

**PROSPECÇÃO CLONAL PARA A CULTIVAR  
FOLHA DE FIGO (*Vitis labrusca* L.)  
NA REGIÃO DE CALDAS, MG**

**FABIOLA VILLA**

**2004**

FABIOLA VILLA

**PROSPECÇÃO CLONAL PARA A CULTIVAR FOLHA DE FIGO  
(*Vitis labrusca* L.) NA REGIÃO DE CALDAS, MG**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para a obtenção do título de "Mestre".

**Orientador:**

Dr. Murillo de Albuquerque Regina

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

2004

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

**Villa, Fabíola**

**Prospecção clonal para a cultivar Folha de Figo (*Vitis labrusca* L.) na  
região de Caldas, MG / Fabíola Villa. – Lavras : UFLA, 2004.**

**72 p. : il.**

**Orientador: Murillo de Albuquerque Regina**

**Dissertação (Mestrado) - UFLA.**

**Bibliografia.**

- 1. *Vitis labrusca* L. 2. 'Folha de Figo'. 3. Viroses. 4. DAS-ELISA. 5. RAPD.  
6. Seleção clonal. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.**

**CDD-634.37**

FABÍOLA VILLA


**PROSPECÇÃO CLONAL PARA A CULTIVAR FOLHA DE FIGO  
(*Vitis labrusca* L.) NA REGIÃO DE CALDAS, MG**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para a obtenção do título de “Mestre”.

**Aprovada em 02 de abril de 2004**

**Dr. Moacir Pasqual - UFLA**

**Dr. Ângelo Albérico Alvarenga - EPAMIG/Lavras**

  
**Dr. Murillo de Albuquerque Regina**  
EPAMIG-Caldas  
(Orientador)

## ***Dedico***

**À minha filha, Chiara Villa, que me permitiu conhecer o mais belo  
e intenso sentimento - o tão falado - ‘amor de mãe’ ...,**

**Aos meus pais, Emerson Carlos Villa e Izabel Villa,  
meus maiores exemplos de vida, amor e dignidade,**

**Aos meus irmãos, Fábio Alexandre Villa e Fabiana Villa Alves,  
pelo companheirismo, cumplicidade e amor que nos une,**

**Ao meu cunhado, Giovani Ferreira Alves,  
pelo apoio, incentivo e carinho,**

**À minha sobrinha, Giulia Villa Alves,  
pela alegria que dá à minha vida,**

**Aos meus avós, Helena Blagitz Villa e Mário Villa (*in memoriam*).**

**“Inteligência é aquilo que permanece em nossa memória, de tudo quanto aprendemos vendo, ouvindo, lendo ou vivendo nossas próprias experiências, quando aplicamos na ocasião certa, de maneira adequada, para fins nobres.”**

**Fausto Rocha**

## *Agradeco*

A Deus, pela minha existência e contínua presença em todos os momentos de minha vida, iluminando sempre meu caminho.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Agricultura (DAG), pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos membros do Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, Profs. Rovilson José de Sousa, Samuel Pereira Carvalho e Édila Vilela de Rezende Von Pinho, pela colaboração durante o curso.

À Fundação de Apoio à Pesquisa, Ensino e Extensão de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro à execução do projeto.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), Fazenda Experimental de Caldas, pelo apoio e infra-estrutura disponibilizada para a execução desse trabalho.

Ao pesquisador e orientador Dr. Murillo de Albuquerque Regina, pela valiosa orientação, oportunidades oferecidas e conhecimentos transmitidos.

Ao pesquisador Geraldo Magela de Almeida Cançado, técnicos e funcionários da EPAMIG de Caldas pela amizade e ajuda na condução dos trabalhos de campo.

A Antonio Flávio Pereira e Cláudia Rita de Souza, pela realização da prospecção nos vinhedos da região de Caldas, MG.

À EMBRAPA Uva e Vinho de Bento Gonçalves, pela realização dos testes sorológicos.

Ao professor Luciano Paiva, pela disponibilidade do Laboratório de Genética Molecular, para a extração de DNA dos clones.

À professora Dulcinéia Carvalho, por ter cedido o material necessário para a execução do RAPD no Laboratório de Melhoramento Florestal.

Aos pesquisadores da EMBRAPA Uva e Vinho, Thor Vinícius Martins Fajardo e Gilmar Barcelos Kuhn.

Ao professor Moacir Pasqual, pelos ensinamentos transmitidos, apoio e amizade durante todo o curso.

Ao professor Nilton Nagib Jorge Chalfun e aos pesquisadores Ângelo Albérico Alvarenga, Enilson Abrahão e José Carlos Fráguas, pela colaboração e amizade.

Ao pesquisador e querido amigo Leonardo Ferreira Dutra que, no meio de tantas atribulações, me ajudou a vencê-las e concluir o curso.

À aluna de Engenharia Florestal Regiane Abjaud Estopa, pela preciosa e essencial ajuda na execução da técnica de RAPD.

Em especial às grandes amigas Ellen Noly Barrocas, Chrystiane Borges Fráguas e Maria Aparecida Moreira, pelo apoio e ajuda fundamental.

Aos amigos da viticultura: Gustavo de Faria Freitas, Paulo Norberto e Tânia das Graças Orlando.

Às amigas Ester A. Ferreira, Leila A. Salles Pio, Rita de Cássia e Sandra Elisabete, pela incansável boa vontade em ajudar e amizade preciosa.

Aos colegas: Adriano, Alba, Anastácia, Carina, Cibelle, Cida, Claret, Enoque, Fernando, Francisco, Hermínio, Janafne, Laura, Lúcia, Marcelo, Márcia, Mívia, Regimeire, Regina, Salwa, Sandra, Sebastião, Vander e Vantuil, pela agradável convivência.

A todos aqueles que, de uma forma ou outra, contribuíram para o desenvolvimento do trabalho e do curso.

***Muito Obrigadal***

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....	i
RESUMO .....	iii
ABSTRACT .....	iv
1 INTRODUÇÃO .....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	03
2.1 A espécie <i>Vitis</i> spp. ....	03
2.2 A videira no Brasil .....	04
2.3 Cultivar Folha de Figo ( <i>Vitis labrusca</i> L.) .....	05
2.4 Viroses .....	06
2.4.1 GFRV ( <i>Grapevine fleck virus</i> ) .....	08
2.4.2 GFLV ( <i>Grapevine fanleaf virus</i> ) .....	09
2.4.3 GVA ( <i>Grapevine virus A</i> ) .....	09
2.4.4 GVB ( <i>Grapevine virus B</i> ) .....	10
2.4.5 GLRaV ( <i>Grapevine leafroll virus associated</i> ) .....	11
2.4.6 Formas de disseminação .....	12
2.4.7 Controle .....	13
2.4.8 Métodos de detecção de vírus .....	14
2.5 Seleção clonal .....	17
2.5.1 Prospecção .....	22
2.5.2 Seleção sanitária .....	23
2.5.3 Seleção genética .....	24
2.5.4 Multiplicação e difusão .....	24
2.6 Marcadores moleculares RAPD e filogenia genética .....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	28
3.1 Local de trabalho e seleção massal dos vinhedos .....	28
3.2 Teste DAS-ELISA .....	30
3.3 Análise de RAPD .....	32
3.3.1 Coleta do material vegetal .....	32
3.3.2 Extração do DNA genômico .....	32
3.3.3 Amplificação do DNA genômico via RAPD .....	34
3.3.4 Eletroforese .....	35
3.3.5 Análise dos dados de RAPD e similaridades genéticas .....	35
3.3.6 Caracterização da variabilidade genética .....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
4.1 Prospecção clonal .....	37
4.1.1 Vinhedo da EPAMIG .....	37
4.1.2 Outros vinhedos do município de Caldas .....	38
4.2 Análise de ocorrência de viroses .....	41
4.3 Caracterização filogenética por RAPD .....	44



4.3.1 Similaridade genética .....	46
4.3.2 Distribuição da variabilidade genética .....	48
5 CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	52
6 CONCLUSÕES .....	53
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	54
ANEXO .....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

a.C.	antes de Cristo
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ANTAV	Association Nationale Technique pour l'Amélioration de la Viticulture
BSA	albumina soro bovino
°Brix	teor de açúcares
CNPUV	Centro Nacional de Pesquisa da Uva e Vinho
CNR	Consiglio Nazionale delle Ricerche
CTAB	brometo de cetiltrimetilamonio
DAS-ELISA	Double-antobody sandwich
dsDNA	DNA de fita dupla
dsRNA	RNA de fita dupla
EDTA	ácido etileno diaminotetracético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPAMIG	Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
fAFLP	Fluorescence Amplified Fragment Length Polymorphism
GFRV (GFkV)	<i>Grapevine fleck virus</i>
GFLV	<i>Grapevine fanleaf virus</i>
GLRaV-1	<i>Grapevine leafroll virus associated 1</i>
GLRaV-3	<i>Grapevine leafroll virus associated 3</i>
GVA	<i>Grapevine virus A</i>
GVB	<i>Grapevine virus B</i>
IAC	Instituto Agrônômico de Campinas
IgG	Imunoglobulina G
INRA	Instituto National de la Recherche Agronomique
meq	equivalente miligrama

<b>nm</b>	<b>nanômetro (<math>10^{-9}</math> m)</b>
<b>PBS-T</b>	<b>tampão de lavagem</b>
<b>PCR</b>	<b>Polymerase Chain Reaction</b>
<b>pé-franco</b>	<b>planta de raízes próprias (sem a utilização de porta-enxerto)</b>
<b>PEG 6000</b>	<b>antioxidante</b>
<b>pH</b>	<b>potencial hidrogeniônico</b>
<b>PVP</b>	<b>polivinilpirrolidona</b>
<b>Popgen</b>	<b>Program Population Genetic Analysis</b>
<b>Primer</b>	<b>oligonucleotídeo iniciador de síntese</b>
<b>QTL</b>	<b>Quantitative Trait Loci</b>
<b>RAPD</b>	<b>Random Amplified Polymorphic DNA</b>
<b>RFLP</b>	<b>Restriction Fragment Length Polymorphism</b>
<b>SCAR</b>	<b>Sequence Characterized Amplified Regions</b>
<b>STS</b>	<b>Sequence Tagged Sites</b>
<b>ssDNA</b>	<b>DNA de fita simples</b>
<b>ssRNA</b>	<b>RNA de fita simples</b>
<b>Taq</b>	<b>enzima DNA polimerase</b>
<b>TBE</b>	<b>tris-borato + EDTA</b>
<b>TE</b>	<b>tampão de extração</b>
<b>Teste-ELISA</b>	<b>Enzyme linked immunosorbent assays</b>
<b>Tris-HCl</b>	<b>hidroximetil aminometano - ácido clorídrico</b>
<b>Tween 20</b>	<b>detergente comercial</b>
<b>UFPA</b>	<b>Universidade Federal de Lavras</b>
<b>UPGMA</b>	<b>Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic Average</b>
<b>µg</b>	<b>micrograma (<math>10^{-6}</math> g)</b>

## RESUMO

VILLA, Fabíola. Prospecção clonal para cultivar Folha de Figo (*Vitis labrusca* L.) na região de Caldas, MG. 2004. 72 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.<sup>1</sup>

A produtividade da cultivar Folha de Figo na região de Caldas, MG, é muito baixa, devido, entre outros fatores, à ocorrência de viroses. Objetivou-se neste estudo, selecionar clones mais produtivos da cv. Folha de Figo (*Vitis labrusca* L.) e avaliar a similaridade genética destes, bem como sanidade dos mesmos. O presente trabalho iniciou-se em 1994, em vinhedo da EPAMIG e propriedades particulares, onde procedeu-se a uma primeira seleção de 137 plantas, obedecendo a critérios visuais de vegetação, produção e identidade varietal. Estas foram marcadas para o acompanhamento do volume e qualidade da produção. Durante a primavera de 1996, antes da colheita, por ocasião do início da maturação dos cachos, iniciavam-se os trabalhos de seleção massal e definiram-se como parâmetros dessa seleção a produção por planta e o índice de fertilidade, estabelecendo arbitrariamente a produção mínima de 5,0 kg/planta e/ou índice de fertilidade dos ramos próximos ou superiores a 1,0. O clone 03, com produção de 1,5 kg/planta e índice de fertilidade de 0,77 foi mantido no *stand* como testemunha local. O teste DAS-ELISA foi realizado para verificar o estado sanitário dos 19 clones e presença ou não das seis principais viroses que ocorrem em videira. Observou-se a presença da virose do enrolamento da folha da videira (GLRaV-3) e da virose da canelura do tronco da videira (GVA). Não foram diagnosticados os vírus GVB, GLRaV-1, GFRV e GFLV em qualquer um dos clones testados. Todas as plantas positivas apresentaram produções médias superiores a 5,0 kg/planta (13,29 t/ha), comprovando que as variedades da espécie *Vitis labrusca* podem conviver com determinadas viroses. Para a análise de marcadores RAPD, foram amplificados 30 fragmentos polimórficos de DNA, utilizando-se sete "primers" da marca "Operon". Pelos resultados obtidos, a 65% de similaridade genética, os clones agruparam-se em 6 grupos distintos. A maior similaridade foi observada entre os clones 6 e 17; 16 e 18; 8 e 10 (100%). Apesar desses clones possuírem similaridades, apresentaram produtividades diferentes, tendo essas variações sido verificadas durante a prospecção clonal e, por isso necessitam ser reavaliadas durante uma posterior competição. A variabilidade genética entre os clones selecionados foi alta e verificada pela técnica de RAPD, ocorrendo devido a mutações espontâneas ao longo dos anos.

---

<sup>1</sup> Comitê Orientador: Dr. Murillo de Albuquerque Regina - EPAMIG, Caldas, MG (Orientador).

## ABSTRACT

VILLA, Fabíola. Clonal prospection for cultivar Folha de Figo (*Vitis labrusca* L.) in region of Caldas, MG. 2004. 72 p. Dissertation (Master in Crop Science) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.<sup>1</sup>

The productivity of cv. Folha de Figo in the region of Caldas, MG, is very low, due to, among others factors, the occurrence of viruses. It was objectified in this study to select and evaluate the genetic similarity of *Vitis labrusca*'s clones. The present work was realized in 1994, in EPAMIG's vineyard and particulars properties, where a first selection was proceeded from 137 plants, obeying the vegetation visual criteria, production and varietal identity. These had been marked for the accompaniment of the volume and quality of the production. During the spring of 1996, before the harvest, during the beginning of the maturation of the clusters, it was initiated the works of massal selection and defined as parameter of this selection the production for plant and the fertility index, establishing arbitrary 5,0 kg/plant as the minimum production and the fertility index as superior of 1,0. The clone number 03, with production 1,5 kg/plant and/or fertility index 0,77 was kept at *stand* as one it witness. The DAS-ELISA test was realized to verified the sanitary state of 19 clones and presence or not of six viruses that occur in grapevine. It was observed the presence of *Grapevine leafroll virus associated 3* (GLRaV-3) and the *Grapevine virus A* (GVA). The viruses GVB, GLRaV-1, GFRV and GFLV had not been diagnosed at clones tested. All the positives plants had presented the average productions superior of 5,0 kg/plant (13,29 t/ha), proving that the *Vitis labrusca* varieties can live together with viruses. For the analysis RAPD markers, had been amplified 30 DNA's polimorphic fragments, using seven primers (Operon). The gotten results, with 65% genetic similarity, the clones had been grouped in six distinct groups. The biggest similarity was observed between the clones 6 and 17; 16 and 18; 8 and 10 (100%). Although these clones shown similarities, they had presented differents productivity, being that these variations had been verified during the clonal prospection and, consequently, this clones must be reevaluated during a posterior competition. The genetic variability among clones selected was high, due to occurred spontaneous mutations to the long of the years.

---

<sup>1</sup> Guidance Committee: Dr. Murillo de Albuquerque Regina - EPAMIG, Caldas, MG (Major Professor).

# 1 INTRODUÇÃO

A videira foi introduzida no Brasil por volta de 1532, trazida pelos colonizadores portugueses, sendo todas as castas pertencentes à espécie *Vitis vinifera*. Devido à grande susceptibilidade dessas castas às doenças fúngicas nas condições climáticas onde foram implantadas e também à filoxera (*Dactylospheera vitifoliae* Fitch), inseto sugador que ataca as raízes, esta cultura encontrou dificuldades para se estabelecer. Em meados do século XIX, foram introduzidas cultivares de origem americana, principalmente as pertencentes às espécies *Vitis labrusca* e *Vitis bourquina* que, por sua rusticidade e produtividade, difundiram-se rapidamente pelas áreas vitícolas do país (Hidalgo, 1986; Sousa, 1996).

Atualmente, o setor vinícola brasileiro, concentrado no estado do Rio Grande do Sul, apresenta uma característica atípica relativamente aos países tradicionais produtores de vinhos e derivados da uva. Isso porque, enquanto naqueles são admitidos apenas produtos originários de variedades de uvas finas (*Vitis vinifera*), no Brasil, além destes, existem produtos originários de variedades americanas e híbridas (*Vitis labrusca* e *Vitis bourquina*), os quais representam mais de 80% do volume total de produção da cadeia produtiva, o que evidencia a existência de dualidade estrutural no setor (Protas et al., 2002).

A região de Caldas, situada no Sul de Minas Gerais, já foi considerada como importante ponto de referência para o país na produção de uvas e vinhos, por volta das décadas de 1940 a 60. No entanto, com o passar dos tempos, o envelhecimento dos parreirais e os elevados índices de ataques de pragas e doenças, aliados à descapitalização dos agricultores, causaram desestímulo aos produtores, culminando com grande queda na produção de uvas. Esta queda fez com que a região perdesse seu *status* de pólo vitivinicultor para outras regiões do país que investiram em tecnologia e manejo de produção, tal como o

Rio Grande do Sul. Este enfraquecimento da viticultura na região do Sul de Minas Gerais trouxe graves problemas, tanto sociais como econômicos, pois provocou o fechamento de várias adegas, enquanto que as que continuam suas atividades estão tendo problemas com a falta de matéria-prima para a elaboração de vinhos (Gonçalves, 1996).

A retomada da atividade vitícola desta região é extremamente importante, uma vez que concentra todos os requisitos para voltar a figurar entre os principais pólos produtores de uvas do país, como: clima, mão-de-obra especializada, proximidades dos principais centros consumidores e aptidão agrícola. Nesta região a cultivar Folha de Figo ('Ives', 'Bordô' ou 'Terci') encontra-se bem adaptada e ligada à característica dos vinhos e sucos locais, constituindo-se, a exemplo do que ocorre no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, numa das principais cultivares americanas de videira.

A produtividade média nacional da 'Folha de Figo' varia de 12 a 26 t/ha (Freire et al., 1992). Já para o Sul de Minas Gerais, esses valores caem para mais ou menos 1,27 kg/planta, para os plantios oriundos de plantas de pé-franco e 3,6 kg/planta para plantas enxertadas (Regina et al., 1998; Souza et al., 2002). Essa baixa produtividade deve-se à ausência de tratos culturais adequados, à não reposição de nutrientes retirados do solo por meio de adubação de restituição, e principalmente, à não utilização de porta-enxertos adequados, falta de controle das principais doenças fúngicas e, possivelmente, à ocorrência de viroses (Gonçalves, 1996).

Devido à importância econômica desta variedade para a viticultura brasileira e mineira, mesmo com todos os problemas citados anteriormente, o produtor da região insiste em mantê-la, fato que aponta para a necessidade de se restaurar as características originais da referida cultivar, principalmente de produtividade. Neste contexto, o atual trabalho tem como objetivo iniciar um programa de seleção clonal para a cultivar Folha de Figo, de forma a resgatar

possíveis mutações de interesse agrônomo e de sanidade comprovada, uma vez que ainda não existem no Brasil programas de seleção para esta cultivar.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A espécie *Vitis* spp.

Existem inúmeras espécies de videira já classificadas e catalogadas distribuídas entre regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo. O gênero *Vitis* é o único de importância econômica e alimentar, abrigando todas espécies de uso comercial, muito embora outros gêneros da família *Vitaceae* tenham grande importância como fonte de variabilidade genética para programas de melhoramento da videira (Sousa, 1996).

A área ocupada pela viticultura mundial é de aproximadamente 7,4 milhões de hectares, sendo a maior parte na Europa (Itália, França e Espanha, com 51,9% da produção). A produção obtida tem se mantido estável nos últimos anos e corresponde a cerca de 60 milhões de toneladas (Pommer, 2003).

O Brasil, atualmente, não figura na lista dos países maiores produtores de uvas, que são: Itália, França, Estados Unidos, Espanha, Turquia, China, Argentina e Irã (Pereira & Nachtigal, 1997; Pommer, 2003). Este cultivo, porém, apresenta grandes possibilidades de expansão no Brasil, principalmente no caso de uvas para mesa, devido à utilização de novas fronteiras agrícolas, de variedades mais promissoras, de novas tecnologias, aumento do poder aquisitivo da população e possibilidade de produção em praticamente todo o ano (Pereira & Nachtigal, 1997).



## 2.2 A videira no Brasil

O Brasil apresenta uma área plantada em torno de 56 mil hectares de videira e uma produção de 882,11 mil toneladas. Dessa produção, 42,7% são destinados para mesa e 57,3% para indústria, o que demonstra grande evolução do consumo de uvas na forma *in natura*, visto que, em 1980, a produção de uvas para mesa representava apenas 10,9% da produção total brasileira (Pereira & Nachtigal, 1997; Pommer, 2003).

Dentre os estados maiores produtores de uvas, destacam-se Rio Grande do Sul, São Paulo, Santa Catarina, Bahia, Paraná, Pernambuco e Minas Gerais. No Rio Grande do Sul, mais de 90% da produção de uvas destinam-se à elaboração de vinhos e sucos. Já nos demais estados, a produção destina-se, principalmente, ao consumo na forma de fruta fresca (Pereira & Nachtigal, 1997; Alvarenga, 2001; Protas et al., 2002).

As cultivares de uvas rústicas, que no conceito técnico internacional possuem baixa qualidade pois apresentam pronunciado sabor foxado, são muito bem aceitas pela população brasileira, que consome praticamente toda a produção das 'Niagaras' como fruta fresca, além de grande quantidade de sucos de uva e vinhos de "consumo corrente", elaborados a partir dessas uvas.

Atualmente, cerca de 9.000 ha de uvas rústicas de mesa são cultivadas no Brasil, concentrando-se a produção nos estados de São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Minas Gerais (Pereira & Nachtigal, 1997).

## 2.3 Cultivar Folha de Figo (*Vitis labrusca* L.)

Segundo Camargo e Dias (1986), esta variedade originou-se acidentalmente em 1840, nos EUA, a partir de uma semente de 'Alexander', uma labrusca muito cultivada nos arredores de Cincinnati, Ohio, onde foi selecionada e recebeu o nome de 'Ives' ou 'Ives Seedling', em homenagem a seu melhorista, Henry Ives.

No Brasil, as informações sobre essa cultivar são escassas e controversas. Gobbato (1940) apenas a cita entre outras videiras americanas e híbridas naturais, sem fazer qualquer referência sobre sua introdução, comportamento e cultivo no Brasil. Outros autores, como Silva Júnior (1888) e Paz (1898), nem a citam. Já Camargo (1994) diz que foi introduzida no Brasil, procedente de Portugal e se expandiu, assumindo diferentes nomes, como: 'Bordô' (RS), 'Cynthiana' (SC), 'Terci' (PR) e 'Folha de Figo' (MG).

Segundo Camargo & Dias (1986), essa cultivar caracteriza-se por ter ramo jovem de cor verde com aspecto ferruginoso, lanoso, com considerável quantidade de pêlos vermelhos; folhas jovens amarelo-queimado, lanosas na face superior e cotonosas na inferior, planas; folha adulta trilobada, seio peciolar em 'V' estreito, limbo ondulado e cacho pequeno, cilíndrico, às vezes alado, baga preta, pequena, esférica, sabor foxado intenso, muito rica em matéria corante.

No Rio Grande do Sul, é a segunda cultivar em ordem de importância, sendo empregada para a elaboração de vinhos, sucos e até mesmo para consumo *in natura* (Pereira, 2001). Segundo Gobbato (1942), na região de Caldas, Sul de Minas Gerais, foi introduzida em 1904, procedente de Portugal recebendo o nome de 'Folha de Figo'. Atualmente, vem sendo utilizada nesta região para a produção de sucos e vinhos tintos encorpados, de sabor foxado (característico de *Vitis labrusca*) e aroma marcante (Pereira, 2001; Gonçalves et al., 1999;

Silva, 1998; Camargo, 1994; Camargo & Dias, 1986). Caracteriza-se por ser rústica e apresentar alto teor de matéria corante para a produção de vinho, contribuindo assim para a sua fixação na região de Caldas, MG (Abrahão et al., 1993). Em Minas Gerais, 96% das cultivares produtoras de uva para vinho são representadas pela 'Folha de Figo' e 'Jacquez' em Caldas e Andradas, respectivamente (Gonçalves, 1996).

A produção média por planta da 'Folha de Figo' encontra-se muito baixa atualmente, em torno de 1,27 kg/planta (produtividade de 3.386 kg/ha), para os plantios oriundos de plantas de pé franco. Segundo Gonçalves (1996), essa queda na produção deve-se à ausência de tratamentos culturais adequados, falta de controle das principais doenças fúngicas, ocorrência generalizada de viroses, à não reposição de nutrientes retirados do solo por meio de adubação de restituição e, principalmente, à não utilização de porta-enxertos adequados.

## **2.4 Viroses**

Desde longo tempo observam-se, em videiras de todas as partes do mundo, doenças estranhas que se manifestam por alterações nas folhas, ramos e frutos, acompanhadas de acentuado raquitismo da planta, falência da produtividade, seguidas de aniquilamento e até morte de plantações inteiras. O agente causal de tais anomalias permaneceu há mais de um século desconhecido, mas revelou, desde logo, seu caráter infeccioso, capaz de transmitir de plantas doentes para as sadias, afetando as videiras em reboleiras dentro dos vinhedos (Sousa, 1969).

Todas as viroses, mesmo aquelas que não induzem sintomas em determinadas cultivares, interferem, de maneira geral, nos processos fisiológicos da planta (respiração, fotossíntese, reprodução, etc.), causando prejuízos, como diminuição no número e tamanho de cachos, má fecundação, maturação

irregular e queda no teor de açúcar da uva, redução da vida produtiva das plantas e morte de mudas e plantas adultas (Kuhn et al., 1996).

Mundialmente, na cultura da videira, já foram identificados 44 vírus diferentes, pertencentes a 5 famílias e 16 gêneros (Martelli & Walter, 1998). Andrade & Peruzzo (1993) afirmam que a videira é afetada por cerca de 25 viroses. Fajardo et al. (2003) afirmam, entretanto, que são conhecidas cerca de 50 doenças de origem viral. Algumas dessas viroses são encontradas ocasionalmente na videira e, aparentemente, não têm expressão econômica. Outras, embora causem prejuízos importantes, somente ocorrem em algumas regiões do mundo, talvez pelo plantio de cultivares sensíveis ou pelas condições edafoclimáticas regionais que favoreçam a ocorrência de vetores (Kuhn, 1996).

Entretanto, existe um grupo dessas doenças de grande importância pelos sérios prejuízos causados na viticultura, razão pela qual são objeto de constante atenção nos programas de seleção sanitária dos diversos países vitícolas.

Os vírus são partículas ultramicroscópicas constituídas, em sua maior parte, por um filamento simples de ácido nucléico envolto por uma série de proteínas chamada capsida. São geralmente transmitidos por enxerto, multiplicação vegetativa e vetores (pulgões, tripes, nematóides, cochonilhas, etc.) (Galet, 1982). Devido à sua presença na maior parte dos vinhedos e à sua grave incidência econômica, numerosos trabalhos de pesquisa foram realizados nos últimos tempos, sobretudo, a partir dos anos 1960. Em Jerez de La Frontera, na Espanha, a presença de viroses é amplamente estudada (Garcia de Luján, 1997).

Os *Nepovirus* são os mais disseminados e na Europa são denominados degenerativos (*Grapevine fanleaf virus* - GFLV). Outro grupo de importância são os *Closterovirus*, cujo principal representante em videira é o *Grapevine leafroll virus 2* (GLRV-2).

Para confirmar a presença de vírus em vegetais, deve-se recorrer a testes de diagnose, tais como a sorologia (ELISA), microscopia eletrônica, técnicas moleculares e plantas indicadoras.

Segundo Kuhn (1984) e Pearson & Goheen (1996), as viroses consideradas mais importantes e relatadas em videira são: GFRV ou GFkV (*Grapevine fleck virus*), GFLV (*Grapevine fanleaf virus*), GVA (*Grapevine virus A*), GVB (*Grapevine virus B*), GLRaV-1 (*Grapevine leafroll virus associated 1*) e GLRaV-3 (*Grapevine leafroll virus associated 3*).

#### 2.4.1 GFRV (*Grapevine fleck virus*)

O vírus GFRV ou GFkV (*Grapevine fleck virus*) é isométrico, não envelopado, com 30 nm de diâmetro e causador de uma doença denominada comumente como mancha das nervuras, a qual está bastante disseminada pelos países vitícolas do mundo. Normalmente, afeta a maioria das cultivares de videira, provocando sintomas latentes. Quando os sintomas aparecem, são caracterizados por pequenas manchas cloróticas nas nervuras da terceira e quarta ordens e áreas adjacentes do parênquima, constituindo um mosaico de nervuras e folhas com superfície ondulada e ligeira curvatura dos bordos para cima. Os sintomas são mais intensos nas folhas jovens e médias da brotação de primavera. A doença foi descrita pela primeira vez em *Vitis vinifera*, na França, por Vuittenez e colaboradores, em 1966 (Brunet et al., 1995), com o nome de “marbrure”.

No Brasil, esta virose foi identificada nos vinhedos de São Paulo (Kuniyuki, 1976) e do Rio Grande do Sul (Kuhn, 1989). Sua transmissão ocorre por enxertia.

#### 2.4.2 GFLV (*Grapevine fanleaf virus*)

As partículas desse vírus são isométricas, não envelopadas e com 30 nm de diâmetro (Brunt et al., 1995).

O GFLV (*Grapevine fanleaf virus*) foi descrito primeiramente em *Vitis vinifera*, na Áustria, por Rathay, em 1883 (citado por Brunt et al., 1995). Trata-se de uma das enfermidades mais importantes da videira, incidindo grandemente nos rendimentos por seus efeitos sobre a perda do vigor e vitalidade dos vinhedos. No Brasil, a doença é conhecida como doença dos entrenós curtos ou degenerescência da videira. Pertence ao gênero *Nepovirus*, família Comoviridae e é caracterizada por pequenas manchas arredondadas e translúcidas, distribuídas irregularmente nas folhas da brotação de primavera ou manchas em forma de anéis e faixas cloróticas, em ziguezague, que também podem ser observadas nas áreas entre as nervuras principais e secundárias de algumas folhas. Ramos severamente afetados apresentam folhas pequenas e ligeiramente deformadas, entrenós curtos, crescimento paralelo, achatamento e nós duplos; o achatamento também pode aparecer no pecíolo e gavinha, proliferação de gemas e bifurcação.

Sua transmissão dá-se, principalmente, pelos nematóides do gênero *Xiphinema index* (Hewitt et al., 1970), *Xiphinema italiae* (Cohn et al., 1970), *Xiphinema diversicaudatum*; por sementes (raro) e por enxertia.

#### 2.4.3 GVA (*Grapevine virus A*)

O vírus caracteriza-se por ser filamentososo, não envelopado e com 800 nm de comprimento.

O GVA (*Grapevine virus A*) possui sinonímia como *Kober stem grooving virus* ou vírus A da videira e é uma doença conhecida por canelura do

tronco. Foi descrito pela primeira vez em Taranto, na Itália, em *Vitis vinifera*, por Conti et al. (1980), com o nome de “legno riccio” e pertence ao gênero *Vitivirus*. No Brasil, a doença é conhecida com os nomes de cascudo, lenho rugoso ou caneluras do tronco. O sintoma mais comum é a presença de engrossamento da casca do tronco que fica com aspecto escamado e corticento. A casca tende a penetrar no tronco, formando reentrâncias quando retirada (caneluras). As plantas afetadas desenvolvem-se menos, apresentam menor vigor, a brotação das gemas atrasa de quatro a cinco semanas e tem a vida produtiva reduzida. Sua transmissão dá-se por vetor (cochonilha - Família *Pseudococcidae*), inoculação mecânica (planta indicadora - *Nicotiana glutinosa*) ou por enxertia.

#### 2.4.4 GVB (*Grapevine virus B*)

Pertence ao gênero *Vitivirus* e o vírus caracteriza-se por ser filamentososo, com 1400-2000 nm de comprimento.

O GVB (*Grapevine virus B*) possui sinonímia como vírus B da videira ou *Grapevine corky bark disease*, e é conhecida como doença do intumescimento dos ramos. Foi descrita primeiramente em *Vitis vinifera* na Suíça e Itália, por Gugerli et al. (1984) e Milne et al. (1984). No Brasil foi constatada nos estados de São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Kuhn, 1992). Os sintomas de intumescimento dos ramos são observados no campo com facilidade nas cultivares Isabel, Niagara Rosada e Niagara Branca (*Vitis labrusca* L.). Nelas, o sintoma mais característico da doença é o intumescimento dos entrenós de ramos do ano, com fendilhamento longitudinal do tecido afetado. Também pode ocorrer o intumescimento com fendilhamento no pecíolo das folhas próximas às regiões intumescidas dos ramos. Sua transmissão dá-se por vetor (inseto-*Psyllidae*) e por enxertia.

A doença denominada canelura do tronco da videira, na verdade é causada por um complexo de viroses, cujos principais vírus são o *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine virus C* (GVC) e *Grapevine virus D* (GVD) (Chevalier et al., 1995).

#### 2.4.5 GLRaV (*Grapevine leafroll virus associated*)

O vírus é filamentososo com 1800 - 2000nm de comprimento.

A virose do enrolamento das folhas, causada pelo *Grapevine leafroll virus associated* - GLRaV, possui 8 estirpes (GLRaV-1 a -8) descritas, reconhecidas e sorologicamente distintas que, isoladamente ou em mistura, causam sintomas similares (Fajardo et al., 2000). O GLRaV-1, -3, -4, -5, -6 e -8 pertencem à família *Closteroviridae* e ao gênero *Ampelovirus*. Já o GLRaV-2 pertence à mesma família e ao gênero *Closterovirus*. O GLRaV-7 pertence à mesma família e não é classificado quanto ao gênero. Recentemente, por meio de detecção molecular, foi proposta uma nova estirpe desse vírus, denominado GLRaV-9 (Alkowni et al., 2002).

Esta doença associada ao vírus do enrolamento das folhas, ainda não foi muito bem caracterizada, devido ao grande número de estirpes existentes (Candresse & Martelli, 1995). Trata-se da principal virose em ocorrência nos vinhedos brasileiros. No Brasil, a doença ocorre com incidência próxima a 100% em variedades de maior importância econômica. Em variedades sensíveis, como a 'Cabernet Franc', pode provocar reduções de 42% no número de cachos, 63% na produção de uva e de 2,7° Brix no teor de açúcar dos frutos. Nas variedades 'Merlot' e 'Sémillon', pode reduzir a produção de uva entre 40% a 50% (Fajardo et al., 2003). Apesar de poucas informações disponíveis acerca dos prejuízos causados pelo vírus, observações têm mostrado que plantas infetadas de muitas variedades são menos desenvolvidas e menos produtivas do que as sadias.



A existência do GLRaV-1, GLRaV-2 e GLRaV-3 já foi demonstrada em vinhedos brasileiros. Há indicações experimentais de que o GLRaV-3 é o que prevalece dentro dos vinhedos e de que o complexo desses vírus contém algum componente que está serologicamente relacionado com o vírus da tristeza dos citros, o *Citrus tristeza virus* (Kuniyuki, 2003).

Sua transmissão é feita por enxertia e por espécies de cochonilhas, *Pseudococcus longispinus* e *Planococcus ficus* (GLRaV-3). Foi citada pela primeira vez como uma doença de origem viral na Alemanha, em 1936, quando o patógeno foi transmitido por enxertia (Kuhn, 1992). No Brasil, foi constatada pela primeira vez em 1972, nos vinhedos do estado de São Paulo (Kuniyuki, 2003).

Em *Vitis labrusca* e híbridas, os sintomas não são característicos: nas folhas das cultivares Niagara Branca, Niagara Rosada e Concord, observa-se apenas um leve enrolamento, enrugamento e, às vezes, queimadura entre as nervuras no fim do ciclo, bem como redução no desenvolvimento da planta (Kuhn, 1992).

Os sintomas do vírus do enrolamento da folha em *Vitis vinifera* são: o enrolamento para baixo das bordas das folhas, acompanhado de um avermelhamento forte do limbo, para cultivares tintas e amarelamento para cultivares brancas, permanecendo as nervuras, normalmente, com a cor verde natural. As plantas muito afetadas apresentam fraco desenvolvimento, baixa produtividade e a uva não completa a maturação.

#### **2.4.6 Formas de disseminação**

Embora haja grande variedade de estirpes de vírus na videira, algumas ocorrem de forma ocasional na planta, aparentemente sem causar danos ou prejuízos econômicos na cultura, devido à sua baixa capacidade patogênica ou

plantas com tolerância a estas estirpes. Outras porém, embora causem prejuízos econômicos importantes, estão restritas a determinadas regiões ou países, possivelmente condicionadas a certas tendências regionais, como o plantio de cultivares sensíveis ou em razão das condições edafoclimáticas que favorecem a ocorrência de vetores (Kuhn & Nickel, 1998).

Contudo, não se pode garantir que estes vírus pouco patogênicos não possam se tornar altamente patogênicos e prejudiciais às videiras quando resultante de acúmulo de diferentes vírus numa mesma planta ou em ambientes diferentes daqueles onde se encontram na forma latente. No entanto, a grande preocupação com a infecção e o controle das doenças viróticas incide sobre aquelas já identificadas que, comprovadamente, causam grandes prejuízos à cultura da videira como as que foram citadas anteriormente (Kuhn & Nickel, 1998).

A disseminação natural do vírus por vetores começou a ser considerada a partir da década de 80, com a constatação da transmissão pelas espécies de cochonilha *Planococcus ficus*, *P. longispinus* e *Pseudococcus affinis* (Rosciglione et al., 1983, Boscia et al., 1993; Golino et al., 1995) e por nematóides *Xiphinema index* e *Xiphinema italiae* (Kuhn, 1984). A disseminação a longa distância ocorre por meio do material propagativo infectado, durante o processo de formação das mudas, independente do método de enxertia utilizado.

#### **2.4.7 Controle**

O controle das doenças causadas por vírus, utilizando métodos tradicionais curativos como é feito para outras doenças, é praticamente impossível, uma vez que as plantas infectadas vão sempre se manter infectadas. Os vírus da videira são sistêmicos, isto é, são translocados pela planta através do sistema vascular e, desse modo, perpetuam-se na planta após sua implantação, devendo-se, assim, realizar um controle preventivo (Amorim, 1996).

Dessa forma, é importante o uso de mudas isentas de vírus, buscando também o controle de vetores para evitar a infecção das plantas depois de instaladas no campo (Parish, 1995).

Para a obtenção de mudas livres de vírus deve-se recorrer a um programa de seleção sanitária. Este programa envolve uma série de etapas até se chegar as plantas matrizes, livres de viroses, que servirão como fonte de materiais para a propagação.

#### **2.4.8 Métodos de detecção de vírus**

Os vírus de plantas podem ter o seu genoma constituído de ssRNA (RNA de fita simples), dsRNA (RNA de fita dupla), ssDNA (DNA de fita simples) ou dsDNA (DNA de fita dupla). A maioria dos vírus de plantas apresenta genoma constituído de ssRNA, inclusive o GVA, GVB, GFLV, GFRV, GLRaV-1 e GLRaV-3 (Murphy et al., 1995).

A presença de vírus em uma planta pode ser diagnosticada por vários métodos. Os mais utilizados são os testes serológicos (ou sorológicos), biológicos, técnicas moleculares e microscopia eletrônica.

A caracterização biológica utiliza plantas indicadoras que apresentam sintomas típicos de fácil identificação, quando infectadas com o vírus patogênico.

A serologia é um importante complemento do método biológico, sendo um dos mais difundidos, rápido para o diagnóstico de vírus de plantas e também chamado de imunoenzimático "ELISA". Entretanto, este teste só pode ser aplicado para vírus que já tenha sido isolado e purificado, permitindo assim o preparo do antissoro (Kuhn, 1984).

Estes testes, tanto o biológico quanto o imunoenzimático, têm importância fundamental em programas de multiplicação para produzir, manter e

propagar material livre de vírus (Kuhn & Nickel, 1998).

Avrameas (1969) propôs, pela primeira vez, a utilização de imunoglobina conjugada a uma enzima para detecção de antígenos e anticorpos. No entanto, o uso do conjugado com a finalidade de detectar e quantificar a Imunoglobina G foi descrita por Engvall & Perlmann (1971), que denominaram este método de ELISA ('Enzyme linked Immunosorbent Assays').

O método ELISA baseia-se no princípio da serologia, no qual o antígeno é reconhecido pelo antissoro (imunoglobina) que lhe deu origem, formando o complexo antígeno-anticorpo, associado a propriedades colorimétricas, ou seja, o teste utiliza anticorpos marcados com enzimas que indicam a presença de vírus pela transformação de um substrato incolor que, depois de hidrolizado pela enzima, torna-se amarelo (EMBRAPA-CNPH, 2002).

A coloração ocorre devido à ação de determinada enzima (previamente conjugada à imunoglobina) sobre um substrato cromogênico. Este aspecto difere o teste ELISA dos demais testes serológicos mais tradicionais empregados em virologia que utilizavam-se de reações de precipitação para obter seus resultados (Clark & Adams, 1977).

Muitas plantas, principalmente as de natureza lenhosa, como *Prunus*, contêm compostos que podem dar origem a reações não específicas indesejáveis que mascaram as reações devidas ao vírus ou podem, ainda, inibir reações imunológicas ou enzimáticas nos testes ELISA (Clark & Adams, 1977; Gomes, 2002). A intensidade das reações não específicas no teste ELISA, devido a compostos existentes em certas plantas, segundo esses autores, pode ser reduzida ou eliminada pelo uso de aditivos ao tampão de extração ou pela diluição do extrato foliar.

Dependendo da natureza e idade do material vegetal utilizado no ELISA, podem surgir interferências, resultando em reações inespecíficas, o que impede a comprovação da presença do vírus (Fajardo, 1994).

Variações do teste ELISA têm sido desenvolvidas, mas o DAS-ELISA (double-antibody sandwich) tem sido o mais utilizado na detecção de viroses em plantas (Clark & Adams, 1977; Borgo, 1990). No ELISA direto duplo sanduíche utiliza-se a IgG e o conjugado produzidos em apenas um animal. Este teste requer um determinado conjugado para cada tipo de vírus a ser detectado, o que torna o método mais caro que o ELISA-indireto. O ELISA-indireto por outro lado envolve a cobertura da placa com a suspensão do vírus, seguida da adição do anticorpo específico, o qual é conjugado a uma enzima específica. Assim como no DAS-ELISA e no ELISA-indireto, o último passo é a adição de substrato adequado para que se possa visualizar a reação colorimétrica da enzima conjugada (Van Regenmortel, 1982).

A técnica ELISA pode ser aplicada para vírus de diferentes tipos morfológicos, tanto em preparados purificados, quanto em extratos brutos. Este teste é bastante sensível, detectando concentrações tão baixas quanto 1 a 10 µg/mL e tem sido bastante explorado para a diagnose de vírus em plantas (Truta, 1997).

Este teste vem sendo muito utilizado para o monitoramento sanitário (viroses) de clones de videira, por ser específico, simples, sensível, rápido e por permitir o processamento de um grande número de amostras. Depois das primeiras experiências realizadas a partir dos anos 1980, esta técnica está adquirindo um interesse sempre maior, seja pela pesquisa (em relação a novos antisseros, confiança e reprodução dos resultados de vários lotes de produção), seja pela aplicação da mesma, na seleção e multiplicação de materiais vitícolas (Peressini et al., 1991).

## 2.5 Seleção clonal

O homem começou a cultivar a videira (*Vitis vinifera*), aproximadamente, 5000 anos a.C. Na Europa, foram selecionados tipos superiores, a partir de uvas silvestres, que foram domesticadas gradualmente. Assim, a maior parte das cultivares utilizadas na viticultura atual foi selecionada antes de qualquer documentação ampelográfica histórica. Os problemas com a produção de uva nos vinhedos europeus começaram a aparecer depois da introdução de pragas e doenças procedentes do Novo Mundo, nos anos de 1850 até 1878, particularmente com a infestação pela filoxera (*Dactylosphaera vitifoliae* Fitch) em 1863. Esta e outras pragas e doenças eram desconhecidas nos antigos vinhedos que haviam sido plantados até 1850 (Pearson & Goheen, 1996).

Em 1878, somente 20% dos vinhedos alemães produziam uvas satisfatórias. Este pobre rendimento conduziu à primeira seleção clonal que precedeu o desenvolvimento de técnicas modernas, como o melhoramento genético das plantas por meio de cruzamentos, controle fitossanitário e o uso amplo de material resistente à filoxera (Villalba, 1998).

Na França, o melhoramento da produção pela seleção de plantas cultivadas é estabelecido e usado desde a origem da agricultura. Os viticultores foram os responsáveis, especialmente, deste domínio, por séculos, permitindo que este país possua, hoje, uma herança varietal de uma riqueza inestimável (Boidron et al., 1993).

A seleção clonal da videira, na França, iniciou-se em 1960, com o Instituto National de la Recherche Agronomique (INRA), com o objetivo de colocar à disposição dos viticultores um material vegetativo mais sadio e, ao mesmo tempo, apresentando melhores características culturais e de produção. A partir de 1962, com a criação da Association Nationale Technique pour

**l'Amélioration de la Viticulture (ANTAV atual ENTAV), os trabalhos de seleção naquele país passaram a ser coordenados de forma conjunta pelo ENTAV/INRA (Boidron et al., 1993).**

**Na Itália, a seleção clonal desenvolveu-se no começo dos anos 1970, pela iniciativa do Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) e, sucessivamente, do Ministero di Agricoltura e Foreste, com o objetivo de fornecer à viticultura italiana um material propagativo de identidade certa, com características positivas típicas da população e sanitariamente seguro (LA SELEZIONE, 2004).**

**Na Toscana, tem-se notícia do início das pesquisas com melhoramento genético de *Vitis vinifera* em 1960, homologando cinco novos clones após 16 anos de seleção. Na Sicília, relatos mostram que a seleção clonal das principais variedades de uva para vinho iniciou-se em 1971, individualizando-se 5 clones, após verificação das características ampelográficas, fertilidade das gemas e produção, análise do mosto e do vinho e suas características organolépticas (Bambara et al., 1981). Estas atividades são desenvolvidas em institutos de pesquisas (CNR, Universidades, Istituto Sperimentale di Viticoltura del Ministero dell'Agricoltura) e também em entidades regionais e empresas privadas. Após 20 anos de intensa seleção conduzida na Itália, atualmente estão registradas, no Catálogo Nacional, cerca de 500 clones de *Vitis vinifera*, sendo a maioria de variedades para vinho e 127 porta-enxertos (Mannini, 2000)**

**No Brasil, a seleção sanitária (leva à seleção clonal) já tem sido efetuada há mais ou menos 20 anos, particularmente pelos Centros de Pesquisa, como a EMBRAPA-CNPUV e a Seção de Fitovirologia do IAC. Atualmente já existe um bom número de matrizeiros instalados no país com material de qualidade, notadamente em empresas estaduais de pesquisa.**

**Com os resultados já obtidos e o intercâmbio com outras entidades de pesquisa nacionais e internacionais, a EMBRAPA-CNPUV dispõe, atualmente, de matrizes livres de vírus de 20 cultivares de porta-enxertos e 57 cultivares de**

produtoras (vinho/suco/mesa), sendo 49 produtoras viníferas, quatro americanas e quatro híbridas, que estão conservadas *in vitro*, casa de vegetação e telado. Aquelas cultivares de porta-enxertos e produtoras de interesse comercial são multiplicadas em matrizeiros destinadas à distribuição anual de material vegetativo para produção de mudas (Kuhn et al., 1996).

Em Minas Gerais, as pesquisas em relação à seleção clonal ainda são recentes, restringindo-se à EPAMIG - Fazenda Experimental de Caldas, com as cultivares Folha de Figo (*Vitis labrusca* L.) e Jacquez.

Ainda que a seleção clonal seja um processo complexo e longo, que requer o apoio de uma bagagem considerável de conhecimentos técnicos e científicos especializados, os seus objetivos e linhas gerais de desenvolvimento resultam relativamente em argumentos simples de se expor.

Em primeiro lugar, é necessário compreender que as variedades existentes não são definidas, mas sim plantas de enorme variabilidade.

Na Galícia, Espanha, um exemplo dessa variabilidade é de um complexo denominado 'Godello'. Esta variedade é de cultivo muito antigo e, ao longo de sua história multissecular, sofreu uma infinidade de cruzamentos realizados por viticultores ancestrais. Estes cruzamentos seguiram critérios os mais variados no tempo e no espaço, ou por apreciações qualitativas do tipo puramente pessoal (Hernández Mafias [1993?]).

Um clone é a descendência vegetativa correspondente a uma planta escolhida por sua identidade indiscutível, suas características fenotípicas e seu estado sanitário. O comportamento produtivo e qualitativo dessa planta é determinado baseando-se em numerosos parâmetros, tais como: produção, tamanho da baga, composição polifenólica, percentagem de açúcar, fertilidade e conseqüente produtividade, susceptibilidade a fitopatógenos, sanidade (viroses), dinâmica de maturação, características químicas e organolépticas do vinho. O potencial produtivo e tecnológico de cada clone está estritamente ligado também



ao lugar onde se realizou a seleção (LA SELEZIONE, 2004; Hernáez Mañas [1993?]).

A seleção clonal, que é a individualização e isolamento dos biótipos das diferentes variedades de uva (clones), baseia-se na uniformidade e singularidade das gemas de cada planta isoladamente. Uma gema pode modificar suas características por causa de uma variação de seu patrimônio genético. Essa variação chamada de mutação, que pode ser global ou setorial, quando identificada, propaga-se por via vegetativa.

Segundo Camargo (2000), o melhoramento genético de uma cultivar tradicional é feito pela seleção e perpetuação de variação de sua forma original, decorrentes de mutações do tipo quimera, propagáveis vegetativamente.

Um exemplo de mutação, alteração cromática ou somática foi a seleção do ‘Pinot Cinza’ e o ‘Pinot Blanc’ que surgiram do ‘Pinot Noir’; do ‘Muscat Cannon Hall’ que é uma forma tetraplóide de ‘Moscatel de Alexandria’; ‘Rubi’ e ‘Benitaka’ derivadas da Itália, entre outras.

Outra mutação muito famosa foi o ‘Brunello’, variedade tinta que deu origem ao ‘Brunello de Montalcino’, na Toscana italiana. É um clone da ‘Sangiovese’ que, pela sua importância, é identificado como variedade.

As variações referentes às características fisiológicas ou fenológicas que podem apresentar importância cultural são diferentes das características morfológicas, de difícil identificação e passam despercebidas. Muitas mutações ocorridas até hoje passaram certamente despercebidas e aumentaram a variabilidade genética dos parreirais cultivados, constituindo assim uma população muito grande de clones. Por outro lado, se a mutação interessa uma característica visível, como a cor da baga, a novidade é facilmente evidenciada e assim nos encontramos seguramente à frente de uma nova cultivar (Gribaudo & Gay, 2000).


Em 1967, em um vinhedo italiano de 'Malvasia di Candia aromatica' do Piacentino, uma mutação gemária ('Malvasia vermelha') em relação à cor do cacho, rosa intenso antes que branco, foi evidenciada por Fregoni (1974). Analogamente, nos anos 1970, na Toscana, durante a seleção clonal do 'Canaiolo', foi individualizado um 'Canaiolo rosa', com boas características enológicas.

Para o 'Sangiovese', em vinhedo na província de Forlì, foi observada uma mutação gemária com despigmentação dos cachos, isolada no Istituto di Coltivazioni Arboree di Bologna. Em 1969, em Cisterna di Latina foi descoberta uma nova variedade de 'Cardinal', da qual as bagas maturavam de 7-10 dias antes das outras, sendo a nova cultivar denominada 'Early Cardinal' (Manzo et al., 1983).

Um exemplo nacional recente de mutação foi o descoberto em 15 de agosto de 2001, em um vinhedo de Urânia, São Paulo. Uma planta de 'Redimeire', com cachos normais, ou seja, com bagos de formato oval longo e coloração rósea, produziu um cacho típico da uva 'Itália', com seus tradicionais bagos elipsóides e coloração amarelo-âmbar. Esse fato representa uma reversão do mutante 'Redimeire' para as características fenotípicas da variedade que lhe deu origem, a uva 'Itália' (Pires et al., 2001).

Para a cultivar Folha de Figo, por se tratar de cultivar americana introduzida em Minas Gerais há mais de 100 anos, em condições ecológicas diferentes daquelas de sua origem, presume-se que tenha ocorrido o surgimento de clones, pois a videira é sensível à ocorrência de mutações.

A seleção clonal tem como objetivo identificar, selecionar e propagar clones superiores oriundos de variações somáticas e sempre é conduzida com dualidade de objetivos, ou seja, obter clones geneticamente superiores e com garantia sanitária (Camargo, 2000). Assim, os melhores resultados são obtidos quando a seleção clonal é conduzida em paralelo com a seleção sanitária ou



virológica, de modo a propagar somente os clones naturalmente saudáveis ou livres de vírus por meio de técnicas de limpeza, como a termoterapia e/ou a cultura de meristemas (Mannini, 2001).

### 2.5.1 Prospecção

A metodologia aplicada aos trabalhos de seleção clonal e sanitária é muito variada, porém, no que diz respeito à parte de seleção clonal, o esquema mais indicado, segundo Villalba (1998), Boidron (2000) e Regina (2001), é o da prospecção. Este esquema visa a identificação, no vinhedo, de plantas com identidade varietal bem definida, sem sintomas de viroses e com potencial de produção ou fertilidade dentro dos objetivos estabelecidos para cada programa de seleção. Normalmente, as prospecções são efetuadas em parcelas com mais de 25 anos de idade e de preferência, em regiões de cultura ainda pouco visitadas, onde as chances de ocorrência de variação são maiores.

As prospecções duram, normalmente, um a dois anos na mesma parcela e as plantas escolhidas são marcadas e suas estacas recuperadas no período de repouso vegetativo, por ocasião da poda.

Plantas livres de viroses, ou seja, de agentes patogênicos capazes de induzir doenças, são obtidas mediante programas de curto e longo prazo. Os de curto prazo são essencialmente baseados na seleção visual por meio da escolha de plantas vigorosas, produtivas, aparentemente sãs, que possam posteriormente ser fonte de material para sucessivas propagações. Este método, praticado instintivamente pelos viticultores, constitui-se de uma série de controles visuais, os quais são realizados no momento em que a expressão sintomatológica das diversas viroses é observada.

## 2.5.2 Seleção sanitária

A seleção sanitária consiste em utilizar as técnicas de monitoramento do estado sanitário dos mesmos, por meio de indexação biológica e/ou teste Elisa. Em caso de reação positiva para qualquer uma dessas viroses, os clones são eliminados imediatamente. Em caso de reação negativa, o material é introduzido em centros de seleção, e passa a ser representado por uma única planta, normalmente cultivada em vaso. Em seguida, este material passará pelos testes sanitários de indexagem em plantas indicadoras durante 2 ou 3 anos. Ocorrendo a manifestação de viroses durante as indexagens, o clone será eliminado ou, em casos especiais, em que os clones possuem um interesse particular em multiplicação, tratado por termoterapia ou cultura de meristemas.

Segundo Barlass (1982), Iri et al. (1982) e Savino et al. (1990), a técnica de cultura de meristemas, combinada ou não com a termoterapia, vem apresentando crescente importância, devido aos bons resultados que tem oferecido para produção de material propagativo livre de vírus. Além disso, sua aplicação tornou-se de maior valor, pois tem possibilitado a obtenção de clones de videira livres de viróides que são de difícil eliminação por meio de termoterapia.

As 6 principais viroses testadas durante a seleção sanitária da videira são: GFRV (GFkV) ou mancha das nervuras, GFLV ou degenerescência da videira ou vírus dos entrenós curtos, GVA ou canelura do tronco ou *Kober stem grooving*, GVB ou *Corky bark disease* ou intumescimento dos ramos, GLRaV-1 ou estirpe 1 do vírus do enrolamento da folha, GLRaV-3 ou estirpe 3 do vírus do enrolamento da folha.

### **2.5.3 Seleção genética**

Realizada ao mesmo tempo que os testes de pureza sanitária, a seleção genética dos clones é imprescindível para a verificação de suas potencialidades de produção e de qualidade. O material introduzido nos centros de seleção, se manifestar reação negativa no teste ELISA para as viroses, é inicialmente introduzido em uma coleção de estudo. As avaliações normalmente começam a partir do quarto ou quinto ano de instalação e devem prolongar-se por, pelo menos, cinco anos.

Os candidatos a clones escolhidos (sintomáticos e assintomáticos) devem ser testados singularmente para se verificar a presença de vírus e de agentes virais que determinam danos economicamente relevantes e que eventualmente devam ser certificados.

Ao final da seleção clonal e sanitária, sem esquecer da importância de uma correta conservação de sanidade da fonte primária, tendo à disposição plantas sanitariamente melhores, ou seja, isentas pelo menos dos vírus e das viroses economicamente importantes, é possível começar a multiplicação para produzir material de propagação destinado aos viticultores.

### **2.5.4 Multiplicação e difusão**

É um complemento indispensável dos trabalhos descritos previamente. Os dados obtidos nas fases de prospecção, seleção sanitária e genética fornecem informações sobre a adaptação de clones para as situações da região onde são testados os produtos para os quais são destinados: uva para mesa, para vinho tinto ou branco. Para a cultivar Folha de Figo, a finalidade é de uva para vinho.

Os sistemas nacionais de certificação do material de propagação da videira de alguns países, como a Itália, prevêm que os clones obtidos com a

seleção clonal e sanitária serão registrados (homologados) oficialmente somente se possuírem requisitos genéticos e sanitários válidos. Desse ponto, os “candidatos clones”, segundo protocolos técnicos oficiais, são submetidos a posterior verificação sanitária e validação das características fenológicas, agrônômicas, produtivas e enológicas mediante a criação de campos de homologações apropriados por pelo menos três anos.

As normas da Comunidade Econômica Européia para homologar um clone de uva para vinho ou para mesa são as seguintes:

- 1) uniformidade de caracteres em 24 cepas sobre dois porta-enxertos diferentes;
- 2) ter três anos de produção no mínimo;
- 3) resultados obtidos em dois campos experimentais localizados em duas regiões ecologicamente diferentes.

O procedimento para a homologação dos clones, segundo Calò (1977), dura geralmente de 8 a 10 anos. Este tempo pode parecer longo, mas é metade do tempo necessário em outros países com o mesmo programa, como a Alemanha, por exemplo.

Quando a seleção clonal de *Vitis labrusca* na região de Caldas for finalizada, poder-se-ão obter-se os primeiros frutos desse programa, destinados a multiplicar-se rapidamente nos próximos anos, permitindo assim o fornecimento de material genético de qualidade superior aos viticultores.

## **2.6 Marcadores moleculares RAPD e filogenia genética**

Os marcadores moleculares tem sido utilizados extensivamente e vêm desempenhando papel fundamental na identificação de cultivares, na determinação de diversidade genética, na verificação da pureza genética, em mapeamento de genes e, principalmente, na identificação de marcas que

permitem a seleção de caracteres específicos e de interesse (Andreani Júnior, 1998).

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA, os quais incluem os marcadores do tipo: Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Williams et al., 1990); Sequence Characterized Amplified Regions (SCAR); Sequence Tagged Sites (STS) (Paran e Michelmore, 1993); Microsatélite (Litt & Lutty, 1989); Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (Goto-Yamamoto, 1997) e Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Helentjaris et al., 1985; Gillet, 1991). Este último foi a primeira metodologia aplicada a plantas.

Em videira, o RFLP foi utilizado pela primeira vez empregando sondas heterólogas de microsatélites (Strien et al., 1990). Esta é uma técnica complexa e de alto custo, um dos motivos pelos quais novos métodos têm sido desenvolvidos com base na amplificação de seqüências genômicas, mediante reação de amplificação em cadeia (Polymerase Chain Reaction - PCR). Assim, segundo Satub et al. (1996), podem-se fazer análises, partindo-se de uma pequena quantidade de DNA e com protocolos relativamente mais simples.

Uma das formas de caracterização dos recursos biológicos é por meio da amplificação casualizada do DNA polimórfico (RAPD). Esta técnica é obtida através de PCR e utiliza oligonucleotídeos iniciadores de síntese ("primers") de seqüência arbitrária, que tendem a produzir uma freqüência relativamente alta de polimorfismo, é um método rápido e eficiente (Fairbanks et al., 1993). Os oligonucleotídeos têm sido utilizados para reproduzir segmentos de DNA genômico em várias espécies de plantas (Williams et al., 1993). Com a ajuda de métodos estatísticos apropriados, a técnica RAPD tem sido efetiva em detectar a diversidade de população em vários tipos de organismos (Chen et al., 1995).

Polimorfismo de fragmentos RAPD são visualizados, como presença e ausência de bandas em um gel de eletroforese, e podem, assim, ser facilmente interpretados e convertidos em dados para diagnósticos de homologia molecular entre indivíduos (Ferreira & Gratapaglia, 1995).

Em frutíferas, os marcadores moleculares são utilizados para várias finalidades, que vão desde estudos de identificação de variedades triploides em bananeira (Bhat et al., 1995), mapeamento genético (Quantitative Trait Loci - QTL) em cacauero (Crouzillat et al., 1996), caracterização de variedades em videira (Ulanovsky et al., 2002) e melancia (Hawkins et al., 2001) e estimativa de diversidade genética em macieira (Oraguzie et al., 2001).

Em *Vitis vinifera*, existem vários exemplos de aplicação de RAPD, tanto para diferenciar cultivares como para mapeamento genético (Ye et al., 1993; Weeden et al., 1994; Lodhi et al., 1994). Porém, alguns autores mostraram restrições no uso do RAPD para a realização de estudos genéticos em videira, principalmente devido à sua reduzida reprodutibilidade (Buscher et al., 1993; Xu et al., 1995). Existem antecedentes indicando que tal metodologia pode ser usada para este fim (Collins & Symons, 1993; Gogorcena et al., 1993; Jean-Jaques et al., 1993; Qu et al., 1996; Bavaresco et al., 1996; Stavrakakis et al., 1997; This et al., 1997). Além disso, estudos recentes desenvolvidos na Galícia (Espanha), em relação à homogeneidade genética da cultivar Albariño (*Vitis vinifera* L.) têm demonstrado alto nível de reprodutibilidade (Vidal et al., 1998).

O RAPD também tem sido usado para identificar progenitores de videira, como é o caso do estudo da origem de uma variedade, a 'Müller-Thurgau' (*Vitis vinifera* L.), uma das mais cultivadas na Europa Central (Buscher et al., 1994). Também tem sido aplicado para diferenciar cultivares geneticamente muito relacionadas, como 'Sultanina' x 'Sultanina Seedless', sendo uma derivada da outra por mutação (Bakalinsky et al., 1993;



Striem et al., 1994) ou, ainda, para discriminar um grupo de 14 cultivares do grupo Moscatel (Stavrakakis & Biniari, 1998).

Os marcadores moleculares ajudaram os melhoristas a superar, em parte, as dificuldades encontradas nas caracterizações morfológicas, fenológicas e organolépticas da videira, permitindo a identificação direta no genoma, das diferenças genéticas entre indivíduos, obtendo, dessa forma, um perfil molecular (“fingerprinting”) característico para cada variedade. Segundo Johns et al. (1997), o uso dos marcadores moleculares também permitiu a obtenção de melhores estimativas da diversidade genética de uma determinada população.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local do trabalho e seleção massal dos vinhedos**

O presente trabalho iniciou-se em 1994, por meio da seleção massal e do acompanhamento da produção de um grupo de plantas da cultivar Folha de Figo em vinhedos instalados no município de Caldas, MG, situado a 1.150m de altitude, 21°40' de latitude S e 40°C de longitude W. O clima apresenta temperatura média anual de 19°C, com médias das mínimas de 13°C e das máximas de 26°C, umidade relativa de 75% e precipitação pluviométrica total de 1.500mm anuais.

Esta seleção foi realizada visualmente por meio do vigor e produção de plantas, com as características de identificação varietal (forma e coloração das folhas, ramos e cachos) e sem sintomas de viroses. Inicialmente, foram selecionadas 27 plantas em vinhedo da EPAMIG, nas quais procedeu-se o acompanhamento da produção durante quatro anos. Durante a colheita foi feita a pesagem da produção (kg/planta), medição do teor de açúcares (°Brix), da acidez

total (meq/mL), do pH e avaliação do índice de fertilidade dos ramos de cada planta, calculado pela fórmula:

$$\text{Índice de fertilidade de gemas/planta} = \text{número de cachos/ramos}$$

Ao mesmo tempo, durante a primavera de 1996, por ocasião do início da maturação dos cachos, iniciaram-se os trabalhos de seleção massal com outros viticultores do município de Caldas, MG. Foram escolhidos 17 viticultores distribuídos nas diferentes regiões vitícolas do município, procurando identificar diferentes condições ecológicas (tipo de solo, exposição, vegetação adjacente) de forma a aumentar as possibilidades de identificação de clones mutantes superiores. Percorreram-se os vinhedos selecionando-se visualmente as plantas mais produtivas e com identidade varietal indiscutível. Foram escolhidos somente vinhedos de pé-franco e com idade superior a 20 anos, de forma a reduzir os riscos de infecção pela enxertia.

A partir da primeira seleção massal, definiram-se como parâmetros de seleção a produção por planta e o índice de fertilidade, estabelecendo arbitrariamente a produção mínima de 5,0 kg/planta e/ou índice de fertilidade dos ramos próximo ou superior a 1,0. Foi mantida uma planta “candidata a clone” com produção e índice de fertilidade inferiores no “stand” como testemunha local.

Os clones inicialmente selecionados durante a fase de prospecção foram multiplicados por meio de estaquia em vasos e mantidos em casa de vegetação (5 repetições/planta) adubados por fertirrigação (Figuras 1, 2, 3 e 4).



Figuras 1, 2, 3 e 4: Plantas selecionadas mantidas em vaso sob estufa. EPAMIG, Caldas, MG, 2003.

### 3.2 Teste DAS-ELISA

O teste serológico foi realizado no Laboratório de Virologia da EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa Uva e Vinho (CNPUV), localizado em Bento Gonçalves, RS. Para a realização deste teste foram empregados antissoros da Agritest, da Itália e seguidas as recomendações dos fornecedores (antissoros monoclonais: GVA, GVB e GFRV e policlonais: GFLV, GLRaV-1 e -3).

Para o diagnóstico das viroses por este método sorológico, foram coletadas 10 folhas por planta. Para os vírus GFRV e GFLV, coletaram-se folhas jovens, próximo a região do ápice dos ramos durante a primavera. Para os vírus GVA, GVB, GLRaV-1 e GLRaV-3, foram amostradas folhas adultas, situadas na base dos ramos e durante o final do ciclo vegetativo. As folhas amostradas foram imediatamente acondicionadas em sacos plásticos e enviadas para o Laboratório.

O teste utilizado foi o DAS-ELISA, com diluição de 1:5 (p/v), ou seja, 1g de folhas + 5 mL de tampão de extração, sendo o controle negativo considerado como o extrato foliar da videira livre de vírus e o positivo (preparações parcialmente purificadas de cada virose) apresentando valor de absorbância (leitura), no mínimo, superior a duas vezes o valor verificado para o controle negativo.

As placas foram cobertas com solução de 200 µL de IgG (Imunoglobulina G) na detecção de cada virose (GLRV, GFLV, GVA, GVB, GLRaV-1 e GLRaV-3), diluída em tampão de revestimento ou de cobertura (carbonato de sódio 0,05M, pH 9,6), incubadas a 37°C, por 4 horas e lavadas três vezes com PBS, pH 7,4 e Tween 20 (detergente) a 0,05% (v/v) (PBS-T - tampão de lavagem). Em seguida, foram adicionados 200 µL de extrato foliar diluído 1:5 em tampão tris-HCl (antioxidante) 0,5M, pH 8,2, NaCl a 0,8% (p/v), PVP (polivinilpirrolidona) a 2% (p/v), PEG 6000 (antioxidante) a 1% (p/v) e Tween 20 a 0,05% (v/v). As placas foram incubadas a 4°C por 14 horas e lavadas com PBS-T, seguindo-se adição de 150 µL do conjugado diluído em tampão PBS-T com PVP a 2% (p/v) e albumina de ovo a 0,2% (p/v). Após incubação por 4 horas, procedeu-se a nova lavagem e adicionou-se o substrato da enzima em dietanolamina a 10% (v/v), pH 9,8 (Clark e Adams, 1977; citado por Fajardo, 2000). As leituras das placas foram realizadas a 405 nm em espectrofotômetro para placa ELISA Labsystems Multiskan MS.

### **3.3 Análise de RAPD**

#### **3.3.1 Coleta do material vegetal**

A análise de RAPD (Willians et al., 1990) foi realizada no Laboratório de Melhoramento Genético Florestal, no Departamento de Engenharia Florestal da UFLA, Lavras, MG. Para a realização do RAPD, foram coletadas folhas jovens das plantas da cultivar Folha de Figo existentes na EPAMIG de Caldas, MG.

Imediatamente após a coleta, as folhas foram identificadas, acondicionadas em sacos plásticos e mantidas em gelo até a chegada ao Laboratório. Em seguida, as folhas foram lavadas, secas, cortadas, maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  (freezer) até o início das análises.

#### **3.3.2 Extração do DNA genômico**

A extração do DNA foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular, no Departamento de Biologia da UFLA, Lavras, MG.

O método testado para a extração de DNA genômico foi o descrito por Lodhi et al. (1994), sendo este uma modificação do protocolo de Doyle & Doyle (1990).

Sabe-se que o genoma da videira (*Vitis vinifera*) é relativamente pequeno quando comparado a outras espécies perenes e acreditava-se que isso poderia facilitar os estudos em genética molecular (Lodhi et al., 1994). Porém, a extração do DNA de videira é bastante delicada, devido à presença de contaminantes, como polifenóis e polissacarídeos. Além disso para a obtenção de bons resultados em análises por RAPD (amplificação casualizada de DNA polimórfico), AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados

por fluorescência) ou qualquer outro tipo de estudo molecular, o DNA deve ser de boa qualidade. O que se deseja é que as extrações de DNA produzam amostras puras, de maneira a não inibir os tratamentos enzimáticos ou interferir nos padrões de migração e amplificação em gel de eletroforese.

A escolha do tecido vegetal é muito importante para uma boa extração, devendo-se utilizar tecidos jovens, no caso de videira. Segundo Ferreira & Grattapaglia (1995), esses critérios são ainda mais importantes em espécies que produzam grandes quantidades de metabólitos secundários que, em geral, interferem na extração de DNA.

Já existem várias metodologias para extração de DNA de plantas e microrganismos e observa-se alguma modificação de uma para outra, visando na maioria das vezes, resolver problemas específicos para cada espécie em estudo. No caso específico da videira, na metodologia descrita por Lodhi et al. (1994), foi utilizado NaCl e PVP (polivinilpirrolidone) para remover polissacarídeos e polifenóis, respectivamente.

Alguns protocolos podem fornecer DNAs degradados ou contaminados, que, mesmo possibilitando ampliações por PCR (Polimerase Chain Reaction ou reação em cadeia da polimerase), podem comprometer a reprodutibilidade das reações, resultando, muitas vezes, em falsos negativos (Romano, 1998).

Para a extração do DNA, foram utilizados 500 mg de tecido foliar fresco, triturado em N<sub>2</sub> líquido. Em seguida, o material foi transferido para tubo de 50 mL de centrifuga, juntamente com 5 mL de tampão de extração [20 mM de Na-EDTA; 100 mM de Tris-HCl; pH 8.0; 1.4M de NaCl; 2% de CTAB (brometo de cetiltrimetilamonio); 0,2% de β-mercaptoetanol] e adicionando-se 50 mg de PVP (Sigma, P6755). A mistura foi homogeneizada por inversão suave dos tubos.

A seguir, a mistura foi incubada a 60°C, em banho-maria, por 25 minutos, sendo homogeneizada a cada 5 minutos. Após esse período foram

adicionados 6 mL da mistura clorofórmio:octanol (24:1), homogeneizada suavemente por 10 minutos. A separação das fases orgânica e aquosa foi realizada por centrifugação a 6.000 rpm por 15 minutos, sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado pela adição de 0,5 volumes de NaCl 5M ao sobrenadante. Acrescentaram-se a seguir dois volumes de etanol 95% resfriado a -20°C e a amostra foi resfriada a 4°C, durante 15-20 minutos, para iniciar a precipitação do DNA.

A solução foi incubada durante uma hora à temperatura ambiente e centrifugada novamente a 5.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi coletado e o pelete lavado com etanol 76% gelado. O etanol foi decantado e o precipitado seco a 37°C, durante 20 a 30 minutos. O pelete foi dissolvido em 200 - 300 µL de TE (10 mM Tris-HCl e 1 mM de EDTA; pH 8,0) e armazenado a -20°C.

A quantificação do DNA foi realizada no Laboratório de Melhoramento Florestal em fluorímetro (Hoeffler DQ 200), utilizando-se padrões de DNA de concentração conhecida.

Após quantificação, foi preparada uma solução de trabalho com a concentração do DNA padronizada para 20ng/µL. O remanescente das amostras originais de DNA foi armazenado em TE a -20°C.

### **3.3.3 Amplificação do DNA genômico via RAPD**

Para a reação de amplificação do DNA, foram realizados ensaios de adequação das concentrações de DNA e de iniciadores, além de diferentes programas testados no termociclador.

Cada reação de RAPD foi realizada em um volume de 10 µL de solução com a seguinte composição: 20ng de DNA genômico; 100µL de cada um dos desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,4µM de um

oligonucleotídeo iniciador (“primer”); 0,2 unidades da enzima Taq DNA polimerase (GIBCO BRL); tampão de reação [50mM de tris pH 8,3; 20mM de KCl; 2mM de MgCl<sub>2</sub>; 5µg.µL<sup>-1</sup> de BSA (albumina soro bovino); 0,25% de Ficol 400; 10mM de tetrazine] e água pura. As reações foram feitas em tubos tipo “ependorf” de 0,2mL, em termociclador GeneAmp PCR System 9700, programado para 45 ciclos, nas seguintes condições: uma etapa de desnaturação de 2 segundos, a 94°C; 30 segundos, a 42°C para anelamento do iniciador e 30 segundos, a 72°C, para extensão. Uma última etapa de 2 minutos, a 72°C, foi realizada para a terminação da extensão.

### **3.3.4 Eletroforese**

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese, em gel de agarose 1%, em tampão TBE (0,045 M tris-borato e 0,001M EDTA), a 60 volts, por 120 minutos. Posteriormente, os géis foram corados com brometo de etídio na concentração de 0,5µL/mL, para a visualização das bandas em transiluminador de luz ultravioleta (Bio-Rad). Os géis foram fotodocumentados com auxílio de máquina Polaroid.

### **3.3.5 Análise dos dados de RAPD e similaridades genéticas**

A presença ou ausência de bandas RAPD foram marcadas por meio de interpretações visuais dos géis fotografados. Durante a avaliação dos géis, cada banda polimórfica foi tratada como carácter único. Os dados foram transformados em matriz de 1 (presença) e 0 (ausência) de todos os genótipos e posições dos fragmentos marcados. A estimativa da similaridade genética (S<sub>gij</sub>) entre cada par de genótipos foi feita pelo do programa NTSYS-PC 2.0 e efetuada pelo coeficiente “Simple Matching”, dado pela seguinte expressão (Rohlf, 1992):



$S_{gj} = m_{ij}/n$  em que:

$m = a$  (presença) +  $d$  (ausência) - presença e ausência de uma dada banda no par de genótipos  $i$  e  $j$ ;

$n$  = número total de bandas analisadas em  $i$  e  $j$ .

A representação simplificada das similaridades foi feita pela construção de dendrograma pelo método de agrupamento Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic Average - UPGMA (Rohlf, 1992).

Os valores de distância genética foram calculados baseados no coeficiente de Jaccard (Anderberg, 1973), utilizando-se a seguinte fórmula:

$D_{ij} = 1 - (B_{ij}/M_{ij})$  onde:

$D_{ij}$  = distância entre os genótipos  $i$  e  $j$ ;

$B_{ij}$  = número de bandas comuns a  $i$  e  $j$ ; e

$M_{ij}$  = número total de bandas analisadas em  $i$  e  $j$ .

A partir dos grupos discriminados pelo dendrograma, foi elaborada uma matriz de distâncias genéticas entre e dentro dos grupos, para identificar os pares de genótipos que potencializam a variabilidade entre os grupos aos quais pertencem, a fim de serem utilizados em cruzamentos preferenciais, em programas de melhoramento e conservação genética.

### 3.3.6 Caracterização da variabilidade genética

Foi utilizado o programa Population Genetic Analysis (Popgen 1.31) para a obtenção das estimativas de distâncias genéticas de Nei, índices de Shannon e estatísticas de  $F$  de Wright. Tendo em vista a natureza dominante dos dados, esse programa pressupõe, para os cálculos das estimativas das frequências alélicas, que os locos estejam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. As

freqüências alélicas foram estimadas a partir da raiz quadrada da freqüência do genótipo nulo (recessivo).

Os índices de diversidade e heterozigosidade observada e esperada foram calculados para cada loco, além das medidas de todos os locos. Os valores de heterozigosidade observada foram obtidos pela média do número de genótipos em cada loco e para a média dos locos. A heterozigosidade esperada, ou diversidade gênica, foi estimada pela média dos heterozigotos observados nos locos, obtida a partir da expressão sugerida por Nei (1978).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Prospecção clonal

#### 4.1.1 Vinhedo da EPAMIG

Dentre as 27 plantas inicialmente amostradas foram selecionadas 12 que apresentavam produção média próxima a 5,0 kg/planta (Tabela 1).

TABELA 1. Produção (kg/planta) dos diferentes clones da cultivar Folha de Figo durante quatro anos de observação na EPAMIG, Caldas, MG.

Clone	1994	1995	1996	1997	Média
1E	9,3	1,4	4,1	4,3	4,8
2E	9,0	4,1	8,1	8,3	7,4
3E	6,7	5,7	6,1	8,7	6,8
4E	8,5	5,0	6,3	10,8	7,6
5E	9,5	3,5	2,9	6,5	5,6
6E	6,6	5,2	6,9	9,8	7,1
7E	6,5	6,3	—	9,1	7,3
8E	8,1	4,6	6,1	10,7	7,4
9E	10,6	4,9	4,6	5,7	6,4
10E	9,9	—	11,9	9,6	10,4
11E	5,6	6,0	7,1	10,4	7,3
12E	6,8	4,3	7,2	9,4	6,9

E = EPAMIG

Pelos dados da Tabela 1 pode-se verificar que a produção média de quatro anos oscilou entre 4,8 e 10,4 kg/planta. Estes valores levam a uma produção média por hectare situada entre 12.796 e 27.726 kg/ha, se considerada a densidade usual de 2.666 plantas/ha, produtividade bastante superior àquela verificada na região de Caldas (Regina et al., 1998) e mostram a grande variabilidade de potencial produtivo existente entre plantas dentro de um mesmo vinhedo, corroborando a importância da seleção clonal para o aumento da produtividade.

Souza et al. (2002), estudando um grupo de plantas jovens de 'Folha de Figo' na EPAMIG de Caldas, MG, obtiveram uma produção de 3,6 kg/planta, valor bem abaixo do observado neste estudo.

As oscilações de produção verificadas entre anos para um mesmo clone podem ser atribuídas à ocorrência de desavinho (aborto das bagas e má formação do cacho), fato comum para esta cultivar (Ferreira et al., 2002) .

#### **4.1.2 Outros vinhedos do município de Caldas**

A prospeção realizada em 17 vinhedos particulares com plantas cultivadas em pé-franco e com idade superior a 20 anos, levou à identificação inicial de 137 plantas (Anexo 1A) que apresentavam melhor aspecto vegetativo, produtivo e sanitário, além de identidade varietal indiscutível.

Por ocasião da colheita, a pesagem da produção levou a uma oscilação da produção situada entre 1,150 e 15,410 kg/planta e índice de fertilidade entre 0,34 e 3,19 cachos/ramo (Anexo 1A). Comprova-se, assim, mais uma vez a grande variação do potencial produtivo das plantas existentes no interior dos vinhedos, demonstrando que, mesmo no interior de vinhedos com baixa produtividade, podem-se encontrar plantas com produção elevada, evidenciando a importância da seleção clonal.

Das 137 plantas inicialmente selecionadas, 13 apresentavam produção superior a 5,0 kg/planta (Tabela 2). As variações nos teores de açúcar e acidez total variaram entre 8,0-10°Brix e 3,8-6,5 meq/mL, respectivamente (Tabela 2).

Entretanto, as variáveis °Brix e acidez total não devem ser consideradas com muito rigor, pois a data de colheita foi determinada pelos viticultores empregando-se processos empíricos e não em função do estado de maturação da uva (curva de acúmulo de açúcares), o que poderia informar a real capacidade das diferentes plantas em acumular açúcares e ácidos orgânicos. Por outro lado, há que se considerar também que os altos índices pluviométricos verificados durante o período de maturação desta safra influenciaram negativamente nos teores médios de açúcar observados.

TABELA 2. Produção, °Brix e acidez total de clones da cultivar Folha de Figo selecionados nos viticultores. EPAMIG, Caldas, 1997.

Clone	Produção (kg/planta)	°Brix	Acidez (meq/mL)
1P	9,75	9,0	6,0
2P	11,8	9,0	3,8
3P	11,1	9,0	4,2
4P	9,7	9,0	3,9
5P	9,6	9,0	5,6
6P	9,4	10,0	5,4
7P	14,6	8,0	6,5
8P	10,4	10,0	6,4
9P	9,3	10,0	4,7
10P	9,3	11,0	5,3
11P	10,4	10,0	5,5
12P	15,4	10,0	5,4
13P	9,4	9,0	5,8

P = Produtor

Após avaliação do índice de fertilidade das gemas, uma vez que as plantas selecionadas apresentavam grande variação na carga de gemas, afetando a análise da produção, estabeleceram-se, de forma arbitrária, os limites mínimos

de produção de 5,0 kg/planta e/ou índice de fertilidade de 1,0, sendo então possível redefinir o quadro de plantas selecionadas em 19 clones.

Por ocasião da poda de inverno, foram retiradas estacas de cada uma das 19 plantas pré-selecionadas para multiplicação em vasos sob cultivo protegido. Em função da qualidade das estacas e da idade avançada das plantas, o enraizamento só foi possível em 19 clones, somados os selecionados na EPAMIG e nos viticultores (Tabela 3) que foram mantidos em vasos para a etapa posterior da seleção.

TABELA 3. Produção, teor de açúcares (°Brix), acidez total e índice de fertilidade de clones selecionados da cultivar Folha de Figo na EPAMIG, Caldas, MG, 1998.

Clone	Produção (kg/planta)	°Brix	Acidez (meq/mL)	Índice de fertilidade <sup>1</sup>
01	9,30	11,0	5,30	1,37
02	7,40	11,0	5,60	0,71
03*	1,50	9,0	3,90	0,77
04	6,48	12,5	3,92	2,65
05	7,29	11,5	4,51	2,76
06	14,60	8,0	6,60	1,87
07	7,88	10,5	3,43	2,29
08	4,80	14,0	4,70	1,63
09	7,68	9,5	4,31	2,29
10	8,00	9,0	5,30	0,86
11	9,65	9,0	5,70	1,49
12	11,15	9,0	4,20	1,61
13	8,35	9,0	4,70	1,02
14	7,41	13,0	3,82	1,64
15	7,40	10,0	5,20	1,00
16	11,80	9,0	3,80	3,19
17	10,40	10,0	6,40	1,38
18	15,40	10,5	5,40	1,08
19	5,64	11,0	4,61	2,25

\*Clone 3 = testemunha

<sup>1</sup> = Índice de fertilidade de gemas/planta = número de cachos/ramos

O clone de número 3, com produção e fertilidade de gemas inferiores foi mantido no *stand* como testemunha local.

#### **4.2 Análise de ocorrência de viroses**

A Tabela 4 apresenta os resultados dos testes sorológicos de DAS-ELISA direto, realizados nas folhas dos 19 clones da cultivar Folha de Figo, para a verificação das seis viroses estudadas.

Observou-se a presença da virose do enrolamento da folha da videira (GLRaV-3) nos clones 3, 4 e 14, ou seja, em 15,8% das amostras. A virose da canehura do tronco da videira (GVA) também se manifestou positiva nos clones 1, 2, 4, 5, 9 e 11, totalizando nove clones (47,37%) infectados. Não foram diagnosticados os vírus GVB, GLRaV-1, GFRV e GFLV em nenhum dos clones testados.

Estas mesmas viroses já foram descritas no Brasil para vinhedos de cultivares americanas no Rio Grande do Sul (Kuhn, 1992) e São Paulo (Kuniyuki & Costa, 1987). A virose que causa o enrolamento da folha da videira (GLRaV) já chegou a atingir 78% a 98% das produtoras viníferas, enquanto nos porta-enxertos, sua ocorrência foi de 15,6% a 33% das plantas amostradas (Fajardo et al., 2003).

No Rio Grande do Sul e São Paulo, o intumescimento dos ramos (GVB) tem sido constatado em cultivares americanas e viníferas, numa incidência de 2,3% a 20%. Em algumas áreas isoladas, a infecção é maior que 50%. No Brasil, a degenerescência da videira (GFLV) tem pouca expressão, com incidência de 2% a 3%. A mancha das nervuras da videira (GFRV) ocorre nos vinhedos brasileiros com frequência e com incidência de até 56% e 18,1% em cultivares de produtoras e de porta-enxertos, respectivamente (Fajardo et al., 2003).

Em 1987, foi realizado um levantamento em 30 municípios do estado de São Paulo, amostrando 20 variedades de copa e 15 de porta-enxertos, a fim de verificar sua sanidade em relação às viroses. Todas as borbulhas coletadas da variedade 'Italia' estavam contaminadas com o vírus do mosaico das nervuras (100% de incidência). Para as variedades 'Niagara Branca' e 'Niagara Rosada', o vírus do enrolamento da folha apresentou a maior incidência (100% em ambas as variedades). Com relação às variedades de porta-enxerto, o 'IAC-571-6', o 'Traviú' e o 'Rupestris-du-Lot' apresentaram, respectivamente, 100%, 36% e 33% de incidência do enrolamento da folha. A incidência de mosaico das nervuras naquelas variedades foi de, respectivamente, zero, 14% e 24% (Kuniyuki & Costa, 1987; Amorim, 1996).

TABELA 4. Ocorrência de viroses da videira em clones da cultivar Folha de Figo. EPAMIG, Caldas, MG. 2002.

CLONE	VÍRUS					
	GLRV	GFLV	GVA	GVB	GLRaV-1	GLRaV-3
01	CN	CN	CP	CN	CN	CN
02	CN	CN	CP	CN	CN	CN
03	CN	CN	CN	CN	CN	CP
04	CN	CN	CP	CN	CN	CP
05	CN	CN	CP	CN	CN	CN
06	CN	CN	CN	CN	CN	CN
07	CN	CN	CN	CN	CN	CN
08	CN	CN	CN	CN	CN	CN
09	CN	CN	CP	CN	CN	CN
10	CN	CN	CN	CN	CN	CN
11	CN	CN	CP	CN	CN	CN
12	CN	CN	CN	CN	CN	CN
13	CN	CN	CN	CN	CN	CN
14	CN	CN	CN	CN	CN	CP
15	CN	CN	CN	CN	CN	CN
16	CN	CN	CN	CN	CN	CN
17	CN	CN	CN	CN	CN	CN
18	CN	CN	CN	CN	CN	CN
19	CN	CN	CN	CN	CN	CN

CN = Controle negativo; CP = Controle positivo

Pode-se ressaltar que os 8 clones positivos foram identificados, tanto no vinhedo da EPAMIG quanto nos vinhedos particulares, ou seja, tratavam-se, ao mesmo tempo, de plantas enxertadas ou pé-franco, mostrando que a disseminação destas viroses pode ter sido feita tanto por enxertia/estaquia quanto pela ocorrência de insetos vetores.

Há de se considerar ainda que todas as plantas positivas apresentaram produções médias superiores a 5,0 kg/planta (13,29 t/ha), comprovando que as variedades da espécie *Vitis labrusca* podem conviver com determinadas viroses (Tabela 5).

TABELA 5. Produção média (kg/planta) dos clones com viroses da cultivar Folha de Figo. EPAMIG, Caldas, 1998.

Clone	Vírus	Produção (kg/planta)
01	GVA	9,30
02	GVA	7,40
03*	GLRaV-3	1,50
04	GVA e GLRaV-3	6,48
05	GVA	7,29
09	GVA	7,68
11	GVA	9,65
14	GLRaV-3	7,41

\* Clone 03 = testemunha

Dessa forma, pode-se considerar que o estado sanitário dos clones selecionados no Sul de Minas Gerais é relativamente bom e que as baixas produtividades diagnosticadas para estes vinhedos, a princípio, não são apenas de ordem sanitária, podendo ser atribuídas a outros fatores, tais como nutrição mineral e manejo, conforme já detectado por Regina et al. (1998).

Peressini et al. (1991), detectou por meio de DAS-ELISA a presença de três viroses testadas: GFLV, GLRaV-1 e GLRaV-3, em plantações de uva (*Vitis vinifera*), na região de Udine, na Itália.



Boscia et al. (1991) e Walter & Cornuet (1993) mostraram que o ELISA pode ser usado com sucesso para a detecção do vírus GLRV em *Vitis vinifera* e porta-enxertos americanos, representando assim uma alternativa no tempo de indexagem em plantas indicadoras de *Vitis rupestris* (Hewitt et al., 1972).

Kuhn et al. (2000), utilizando o DAS-ELISA e cultivares indicadoras, identificaram cinco viroses em 10 variedades de *Vitis vinifera* e híbridas na região do submédio São Francisco, no pólo vitícola de Petrolina/Juazeiro.

### 4.3 Caracterização filogenética por RAPD

A análise da variabilidade entre os 19 clones foi realizada utilizando sete oligonucleotídeos (marca OPERON), relacionados na Tabela 6. Foram amplificados 30 fragmentos polimórficos de DNA. Percebe-se que os clones avaliados dispõem de um enorme potencial para serem utilizados em programas de melhoramento visando ganhos genéticos significativos, desde que este polimorfismo molecular revelado corresponda a regiões ativas do genoma.

TABELA 6: Relação do número de produtos amplificados para cada “primer”, com suas respectivas percentagens de polimorfismo. UFLA, Lavras, MG, 2003.

“Primers”	% de polimorfismo	número de bandas	Seqüência 5' → 3'
OPM-11	16,7	5	GTCCACTGTG
OPN-06	13,3	4	GAGACGCACA
OPN-08	16,7	5	ACCTCAGCTC
OPN-12	16,7	5	CACAGACACC
OPN-13	13,3	4	GTCAGAGTCC
OPN-14	10,0	3	TCGTGCGGGT
OPO-05	13,3	4	CCCAGTCACT
<b>TOTAL</b>		<b>30</b>	

Os primers OPM-11, OPN-08 e OPN-12 foram os que amplificaram o maior número de fragmentos (cinco). A ocorrência de polimorfismo entre clones pode ser observada, por exemplo, ao se amplificarem as preparações de DNA com os “primers” OPN-08 e OPN-06 (Figuras 5 e 6).

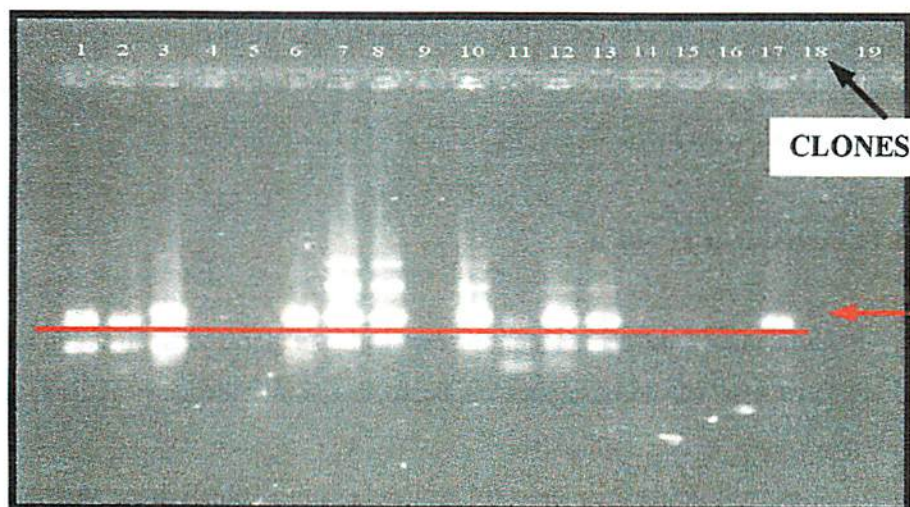


FIGURA 5: Gel de agarose (1%) com o “primer” OPN-08, com a seta indicando ocorrência de polimorfismo entre os clones na amplificação dos DNAs. UFLA, Lavras, MG. 2003.

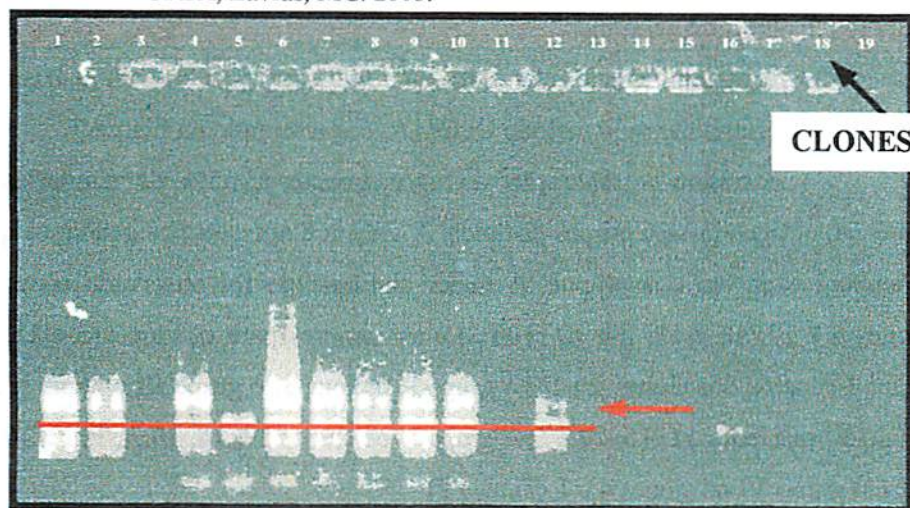


FIGURA 6: Gel de agarose (1%) com o “primer” OPN-06, com a seta indicando ocorrência de polimorfismo entre os clones na amplificação dos DNAs. UFLA, Lavras, MG. 2003.

O número de bandas polimórficas utilizadas em trabalhos de filogenia genética em plantas tem variado bastante, indo de 27, para a samambaia *Dryopteris cristata* (Lander Gott et al., 2001) até 289, para o feijão (Link et al., 1995). Segundo Dudley (1994), resultados obtidos com 30 a 100 bandas tendem a coincidir com informações baseadas no pedigree das amostras e, sendo assim, as 30 bandas obtidas podem ser consideradas suficientes para o propósito deste trabalho.

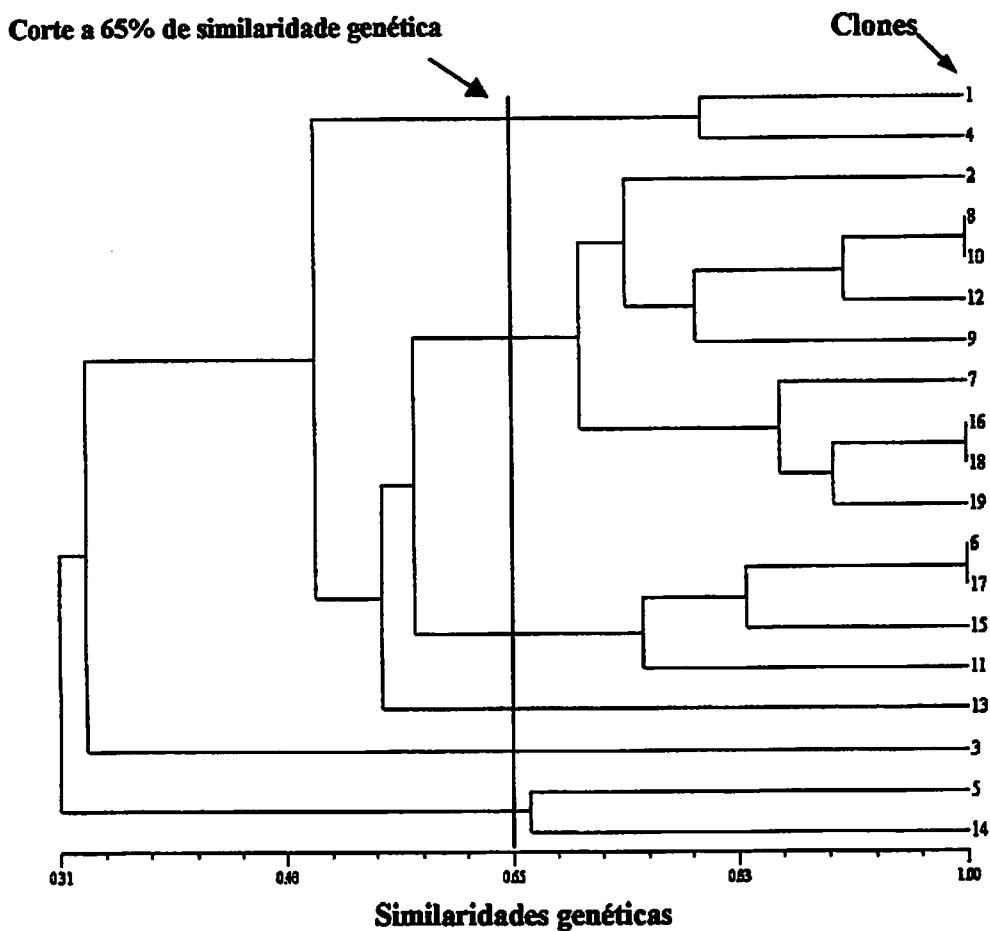
#### 4.3.1 Similaridade genética

Uma matriz de zero e um foi construída a partir dos 30 fragmentos polimórficos e serviu de base para o cálculo das similaridades genéticas entre todos os clones.

A análise de agrupamento foi realizada com o objetivo de verificar o poder de discriminação dos marcadores RAPD. Os resultados sugerem que tal discriminação foi bastante diferenciada, uma vez que os grupos incluíram números distintos de genótipos.

O agrupamento dos 19 clones de *Vitis labrusca*, com base na matriz das similaridades genéticas pelo método UPGMA, é apresentado na Figura 7.

Considerando a separação do agrupamento a 65% de similaridade genética, obtiveram-se 6 grupos distintos. A Tabela 8 apresenta os genótipos que compõem cada um dos grupos. A maior similaridade foi observada entre os clones 6 e 17; 16 e 18; 8 e 10 (100%) e as menores para os clones 3 e 13. O grupo I constou dos clones 5 e 14; o grupo II o clone 3; o grupo III o clone 13; o grupo VI os clones 11, 15, 17 e 6; o grupo V os clones 19, 18, 16, 7, 9, 12, 10, 8 e 2 e o grupo VI os clones 4 e 1 (Tabela 7).



**FIGURA 7.** Dendrograma das distâncias genéticas entre os 19 clones de videira, gerado pelo programa NTSYS-PC 2.0. UFLA, Lavras, MG, 2003.

**TABELA 7.** Agrupamento de genótipos de clones de 'Folha de Figo', discriminados em nível de 65% de similaridade genética. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Grupos	Clones
I	05 e 14
II	03
III	13
IV	06, 11, 15, 17
V	07, 08, 09, 10, 12, 16, 18, 19
VI	01, 04

#### 4.3.2 Distribuição da variabilidade genética.

A similaridade genética entre os clones variou de 0,31 a 1,00, com média de 0,65 (Tabela 8).

A análise genética em outras espécies de *Vitis vinifera* verificou variações na similaridade de 0,2 a 1,00 (Sawazaki et al., 1996), 0,60 a 1,00 (Tschammer & Zyprian, 1994) e de 0,56 a 0,91 (Fanizza et al., 2000), indicando que os clones da cultivar Folha de Figo (*Vitis labrusca* L.) estudados têm variação genética considerável.

O dendrograma possibilitou a interpretação dos resultados obtidos pela técnica de RAPD com a vantagem de mostrar o grau de similaridade entre os clones e agrupá-los de acordo com os dados obtidos.

Quando se obtém alta diversidade genética entre variedades de uma mesma espécie, pode-se concluir que esse material encontra-se num estágio de pouca domesticação. Dessa forma, uma cultura pouco manipulada pode ter seu polimorfismo facilmente acessado, pois, para isso, é necessário um pequeno número de “primers” (Xavier, 2001).

Silva (2002,) em estudo com uvas apirênicas, uma cultivar ainda pouco estudada, conseguiu identificar uma marca molecular específica pela técnica RAPD, utilizando o “primer” UBC 443 (TGATTGCTCG).

Fanizza et al. (2000), por meio de RAPD, obtiveram agregação entre genótipos com 484 bandas polimórficas e a utilização de 200 “primers”, indicando assim uma diversidade entre ‘Moscatos’ na região da Apulia (Itália).

Ye et al. (1998) investigaram a relação entre 16 cultivares de videira por meio de RAPD. De 53 “primers”, um total de 464 bandas foram geradas. Não foi detectado polimorfismo entre os clones de ‘Chardonnay’ e ‘Pinot noir’. ‘Auxerrois’ e ‘Melon’, por terem pais únicos, foram classificados como cultivares distintas.

TABELA 8. Distâncias genéticas entre os 19 clones da cultivar Folha de Figo, UFPA, Lavras, MG, 2003.

Cl	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
1	1,00																			
2	0,52	1,00																		
3	0,28	0,47	1,00																	
4	0,58	0,55	0,32	1,00																
5	0,58	0,22	0,16	0,29	1,00															
6	0,33	0,57	0,46	0,32	0,29	1,00														
7	0,39	0,53	0,43	0,32	0,30	0,67	1,00													
8	0,85	0,52	0,28	0,46	0,58	0,33	0,50	1,00												
9	0,56	0,78	0,37	0,59	0,19	0,44	0,58	0,56	1,00											
10	0,69	0,62	0,33	0,54	0,42	0,44	0,60	0,83	0,65	1,00										
11	0,32	0,64	0,42	0,37	0,28	0,70	0,50	0,32	0,50	0,38	1,00									
12	0,52	0,48	0,27	0,42	0,42	0,40	0,52	0,63	0,52	0,74	0,38	1,00								
13	0,46	0,29	0,32	0,42	0,48	0,39	0,45	0,46	0,35	0,54	0,30	0,68	1,00							
14	0,41	0,17	0,22	0,35	0,65	0,22	0,24	0,41	0,14	0,36	0,21	0,48	0,63	1,00						
15	0,54	0,50	0,40	0,36	0,50	0,50	0,47	0,54	0,41	0,38	0,57	0,27	0,25	0,29	1,00					
16	0,56	0,60	0,37	0,35	0,39	0,44	0,58	0,68	0,64	0,52	0,50	0,41	0,30	0,23	0,72	1,00				
17	0,56	0,52	0,44	0,46	0,39	0,44	0,43	0,56	0,44	0,41	0,42	0,36	0,40	0,39	0,72	0,71	1,00			
18	0,44	0,45	0,28	0,23	0,45	0,53	0,59	0,56	0,50	0,40	0,50	0,46	0,33	0,26	0,65	0,83	0,57	1,00		
19	0,67	0,35	0,21	0,31	0,67	0,39	0,50	0,73	0,44	0,58	0,36	0,64	0,52	0,46	0,48	0,63	0,44	0,71	1,00	

Embora muito cultivada e de grande importância econômica mundial, ainda há muito o que se pesquisar sobre a genética da videira. Segundo Reisch & Pratt (1996), este “atraso” deve-se, principalmente, à alta heterozigose e ao longo período de juvenilidade, característicos do gênero. Os estudos genéticos em videira intensificaram-se a partir de 1990, coincidindo com o advento da técnica RAPD.

Os resultados obtidos neste trabalho fornecem muitos subsídios para estudos futuros, principalmente pela utilização da cultivar Folha de Figo (*Vitis labrusca* L.) na indústria vinícola, visto que, na maioria dos trabalhos encontrados com marcadores moleculares em videira, foram utilizadas cultivares de *Vitis vinifera*, predominando as uvas destinadas à viticultura, que também é uma atividade econômica de grande importância mundial.

A natureza molecular dos fragmentos amplificados utilizando-se iniciadores arbitrários não está completamente elucidada e não se sabe ao certo se cada fragmento no gel pode ser considerado um caráter independente. De fato, tem sido demonstrado que muitos fragmentos RAPDs segregam como herança mendeliana, indicando um único locus por fragmento (Tinker et al., 1993; Silva, 2002). Entretanto, há uma alta probabilidade destes fragmentos amplificados conterem seqüências repetidas (Devos & Gale, 1992) que podem distorcer os resultados do dendrograma. A análise de um grande número de fragmentos, pelo uso de vários iniciadores (“primers”), contribui para diminuir este problema.

Ainda, devido a problemas de repetibilidade e dificuldade em acessar a homologia entre as bandas, a técnica RAPD tem sido criticada no uso das relações filogenéticas em espécies. Entretanto, desde que se obtenham géis de alto nível de definição (geralmente obtidos com géis de acrilamida) e se realize uma atribuição meticulosa entre presença e ausência de bandas, não existem



inconvenientes, exceto na dificuldade de análise do bandeamento, mas que, com dedicação, pode ser realizada com êxito.

Neste estudo de 19 clones selecionados, ocorreu grande variabilidade genética. Esta variabilidade não era esperada, pois os 137 clones inicialmente selecionados de 'Folha de Figo' foram obtidos de videiras bastante antigas, introduzidas por imigrantes no início da colonização de Caldas (algumas das videiras possuíam mais de 90 anos de existência). Além disso, a videira é uma espécie de propagação vegetativa, ou seja, baixíssima variabilidade genética, pois a recombinação de gametas não ocorre naturalmente.

A cultivar Folha de Figo, é uma cultivar americana introduzida em Minas Gerais há mais de 100 anos, em condições edafoclimáticas diferentes daquelas da região de origem. Por essa razão presume-se que ocorreu o surgimento de clones geneticamente distintos, pois a videira é sensível à ocorrência de mutações.

Como se supõe que esta cultivar foi introduzida na região a partir de material vegetal proveniente de um mesmo local ou, até mesmo, de um mesmo lote, era esperada pouca variabilidade genética entre eles, mesmo utilizando-se técnicas mais sensíveis para a detecção de polimorfismo, como microssatélites e AFLP. Portanto, outras forças evolutivas, tais como mutações espontâneas, podem estar ocorrendo, ocasionando a variabilidade genética.

Apesar de haver maior similaridade entre os clones 6 e 17; 16 e 18; 8 e 10 (100%), não se pode fazer uma correlação direta entre os dados gerados no RAPD e dados fenotípicos, principalmente porque a produtividade é uma característica complexa, controlada por vários genes de ação maior e menor. Além disso, há inúmeras variáveis neste estudo que não foram controladas para determinar características fenotípicas, como por exemplo, a carga viral de cada clone no momento da coleta e a variação da produtividade de cada clone em cada local, variou segundo o manejo do viticultor, etc. O efeito do ambiente,



não detectado pelo RAPD, também pode influenciar em muito as características estudadas neste trabalho.

As diferenças de produtividade e/ou fertilidade das gemas observadas durante a prospecção inicial podem ser devido à condição agronômica em que a planta estava inserida (mancha de fertilidade do solo, idade, etc.) e não necessariamente às variações genéticas para produtividade. Por isso, deve-se iniciar uma segunda etapa deste trabalho, a fim de colocar os clones selecionados em competição.

Este estudo é uma primeira etapa de prospecção, na qual buscou-se somente eliminar aqueles clones infectados por viroses e verificar a variação genética existente entre eles. A ligação entre os fatores ainda deverá ser analisada na próximas etapas. Devido a isso, em estudos futuros, deve-se realizar experimentos de produtividade com os clones, em condições mais homogêneas possíveis.

## **5 CONSIDERAÇÕES GERAIS**

A prospecção inicial dos clones mostrou a existência de grande variabilidade de produção e fertilidade no interior de plantas de um mesmo vinhedo, demonstrando a importância de se proceder seleção clonal para a cultivar Folha de Figo, visando aumentar a produtividade. Entretanto esta variação da produção e da fertilidade entre os clones selecionados deverá ser comprovada por meio de dispositivo experimental adequado, pois as variações observadas podem depender de outros fatores, como idade das plantas, fertilidade do solo, clima e manejo dos vinhedos. Para tanto, este mesmo material deverá ser colocado em competição sobre o mesmo porta-enxerto e em parcela homogênea, a fim de que sejam avaliados diferentes parâmetros agronômicos antes de se concluir sobre um clone mais produtivo.

A diagnose das viroses pelo teste ELISA mostrou que, embora em pequena escala e sem impacto direto sobre o volume da produção dos clones positivos, algumas doenças estão presentes nos vinhedos da cultivar Folha de Figo no Sul de Minas Gerais. Esse fato comprova a importância da seleção sanitária para garantir que futuros vinhedos sejam implantados com material sadio.

Os clones considerados sadios deverão passar por etapas posteriores de seleção sanitária, antes de serem considerados verdadeiramente sadios e multiplicados para formação de matrizeiro de borbulhas.

A técnica RAPD tem sido criticada no uso das relações filogenéticas, devido a problemas de repetibilidade e dificuldade em acessar a homologia entre as bandas. Entretanto, desde que se obtenham géis bem definidos e se realize cuidadosa atribuição entre presença e ausência de bandas, não existem inconvenientes, podendo assim, ser realizada com êxito.

Apesar dos clones 6 e 17; 16 e 18; 8 e 10 (100%) serem similares no RAPD, os mesmos apresentaram produtividades diferentes, tendo essas variações sido verificadas durante a prospeção clonal e, por isso, necessitam de serem reavaliadas durante uma posterior competição.

## 6 CONCLUSÕES

1. A variação de produção observada entre plantas de um mesmo vinhedo da cultivar Folha de Figo, em Caldas, MG, indicou a existência de clones mais produtivos.
2. Ocorreram as viroses do enrolamento da folha (GLRaV-3) e canelura do tronco (GVA) em vinhedos de 'Folha de Figo' de Caldas, MG.
3. A variabilidade genética, registrada pela técnica de RAPD, entre os clones selecionados foi alta.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, E.; ALVARENGA, A. A.; OLIVEIRA, N. C. de. 'Folha de Figo': importância e tradição na viticultura de Caldas - MG. *Boletim Técnico*, Lavras: ESAL, n. 17, p. 33-40, 1993.

ALKOWNI, R.; ROWHANI, A.; GOLINO, D. A. Partial nucleotide sequence and molecular detection of a putative new *grapevine leafroll associated virus*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 92, n. 6, p. 53, 2002. Supplement.

ALVARENGA, A. A. Avaliação de cultivares porta-enxertos e produtoras de videira (*Vitis* spp.) em condições de solos ácidos e alumínio. 2001. 153p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

AMORIM, L. Principais doenças das frutíferas de clima temperado. In: ENCONTRO SUL MINEIRO DE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 1., 1996, Poços de Caldas. *Anais... Poços de Caldas*: [s. n.], 1996. p. 49-55.

ANDERBERG, M. R. *Cluster analysis for applications*. New York: Academic press, 1973.

ANDRADE, E. R.; PERUZZO, E. L. Víroses da videira: caracterização e obtenção de matrizes livres dos principais vírus. *Agropecuária Catarinense*, Florianópolis, v. 6, n. 3, p. 10-13, 1993

ANDREANI JÚNIOR, R. Caracterização do sexo do mamoeiro (*Carica papaya* L.) através de marcadores moleculares e de microscopia eletrônica de varredura. 1998. 65p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

AVRAMEAS, S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry*, Oxford, v. 6, n. 1, p. 43-52, 1969.

BAKALINSKY, A. T.; WILSON, D.; ARULSEKAR, S. DNA fingerprinting of grape rootstocks. *American Journal of Enology and Viticulture*, Davis, v. 44, n. 468, 1993. Abstract.

BAMBARA, G.; PICCIOLO, F.; ROMEO, S.; REFATTI, E.; GRANATA, G. **Risultati della selezione di alcuni vitigni siciliani. SIMPOSIO INTERNAZIONALE SULLA SELEZIONE CLONALE DELLA VITE**, 1., 1981, Venezia. Venezia: C.N.R., 1981. p.370-378.

BARLASS, M.; SKENE, K. G. M.; WOODHAM, R. C.; KRAKE, L. R. Regeneration of virus-free grapevines using in vitro apical culture. **Annals of Applied Biology**, London, v. 101, n. 1, p. 291-295, Aug. 1982.

BAVARESCO, L.; CANTU, E.; FREGONI, M. Primi risultati sull'uso di marcatori RAPD su DNA proveniente da gemme dormienti di vite. **Vignevini**, Bologna, v. 23, n. 12, p. 11-13, 1996. Supplement.

BHAT, K. V., JARRET, R. L. Random amplified polymorphic DNA and genetic diversity in Indian Musa germplasm. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 42, n. 2, p. 107-118, June 1995.

BOIDRON, R. Evolution de l'assortiment varietal et clonal. Objectifs et methodes de selection. **Assises de la pépinière viticole**, Valence, p. 1-8, 2000.

BOIDRON, R.; BOIS, G.; MAYOUX, L. La sélection clonale de la Syrah. **Cahiers Techniques. Supplement au journal le vigneron des cotes du rhone et du sud-est**, n. 362, p. 6-9, June 1993.

BORGIO, M. Determinazione sierologica dei virus dell'arriciamento e dell'accartocciamento fogliare mediante test ELISA su organi legnosi della vite. **Rivista di Viticoltura e Enologia**, Conegliano, v. 3, n. 1, p. 3-13, 1990.

BOSCHIA, D.; MARTELLI, G. P.; SAVINO, V.; CASTELLANO, M. A. Identification of the agent of fleck disease. **Vitis**, Siebeldigen, v. 30, n. 2, p. 97-105, June 1991.

BOSCHIA, D.; SAVINO, V.; MINAFRA, A.; NAMBA, S.; ELICIO, V.; CASTELLANO, M. A.; CONSALVES, D.; MARTELLI, G. P. Properties of filamentous virus isolated from grapevines affected by cork bark. **Archives of Virology**, New York, v. 130, n. 1-2, p. 109-120, 1993.

BRUNT, A.; CROBTREE, K.; DALLWITZ, M.; GIBBS, A.; WATSON, L. **Viruses of Plants. Description and Lists from the VIDE Database**. 1484 p. 1995.

BUSCHER, N.; ZYPRIAN, E. BLAICH, R. Identification of grapevine cultivars by DNA analyses: Pitfalls of random amplified polymorphic DNA techniques using 10mer primers. *Vitis*, Siebeldigen, v. 32, n. 3, p. 187-188, Sept. 1993.

BUSCHER, N.; ZYPRIAN, E.; BACHMANN, O. BLAICH, R. On the origin of the grapevine variety Müller-Thurgau as investigated by the inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Vitis*, Siebeldigen, v. 33, n. 1, p. 15-17, Mar. 1994.

CALÒ, A. Disposizioni comunitarie e nazionali in tema di selezione dei vitigni e loro premoltiplicazione. Atti Seminario selezione vite da vino, Bari, 1977, p.19-37, 1977.

CAMARGO, U. A. Melhoramento genético da videira. A viticultura no Semi-Árido Brasileiro, 2000. p. 65-91. Petrolina: EMBRAPA-CPATSA, 2000. 368 p.

CAMARGO, U. A. Uvas para o Brasil Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 90 p. (EMBRAPA-CNPUV. Documentos, 9).

CAMARGO, U. A.; DIAS, M.F. Identificação ampelográfica de videiras americanas e híbridas cultivadas na MRH 311. Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPUV, 1986. 40 p. (EMBRAPA/CNPUV. Circular Técnica, 12).

CANDRESSE, T.; MARTELLI, G. P. Archives of Virology, New York, n. 1, p. 461, 1995. Supplement.

CHEN, J.; LAMIKANRA, O.; CHANG, C. J.; HOPINS, D. L. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Xylella fastidiosa*, Pierce's disease and oak leaf scorch pathotypes. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, v. 61, p. 1688-1690, May 1995.

CHEVALIER, S.; GREIF, C.; CLAUZEL, J. M.; WALTER, B.; FRITSCH, C. J. Use of an immunocapture-polymerase chain-reaction procedure for the detection of grapevine virus-A in kober stem gooving-infected grapevines. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v. 143, n. 6, p. 369-373, June 1995.

CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, Reading, v. 34, n. 3, p. 475-483, Mar. 1977.

- COHN, E.; TANNE, E.; NITZANY, F. E. *Xiphinema italiae*, a new vector of grapevine fanleaf virus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, n. 1, p. 181, Jan. 1970.
- COLLINS, G. G.; SYMONS, R. H. Polymorphisms in grapevine DNA detected by the RAPD PCR technique. **Plant Molecular Biology Reporter**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 105-112, 1993.
- CONTI, M.; MILNE, R. G.; LUISONI, E.; BOCCARDO, G. A closterovirus from a stem-pitting diseased grapevine. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, n. 5, p. 394-399, May 1980.
- CROUZILLAT, D.; LERCETEAU, E.; PETIARD, V.; MORERA, J.; RODRIGUEZ, H.; WALKER, D.; PHILLIPS, W.; RONNING, C.; SCHNELL, R.; OSEL, J.; FRITZ, P. *Theobroma cacao* L.: a genetic linkage map and quantitative trait loci analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 93, n. 1-2, p. 205-214, July 1996.
- DEVOS, K. M.; GALE, M. D. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. **Theoretical and Applied Genetic**, Berlin, v. 84, n. 5-6, p. 567-572, Aug. 1992.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Hitchin, v. 1, n. 1, p. 13-15, Jan. 1990.
- DUDLEY, J. W. Comparison of genetic distance estimators using molecular marker data. In: **ANALYSIS of molecular marker data**. Corvallis: Oregon, 1994. p. 3-7.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA 2002.  
Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br>> . Acesso em: 4 dez. 2003.
- ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, Oxford, v. 8, n. 9, p. 871-874, Sept. 1971.
- FAIRBANKS, D. J.; WALDRIGUES, A.; RUAS, P. M. Efficient characterization of biological diversity using field DNA extraction and random amplified polymorphic DNA markers. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 16, n. 1, p. 11-22, Mar. 1993.
- FAJARDO, T. V. M. Caracterização parcial de um isolado do *Grapevine fanleaf virus*. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 25, n. 3, p.505-511, set. 2000.

**FAJARDO, T. V. M. Imunodiagnóstico do mosaico da pimenta do reino causado pelo vírus do mosaico do pepino (CMV). 1994. 63 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG**

**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 virus 3*. *Fitopatologia brasileira*, Brasília, v. 27, n. 1, p. 58-64, 2000.**

**FAJARDO, T. V. M.; KUHN, G. B.; NICKEL, O. Doenças virais. In: FAJARDO, T. V. M. (Ed.). *Uva para Processamento: fitossanidade*. Brasília: EMBRAPA, 2003. p. 45-62. (Série Frutas do Brasil, 35).**

**FANIZZA, G.; CORONA, M. G.; RESTA, P. Analysis of genetic relationships among Muscat grapevines in Apulia (South Italy) by RAPD markers. *Vitis*, Siebeldigen, v. 39, n. 4, p. 159-161, Dec. 2000.**

**FERREIRA, E. A.; REGINA, M. de A.; ANTUNES, L. E. C.; CHALFUN, N. N. J. Antecipação de safra da videira 'Niagara rosada' no sul de Minas Gerais. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 1., 2002, Andradás. *Anais... Andradás: Atualizando Conceitos*, 2002. p. 287-295.**

**FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares RAPD e RFLP em análise genética. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1995. 220 p.**

**FREGONI, M. La 'Malvasia rossa': nuova mutazione gemmaria. *Frutticoltura*, Bologna, v. 36, n. 3, p. 5-8, Mar. 1974.**

**FREIRE, L. M. de M.; FREIRE, J.; CLADART, W. Transformações na estrutura produtiva dos viticultores da Serra Gaúcha : 1985/1992. Bento Gonçalves: EMBRAPA/CNPUV, 1992. 44 p. (EMBRAPA /CNPUV. Documentos, 7).**

**GALET, P. *Les maladies et les parasites de la vigne*. Montpellier: Paysan du Midi, 1982. v. 1, 1876 p.**

**GARCIA DE LUJÁN, A. *La viticultura del Jerez*. [S. l.]: Edicione Mundi-Prensa, 1997. p. 142-145.**

**GILLET, M. E. Genetic analysis of nuclear DNA restriction fragments patterns. *Genome*, Ottawa, v. 34, n. 5, p. 693-703, Oct. 1991.**

GOBBATO, C. **Manual prático de viticultura**. 4. ed. Porto Alegre: Globo, 1940. 356 p.

GOBBATO, C. **Manual do viti-vinicultor brasileiro**. Porto Alegre, Globo, 1942. v. 2, 473p.

GOGORCENA, Y.; ARULSEKAR, S.; DANDEKAR, A. M., PARFITT, D. E. Molecular markers for grape characterization. *Vitis*, Siebeldigen, v. 32, n. 3, p. 183-185, Sept. 1993.

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, n. 3, p. 408, 1995.

GOMES, G. A. C. **Divergência genética entre cultivares e certificação genética e fitossanitária de matrizes de bananeiras**. 2002. 127 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

GONÇALVES, C. A. A. **Comportamento da cultivar Folha de Figo (*Vitis labrusca* L.) sobre diferentes porta-enxertos de videira**. 1996. 45 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

GONÇALVES, C. A. A.; REGINA, M. de A.; CHALFUN, N. N. J.; ALVARENGA, A. A.; ABRAHÃO, E.; BERZOTI, E. Comportamento da cultivar Folha de Figo (*Vitis labrusca* L.) sobre diferentes porta-enxertos de videira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 21, n. 1, p. 7-11, abr. 1999.

GOTO-YAMAMOTO, N. Estimation of the relationship among grape cultivars based on AFLP analysis. *Journal American Society Enology and Viticulture*, Davis, v. 8, n. 3, p. 204-206, 1997.

GRIBAUDO, I.; GAY, G. Il miglioramento genetico delle uve da vino e da tavola. *Contributo della Scuola Italiana al progresso delle Scienze Vitivinicole*, AIVV, Siena, I, p. 63-82, 2000.

GUGERLI, P.; BRUGGER, J. J.; BOVEY, R. Grapevine leafroll: presence of viroses particles and development of an immuno-enzyme method for diagnosis and detection. *Revisite Suisse of Viticulture Arboriculture and Horticulture*, n. 16, p. 299-304, 1984.



HAWKINS, L. K.; DANE, F.; KUBISIAK, T. L. Molecular markers associated with morphological traits in watermelon. **HortScience**, Alexandria, v. 36, n. 7, p. 1318-1322, Dec. 2001.

HELIENTJARIS, T.; KING, G.; SLOCUM, M.; SIEDENSTRANG, C.; WEGMAN, S. Restriction fragment length polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 5, p. 109-118, 1985.

HERNÁNDEZ MAÑAS, J.L. (Dir.). **Selección clonal e sanitaria da vide en Galicia: I. Treixadura**. Galicia: Xunta de Galicia, [1993?]. 89p.

HEWITT, W. B.; GOHEEN, A.C.; CORY, L.; LUHN, C.F. *Grapevine fleck disease*, latent in many varieties, is transmitted by graft inoculation. **Annals of Phytopathology**, Paris, p. 43-47, 1972. (Hors Serie),

HEWITT, W. B.; MARTELLI, G.; DIAS, H. F.; TAYLOR, R. H. CMI/AAB **Description of Plants Viruses**, n. 28, p. 4, 1970.

HIDALGO, L. **Tratado de viticultura general**. Madri: Mundi-Prensa, 1986. 372 p.

IRL, M.; SHIMURA, T.; TOGAWA, H.; UENO, K. Elimination of grapevine viruses by meristem tip culture. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 5., Yamanakako, 1982. **Proceedings...** Yamanakako, Japan: [s. n.], 1982. p. 807-808.

JEAN-JAQUES, I.; DEFONTAINE, A. HALLET, J. N. Characterization of *Vitis vinifera* cultivars by random amplified polymorphic DNA markers. **Vitis**, Siebeldigen, v. 32, n. 3, p. 189-190, Sept. 1993.

JOHNS, M. A.; SKROCH, P.; NIENHUIS, J.; HINRICHSEN, P.; BASCUR, G.; MUNHOZ, C. Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. **CropScience**, Madison, v. 37, n. 2, p. 605-613, Mar./Apr. 1997.

KUHN, G. B. Ocorrência de uma infecção latente na videira (*Vitis* spp.) no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, n. 2, p. 151, 1989. Resumo.

KUHN, G. B. Principais vírus que ocorrem nos vinhedos brasileiros. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 10, n. 117, p. 62-68, set. 1984.

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. 27 p. (EMBRAPA-CNPUV. Circular Técnica, 16).

KUHN, G. B. Sanidade do material vegetativo em viticultura. In: ENCONTRO SUL MINEIRO DE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 1., 1996, Poços de Caldas. *Anais...* Poços de Caldas: [s. n.], 1996. p. 56-59.

KUHN, G. B.; FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O. **Viroses da videira identificadas na região do Submédio São Francisco no polo vitícola Petrolina/Juazeiro.** *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 25, p. 442-443, 2000. Suplemento Resumo.

KUHN, G. B.; LOVATEL, J. L.; PREZOTTO, O. P.; RIVALDO, O. F.; MANDELLI, F.; SÓNEGO, O. R. **O cultivo da videira: Informações básicas.** 2. ed. Bento Gonçalves: EMBRAPA/CNPUV, 1996. 60 p. (EMBRAPA-CNPUV. Circular Técnica, 10).

KUHN, G. B.; NICKEL, O. **Viroses e sua importância na viticultura brasileira.** *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 19, n. 194, p. 85-91, 1998.

KUNIYUKI, H. **Ocorrência do mosaico das nervuras da videira (*grapevine fleck disease*) em São Paulo.** *Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia*, Brasília, v. 9, p. 39, 1976. Resumo.

KUNIYUKI, H. **Viroses.** In: POMMER, C. V. *Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado.* [S. l.]: Cinco Continentes, 2003. p. 596-615.

KUNIYUKI, H.; COSTA, A.S. **Incidência de vírus da videira em São Paulo.** *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 12, n. 3, p. 240-245, 1987.

LANDERGOTT, U.; HOLDEREGGER, R.; KOZLOWSKI; SCHNELLER, J. J. **Historical bottlenecks decrease genetic diversity in natural populations of *Dryopteris cristata*.** *Heredity*, Oxford, v. 87, n. 3, p. 344-355, Sept. 2001.

LA SELEZIONE clonale in Italia. In: REGIONE Piemonte. *Agricoltura e Qualità.* 2004. Disponível em: <<http://www.regione.piemonte.it/agri/ita/piemontedoc/vino/vitigni/index.htm>>. Acesso em: 5 jan. 2004.

LINK, W.; DIXKENS, C.; SINGH, M.; SCWALL, M.; MELCHINGER, A. E. Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germoplasm revealed by RAPD markers. *Theoretical Applied in Genetics*, Berlin, v. 90, n. 1, p. 27-32, 1995.

LITT, M.; LUTTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, Chicago, v. 44, n. 3, p. 388-396, Mar. 1989.

LODHI, M. A.; GUANG-NING, Y. E.; WEEDEN, N. F.; REISCH, B. I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, Oxford, v. 12, n. 1, p. 6-13, 1994.

MANNINI, F. Miglioramento genetico - selezione clonale. *Contributo della Scuola Italiana al progresso delle Scienze Vitivinicole*, AIVV, Siena, I, p.85-107, 2000.

MANNINI, F. Effetti del risanamento da virus sulle attitudini di cloni di vite. *Speciale Difesa delle Vite. Informatore fitopatologico*, Bologna, v. 4, n. 1, p. 25-30, 2001.

MANZO, P.; TAMPONI, G. Una mutazione precoce dell'uva Cardinal: 'Early Cardinal'. *Frutticoltura*, Bologna, v. 45, n. 9/10, p. 9-10, 67-68, Sept./Oct. 1983.

MARTELLI, G.; WALTER, B. Virus certification in grapevines. In: Hadidi, A.; KHETARPAL, R.; KOGANEZAWA, H. (Eds.). *Plant virus disease control*. St. Paul, Minnesota: APS Press, 1998.

MILNE, R. G.; CONTI, M.; LESEMANN, D. E.; STELLMACH, G.; TANNE, E.; COHEN, J. Clostevirus-like particles of two types associated with diseased grapevines. *Journal of Phytopathology*, Hamburg, v. 110, n. 4, p. 360-368, 1984.

MURPHY, F. A.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; SUMMERS, M. D. *Virus taxonomy*. In: *REPORT OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES*, 6., 1996, New York. New York: Springer-Verlag, 1995.

- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, Baltimore, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.
- ORAGUZIE, N. C.; HOFSTEE, M.E.; BREWER, L.R.; HOWARD, C. Estimation of genetic parameters in a recurrent selection program in apple. *Euphytica*, Wageningen, v. 118, n. 1, p. 29-37, 2001.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical Applied Genetics*, Berlin, v. 85, n. 8, p. 985-993, Feb. 1993.
- PARISH, L. Production, distribution and inspection of fruit trees free from virus and other systemic diseases. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v. 17, n. 1, p. 14-18, 1995.
- PAZ, C. da. *Manual prático do viticultor brasileiro*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1898. 151 p.
- PEARSON, R. C.; GOHEEN, A. C. *Plagas y Enfermedades de la vid*. Ediciones Mundi-Prensa. The American Phytopathological Society. 1996, p. 47-76.
- PEREIRA, G. E. *Caracterização agrônômica de cultivares de videira para suco em Minas Gerais. Avaliação e análise sensorial dos sucos*. 2001. 126p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- PEREIRA, F. M.; NACHTIGAL, J. C. A cultura da videira no Brasil. In: FORO INTERNACIONAL DE CULTIVO PROTEGIDO, 1997, Botucatu. *Anais...* Botucatu: [s.n.], 1997. p. 194-225.
- PERESSINI, S.; MUCIGNAT, D.; BIANCHI, G. L.; COLUSSI, G. Utilizzazione del test ELISA per la valutazione dello stato sanitario nell'ambito della selezione clonale in viticoltura. *Rivista di Viticoltura e Enologia*, Conegliano, v. 3, n. 1, p. 27-33, 1991.
- PIRES, E. J. P.; SAWAZAKI, H. E.; TERRA, M. M. Redimeire: nova mutação da uva 'Itália'. *O Agrônômico*, Campinas, v. 53, n. 2, 2001.
- POMMER, C. V. *Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado*. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003. 778 p.

PROTAS, J. F. da S.; CAMARGO, U. A.; MELO, L. M. R. de. A viticultura brasileira: realidade e perspectivas. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 1., 2002, Andradadas. Anais... Andradadas: Atualizando Conceitos, 2002. p. 17-32.

QU, X.; LU, J.; LAMIKANRA, O. Genetic diversity in muscadine and American bunch grapes based on Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Journal of American Society of Horticultural Science*, Alexandria, v. 121, n. 6, p. 1020-1023, Nov. 1996.

REGINA, M. de A. **Seleção clonal, produção e certificação de mudas de videira.** Caldas, MG: EPAMIG, 2001. 95 p.

REGINA, M. de A.; ALVARENGA, A. A.; CHALFUN, N. N. J.; CHALFUN JUNIOR, A. Levantamento nutricional e diagnóstico agrônômico dos vinhedos de Caldas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v. 20, n. 1, p. 15-20, 1998.

REISCH, B. I.; PRATT, C. Grapes. In: JANICK, J.; MOORE, J. N. (Eds.) *Fruit Breeding: vine and small fruits*. New York: [s.n.], 1996. v. 2.

ROHLF, F. J. *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System: version 1.70*. New York: [s.n.], 1992. 470 p.

ROMANO, E. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Eds.). *Manual de transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA/SPI/EMBRAPA/CENARGEN, 1998. p. 163-177.

ROSCIGLIONE, B.; CASTELLANO, M. A.; MARTELLI, G. P.; SAVINO, V.; CANNIZZARO, G. Mealybug transmission of grapevine virus A. *Vitis*, Siebeldigen, v. 22, n. 4, p. 331-347, 1983.

SATUB, J. E.; SERQUEN, F. C.; GUPTA, M. Genetic markers, map construction and their application in plant breeding. *HortScience*, Alexandria, v. 31, n. 5, p. 729-741, Sept. 1996.

SAVINO, V.; BOSCIA, D.; D'ONGHIA, A. M.; MARTELLI, G. P. Effect of heat therapy and meristem tip culture on the elimination of *grapevine leafroll-associated closterovirus* type III. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS DISEASES OF THE GRAPEVINE, 10., Volos, 1990. *Abstracts of papers...* Volos: Plant Protection Institute, 1990. p. 69.

SAWAZAKI, H. E.; POMMER, C. V.; PASSOS, I. R. S. da; TERRA, M. M.; PIRES, E. J. P. Identificação de parentais e híbridos entre *Vitis Vinifera* e *Vitis rotundifolia* utilizando polimorfismo enzimático e marcador RAPD. *Bragantia*, Campinas, v. 55, n. 2, p. 221-230, 1996.

SILVA, A. V. C. da. Identificação de marcas moleculares ligadas à ausência de sementes em videira. 2002. 58 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SILVA JÚNIOR, D. da. *Manual do viticultor brasileiro*. Rio de Janeiro: Typ. Carioca, 1888. 224 p.

SILVA, T. das G. *Diagnóstico vitivinícola do sul de Minas Gerais*. 1998. 196 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SOUSA, J. S. I. de. *Uvas para o Brasil: pragas e moléstias*. Piracicaba: FEALQ, 1996. p. 609-727.


SOUSA, J. S. I. de. *Uvas para o Brasil*. São Paulo: Melhoramentos, 1969. 454 p.

SOUZA, C. M.de.; REGINA, M. de A.; PEREIRA, G. E.; FREITAS, G.de F. Indicação de cultivares de videira para o Sul de Minas Gerais. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 1., 2002, Andradás. *Anais...* Andradás: Atualizando Conceitos, 2002. p. 277-286.

STAVRAKAKIS, M. N. BINIARI, K. Genetic analysis of grape cultivars belonging to the muscat family by random amplified polymorphic DNA markers. *Vitis*, Siebeldigen, v. 37, n. 3, p. 119-122, Sept. 1998.

STAVRAKAKIS, M. N.; BINIARI, K. HATZOPOULOS, P. Identification and discrimination of eight Greek grape cultivars (*Vitis vinifera* L.) by random amplified polymorphic DNA markers. *Vitis*, Siebeldigen, v. 36, n. 4, p. 175-178, Dec. 1997.

STRIEM, M. J.; BEN-HAYYIM, G. SPIEGEL-ROY, P. Developing molecular genetic markers for breeding using polymerase chain reaction procedures. *Vitis*, Siebeldigen, v. 33, n. 1, p. 53-54, Mar. 1994.



STRIEM, M. J.; SPIEGEL-ROY, P.; BEN-HAYYIM, G.; BECKMANN, J.;  
GIDONI, D. Genomic DNA fingerprinting of *Vitis vinifera* by the use of  
multi-loci probes. *Vitis*, Siebeldigen, v. 29, p. 223-227, 1990.

TINKER, N. A.; FORTIN, M. G.; MATHER, D. E. Random amplified  
polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. **Theoretical  
Applied Genetic**, Berlin, v. 85, n. 8, p. 976-984, Feb. 1993.

THIS, P.; CUISSET, C. BOURSIQUOT, J. M. Development of stable RAPD  
markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic  
relationships. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 48, n.  
4, p. 492-501, 1997.

TRUTA, A. A. C. **Detecção simultânea de vírus em batata por DAS-ELISA e  
determinação do material vegetal ideal a ser utilizado em programas de  
indexação**. 1997. 58 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade  
Federal de Lavras, Lavras.

TSCHAMMER, J.; ZYPRIAN, E. Molecular characterization of grapevine  
cultivars of Riesling-type and closely related Burgundies. *Vitis*, Siebeldigen, v.  
33, p. 249-250, 1994.

ULANOVSKY, S.; GOGORCENA, Y.; MARTINEZ DE TODA, F.; ORTIZ, J.  
M. Use of molecular markers in detection of synonymies and homonymies in  
grapevines (*Vitis vinifera* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 92, n. 3-  
4, p. 241-254, Feb. 2002.

VAN REGENMORTEL, M. H. V. **Serology and immunochemistry of plant  
viruses**. New York: Academic Press, 1982. 302 p.

VIDAL, J. R.; MORENO, S.; MASA, A. ORTIZ, J. M. Study of the genetic  
homogeneity of Albariño (*Vitis vinifera* L.) growing in Galicia (Spain) using  
isozyme and RAPD markers. *Vitis*, Siebeldigen, v. 37, n. 3, p. 145-146, Sept.  
1998.

VILLALBA, V. P. **Los parasitos de la vid: estrategias de proteccion razonada**.  
4. ed. [S.l.]: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentacion, 1998. p. 238-256.

WALTER, B.; CORNUET, P. ELISA detection of *grapevine fleck virus*  
(GFkV). *Agronomie*, France, v. 13, p. 651-657, 1993.

WEEDEN, N. F.; HEMMAT, M.; LAWSON, D. M.; LODHI, M.; BELL, R. L.; MANGANARIS, A. G.; REISCH, B. I.; BROWN, S. K.; YE, G. N.

Development and application of molecular marker linkage maps in woody fruit crops. *Euphytica*, Dordrecht, v. 77, n. 1-2, p. 71-75. 1994.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; HANAFEY, M. K.; RAFALSKI, J. A. Genetics Analysing Random Amplified Polymorphic Markers. *Methods in Enzimology*, Oxford, v. 218, p. 704-740, 1993.

XAVIER, K. G. *Divergência genética em clones de Eucalyptus avaliada por marcadores RAPD, e variações nas propriedades da madeira*. 2001. 107 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras: Lavras.

XU, H.; WILSON, D. J.; ARULSEKAR, S. BAKALINSKY, A. T. Sequence-specific polymerase chain-reaction markers derived from randomly amplified polymorphic DNA markers for fingerprinting grape (*Vitis*) rootstocks. *Journal of American Society of Horticultural Science*, Alexandria, v. 120, n. 5, p. 714-720, Sept. 1995.

YE, G. N.; SOYLEMEZOGLU, G.; WEEDEN, N. F.; LAMBOY, W. F.; POOL, R. M.; REISCH, B. I. Analysis of the relationship between grapevine cultivars, sports and clones via DNA fingerprinting. *Vitis, Siebeldigen*, v. 37, n. 1, p. 33-38, Mar. 1998.

YE, G. N.; WEEDEN, N. F. REISCH, B. I. Genetic mapping and fingerprinting of grape vines using molecular markers. *American Journal of Enology and Viticulture*, Davis, v. 44, p. 468, 1993. Abstract.



## ANEXO .

### ANEXO A

### Página

TABELA 1A	Primeira prospecção de 137 plantas de videira em Caldas. EPAMIG, Caldas, MG, 1997.....	69
-----------	---	----

TABELA 1A: Primeira prospeção de 137 plantas de videira em Caldas. EPAMIG, Caldas, MG, 1997.

Clone	Peso médio dos cachos (g)	°Brix	Acidez mg/100g	Produção (kg/planta)	Índice de fertilidade (*)
01	1013,48	11	6,394	4,250	0,68
02	1413,53	9	6,860	3,400	0,48
03	969,59	11	6,100	2,100	0,87
04	953,81	11	6,223	2,300	0,60
05	1004,97	12	5,733	2,650	1,10
06	1040,17	11	6,419	3,850	1,09
07	1101,56	11	4,312	4,900	0,78
08	1227,97	11	4,410	4,250	0,67
09	1141,54	11	5,537	2,600	1,14
10	1100,94	11	4,655	4,100	0,69
11	871,34	11	3,993	2,700	0,76
12	1196,09	10,5	4,483	3,500	0,49
13	964,09	11	3,773	3,100	0,77
14	1107,29	11	3,969	4,850	0,65
15	1165,39	11	4,679	3,450	0,51
16	1195,33	9	5,194	4,900	0,79
17	1319,01	10	6,730	4,500	0,74
18	998,01	9	6,076	9,750	1,74
19	1147,82	9	5,586	4,500	0,64
20	1056,29	9	5,880	6,200	1,22
21	1058,80	8	4,900	6,900	1,18
22	1081,67	9	5,586	5,200	0,91
23	699,63	11	3,185	3,500	1,52
24	844,53	10	5,096	2,700	0,60
25	844,75	11	4,312	3,300	0,69
26	1122,52	11	6,076	7,400	0,86
27	1255,32	10	4,900	7,850	0,99
28	677,45	11	3,675	5,200	1,67
29	1056,04	9	3,871	11,800	3,19
30	1070,70	12	3,528	3,200	0,35
31	1040,39	10	5,439	3,750	0,60
32	1168,84	9	4,753	8,350	1,02
33	887,33	10	5,096	6,350	1,46
34	1255,83	9	4,214	11,150	1,61
35	1196,50	11	4,655	6,850	1,22
36	763,78	11	4,067	4,350	1,07
37	830,42	10	5,390	5,400	0,96
38	1228,63	9	3,920	9,750	1,31
39	1014,02	11	4,949	4,250	1,10
40	932,75	9	3,920	1,500	0,77
41	1041,47	9	6,664	6,500	1,06

Continua...

Continuação...

Clone	Peso médio dos cachos (g)	°Brix	Acidez meq/100g	Produção (kg/planta)	Índice de fertilidade (*)
42	882,94	10	5,635	5,950	1,12
43	1110,94	9	5,684	9,650	1,49
44	1134,79	10	5,439	9,400	1,62
45	1198,67	9	5,880	5,500	0,59
46	1203,21	9	4,410	6,150	1,04
47	1110,64	9	4,214	5,650	0,77
48	976,48	9	6,174	4,550	0,88
49	1311,47	8,5	5,488	6,450	0,93
50	1107,9	9	5,880	3,450	0,89
51	1236,11	8	5,096	6,500	0,79
52	986,88	9,5	4,116	3,550	0,97
53	994,33	8	6,566	14,650	1,87
54	1356,16	9	5,586	5,550	1,17
55	1109,52	10	6,390	10,400	1,38
56	974,14	8	5,978	7,650	0,72
57	1241,25	8	5,194	6,200	0,75
58	1054,49	10	5,684	2,950	0,48
59	1063,16	10	4,214	4,150	0,66
60	1241,53	10,5	6,370	3,850	0,66
61	1168,34	10	6,468	1,150	1,73
62	969,98	11	5,390	2,250	0,53
63	1034,28	8	6,664	5,250	2,11
64	862,91	10	5,880	4,450	1,43
65	1157,09	10	6,566	4,850	0,76
66	810,35	10,5	5,880	1,750	0,42
67	1294,88	10	6,664	3,250	0,50
68	1122,26	10	5,194	3,050	0,62
69	1084,15	10,5	5,978	3,600	1,15
70	1074,89	10	6,174	4,550	1,28
71	1275,53	10,5	6,860	5,350	0,49
72	1360,90	11	6,860	5,200	0,93
73	896,59	11,5	6,370	2,250	0,55
74	1092,69	9,5	5,096	4,850	1,20
75	1219,64	9	5,684	4,850	1,02
76	1248,49	9,5	6,174	5,650	1,01
77	1227,74	11	5,880	4,800	0,61
78	1268,86	11	6,370	3,150	0,61
79	1314,99	11	5,782	5,500	0,97
80	1059,76	11	6,174	3,650	0,45
81	1390,56	11	5,880	4,950	0,73
82	818,02	10,5	5,880	3,200	0,46
83	1110,65	11,5	5,880	3,700	0,44

Continua...

Continuação...

Clone	Peso médio dos cachos (g)	°Brix	Acidez meg/100g	Produção (kg/planta)	Índice de fertilidade (*)
84	1241,82	10,5	6,272	2,100	0,58
85	1229,18	10,5	5,880	4,850	0,94
86	1234,63	11,5	6,860	5,350	0,50
87	1167,25	9	4,116	6,400	1,52
88	678,24	9	6,076	2,800	1,12
89	992,68	10	4,998	4,900	1,18
90	1083,83	10,5	4,116	2,000	0,39
91	993,25	9,5	4,508	2,400	0,83
92	117,75	9	6,076	8,200	1,44
93	935,47	9,5	5,880	4,900	1,31
94	1199,73	10	5,782	4,700	0,89
95	836,27	11	4,410	3,300	0,69
96	741,24	10	4,802	3,600	1,13
97	809,85	11	4,410	3,200	0,53
98	963,77	9	5,292	8,000	0,86
99	893,84	10	4,508	4,200	0,75
100	1015,70	9,5	4,704	5,400	1,04
101	1167,25	9	5,684	5,500	0,94
102	598,45	10	5,194	3,200	0,97
103	1050,00	10,5	5,096	3,100	0,62
104	800,00	10	4,704	9,350	1,86
105	950,00	10	5,292	4,100	0,78
106	750,00	9	4,998	5,850	1,08
107	700,00	9	5,978	2,950	0,61
108	1450,00	11	5,096	6,900	0,61
109	1200,00	11	5,390	9,350	1,37
110	1100,00	9,5	4,606	3,450	1,05
111	900,00	10	6,076	2,400	0,47
112	850,00	12	4,508	1,900	0,51
113	850,00	11	5,194	2,100	0,67
114	1100,00	11	5,880	4,000	1,14
115	1150,00	10	5,684	3,700	0,75
116	1080,00	10	5,586	10,400	1,19
117	1850,00	10	5,194	7,400	1,00
118	900,00	11	4,116	3,100	0,77
119	1300,00	10,5	6,664	5,180	0,63
120	1200,00	11	5,586	7,450	0,71
121	1650,00	11	4,900	5,750	1,06
122	1200,00	11	5,488	2,410	1,00
123	1300,00	10	6,664	3,750	0,59
124	1300,00	10,5	5,390	15,410	1,08
125	1550,00	10,6	5,194	3,420	0,53

Continua...

Continuação...

Clone	Peso médio dos cachos (g)	°Brix	Acidez meg/100g	Produção (kg/planta)	Índice de fertilidade (*)
126	1450,00	11,5	4,943	4,880	0,84
127	1300,00	12	4,943	5,500	0,36
128	1450,00	10	4,848	4,630	0,73
129	1300,00	10	5,228	3,600	0,54
130	1100,00	10	4,848	3,350	0,78
131	1600,00	9	5,799	9,450	0,88
132	1200,00	10	5,228	6,850	1,04
133	1200,00	11	5,704	5,650	1,06
134	1150,00	10	4,484	4,750	0,59
135	1450,00	10	5,418	6,000	0,68
136	1200,00	11	5,228	5,850	0,53
137	1300,00	10	5,704	4,750	1,11

(\*) Índice de fertilidade de gemas/planta = número de cachos/ramos

