas infectadas de Niagara Rosada são menores do que as sadias e tem produção reduzida. O *Grapevine virus A* (GVA) está associado com a “acanaladura do lenho de Kober” (*Kober stem grooving*) (Chevalier et al., 1995; Digiario et al., 1994; Garau et al., 1994). O vírus é do gênero Vitivírus (Garau et al., 1994; Regenmortel et al., 2000) e possui partículas alongadas e flexuosas medindo 725-825 x 12 nm e genoma de RNA fita simples e senso positivo com aproximadamente 7.400 nucleotídeos. Ocorre transmissão por forma mecânica (hospedeiros herbáceos), enxertia e de forma semi-persistente por várias espécies de cochonilhas da família *Pseudococcidae* (Rosciglione et al., 1983; La Notte et al., 1997; Regenmortel et al., 2000). No Brasil, o GVA foi caracterizado biologicamente por transmissão mecânica e sorologia para cinco hospedeiras herbáceas e por enxertia na cultivar indicadora Kober 5BB (Fajardo et al., 2003). O GVA ocasiona diminuição do vigor da planta e atraso na brotação das gemas.

(d) Acanaladura do lenho de LN-33 (*LN stem grooving*), caracterizado por acanaladuras no tronco de plantas de LN-33.

Segundo Kuniyuki (2003), no Brasil, ocorrem somente as três primeiras doenças associadas ao lenho rugoso da videira.

A eliminação do lenho rugoso da videira (*Grapevine rugose wood*) pode ser obtida através de cultura de meristemas *in vitro* após termoterapia longa (Engelbrecht & Human, 1987), cultura de ápices caulinares fragmentados (Barlass, 1987); microenxertia *in vitro* (Benin & Grenan, 1984) e cultura de embriões somáticos (Goussard et al., 1990).

A mancha ou mosaico das nervuras (*Grapevine fleck disease*) apresenta uma distribuição em diversos países, ocorrendo no Brasil em parreirais dos Estados de GO, MG, SC, PR, SP, RS, e na região do Submédio do Vale do São Francisco (PE e BA). Em São Paulo a incidência da doença foi em média de 58% em variedades copa e de 18,1% em variedades porta-enxerto (Kuniyuki & Costa, 1994). No Rio Grande do Sul, a incidência da mancha das nervuras foi de 19,8% e 6,9%, respectivamente, em variedades produtoras e porta-enxertos (Kuhn, 1992). O sintoma típico da doença é o aparecimento de manchas cloróticas, translúcidas, alongadas e irregulares, em folhas, acompanhando as nervuras, sendo sua detecção possível também através de métodos sorológicos (Faggioli et al., 1993).

Uma ampla aplicação dos testes diagnósticos (ELISA, PCR, inoculação em plantas indicadoras herbáceas ou lenhosas) aliados a um programa de certificação de videiras são necessários para reduzir ou eliminar os efeitos negativos das doenças virais em videira (Johnson, 2003).

Embora em pequena quantidade, os dados sobre otimização de performance de genótipos, devido à eliminação viral, estão adquirindo consistência especialmente a partir da última década, quando vários experimentos em diferentes condições ambientais e diferentes variedades trouxeram mais informações sobre a matéria. Os estudos estão levando mais em consideração o agente viral específico e não somente os sintomas, otimizando a compreensão do complexo vírus-videira. Até o momento, avaliações de campo e no pós-colheita têm confirmado a superioridade de plantas livres de vírus em relação às plantas infectadas. A alta performance consiste principalmente num aumento de vigor vegetativo e produtividade, aliado a uma melhor qualidade dos

frutos no amadurecimento, com maiores concentrações de açúcares, antocianinas (coloração mais acentuada) e terpenos (Mannini, 2003).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL 2004. São Paulo: FNP, p. 488-496, 2003.

AHMED, H. M. H.; DIGIARO, M.; MARTELLI, G. P. A preliminary survey for grapevine viruses in Egypt. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts...** Locorotondo: University of Bari, 2003. p. 178-179.

ALMEIDA, W. A. B. de et al. Otimização do processo de organogênese *in vitro* e regeneração de plantas em *Citrus sinensis* e *C. limonia*. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 59, n. 1, p. 35-40, jan./mar. 2002.

ALLEWELDT, G.; SPIGEL-ROY, P.; REISCH, B. Grapes (*Vitis*). In: MOORE, J. N.; BALLINGTON JUNIOR, J. R. (Ed.). Genetic resources of temperate fruit and nut crops. **Acta Horticulturae**, Wageningen, p. 291-327, 1990.

ALKOWNI, R.; ROWHANI, A.; GOLINO, D. A. Partial nucleotide sequence and molecular detection of a new putative grapevine leafroll associated virus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 6, 2002. Suplemento.

Anuário Brasileiro da Fruticultura 2004. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2004. p. 32-39.

ARELLO, E. F.; PASQUAL, M.; PINTO, J. E. B. P. Influência do ANA e BAP sobre multiplicação de brotos de macieira (*Malus domestica* Borkh) cv. Melrose *in vitro*. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 13, n. 3, p. 306-313, 1989.

BARBA, M.; CUPIDI, A.; CASORRI, L. Influence of virus and virus-like diseases of grapevine in shoot cultures. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 11., 1993, Montreux. **Extended Abstracts...** Montreux, 1993. p. 43-44.

BARLASS, M. Elimination of stem pitting and corky bark diseases from grapevine by fragmented shoot apex culture. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v. 110, p. 653-656, 1987.

BAYDAR, N. G. Study of adventitious shoot formation in leaves of grape (*Vitis* spp.). **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v. 24, n. 3, p. 645-656, 2000.

BENIN, M.; GREANAN, S. Le microgreffage: nouvelle technique d'élimination des virus de la vigne. **Progrès Agricole et Viticole**, Montpellier, v. 101, p. 33-36, 1984.

BONFIGLIOLI, R. et al. Introduction of a private certification scheme an unregulated national industry: The New Zealand experience. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts...** Locorotondo: University of Bari, 2003. p. 152.

BORGIO, M. Influenza della virosi dell'accartocciamento fogliare della vite su alcuni parametri della produzione. **Rivista di Viticoltura e di Enologia**, Conegliano -Treviso, n. 2, p. 21-30, 1991.

BORGIO, M.; MICHIELINI, C. Natural spread of grapevine leafroll on varieties and biotypes of *Vitis vinifera*. **Rivista di Viticoltura e di Enologia**, Conegliano-Treviso, n. 4, p. 3-13, 2000.

BORGIO, M.; ANGELINI, E.; FLAMINI, R. Effetti del virus GLRaV-3 dell'accartocciamento fogliare sulle produzioni di tre vitigni. **L'Enologo**, v. 39, n. 3, p. 99-110, 2003.

BOUQUET, A. Intérêt des techniques de culture *in vitro* pour l'amélioration génétique de la vigne. **Bulletin de l'OIV**, Paris, v. 62, n. 697/698, p. 179-192, mars/avril, 1989.

BOUYAHIA, H.; POTERE, O.; BOSCIA, D. Sampling methodology for the detection of *Grapevine Fanleaf virus* by ELISA. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts...** Locorotondo: University of Bari, 2003. p. 204-205.

BOVEY, R.; BRUGGER, J. J.; GUGERLI, P. Detection of fanleaf virus in grapevine tissue extracts by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immune electron microscopy (IEM). In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 7., 1980, Niagara Falls (Canada Agriculture, Research branch). **Proceedings...** Niagara Falls, p. 259-275.

BOVEY, R.; MARTELLI, G. P. The viruses and virus-like diseases of the grapevine. **Vitis**, Geneva, NY, v. 25, p. 227-275, 1986.

BOVEY, R.; MARTELLI, G. P. **Directory of major virus and virus-like diseases of grapevine. Description, historical review and bibliography.** Tunis, Mediterranean Fruit Crop Improvement Council/Intern. Council for the Study of Viruses and Virus diseases of the Grapevine, 1992.111 p.

BOVEY, R. Bibliography on grapevine virus and virus-like disease 1985-1997. Disponível em: < <http://www.icvg.ch>>. Acesso em: 20 ago. 2004.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. E.; BUSSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPQ, v. 1, p. 87-132, 1999.

CAMARGO, U. A.; MASHIMA, C. H.; CZERMAINSKI, A. B. C. **Avaliação de cultivares de uvas apirênicas no Vale do São Francisco**. Bento Gonçalves: Embrapa-CNPUV, 1997. 8 p. (Embrapa-CNPUV. Comunicado Técnico, 26).

CASTELLANO, M. A.; MARTELLI, G. P.; SAVINO, V. Virus-like particles and ultrastructural modifications in the phloem of leafroll-affected grapevines. **Vitis**, Geneva, NY, v. 22, p. 23-39, 1983.

CAUDWELL, A. **Bibliographie des virus de la vigne des origins à 1965**. Paris: Office International de la Vigne et du Vin, 1965. 76p. References 1-1019.

CAUDWELL, A.; HEWITT, W. B.; BOVEY, R. Les virus de la vigne. Bibliographie de 1965-1970. **Vitis**, Geneva, NY, v. 11, p. 303-324, 1972. References 1387-2163.

CHEVALIER, S. et al. Use of an immunocapture-polymerase chain reaction procedure for the detection of grapevine virus A in Kober stem grooving-infected grapevines. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 143, p. 369-373, 1995.

CHRISTIANSON, M. L. An embryogenic culture of soyabean: towards a general theory of somatic embryogenesis. In: HENKE, R. R.; HUGHES, K. W.; CONSTANTIN, M. J.; HOLLAENDER, A. (Ed.). **Tissue culture in forestry and agriculture**. New York: Plenum, 1985. p. 83-103.

CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal General Virology**, Reading, v. 34, p. 475-483, 1977.

CREDI, R.; BALBINI, A. R. Effects of virus and virus-like infections on the growth of grapevines rootstocks. **Advanced Horticultural Science**, Florence, v. 10, p. 95-98, 1996.

CLOG, E.; BASS, P.; WALTER, B. Plant regeneration by organogenesis in *Vitis* rootstock species. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 8, n. 12, p. 726-728, 1990.

DIGIARO, M. et al. On the correlation between grapevine virus A and rugose wood. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 33, p. 187-193, 1994.

DIGIARO, M. et al. Two hitherto undescribed nepoviruses from Turkish Grapevines. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts...** Locorotondo: University of Bari, 2003. p. 14-15.

DOVAS, C. I. et al. Sanitary status of self rooted and grafted Debina and Vlachiko wine grape varieties in Epirus Greece. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts...** Locorotondo: University of Bari, 2003. p. 156.

DUNSTAN, D. I.; TURNER, K. E.; LAZAROFF, W. R. Propagation *in vitro* of apple rootstock M.4: Effect of phytohormones on shoot quality. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 4, p. 55-60, 1985.

EDWARD, H. L.; COOPER, J. Plant virus detection using a new form of indirect ELISA. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 11, p. 309-319, 1985.

EDWARD, R. **Immunoassays essential data**. London: NETRIA, St Bartholomew ' Hospital, 1996. 141 p.

ENGEL, E. et al. Isolation, sequencing and expression of Chilean isolates of grapevine fanleaf virus. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts...** Locorotondo: University of Bari, 2003. p. 24.

ENGELBRECHT, D. J.; HUMAN, R. Absence of grapevine virus A correlated with elimination of leafroll disease. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL

FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 9., 1987, Kiryat Anavim. **Proceedings...** Kiryat Anavim, 1987. p. 159-163.

FAGGIOLI, F.; DEL SERRONE, P.; BARBA, M. Presence de Grapevine Fleck virus in Latium and its rapid serological detection. **Rivista di Viticoltura e di Enologia**, Conegliano, v. 46, n. 2, p. 55-59, 1993.

FAJARDO, T. V. M. et al. Detecção de um isolado de *Grapevine virus A* e caracterização do gene da proteína capsidial. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, n. 5, p. 521-527, set./out., 2003.

FALLOT, J. Cultures aseptiques de tiges de vigne prélevées juste avant et pendant le repos hivernal. **Bulletin de la Societe d' Histoire Naturelle de Toulouse**, v. 90, p. 173-181, 1954.

FAO. FAOSTAT- Statistics database. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 20 jun. 2004.

FAVRE, J. M. Premiers résultats concernant l'obtention *in vitro* de néoformations caulinares chez la vigne. **Annuaire Amelioration Plantes**, Paris, v. 27, p. 151-169, 1977.

FRANKS, T.; GANG, H. E. D.; THOMAS, M. R. Regeneration of transgenic shape *Vitis vinifera* L. Sultana plants: genotypic and phenotypic analysis. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 4, p. 321-333, 1998.

GALZY, R. Remarques sur la croissance de *Vitis rupestris* cultivée *in vitro* sur différents milieux nutritifs. **Vitis**, Geneva, v. 8, p. 191-205, 1969.

GARAU, R.; PROTA, U.; CUGUSI, M. Research on wood disorders (stem pitting and/or stem grooving) of grapevine in Sardinia. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE

DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 9., 1987, Kiryat Anavim. **Proceedings...** Kiryat Anavim, 1987. p. 135-141.

GARAU, R. et al. On the possible relationship and Kober stem grooving and grapevine virus A. **Vitis**, Geneva, NY, v. 33, p. 161-163, 1994.

GOLINO, D. A.; SIM, S. T.; ROWHANI, A. Transmission studies of grapevine leafroll associated virus and grapevine corky bark associated virus by the obscure mealybug. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 46, p. 408, 1995.

GONZALES, E.; DIAZ, M.; MOSQUERA, M. V. Effects of various types of virus on *Vitis vinifera* L. cv. Albariño cultivated *in vitro*. **Vitis**, Geneva, NY, v. 34, p. 243-244, 1995.

GOUSSARD, P. G. et al. The elimination of leafroll associated viruses from grapevines using *in vitro* somatic embryogenesis. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 10., 1990, Volos. **Proceedings...** Volos, 1990. p. 334-352.

GRACIA, O. et al. Present status of grapevine sanitary selection in Argentina. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts...** Locorotondo: University of Bari, 2003, p.154.

GUGERLI, P. Detection of grapevine leafroll associated viruses by chemiluminometric enzyme-linked immunosorbent assay (LUMINO-ELISA). In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 13., 2000, Adelaide. **Extended Abstracts...** Adelaide: University of Adelaide, 2000.

GUGERLI, P.; BRUGGER, J.; BOVEY, R. Lénroulment de la vigne: mise en évidence des particules virales et développement d'une méthode immuno-

enzymatique pour le diagnostic rapide. **Revue Suisse de Viticulture di Arboriculture et di Horticulture**, Lausanne, Suíça, v. 16, p. 299-304, 1984.

HABILI, N.; AFSHARIFAR, A.; SYMONS, R. H.; First detection of an Ampelovirus, A. Maculavirus and two vitiviruses in Iranian table grapes. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts...** Locorotondo: University of Bari, 2003, p. 162-163.

HEWITT, W. B.; BOVEY, R. The viruses and virus-like diseases of the grapevine. A bibliographic report 1971-1978. **Vitis**, Geneva, NY, v. 18, p. 316-376, 1979, References 1387-2163.

IPACH, U.; KLING, L.; LESEMANN, D. First record of cherry leafroll virus on grapevine in Germany. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts...** Locorotondo: University of Bari, 2003, p.17-18.

JOHNSON, R. C.; Virus testing and the Canadian plant protection export certification program for grapevine nursery stock (PPECP). In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts...** Locorotondo: University of Bari, 2003, p. 171-172.

KASSEMAYER, H. H.; GREANAN, S.; GREIF, C. Use of green grafting for the biological indexing of grapevine virus and virus-like diseases. In: WALTER, B. (Ed.). **Sanitary selection of the grapevine**. Protocols for detection of viruses and virus-like diseases. Paris: INRA, 1997, p. 97-117. (Les Colloques, 86).

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. E.; BUSSO, J. A.(Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPH, v. 2, p. 519-531, 1999.

KIKKERT, J. R. et al. Transgenic plantlets of Chancellor grapevine (*Vitis* sp.) from biobalistic transformation of embryogenic cell suspensions. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 15, p. 311-316, 1996.

KOMÍNEK, P. et al. Occurrence of grapevine viruses in the Czech Republic. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts...** Locorotondo: University of Bari, 2003, p.182.

KOVACS, L. G. et al. Latent infection by leafroll agent GLRaV-3 is link to lower fruit quality in French American hybrid grapevines Vidal blanc and St. Vincent. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 52, p. 254-259, 2001.

KRUL, W. R.; MOWBRAY, G. H. Grapes. In: SHARP, W. R.; EVANS, D. A.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed). **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, 1984. Cap. 6, p. 396-434.

KRUL, W. R.; WORLEY, J. F. Formation of adventitious embryos in callus cultures of 'Seyval', a French hybrid grape. **Journal American Society Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 102, p. 360-363, 1977.

KUHN, G. B. Identificação, incidência e controle do vírus do enrolamento da folha da videira no estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.14, n. 3/4, p. 220-226, 1989.

KUHN, G. B. **Principais vírus e doenças consideradas de origem viral que ocorrem nos vinhedos do Rio Grande do Sul**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa-CNPUV, 1992, 28 p. (Embrapa-CNPUV. Circular Técnica,16).

KUNIYUKI, H. et al. Mosaico da videira traviú, uma doença causada pelo vírus da folha em leque em São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 19, n. 2, p. 224-230, 1994.

KUNIYUKI, H.; COSTA, A. S. Mosaico das nervuras uma virose da videira em São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 20, p. 152-157, 1994.

KUNIYUKI, H. et al. Incidência de *Grapevine leafroll-associated viruses 1,2 e 3* em vinhedos do estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 28, n. 4, p. 311-314, 2002.

KUNIYUKI, H.; GASPAR, J. O.; REZENDE, A. M. Ocorrência do Grapevine leafroll-associated virus 6 em vinhedos do Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 29, n. 3, p. 288-289, 2003.

KUNIYUKI, H. Doenças e pragas: víruses. In: Pommer, C. V. **Uva, tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003, Cap. 9, p. 596-616.

KWON, Y. J.; LEE, C. H.; HYUNG, N. I. Effects of medium composition and culture condition on plant regeneration via organogenesis of "Kyoho" grape. **Journal of the Korean Society for Horticultural Science Korea**, v. 41, n. 3, p. 276-280, 2000.

LA NOTTE, P.; MINAFRA, P.; SALDARELLI, P. A spot-PCR technique for the detection of phloem-limited grapevine viruses. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 66, p. 103-108, 1997.

LEÃO, P. C. de S.; POSSÍDIO, E. L. de. Histórico da videira. In: LEÃO, P. C. S.; SOARES, J.M. **A Viticultura no Semi-Árido Brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2000, p. 13-17.

MAGALHÃNES, N. et al. Evolution of leafroll (GLRaV-3) effect on grapevine yield and potential ethanol. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 12., 1997, Lisbon. **Extended Abstracts**... Lisbon, 1997, p. 175-176.

MANNINI, F.; Nuovi orientamenti nella selezione clonale e sanitaria. **Vignevini**, Bologna, v. 12, p. 71-76, 1994.

MANNINI, F.; CREDI, R.; ARGAMANTE, N. Changes in field performances of clones of the grapevines cv. Nebbiolo after virus elimination by heat-therapy. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON GRAPE BREEDING, 6th, 1994, Yalta. Proceedings... Yalta: OIV, 1994. p. 117-119.

MANNINI, F. Clonal selection in grapevine: interactions between genetic and sanitary strategies to improve propagation material. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 528, p. 703-712, 2000.

MANNINI, F. Virus elimination in grapevine and crop performance. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts**... Locorotondo: University of Bari, 2003, p. 234-239.

MARTELLI, G. P. Rugose wood complex. In: Martelli, G. P. (Ed.). Graft-transmissible Diseases of Grapevines. **Handbook for detection and diagnosis**, Rome: FAO, 1993. p. 45-53. (Publication Division).

MARTELLI, G. P. et al. Occurrence of filamentous viruses and rugose wood of grapevine in Yemen. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 33, p. 146-151, 1994.

MARTELLI, G. P. et al. *Maculavirus*, a new genus of plant viruses. **Archives of Virology**, New York, v. 147, p. 1847-1853, 2002.

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

MATTHEWS, R. E. F. **Plant virology**. 3rd ed. London: Academic Press, 1991. 815 p.

MEREDITH, C. P. GENERAL ASSEMBLY OF THE OIV, 76th, 1996. Cape Town, Republic of South Africa. Proceedings... Cape Town: OIV, 1996.

MEZZETTI, B. et al. Genetic transformation of *Vitis vinifera* via organogenesis. **BMC Biotechnology**, local, v. 2, n. 18, 2002. Disponível em <<http://www.biomedcentral.com>>. Acesso em 02 jun. 2004.

MINAFRA, A. et al. Serological detection of grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV) by polyclonal antiserum to recombinant virus coat protein. **Vitis**, Geneva, NY, v. 39, n. 3, p.115-118, 2000.

MORALES, C. F. G. et al. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira cv. Gala RW1. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 5, n. 3, p. 174-177, set./dez., 1999.

MULJUKINA, N.; TULAEVA, M.; CHISNIKOV, V. Sanitary selection and diagnostics of grapevine virus diseases in Ukraine. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts**. Locorotondo: University of Bari, 2003, p. 155.

MULLINS, M.G. Applications of tissue culture to the genetic improvement of grapevines. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON GRAPE BREEDING, 5th, 1989, St. Martin. Proceedings... St. Martin/Pfalz, FR of Germany. **Vitis**, Geneva, NY, p. 399-407, 1990. Special issue.

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

NEHRA, N. S.; STUSHNOFF, C.; KARTHA, K. K. Direct shoot regeneration from strawberry leaf discs. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 114, p.1014-1018, 1989 .

NITSCH, J. P.; NITSCH, C. Haploid plants from pollen grains. **Science**, Washington, v. 163, p. 85-87, 1969.

NOLASCO, G. Diagnosis: recent development and routine implementation. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts...** Locorotondo: University of Bari, 2003, p.184-187.

PADILHA, V. et al. Grapevine insidious viruses in Spanish Viticulture. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts...** Locorotondo: University of Bari, 2003, p.173.

PEARSON, R. C.; GOHEEN, A. C. (Ed.). **Compendium of grapes diseases**, St. Paul. APS PRESS. American Fitopathology Society, 1994, 93 p.

PELET, F. A. et al. Growth *in vitro* of tissues isolated from normal stems and insect gall. **American Journal of Botany**, Ottawa, v. 47, p. 186-195, 1959.

PÉROS, J. P.; TORREGROSA, L.; BERGER, G. Variability among *Vitis vinifera* cultivars in micropropagation, organogenesis and antibiotic sensitivity. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, n. 319, p.171-179, 1998.

PETERSEN, C. L.; CHARLES, J. G. Transmission of grapevine leafroll-associated closteroviruses by *Pseudococcus longispinus* and *Pseudococcus calceolariae*. **Plant Pathology**, Osney Mead, Oxford, v. 46, p. 509-515, 1997.

PFEIFFER, P. et al. Shedding new light on grapevine fanleaf virus replication. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts...** Locorotondo: University of Bari, 2003, p.11.

PIETERSEN, G. et al. Effect of rouging on natural spread of grapevine leafroll disease in two vineyards in South Africa. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 8th, 2003, Christchurch. **Abstracts...**Christchurch: University of Stellenbosch, 2003, p. 301.

RAJASEKARAN. K.; MULLINS, M. G. Embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 30, p. 399-407, 1979.

RAJASEKARAN, K.; MULLINS, M. G. The origin of embryos and plantlets from cultured anther of hybrid grapevines. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 34, p. 108-113, 1983.

RAJASEKARAN, K.; MULLINS, M. G. Organogenesis in internode explants of grapevines. **Vitis**, Geneva, NY, v. 20, p. 218-227, 1981.

RAMALHO, M.; SANTOS, J. B. P. **Genética na agropecuária**. São Paulo: Globo, 1990. 359 p.

REGENMORTEL, M. H. V. et al. (Ed.). **Virus taxonomy - classification and nomenclature of viruses. Genus *Vitivirus***. San Diego: Academic Press, 2000, p. 960-964.

REGNER, F.; ROMANN, H. **Regeneration of grapevine**. F-75008 Paris, France: Office International de la Vigne et du Vin, 1994, p. 49-54.

REISCH, B. I.; MARTENS, M. H.; CHENG, Z. M. High frequency shoot regeneration from grape leaves, petioles and tendrils. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM GRAPE BREEDING, 5th, 1989, St. Martin. **Proceedings...**St. Martin: Pfalz, F.R. Germany, 1989,

REYNOLDS, A.; LANTERMAN, W. S.; WARDLE, D. A. Yield and berry composition of five vitis cultivars as affected by rupestris stem pitting virus. **American Journal Enology Viticulture**, Davis, v. 48, n. 4, p. 449-458, 1997.

ROSCIGLIONE, B.; CASTELLANO, M. A.; MARTELLI, G. P.; SAVINO, V.; CANNIZZARO, G. Mealybug transmission of *Grapevine virus A*. **Vitis**, Geneva, NY, v. 22, p. 331-347, 1983.

ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A.; KATSIRDAKIS, K. C. *In vitro* micromultiplication of grapevine: Effect of age, genotype and culture conditions on induction of callus in *Vitis* spp. leaf segments. In: RODRIGUEZ, R.; THAMES, R.; DURAZ, D. J. (Ed.): **Plant Aging: Basic and Applied Approaches**, BOOK, 1990, p. 89-95.

SANTOS, C. et al. Survey of filamentous viruses in Portuguese vineyards. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts**. Locorotondo: University of Bari, 2003, p.167-168.

SEGURA, J. Morfogénesis *in vitro*. In: BIETO, J.A.; TALON, M. (Ed.). **Fisiología y bioquímica vegetal**, Madrid: Ed. Interamericana, 1993. 625 p.

SFORZA, R.; KOMAR, V.; GREIF, C.; New scale insect vectors of grapevine closteroviruses. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 14., 2003, Locorotondo...**Extended Abstracts**. Locorotondo: University of Bari, 2003, p.14.

SILVA, P. C. G.; CORREIA, R. C. Caracterização social e econômica da videira. In: LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M. **A Viticultura no Semi-Árido Brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2000. Cap. 2, p. 19-32.

SINGH, Z.; BRAR, S. J. S. *In vitro* plant regeneration in seedless grapes. **Vitis**, Geneva, NY, v. 32, p. 229-232, 1993.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium Society Experimental Biology**, v. 11, p. 118-131, 1957.

STAMP J. A.; COLBY S. M.; MEREDITH, C. P. Improved shoot organogenesis from leaves of grape. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 115, p. 1038-1042, 1990.

TANG, F. A.; MULLINS, M. G. Adventitious bud formation in leaf explants of some grapevine rootstock and scion cultivars. **Vitis**, Geneva, NY, v. 29, p. 151-158, 1990.

TELIZ, D. Field serological detection of viral antigens associated with grapevine leafroll disease. **Plant Disease**, St. Paul, v. 71, n. 8, p. 704-709, 1987.

TERRA, M. M.; PIRES, E. J. P.; NOGUEIRA, N. A. M. **Tecnologia para produção de uva Itália na região noroeste do Estado de São Paulo**. Campinas, Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, 1993. 51p. (CATI, Documento Técnico, 97).

TOMAZIC, I.; KOROZEC-KORUZA, Z.; KORUZA, B. GLRaV-1 and stem pitting- two factors affecting the yield of grapevine cv. Refosk. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts...** Locorotondo: University of Bari, 2003, p.160-161.

TORREGROSA, L.; BOUQUET, A. Adventitious bud formation and shoot development from *in vitro* leaves of *Vitis x Muscadinia* hybrids. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 45, p. 245-252, 1996.

VIGNE, E. et al. Structure of a population of grapevine fanleaf virus isolates from a Chardonnay vineyard in the Champagne region in France: evidence for mixed infection and recombination. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE

GRAPEVINE-ICVG, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts...** Locorotondo: University of Bari, 2003, p.13.

WALTER, B.; MARTELLI, G. P. Selection clonal de la vigne: sélection sanitaire et sélection pomologique. Influences des viroses et qualité. **Bulletin de l'O.I.V.**, Paris, v. 70, p. 5-23, 1996.

WILLIAMS, E. S.; MAHESWARAN, B. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, Londres, v. 57, p. 443-462, 1986.

ZAMBOLIM, E. M. Métodos de diagnose em vírus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 24, p. 236-237, 1999. (Suplemento).

ZORLONI, A. et al. Latent infections by different viruses recently detected in grapevine during sanitary selection in Lombardia (Northern Italy). In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts...** Locorotondo: University of Bari, 2003, p.165-166.

CAPÍTULO 1

ORGANOGENESE *IN VITRO* EM VIDEIRAS CULTIVADAS NO VALE DO RIO SÃO FRANCISCO¹

¹Artigo submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira

ORGANOGÊNESE *IN VITRO* EM VIDEIRAS CULTIVADAS NO VALE DO RIO SÃO FRANCISCO

Resumo – A produção de uvas de mesa e de vinho destaca-se entre as principais atividades do agronegócio irrigado do Vale do São Francisco. Os programas de melhoramento são fundamentais para a sustentabilidade da atividade. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de organogênese *in vitro*, em sete cultivares de videiras implantadas no Vale do Rio São Francisco. Explantes foliares contendo pecíolo, de plantas cultivadas *in vitro*, foram inoculados em meio NN suplementado com 10 µM, 12,5 µM e 15,0 µM de BAP, todos associados a 0,1 µM ANA e um controle sem reguladores vegetais. Os explantes permaneceram no escuro por 15 dias, e em seguida, foram mantidos em condição de fotoperíodo de 16 horas de luz por 60 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial, composto por sete genótipos, quatro tratamentos e quatro repetições. Os parâmetros avaliados aos 75 dias da inoculação foram: porcentagem de explantes regenerativos (PER) e índice de regenerantes por explante (IR/E), sendo o último estabelecido através de notas: (0) ausência; (1) 1 a 3; (2) 4 a 7 e (3) acima de 7 regenerantes. A porcentagem de explantes regenerativos variou de 0%, na cultivar Benitaka, até 50% na cultivar Thompson Seedless. Os explantes inoculados no controle, para todas as cultivares, não responderam a indução para organogênese. As cultivares com taxas acima de 7 regenerantes por explante foram: Petit Shiraz (15,0 µM BAP + 0,1 µM ANA) e Red Globe (10,0 µM BAP + 0,1 µM ANA).

Termos para indexação: *Vitis*, organogênese, reguladores de crescimento, cultura de tecidos.

IN VITRO ORGANOGENESIS IN GRAPEVINES CULTIVATED ON THE SÃO FRANCISCO RIVER VALLEY

Abstract - The viticulture is an important economical activity in the irrigated agriculture of the São Francisco river Valley. The breedings programs are basic for the sustentability of the activity. The objective of this research was to establish a protocol of *in vitro* organogenesis in seven grapevine cultivars on the San Francisco river Valley. Leaves explants with petiole, originated *in vitro*, were inoculated in NN culture medium, supplemented with: 10 μM , 12,5 μM e 15,0 μM de BAP associated with 0,1 μM ANA and a control without growth regulators. The explants were cultured in the dark for 15 days followed by 16 h photoperiod for 60 days. The experimental was completely randomized in a factorial design, with seven genotypes, four replicates and four treatments. The parameters evaluated 75 days after the inoculation were: percent of explant regeneration (PER) and the rate of regenerants per explant (IR/E), through a rating system: (0) absence, (1) 1 – 3, (2) 4 – 7, (3) more than 7 regenerants. The percent of explant regeneration varied from 0%, in Benitaka cultivar, up to 50%, in Superior Seedless cultivar. The explants inoculated in control, for all cultivars, did not respond to the organogenesis induction. The cultivars with rate more than 7 regenerants per explants were: Petit Shiraz (15,0 μM de BAP + 0,1 μM ANA) and Red Globe (10,0 μM de BAP + 0,1 μM ANA).

Index terms: *Vitis*, organogenesis, growth regulators, tissue culture.

Introdução

A vitivinicultura destaca-se como uma das principais atividades do agronegócio irrigado do Vale do Rio São Francisco, representando aproximadamente 95% das exportações nacionais de uvas finas para mesa, e com participação crescente no setor vinícola nacional (Anuário Brasileiro da Fruticultura, 2004). Por outro lado, a deficiência de materiais adaptados à região, especialmente apirênicos, aliados à suscetibilidade a doenças e pragas têm aumentado os custos de produção (Camargo et al., 1997). Nesse caso, os trabalhos de melhoramento genético, através de métodos convencionais, são demorados e caros, resultando muitas vezes em alterações indesejáveis no

genoma de variedades tradicionais. Assim, técnicas não convencionais como a cultura de embriões, o cultivo de protoplastos e a transformação genética, têm sido propostas com o objetivo de acelerar os processos de melhoramento e superar as barreiras de incompatibilidade entre as espécies (Meredith, 1996). O pré-requisito para trabalhar estes processos está no desenvolvimento de protocolos de regeneração e obtenção de clones idênticos à planta matriz (Monette, 1988). Para isso, alguns processos morfogenéticos, como formação de gemas e raízes (organogênese) ou embriões somáticos (embriogênese), constituem conhecimento indispensável, resultantes do desenvolvimento de áreas da bioquímica, fisiologia e genética de plantas (Ramalho & Santos, 1990).

A regeneração de videiras, via organogênese *in vitro*, tem sido descrita a partir de diferentes explantes, tais como folhas com pecíolo (Stamp et al., 1990; Pêros et al., 1998), lâmina foliar (Martinelli et al., 1996), pecíolos (Tang & Mullins, 1990), segmentos internodais (Rajasekaran & Mullins, 1981) e brotos proliferativos (Mezetti et al., 2002). A regeneração através de embriogênese somática indireta tem sido obtida a partir de óvulos (Mullins & Srinivasan, 1976), folhas (Scorza et al., 1996) e principalmente por cultura de anteras (Franks et al., 1998). Vale salientar que a regeneração por cultura de anteras é laboriosa e cultivar dependente (Perl et al., 1996), tendo sido relatadas alterações fenotípicas como forte pigmentação por antocianina, vigor reduzido, lobulação foliar e albinismo (Rajasekaran & Mullins, 1983; Franks et al., 1998).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi estabelecer um processo de regeneração via organogênese somática *in vitro*, em sete cultivares de videira (uvas para vinho, apirênicas e com semente), implantadas no Vale do Rio São Francisco (Brasil), que possa ser compatível com processos de transferência gênica por métodos biobalísticos e/ou por *Agrobacterium*.

Material e Métodos

Material e formação do explante

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semi-Árido em Petrolina-PE no período 2003-2004. Foram utilizadas plantas *in*

in vitro das seguintes cultivares de videira: Cabernet Sauvignon, Petit Shiraz, Benitaka, Red Globe, Crimson Seedless, Superior Seedless e Thompson Seedless. Segmentos nodais, produzidos *in vitro*, foram excisados e inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio Galzy (Galzy, 1964) (anexo 1), suplementado com 4,4 μM de BAP (benzilaminopurina), 2 mgL^{-1} de glicina, 100 mgL^{-1} de inositol, 30 gL^{-1} de sacarose, solidificado com 5 gL^{-1} de agargel, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120 °C por 20 minutos. O material foi mantido por 30 dias em condição de fotoperíodo com 16 h de luz, 25 °C e intensidade luminosa de 40 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$.

Indução de organogênese *in vitro*

As duas folhas superiores mais desenvolvidas, das brotações obtidas no passo anterior, foram excisadas com parte do pecíolo e tiveram sua nervura central cortada transversalmente e inoculada com sua face adaxial sobre meio de cultura NN (Nitsch & Nitsch, 1969) (anexo 1) suplementado com 2 mgL^{-1} de glicina, 100 mgL^{-1} de inositol, 20 gL^{-1} de sacarose e as seguintes combinações de reguladores de crescimento vegetal: 10 μM , 12,5 μM e 15,0 μM de BAP, todos associados a 0,1 μM ANA e um controle sem reguladores vegetais. O meio foi solidificado com 5 gL^{-1} de agargel e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120 °C por 20 minutos. As culturas foram incubadas durante as duas primeiras semanas em condição de escuro. A partir da segunda semana foram colocadas em condição de fotoperíodo com 16 h de luz, 25 °C e intensidade luminosa de 40 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 7 (cultivares) x 4 (tratamentos) e 4 repetições, sendo inoculados 6 explantes por parcela. A avaliação da porcentagem de explantes com regeneração adventícia (PER) (gemas e brotos) e o índice de regenerantes por explante (IR/E) foi realizada aos 75 dias após a inoculação dos explantes. O índice de regenerantes por explante (IR/E) foi avaliado atribuindo-se uma classificação mediante um sistema de notas, segundo observação em microscópio estereoscópico, sendo: (0) ausência; (1) de 1 a 3; (2) de 4 a 7; (3) acima de 7 regenerantes. Os dados foram transformados para $(x+1)^{1/2}$ e analisados utilizando-se o programa estatístico SisVar (Sistema de análise de variância, Lavras, UFLA, 1998).

Resultados e Discussão

Os explantes regenerativos apresentaram formação de calo na região do corte peciolar nos primeiros 15 dias de cultivo, com coloração clara na condição de escuro, tornando-se esverdeados quando colocados na condição de luz com intensidade luminosa de $40 \mu\text{mols}^{-1}\text{m}^{-2}$.

A partir da transferência para condição de luminosidade, observou-se maior atividade organogênica na base do pecíolo e na região adjacente (faces abaxial e adaxial) dos explantes, com formação assíncrona de brotos, folhas, gemas e calos associados ao explante original (Figura 1). Por outro lado, ocorreu organogênese em menor intensidade na parte excisada da região das nervuras da lâmina foliar. A formação de gemas verificada pode ser similar à citada por diversos autores. Em estudos anatômicos de brotações adventícias em folhas com pecíolo em videira, descritos por Colby et al. (1991), observou-se a presença de três regiões distintas no pecíolo com aparente atividade meristemática. Da mesma forma, Torregrosa & Bouquet (1996) descreveram a iniciação do promeristema na camada externa de células próxima à região peciolar excisada.

Por outro lado, a idade e o estágio de desenvolvimento dos explantes parecem ter influência na resposta obtida “*in vitro*”. Em experimentos preliminares (dados não apresentados), explantes foliares retirados de culturas nodais enraizadas, com 60 dias de idade, apresentaram baixa capacidade regenerativa. Em contraste, explantes foliares originados de brotações proliferativas com 30 dias de idade e ausência de raízes, apresentaram maior capacidade em regenerar novos brotos. Da mesma forma, as correlações entre maturidade do explante e competência morfogênica foram observadas, tanto em sistemas organogênicos (Stamp et al., 1990), como em sistemas embriogênicos (Harst, 1995).

Os resultados mostraram diferenças genotípicas significativas entre cultivares de videira, em relação à competência e determinação dos explantes de folha com pecíolo, para regeneração de brotos e gemas, com taxas de regeneração variando de 0%, para a cultivar Benitaka, até 50% na cultivar Thompson Seedless, conforme observado na Tabela 1. A influência do genótipo

na capacidade de regeneração já foi reportada anteriormente para a videira (Martinelli et al., 1996; Péros et al., 1998), morangueiro (Nehra et al., 1989) e espécies cítricas (Almeida et al., 2002). Nesse caso, é possível que vários fatores sejam responsáveis pelas respostas organogênicas verificadas nas diferentes cultivares estudadas. No processo de regeneração, explantes com intensidades variadas de determinação celular adquirem nova competência, através da ação de sinais químicos (balanço hormonal citocinina/auxina), que ativam seletivamente determinado grupo de genes (epigênese), ocorrendo a formação de calos, gemas e/ou embriões (Segura, 1993). Além disso, para que um tecido se diferencie em um determinado órgão, faz-se necessário que ele possua a capacidade de expressão dos chamados “genes mestres” que coordenam a expressão dos vários genes que serão requeridos na organogênese (Peres, 2002).

A análise do parâmetro porcentagem de explantes regenerativos (PER) (Tabela 1), para o grupo de genótipos estudados, mostra que as cultivares apirênicas Crimson Seedless e Thompson Seedless apresentaram os melhores resultados para 10 μM BAP + 0,1 μM ANA, com porcentagens de regeneração adventícia de 41,7% e 50,0%, respectivamente. Para 15,0 μM BAP + 0,1 μM de ANA destacaram-se as cultivares Petit Shiraz, Superior Seedless e Thompson Seedless, com porcentagens de regeneração de 30,8%, 33,3% e 33,3%, respectivamente. As cultivares Red Globe e Cabernet Sauvignon, por outro lado, apresentaram melhores porcentagens de explantes regenerativos, não significativos, para 12,5 μM BAP + 0,1 μM ANA, com valores respectivos de 13,0% e 16,7%. Entretanto, os explantes da cultivar Benitaka e do controle em todas as cultivares, apresentaram descoloração lâminar e necrose intensa nas partes excisadas, não respondendo à regeneração adventícia. Para Cary et al. (2001) a falha de competência de um tecido reflete a falta de receptores para a classe hormonal utilizada para induzir o processo organogênico.

No presente trabalho, o aumento nas concentrações relativas entre citocininas e auxinas, somente produziu diferenças significativas para a cultivar Crimson Seedless (Tabela 1). Segundo Skoog & Miller (1957), as concentrações absolutas de citocinina e auxina são menos importantes que suas concentrações relativas na indução da organogênese. O efeito das citocininas e auxinas

aplicadas ao meio de cultura parece ser o reflexo dessas substâncias alterando o metabolismo hormonal endógeno de citocininas/auxinas nas células vegetais (Peres et al., 1999).

Por outro lado, os resultados relativos ao parâmetro índice de regeneração por explante (IR/E) mostraram que para 10 μM BAP + 0,1 μM ANA, a cultivar Red Globe apresentou taxa acima de 7 regenerantes, valor significativamente maior do que o obtido para as outras cultivares. Para 15 μM BAP + 0,1 μM ANA destacaram-se, sem diferença significativa, as cultivares Petit Shiraz, Superior Seedless, Thompson Seedless e Cabernet Sauvignon, com notas 3, 2, 2, e 2, respectivamente (Figura 2).

A avaliação conjunta dos parâmetros acima, mostraram que nem sempre a maior porcentagem de explantes regenerativos, para um tratamento, está associada à taxa mais eficiente de regeneração por explante. Por exemplo, a cultivar Thompson Seedless para 10 μM BAP + 0,1 μM ANA, apresentou 50% de explantes regenerativos e, contudo, obteve somente de 1 a 3 regenerantes por explante. É possível que estes resultados estejam relacionados com a intensidade de competência e determinação adquirido pelos tecidos *in vitro*. As mudanças fisiológicas e morfológicas das células, tornando-as especializadas para a formação de gemas, brotos e folhas reflete o efeito de fatores genéticos, fatores ligados as características originadas durante a ontogênese e, por último, as características cuja expressão depende apenas do ambiente (Kerbauy, 1999).

Tabela 1- Percentual de explantes regenerativos em cultivares de videira PS (Petit Shiraz), RG (Red Globe), SS (Superior Seedless), TS (Thompson Seedless), CrS (Crimson Seedless), CaS (Cabernet Sauvignon) e B (Benitaka), em função de diferentes combinações de BAP + ANA.

em meio NN (Nitsch & Nitsch, 1969), suplementado com diferentes dosagens de reguladores vegetais.

Cultivares	Tratamentos** (%)		
	T1	T2	T3
Petit Shiraz	6,25 [*] Aab	12,5 Aa	30,8 Ab
Red Globe	11,1 Aab	13,0 Aa	0,0 Aa
Superior Seedless	11,1 Aab	28,5 Aa	33,3 Ab
Thompson Seedless	50,0 Ac	16,6 Aa	33,3 Ab
Crimson Seedless	41,7 Bbc	20,0 ABa	0,0 Aa
Cabernet Sauvignon	0,0 Aa	16,7 Aa	12,5 Aa
Benitaka	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa

*Porcentagens seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna (para o mesmo tratamento), não diferem significativamente entre si (teste t; 0,05).

** T1 (10 µM BAP + 0,1 µM ANA);

T2 (12,5 µM BAP + 0,1 µM ANA);

T3 (15,0 µM BAP + 0,1 µM ANA).

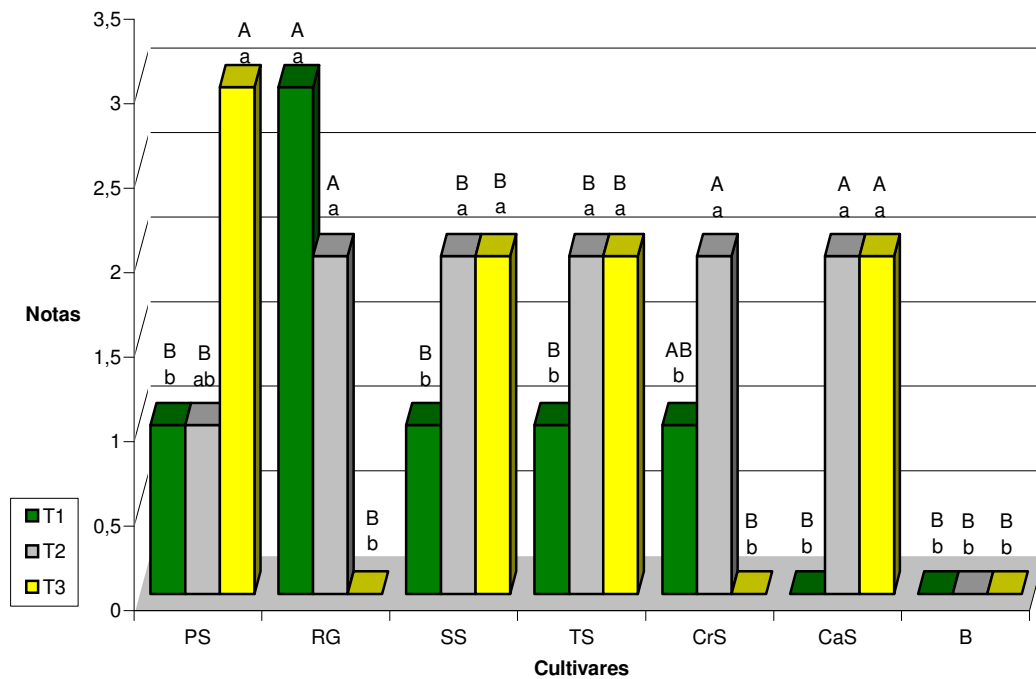


Figura 2. Índice de regeneração por explante em cultivares de videira PS (Petit Shiraz), RG (Red Globe), SS (Superior Seedless), TS (Thompson Seedless), CrS (Crimson Seedless), CaS (Cabernet Sauvignon) e B (Benitaka), em função de diferentes combinações de BAP + ANA.

T1 (10 μM BAP + 0,1 μM ANA), T2 (12,5 μM BAP + 0,1 μM ANA) e T3 (15 μM BAP + 0,1 μM ANA).

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, dentro de cada cultivar e minúscula para o mesmo tratamento, não diferem significativamente entre si (teste t; 0,05).

Conclusões

1. A organogênese *in vitro* da videira, nas cultivares estudadas, é afetada pelo genótipo e balanço hormonal citocinina/auxina.

2. A utilização de reguladores vegetais é essencial para a resposta organogenética, visto que não houve resposta para o tratamento testemunha em todas as cultivares estudadas.

3. As cultivares estudadas apresentam capacidade regenerativa satisfatória, podendo ser utilizadas para estudos de transformação genética, com exceção da cultivar Benitaka, que deve receber estudos específicos.

REFERÊNCIAS

Anuário Brasileiro da Fruticultura 2004. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2004. p. 32-39.

ALMEIDA, W.A.B. de; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; RODRIGUEZ, A.P.M. Otimização do processo de organogênese *in vitro* e regeneração de plantas em *Citrus sinensis* e *C. limonia*. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.59, n.1, p.35-40, jan./mar. 2002.

CAMARGO, U.A.; MASHIMA, C.H.; CZERMANSKI, A.B.C. **Avaliação de cultivares de uvas apirênicas no Vale do São Francisco.** Bento Gonçalves: Embrapa-CNPUV, 1997. 8p. (Embrapa-CNPUV. Comunicado Técnico, 26).

CARY, A.; UTTAMCHANDANI, S.J.; SMETS, R.; VAN ONCKELEN, H.A.; HOWELL, S.H.H. *Arabidopsis* mutants with increased organ regeneration in tissue culture are more competent to respond to hormonal signals. **Planta**, Berlin, v.213, p.700-707, 2001.

COLBY, S.M.; JUNCOSA, A.M.; MEREDITH, C.P. Cellular differences in *Agrobacterium* susceptibility and regenerative capacity restrict the development of transgenic grapevines. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v.116, p.351-361, 1991.

FRANKS, T.; GANG, H.E.D.; THOMAS, M.R. Regeneration of transgenic shape *Vitis vinifera* L. Sultana plants: genotypic and phenotypic analysis. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.4, p.321-333, 1998.

GALZY, R. Technique de thermothérapie des virus de la vigne. **Annales des Epiphyties**, Paris, v.15, p.245-256, 1964.

HARST, M. Development of a regeneration protocol for high frequency somatic embryogenesis from explants of grapevines *Vitis* spp. **Vitis**, Geneva, NY, v.34, n.1, p.27-29, 1995.

KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.E.; BUSSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPQ, v.2, p.519-531, 1999.

MARTINELLI, L.; POLETTI, V.; BRAGAGNA, P.; POZNANSKI, E. A study on organogenic potential in the *Vitis* genus. **Vitis**, Geneva, NY, v.35, n.4, p.159-161, 1996.

MEREDITH, C.P. GENERAL ASSEMBLY OF THE OIV, 76th, 1996. Cape Town, Republic of South Africa. Proceedings... Cape Town: OIV, 1996.

MEZZETTI, B.; PANDOLFINI, T.; NAVACCHI, O.; LANDI, L. Genetic transformation of *Vitis vinifera* via organogenesis. **BMC Biotechnology**, v.2, n.18, 2002. Disponível em <<http://www.biomedcentral.com>>. Acesso em: (02 jun. 2004).

MONETTE, P.L. Grapevine (*Vitis vinifera* L.). In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer-Verlag, 1988. v.6, p.3-37.

MULLINS, M.G.; SRINIVASAN, C. Somatic embryos and plantlets from ancient clone of the grapevine (cv. Cabernet Sauvignon) by apomixes *in vitro*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.27, p.1022-1030, 1976.

NITSCH, J.P., NITSCH, C. Haploid plants from pollen grains. **Science**, Washington, v.163, p.85-87, 1969.

NEHRA, N.S.; STUSHNOFF, C.; KARTHA, K.K.; Direct shoot regeneration from strawberry leaf discs. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.114, p.1014-1018, 1989.

PERES, L.E.P.; AMAR, S.; KERBAUY, G.B.; SALATINO, A.; ZAFFARI, G.R.; MERCIER, H. Effects of auxin-cytokinin and ethylene treatments on the endogenous ethylene and auxin-to-cytokinin ratio related to direct root tip conversion of *Catsetum fimbriatum* Lindl.(Orchidaceae) into buds. **Journal Plant Physiology**, Stuttgart, v.155, p.551-555, 1999.

PERES, L. E. P. AS BASES FISIOLÓGICAS E GENÉTICAS DA REGENERAÇÃO DE PLANTAS *IN VITRO*: Um conhecimento útil para o desenvolvimento de protocolos biotecnológicos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, Ano IV, número 25, p.44-48, 2002.

PERL, A.; LOTAN, O.; ABU-ABIED, M.; HOLLAND, D. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): The role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* interactions. **Nature Biotechnology**, New York, v.14, n.11, p.1521, 1996.

PÈROS, J.P.; TORREGROSA, L.; BERGER, G. Variability among *Vitis vinifera* cultivars in micropropagation, organogenesis and antibiotic sensitivity. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.49, n.319, p.171-179, 1998.

RAJASEKARAN, K.; MULLINS, M.G. Organogenesis in internode explants of grapevines. **Vitis**, Geneva, NY, v.20, p.218-227, 1981.

RAJASEKARAN, K.; MULLINS, M.G. The origin of embryos and plantlets from cultured anther of hybrid grapevines. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.34, p.108-113, 1983.

RAMALHO, M.; SANTOS, J.B.P. **Genética na agropecuária**. São Paulo: Globo, 1990. 359p.

SCORZA, R.; CORDTS, J.M.; GRAY, D.J.; GONSALVES, D.; EMERSHAD, R.L.; RAMMING, D.W. Producing transgenic Thompson Seedless grape (*Vitis vinifera* L.) plants. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v.121, n.4, p. 616-619, 1996.

SEGURA, J. Morfogénesis *in vitro*. In: BIETO, J.A.; TALON, M. (Ed.). **Fisiología y bioquímica vegetal**. Madrid: Ed. Interamericana, 1993. 625 p.

STAMP J.A.; COLBY S.M.; MEREDITH, C.P. Improved shoot organogenesis from leaves of grape. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v.115, p.1038-1042, 1990.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium Society Experimental Biology**, v.11, p.118-131, 1957.

TANG, F.A.; MULLINS, M.G. Adventitious bud formation in leaf explants of some grapevine rootstock and scion cultivars. **Vitis**, Geneva, NY, v.29, p.151-158, 1990.

TORREGROSA, L.; BOUQUET, A. Adventitious bud formation and shoot development from *in vitro* leaves of *Vitis x Muscadinia* hybrids. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.45, p.245-52, 1996.

CAPÍTULO 2

DIAGNOSE DE VIROSES POR DAS-ELISA EM VIDEIRAS CULTIVADAS NO VALE DO RIO SÃO FRANCISCO¹

¹Artigo submetido ao Comitê Editorial do periódico científico: Revista Summa Phytopathologica

Diagnose de viroses por DAS-ELISA em videiras cultivadas no Vale do Rio São Francisco

RESUMO

Foi utilizado o teste DAS-ELISA visando avaliar sua eficiência na detecção de vírus em videiras cultivadas NO Vale do Rio São Francisco. Para isso, foram utilizadas amostras de: a) pecíolo + nervuras de folhas adultas, b) lâmina de folhas adultas, c) pecíolo + nervuras de folhas jovens e d) lâmina de folhas jovens. Foram investigadas a presença dos vírus *Grapevine leafroll virus 1* (GLRaV-1), *Grapevine leafroll virus 3* (GLRaV-3), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) e *Grapevine fleck virus* (GFkV) nas cultivares de copa Benitaka, Superior Seedless e Itália, além do porta-enxerto IAC-313. Foi detectada a presença de GLRaV-3 nas cultivares Benitaka, Superior Seedless e Itália em amostras de pecíolo + nervuras de folhas adultas com incidência de 80%, 60% e 40%, respectivamente. A detecção do vírus GVA, na cultivar Superior Seedless, foi mais efetiva na amostra de pecíolo + nervuras de folhas adultas, com 40% de incidência. Entretanto, para a cultivar Benitaka, as amostras de pecíolo + nervuras de folhas jovens, apresentaram melhor resposta com 20% de incidência. Por outro lado, para o porta-enxerto IAC-313 o material mais efetivo foi lâmina de folhas adultas com 40% de incidência de infecção para o GVA. Em terceira ordem de importância, destacou-se com 20% de incidência o GFLV, nas amostras de pecíolo + nervura folhas adultas para a cultivar Benitaka. Não foram detectados GLRaV-1 e GFkV. Os resultados mostraram que a técnica sorológica DAS-ELISA foi eficiente na detecção dos vírus GLRaV-3, GVA e GFLV, em condições tropicais de altas temperaturas.

Palavras-chave adicionais: *Vitis*, detecção, testes sorológicos, GLRaV-3, GVA.

ABSTRACT

Serological test DAS-ELISA was used aiming at to evaluate its efficiency to detect virus in grapevine plants cultivated on San Francisco river Valley. The samples used were: a) samples of petiole and leaf veins of adult leaves, b) lamina of adult leaves, c) petiole and leaf veins of young leaves and d) lamina of young leaves. The presence of *Grapevine leafroll virus 1* (GLRaV-1), *Grapevine leafroll virus 3* (GLRaV-3), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) and *Grapevine fleck virus* (GFkV) was investigated in Benitaka, Superior Seedless, Italia and rootstock IAC-313 cultivars. The presence of GLRaV-3 in Benitaka, Superior Seedless and Italia cultivars was detected in samples of petiole and leaf veins of adult leaves with incidences of 80%, 60% and 40%, respectively. For GVA, samples of adult leaves petiole and leaf veins were effective for virus detection, with an incidence of 40% for Superior Seedless. On the other hand, the most effective sample for Benitaka cultivar was young leaves petiole and leaf veins, with an incidence of 20%. The most effective sample for rootstock IAC-313 was lamina of adult leaf with 40% of infection by GVA. In third order of importance the GFLV is distinguished with 20% of incidence, in the samples of petiole and leaf veins of adult leaves for Benitaka. It was not detected GLRaV-1 and GFkV. The results show that the DAS-ELISA test was efficient to detect GLRaV-3, GVA and GFLV virus under tropical conditions of high temperature.

Additional keywords: *Vitis*, detection, serological tests, GLRaV-3, GVA.

O Vale do São Francisco, situado no Semi-Árido Nordeste, destaca-se pelo forte crescimento no setor vitivinícola, representando aproximadamente 95% das exportações nacionais de uvas finas para mesa (1). Por outro lado, a grande demanda por novos plantios, acarreta muitas vezes na utilização de fontes não certificadas de material genético isento de vírus, possibilitando a disseminação desses patógenos através da enxertia e estaquia. As conseqüências são a diminuição da vida útil dos vinhedos e a crescente redução do peso, qualidade e características bioquímicas dos frutos, levando à inviabilidade econômica da produção (4, 12, 13).

No Brasil, foram relatadas as ocorrências dos vírus para o enrolamento da folha da videira (*Grapevine leafroll virus 1, 3 e 6*), folha em leque ou dos entrenós curtos da videira (*Grapevine fanleaf virus*), lenho rugoso da videira (*Grapevine rugose wood*), mosaico das nervuras (*Grapevine fleck virus*), entre outros.

A doença do enrolamento das folhas da videira (*Grapevine leafroll associated virus*) é atribuída a pelo menos nove vírus sorologicamente distintos, estando associados ao floema de videiras infectadas (2). Apresenta alta incidência em parreirais do Estado de São Paulo (17), Rio Grande do Sul (14) e na região do Vale do Rio São Francisco no dipólo Petrolina (PE)-Juazeiro (BA) (Melo, 2004 comunicação pessoal). Caracteriza-se pelo enrolamento das bordas foliares para baixo e avermelhamento nas variedades tintas.

Acanaladura do lenho de Kober (*Kober stem grooving*) é uma das doenças do grupo do lenho rugoso da videira, e está associado com *Grapevine virus A* (5, 6, 10). O vírus é do gênero *Vitivirus* (10, 20). Ocasionalmente ocasiona diminuição do vigor da planta e atraso na brotação das gemas. Quando se utilizam cultivares copa com porta-enxertos mais sensíveis, a doença pode causar o declínio da planta, podendo levá-la à morte (18).

A doença dos entrenós curtos (GFLV) ocorre com baixa incidência em vinhedos do Estado de São Paulo (15) e Rio Grande do Sul (14), com prejuízos que variam com a intensidade da infecção, raça do vírus e cultivar afetada. Nos ramos é comum a presença de entrenós curtos, nós duplos e bifurcação (14).

A mancha ou mosaico das nervuras (*Grapevine fleck disease*) apresenta uma disseminação generalizada pelos parreirais do Brasil. Em São Paulo a incidência da doença foi em média de 58%, em variedades copa, e de 18,1% em variedades porta-enxerto (16). O sintoma típico da doença é o aparecimento de manchas cloróticas, translúcidas, alongadas e irregulares, em folhas, acompanhando as nervuras (7).

No Submédio do Vale do São Francisco observou-se a presença de sintomas característicos de, pelo menos cinco tipos de viroses (11). Entretanto, as avaliações de observação em campo podem ser imprecisas à medida que, outras causas podem induzir o aparecimento de sintomas semelhantes (23).

O uso de material livre de vírus para propagação constitui-se no meio mais efetivo para o controle das viroses da videira. A utilização de técnicas sorológicas,

para detecção de viroses, oferece economia de tempo e trabalho, e fazem parte de programas de certificação fitossanitária em diversos países (9, 12, 19).

No presente trabalho, foi utilizado o teste DAS-ELISA visando avaliar sua eficiência na detecção de vírus em videiras cultivadas em condições tropicais de altas temperaturas.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivares

Foram executados testes para detecção dos vírus GLRaV-1 (*Grapevine leafroll virus 1*), GLRaV-3 (*Grapevine leafroll virus 3*), GVA (*Grapevine virus A*), GFLV (*Grapevine fanleaf virus*) e GFkV (*Grapevine fleck disease*) em videiras cultivadas no Submédio São Francisco. As cultivares investigadas foram Benitaka, Superior Seedless e Itália, além do porta-enxerto IAC-313. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semi-Árido, em Petrolina-PE. Para a diagnose viral, utilizou-se o “Kit” para técnica DAS-ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), produzido pelo laboratório BIO-RAD da França. As leituras foram efetuadas em aparelho de leitura de absorvância de placas, marca Sunrise, na faixa de 405 nanômetros.

Coleta e preparo das amostras

Para cada cultivar foram amostradas cinco plantas ao acaso e coletadas 10 amostras foliares/planta, sendo cinco amostras de folhas adultas e cinco amostras de folhas jovens. No laboratório, lâminas foram separadas de pecíolos e nervuras, originando quatro tipos diferentes de amostras: a) pecíolo + nervuras de folhas adultas (PNFA); b) pecíolo + nervuras de folhas jovens (PNFJ); c) lâmina de folhas adultas (LFA) e d) lâmina de folhas jovens (LFJ).

As culturas amostradas apresentavam-se nas seguintes fases fenológicas: cultivar de copa Benitaka em estágio pré-colheita; cultivar de copa Superior Seedless em estágio repouso; cultivar de copa Itália e cultivar de porta-enxerto IAC-313 em estágio de desenvolvimento vegetativo. A temperatura máxima média do mês de retirada das amostras (abril/2003) foi de 32,9 °C. No laboratório, as amostras foram maceradas em almofariz na presença de nitrogênio líquido e

diluídas 1:5 (p/v) em tampão de extração tris HCl 0,2 M pH 8,2, NaCl (0,8%) e PVP (2%).

Aplicação do protocolo DAS-ELISA

Anticorpos para GLRaV-1 (*Grapevine leafroll virus 1*), GLRaV-3 (*Grapevine leafroll virus 3*), GVA (*Grapevine virus A*), GFLV (*Grapevine fanleaf virus*) e GFkV (*Grapevine fleck disease*) foram diluídos na proporção de 1/100 em tampão de fixação e depositados em células de microplacas, cobertos com filme adesivo, incubados por 2 h a 37 °C e lavados por 3 vezes com solução PBS-Tween.

Posteriormente, amostras preparadas de PNFA, PNFJ, LFA e LFJ, dois controles positivos e dois controles negativos foram depositadas sobre as células das microplacas e incubadas por uma noite a temperatura de 8 °C. No dia seguinte, as microplacas foram lavadas duas vezes com solução PBS-Tween, seguida por duas lavagens adicionais com aproximadamente 3 minutos de duração. Logo após, anticorpos para GLRaV-1, GLRaV-3, GVA, GFLV e GFkV, conjugados com fosfatase alcalina, foram diluídos na proporção de 1/100 em tampão de conjugado e depositados em células de microplacas, sendo cobertas com filme adesivo e incubadas por 2h a 37 °C. Posteriormente, foram lavadas por 3 vezes com PBS-Tween. Em seguida, procedeu-se a deposição do substrato pNPP (p-nitrofenil fosfato) sobre as células das microplacas e incubadas por 15 min a 37 °C. Foram efetuadas leituras de densidade óptica aos 30, 60, 120, 180 e 240 min da deposição dos substratos.

Neste trabalho as leituras foram consideradas positivas para valores próximos ou superiores a duas vezes o valor do controle negativo. De maneira geral, são utilizados valores de duas vezes (8, 19, 21) a três vezes (16) a leitura do controle negativo. Os valores das densidades ópticas brutas das amostras, obtidos na leitura aos 240 minutos da deposição do substrato, foram analisados pelo programa estatístico SisVar (Sistema de análise de variância, Lavras, UFLA, 1998) .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As leituras médias de absorvância e incidência dos vírus GLRaV-1, GLRaV-3, GVA, GFLV e GFkV, nas cultivares de videira Superior Seedless, Benitaka, Itália e IAC-313, podem ser observadas na Tabela 1.

Os vírus *Grapevine leafroll associated virus 3*, *Grapevine virus A* e *Grapevine fanleaf virus* foram detectados nas amostras analisadas. A presença de GLRaV-3 nas cultivares Benitaka, Superior Seedless e Itália foi detectada, principalmente, na amostra de material pecíolo + nervuras de folhas adultas com incidência por cultivar de 80%, 60% e 40%, respectivamente. Os valores médios de absorvância para os extratos infectados por GLRaV-3, foram de 0,500 para a cultivar Benitaka, 0,553 para a cultivar Superior Seedless e 0,370 para a cultivar Itália, com um controle negativo igual a 0,194.

Do mesmo modo, em trabalhos anteriores, a detecção dos antígenos virais apresentou maiores concentrações em folhas basais do que em folhas apicais (19, 24). A maior titulação em amostras localizadas na base dos ramos (folhas adultas e nervuras principais) e no final da estação de produção, sugerem que o movimento do antígeno viral é lento pelo floema, o que produz uma distribuição desuniforme do vírus pela planta (19).

Para o GVA (controle negativo igual a 0,183), as cultivares Superior Seedless, Benitaka e o porta-enxerto IAC-313 apresentaram comportamento distinto. A amostra pecíolo + nervuras de folhas adultas foi efetiva na detecção deste vírus, com 40% de incidência para a cultivar Superior Seedless, atingindo valores médios de absorvância de 0,406. Para a cultivar Benitaka, a amostra mais efetiva para detecção de GVA foi pecíolo + nervuras de folhas jovens, com 20% de incidência e leitura de 0,376. Entretanto, no caso do porta-enxerto IAC-313, a detecção do GVA, com 40% de incidência, somente foi possível em amostra de lâmina de folha adulta, com valor médio de absorvância de 0,410.

Em terceira ordem de importância foi detectado, com 20% de incidência, o GFLV, em amostras de pecíolo + nervura de folhas adultas, para a cultivar Benitaka, com leitura de absorvância de 0,132 e controle negativo igual a 0,069. Resultado similar foi encontrado por Bouyahia et al. (3), que verificaram um

gradiente de titulação para o antígeno viral em ramos maduros com aumento significativo do ápice para a base do ramo. A baixa incidência de GFLV, nas cultivares estudadas, apresenta comportamento similar aos vinhedos do estado de São Paulo (15) e Rio Grande do Sul (14).

Os vírus GLRaV-1 (controle negativo igual a 0,197) e GFkV (controle negativo igual a 0,206) não foram detectados nas amostras analisadas. A ausência de GLRaV-1 nas cultivares de videira deve-se provavelmente a origem e tipo de material analisado (uva fina para mesa), uma vez que este vírus é mais comum em uvas para vinho (17).

A alta incidência de GLRaV-3 em amostras de uvas finas para mesa, está de acordo com os dados do trabalho de Fajardo et al. (8), os quais destacaram este vírus como o mais importante nos vinhedos brasileiros. Com a mesma representatividade, em parreirais do Estado de São Paulo, sua incidência foi de 88% (17).

As cultivares, na ocasião das amostragens, encontravam-se no estágio de pré-colheita (Benitaka) e repouso (Superior Seedless), com ramos maduros não apresentando sintomas típicos de viroses. Segundo Rowhani & Golino (22), a ausência de sintomas ocorre porque a infecção é latente, ou por outros fatores, como reação varietal e a idade da planta.

O caráter precoce da infecção por GLRaV-3 foi evidenciado na cultivar Itália, onde plantas relativamente jovens (6 meses), em estágio de formação de copa, apresentaram leituras médias de absorvância alta, aproximadamente 65% da leitura média da cultivar Superior Seedless para a amostra de pecíolo + nervura de folha adulta.

No presente trabalho, de uma maneira geral, o material pecíolo + nervuras de folhas adultas, foi eficiente para detecção de GLRaV-3 e GVA na cultivar Superior Seedless (infecção dupla), GLRaV-3 nas cultivares Benitaka e Itália e GFLV na cultivar Benitaka. O material pecíolo + nervura de folhas jovens foi eficiente para detecção de GVA na cultivar Benitaka (infecção tripla). O material lâmina de folha adulta foi eficiente para detecção de GVA em porta-enxerto IAC-313 (infecção simples).

Tabela 1- Detecção de viroses por DAS-ELISA em cultivares de videira implantadas no Vale do Rio São Francisco.

Vírus	Cultivares								
	Superior Seedless		Benitaka		Itália		IAC-313		
	Trat.	** média	*** detecção	média	detecção	média	detecção	média	detecção
GLRaV-1									
	PNFA	0,197 a	0/5	0,197 a	0/5	0,196 a	0/5	0,198 a	0/5
	LFA	0,209 a	0/5	0,192 a	0/5	0,195 a	0/5	0,198 a	0/5
	PNFJ	0,194 a	0/5	0,194 a	0/5	0,199 a	0/5	0,202 a	0/5
	LFJ	0,193 a	0/5	0,192 a	0/5	0,196 a	0/5	0,199 a	0/5
GLRaV-3									
	PNFA	0,553 a	3/5	0,500 a	4/5	0,370 a	2/5	0,211 a	0/5
	LFA	0,209 b	0/5	0,367 b	1/5	0,237 b	0/5	0,220 a	0/5
	PNFJ	0,227 b	0/5	0,489 a	4/5	0,233 b	0/5	0,209 a	0/5
	LFJ	0,201 b	0/5	0,228 c	0/5	0,216 b	0/5	0,222 a	0/5
GVA									
	PNFA	0,406 a	2/5	0,279 b	0/5	0,232 a	0/5	0,239 b	0/5
	LFA	0,219 b	0/5	0,230 b	0/5	0,217 a	0/5	0,410 a	2/5
	PNFJ	0,216 b	0/5	0,376 a	1/5	0,222 a	0/5	0,204 b	0/5
	LFJ	0,221 b	0/5	0,238 b	0/5	0,240 a	0/5	0,226 b	0/5
GFLV									
	PNFA	0,073 a	0/5	0,132a	1/5	0,078 a	0/5	0,076 a	0/5
	LFA	0,066 a	0/5	0,076 b	0/5	0,081 a	0/5	0,078 a	0/5
	PNFJ	0,077 a	0/5	0,077 b	0/5	0,095 a	0/5	0,090 a	0/5
	LFJ	0,076 a	0/5	0,073 b	0/5	0,082 a	0/5	0,092 a	0/5
GFkV									
	PNFA	0,202 a	0/5	0,199 a	0/5	0,193 a	0/5	0,197 a	0/5
	LFA	0,210 a	0/5	0,199 a	0/5	0,193 a	0/5	0,204 a	0/5
	PNFJ	0,194 a	0/5	0,198 a	0/5	0,191 a	0/5	0,205 a	0/5
	LFJ	0,188 a	0/5	0,196 a	0/5	0,203 a	0/5	0,202 a	0/5

* PNFA- pecíolo + nervura de folhas adultas; LFA- lâmina folhas adultas; PNFJ- pecíolo + nervura de folhas jovens; LFJ- lâmina de folhas jovens.

** Médias seguidas pela mesma letra na coluna, dentro de cada variável, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

*** Número de plantas positivas / número de plantas analisadas.

Os resultados encontrados neste trabalho mostraram que o uso do teste sorológico DAS-ELISA foi eficiente para a detecção de viroses, quando aplicado em videiras cultivadas em condição tropical. Os números encontrados servem de alerta, uma vez que, a maior parte dos viticultores do Vale do São Francisco utilizam material de propagação sem certificação fitossanitária para viroses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Anuário Brasileiro da Fruticultura 2004**. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2004. p.32-39.
2. Alkowni, R.; Rowhani, A.; Golino, D. A. Partial nucleotide sequence and molecular detection of a new putative grapevine leafroll associated virus. **Phytopathology**, St. Paul, v.92, n.6, 2002. Suplemento.
3. Bouyahia, H.; Potere, O.; Boscia, D. Sampling methodology for the detection of *Grapevine Fanleaf virus* by ELISA. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts**... Locorotondo: University of Bari, 2003. p.204-205.
4. Castellano, M.A.; Martelli, G.P.; Savino, V. Virus-like particles and ultrastructural modifications in the phloem of leafroll-affected grapevines. **Vitis**, Geneva, NY, v.22, p.23-39, 1983.
5. Chevalier, S.; Greif, C.; Clauzel, J.M.; Walter, B.; Fritsch, C. Use of an immunocapture-polymerase chain reaction procedure for the detection of grapevine virus A in Kober stem grooving-infected grapevines. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.143, p.369-373, 1995.
6. Digiario, M.; Popovic Bedzrob, M.; D'onghia, A.M.; Boscia, D.; Savino, V. On the correlation between grapevine virus A and rugose wood. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v.33, p.187-193, 1994.

7. Faggioli, F.; Del Serrone, P.; Barba, M. Presence of Grapevine Fleck virus in Latium and its rapid serological detection. **Rivista di Viticoltura e di Enologia**, Conegliano-Treviso, v.46, n.2, p.55-59, 1993.
8. Fajardo, T.V.M.; Kuhn, G.B.; Eiras, M.; Nickel, O. Detecção de closterovirus em videira e caracterização parcial de um isolado do Grapevine leafroll-associated vírus 3. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília-DF, v.27, n.1, p.58-64, jan./fev., 2002.
9. Forsline, P.L.; Hoch, J.; Lamboy, F.; Hu, J.S.; McFerson, J.R.; Golino, D.A.; Gonsalves, D. Comparative effectiveness of symptomatology and ELISA for detecting two isolates of grapevine leafroll on graft-inoculated Cabernet franc. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.47, n.3, p.239-243, 1996.
10. Garau, R.; Prota, V.A.; Piredda, R.; Boscia, D.; Prota, U. On the possible relationship and Kober stem grooving and grapevine virus A. **Vitis**, Geneva, NY, v.33, p.161-163, 1994.
11. Hegedus, L. **Relatório de atividades 1989-1992**. Petrolina-PE: CODEVASF, 1992. 95p.
12. Johnson, R.C.; Virus testing and the Canadian plant protection export certification program for grapevine nursery stock (PPECP). In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE-ICVG, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts...** Locorotondo: University of Bari, 2003, p.171-172.
13. Kovacs, L.G.; Hanami, H.; Fortenberry, M.; Kaps, M.L. Latent infection by leafroll agent GLRaV-3 is link to lower fruit quality in French American hybrid grapevines Vidal blanc and St. Vincent. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.52, p.254-259, 2001.

14. Kuhn, G.B. **Principais vírus e doenças consideradas de origem viral que ocorrem nos vinhedos do Rio Grande do Sul**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa-CNPUV, 1992, 28p. (Embrapa-CNPUV. Circular Técnica, 16).
15. Kuniyuki, H.; Veja, J.; Martins, F.P.; Costa, A.S. Mosaico da videira traviú, uma doença causada pelo vírus da folha em leque em São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.19, n.2, p.224-230, 1994.
16. Kuniyuki, H.; Costa, A.S. Mosaico das nervuras uma virose da videira em São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.20, p.152-157, 1994.
17. Kuniyuki, H.; Rezende, J.A.M.; Scagliusi, S.M.M.; Yuki, V.A. Incidência de Grapevine leafroll- associated viruses 1,2 e 3 em vinhedos do Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.28, n.4, p.311-314, 2002.
18. Martelli, G.P. Rugose wood complex. In: Martelli, G. P. (Ed.). Graft-transmissible Diseases of Grapevines. **Handbook for detection and diagnosis**, Rome: FAO, 1993. p. 45-53. (Publication Division).
19. Monis, J.; Bestwick, R.K. Serological detection of grapevine associated closteroviruses in infected grapevine cultivars. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, n.7, p.802-808, 1997.
20. Regenmortel, M.H.V.; Fauquet, C.M.; Bishop, D.H.L.; Cartens, E.B.; Estes, M. K.; Lemon, S.M.; Maniloff, J.; Mayo, M.A.; McGeoch, D.J.; Pringle, C.R.; Wickner, R.B. (Ed.). **Virus taxonomy- classification and nomenclature of viruses. Genus *Vitivirus***. San Diego: Academic Press, 2000, p.960-964.

21. Rowhani, A. Use of F(ab)^l₂ antibody fragment in ELISA for detection of grapevine viruses. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.43, n.1, p.38-40, 1992.
22. Rowhani, A.; Golino, D.A. ELISA tests reveals new information about leafroll disease. **California Agriculture**, Oakland, v.49, p.26-29, 1995.
23. Rowhani, A.; Uyemoto, J.K.; Golino, D.A. A comparison between serological and biological assays in detecting grapevine leafroll viruses. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, p.799-801, 1997.
24. Teliz, D.; Tanne, E.; Gonsalves, D.; Zee, F. Field sorological detection antigens associated with grapevine leafroll disease. **Plant Disease**, St. Paul, v.71, p.704-709, 1987.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sabe-se que a utilização das técnicas de cultura de tecidos tem sido amplamente aplicada nos métodos de melhoramento e limpeza viral, em genótipos de videiras. Nesta Dissertação de Mestrado, desenvolvida em dois capítulos, procurou-se estudar duas linhas de pesquisa em videira: a primeira relacionada ao melhoramento vegetal (morfogênese *in vitro*) e a segunda ligada a fitossanidade (diagnóstico de viroses). O objetivo principal do enfoque melhoramento / fitossanidade foi intensificar dentro da área científica a concepção de que “os melhores resultados são obtidos quando seleções sanitárias e genéticas são conduzidas ao mesmo tempo”. A utilização da pesquisa básica em morfogênese *in vitro*, constitui pré-requisito para aplicação em métodos de melhoramento. A regeneração *in vitro* e obtenção de clones idênticos à planta matriz abrem um vasto campo para o desenvolvimento de áreas da genética, bioquímica, fisiologia vegetal e fitossanidade. Por outro lado, a grande demanda por novos plantios, na região do Vale do rio São Francisco, têm proporcionado a utilização de grande quantidade de material vegetativo de videira sem procedência. Assim, a aplicação de testes diagnósticos proporciona a certificação fitossanitária dos genótipos e reduz a disseminação de viroses. Os resultados, de um modo geral, mostraram que foi possível obter indução de organogênese *in vitro*, para seis cultivares de videira, com porcentagens de regeneração variando de 11,1% até 50%. Por outro lado, o teste diagnóstico DAS-ELISA detectou viroses nas cultivares Benitaka (infecção tripla por GLRaV-3, GVA e GFLV), Superior Seedless (infecção dupla por GLRaV-3 e GVA), Itália (infecção simples por GLRaV-3) e IAC-313 (infecção simples por GVA). De modo geral, os trabalhos revisados referentes à organogênese estabelecem interpretações dos resultados relacionados à genética do material, balanço de reguladores vegetais e/ou características do ambiente de cultura. Diante disso, procurou-se, nesta Dissertação, aplicar estas interpretações e ampliá-las, com informações dos testes diagnósticos. Assim, é possível que umas das explicações da cultivar

Benitaka não responder à regeneração adventícia, pode estar relacionada a seu estado fitossanitário, já que está apresentou infecção por três tipos de vírus.

Os primeiros trabalhos relatando organogênese *in vitro* em videiras, com regeneração de brotos, datam da década de 70. No Brasil, este trabalho é pioneiro. Verifica-se assim, o descompasso da pesquisa brasileira neste setor, o que mostra a necessidade de maiores investimentos em infra-estrutura, financiamento de pesquisas e formação de mão-de-obra qualificada. Portanto, os resultados encontrados são importantes no sentido de fornecer subsídios à pesquisa em morfogênese *in vitro* em videiras; incentivar a utilização de testes diagnósticos para viroses; participar como fonte parcial de dados da situação fitossanitária da viticultura do Vale do São Francisco. Espera-se então, que esta dissertação possa contribuir para a sustentabilidade desta atividade milenar.

ANEXOS

Tabela 1- Composição dos meios NN (Nitsch & Nitsch, 1969) e Galzy (Galzy, 1964).

	Meio NN mgL ⁻¹	Meio Galzy mgL ⁻¹
Macronutrientes		
Ca (NO ₃) ₂	0,00	500,00
NH ₄ NO ₃	720,00	320,00
KNO ₃	950,00	125,00
CaCl ₂ . 2H ₂ O	166,00	0,00
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	185,00	125,00
KH ₂ PO ₄	68,00	125,00
FeEDTA		
Na ₂ EDTA	37,30	37,30
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	27,80	27,80
Micronutrientes		
BeSO ₄ . 4 H ₂ O	0,00	0,050
H ₃ BO ₃	10,00	0,025
MnSO ₄ . 4 H ₂ O	25,00	0,610
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	10,00	0,050
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,25	0,025
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025	0,025
KI	0,00	0,250
NiCl ₂	0,00	0,025
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,00	0,025
Vitaminas e aminoácidos		
Ácido nicotínico	5,00	0,10
Piridoxina.HCl	0,50	0,10
Tiamina.HCl	0,50	0,10
Pantotenato de cálcio	0,00	0,10
Ácido fólico	0,50	0,00
Biotina	0,10	0,001
Glicina	2,00	2,00
Mio-inositol	100	100
Sacarose	20.000	30.000