



ANA PAULA RIBEIRO

**MICROPROPAGAÇÃO, AVALIAÇÃO DA
VARIAÇÃO SOMACLONAL E DETECÇÃO DE
VÍRUS EM VIDEIRA**

LAVRAS – MG

2012

ANA PAULA RIBEIRO

**MICROPROPAGAÇÃO, AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO SOMACLONAL
E DETECÇÃO DE VÍRUS EM VIDEIRA**

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

Orientador

Dr. Moacir Pasqual

Co-orientador

Dr. Geraldo Magela de Almeida Cançado

LAVRAS – MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Ribeiro, Ana Paula.

Micropropagação, avaliação da variação somaclonal e detecção de vírus em videira / Ana Paula Ribeiro. – Lavras : UFLA, 2012.
128 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.
Orientador: Moacir Pasqual.
Bibliografia.

1. *Vitis* spp. 2. SSR. 3. Vírus do enrolamento. 4. Citometria de fluxo. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.883

ANA PAULA RIBEIRO

**MICROPROPAGAÇÃO, AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO SOMACLONAL
E DETECÇÃO DE VÍRUS EM VIDEIRA**

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

Aprovada em 23 de fevereiro de 2012.

Dr. Luciano Vilela Paiva

UFLA

Dr. Juliano Lino Ferreira

PNPD CAPES/EPAMIG

Orientador

Dr. Moacir Pasqual

Co-orientador

Dr. Geraldo Magela de Almeida Cançado (EPAMIG)

LAVRAS – MG

2012

*Àqueles que sempre acreditaram neste sonho que hoje é uma conquista,
que não pouparam esforços em me ajudar: Marta, Luiz Paulo e Vinícius.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço, a Deus, por iluminar meu caminho, me dar força e sabedoria em todos os dias de minha vida para continuar seguindo em frente.

Ao meus pais, Marta e Luiz Paulo, e meu irmão por acreditarem em mim, e me ampararem em todos os momentos, sejam bons ou ruins, minha madrinha Maria das Graças, pelas orações.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia pela oportunidade da realização do curso de mestrado.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), em especial ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Núcleo Tecnológico Uva e Vinho, situado em Caldas (MG), pela infraestrutura e condições técnicas de alta qualidade para a execução deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e à International Foundation for Science (IFS) pelo auxílio financeiro à execução do projeto.

Ao orientador Prof. Moacir Pasqual, pelo exemplo profissional, pela oportunidade, pelos ensinamentos, apoio e confiança na realização deste trabalho.

Ao co-orientador Pesq. Dr. Geraldo Magela de Almeida Cançado, pelo grande incentivo e exemplo profissional a mim passado durante todo o tempo que dediquei à pesquisa, pela confiança, amizade, ensinamentos, esforços não poupados para garantir a execução deste trabalho com seriedade e dedicação.

Ao Prof. Luciano Paiva, por aceitar participar da banca avaliadora, pela disponibilidade de fazer suas contribuições para este trabalho.

Ao pesquisador e grande amigo Dr. Juliano Lino Ferreira, pela enorme ajuda nos ensinamentos, dúvidas, apoio, por passar tranquilidade nas horas de desespero, descontração, risadas, conversas e por amparar nas escolhas durante a execução deste trabalho, e pela amizade de sempre.

Ao Pesq. Dr. João Vieira Neto, Dr. Hermínio de Souza Rocha, Prof. Dr. Aluizio Borém, Prof. Dr^a Bárbara Dantas Fontes Soares, Pesq^a. Dr^a. Leila Aparecida Salles Pio, pessoas que contribuíram em cada parte de execução deste trabalho. Em especial aos bolsistas e estudantes, Sâmera de Souza Breves, Andressa Leal Generoso, Bruna Félix, Alisson Williams, por não pouparem esforços, dedicação e ajuda na execução dos experimentos, além da amizade, por tornarem os momentos tensos, em descontraídos, alegres facilitando a convivência diária.

Aos amigos, Aurinete, Claudinéia, Franciane, Dalilha, Tesfahun, Raoni, Rafaeli, Gustavo Sant'ana, Gustavo Freitas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da EPAMIG de Caldas, pela amizade e contribuição direta ou indiretamente. Colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT), e NECult: Rafael, Joyce, Renata, Simone, Ylana, Filipe, Grabiellen, Fabrício, David, Flávia pelo apoio, em especial à Ana Catarina, Karine, Camila pela ajuda na execução de experimentos; e aos queridos laboratoristas Claret e Vantuil pelo auxílio na condução dos trabalhos em laboratório. À secretária Marli e funcionários do Departamento de Agricultura.

Aos pesquisadores e funcionários do Núcleo Tecnológico EPAMIG Uva e Vinho em Caldas (MG), pela amizade, colaboração e conhecimentos passados, em destaque à laboratorista D. Isa Magalhães por poder contar com sua generosidade, orações e dedicação sendo uma “Mãe” em Caldas desde quando cheguei.

E aos inesquecíveis amigos presentes, ausentes, ouvintes, torcedores: Aline, Fernanda, Cyntia, Sheila, Gláucia, Lígia, João, Lívia Rezende, aos casais

Deny e Rosana; César Augusto e Sylvia; José Amaury e Elaine; Fernando e Maria Rosa; Paulo Hamilton e Jacqueline; Welinton e Adriana; Ronald e Carminha; Thiago e Cristiane; Maurício Nicoletti e Maria do Carmo e todos seus familiares que fazem parte desta conquista tornando minha estadia em Caldas-MG mais divertida, tornando-se uma verdadeira convivência familiar. À República “Monarkia” nas pessoas Stella e Diane pela acolhida e divertimento em Lavras, em especial à Gabrielle por tornar-se incomparável no que a amizade tem que ser.

E por fim agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

“Não há invenção mais rentável que a do conhecimento.”

Benjamin Franklin

RESUMO

A videira é uma espécie frutífera de grande importância comercial no Brasil e no mundo. Seu cultivo está em ascensão no Brasil, mas a baixa disponibilidade de material propagativo com qualidade tem sido uma das principais limitações para a expansão do setor vitícola. A micropropagação é uma técnica que permite a produção clonal de plantas de qualidade em curto espaço de tempo. No presente trabalho foi avaliado o potencial micropropagativo de 11 genótipos de porta-enxertos em diferentes variações de concentração e composição dos meios de cultura MS e DSD1, concluindo-se que o meio MS em sua concentração original sem adição de fitorreguladores é o mais apropriado para introdução e manutenção de plântulas *in vitro*. Posteriormente, foi avaliada a ocorrência de variação somaclonal em cinco genótipos de porta-enxertos de plantas matrizes cultivados no campo, cultivadas *in vitro* em sala de crescimento e cultivadas em viveiro após aclimatização, utilizando marcadores microssatélite. Foi estudado cinco dos marcadores indicados no 'core set' para videira: VVS2, VVMD7, VVMD5, VVMD25 e VRZag62, destes somente o VVMD7 detectou polimorfismo genético (variação somaclonal) em algumas plântulas *in vitro*, dos genótipos 101-14 e Kober 5BB. Outra técnica utilizada com os mesmos genótipos para avaliar a variação somaclonal em plântulas cultivadas *in vitro*, comparando com plantas matrizes de banco de germoplasma *in vivo*, foi a citometria de fluxo, através de conteúdo de DNA. Obteve-se a estimativa da ocorrência de variação somaclonal pelo valor de coeficiente de variação e teste de médias, onde o mesmo comprovou que ocorreu variação de conteúdo de DNA em todos os genótipos quando comparados com plantas matrizes, confirmando que o uso da técnica de cultura de tecidos para a micropropagação de porta-enxertos de videira pode ser utilizada, mas com acompanhamento e monitoramento, pois variações no DNA podem comprometer a fidelidade genética do material propagado. Foram feitas também nesse estudo, a avaliação da presença e o acompanhamento dos vírus do enrolamento, tipos GLRaV-1, GLRaV-2 e GLRaV-3, durante o ciclo vegetativo de clones das variedades de *Vitis labrusca* cv. 'Bordô' e *Vitis vinifera* cv. 'Cabernet sauvignon', mantidas em viveiro telado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, da EPAMIG de Caldas-MG. Através da análise sorológica utilizando a técnica de DAS-ELISA, pode constatar o aumento da carga viral ao longo do ciclo vegetativo das plantas, para todos os vírus analisados.

Palavras-chave: *Vitis* spp. SSR. Citometria de fluxo. Vírus do Enrolamento.

ABSTRACT

The grapevine is a fruit species of great commercial importance in Brazil and worldwide. Its cultivation is increasing in Brazil, but the low availability of propagation material with adequate quality has been a major limitation to the expansion of the vineyard. Micropropagation is a technique that allows the clonal production of plants with best quality in a short time period. The present study evaluated the potential of micropropagation of 11 rootstock genotypes in different variations of concentration and composition of culture media MS and DSD1. Results indicate that the MS medium in its regular concentration without addition of growth regulators is the most appropriate for cultivation *in vitro*. It was also evaluated the occurrence of somaclonal variation in five genotypes of rootstock plants cultivated in the following conditions: in field, *in vitro* in a growth chamber, and in greenhouse (acclimatized plants), using microsatellite markers. We studied five markers listed in the 'core set' for grapevine: VVS2, VVMD7, VVMD5, VVMD25 and VRZag62. Only VVMD7 detected genetic polymorphism (somaclonal variation) in plantlets cultivated *in vitro* from the genotypes 101-14 and Kober 5BB. Flow cytometry was another technique used to evaluate the somaclonal variation by means of DNA content in plants of the same genotypes cultivated in field and *in vitro*. It was obtained estimates of somaclonal variation by means of coefficient of variation, being these estimates compared with adequate statistical tests. This approach confirms that the use of tissue culture techniques for the micropropagation of grapevine rootstocks might be effective but it still requires close monitoring to avoid multiplication of plants without genetic fidelity. In this study were also evaluated the presence of the virus GLRaV-1, GLRaV-2 and GLRaV-3 during the growth cycle of clones from *Vitis labrusca* cv. 'Bordô' and *Vitis vinifera* cv. 'Cabernet Sauvignon', kept under controlled environment in the Laboratory of Plant Biotechnology of EPAMIG in Caldas-MG. The serological analysis using the technique of DAS-ELISA, allowed assessing the increase in viral load within the reproductive period of plants for all viruses analyzed.

Keywords: *Vitis* spp. SSR. Flow cytometry. Leafroll virus.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução Geral	13
1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Videira	16
2.2	Produção de mudas	17
2.2.1	Estaquia e enxertia	19
2.2.2	Cultura de tecidos	20
2.2.2.1	Variação somaclonal	24
2.3	Marcadores moleculares	27
2.4	Citometria de fluxo	29
2.5	Viroses	31
	REFERÊNCIAS	35
	CAPÍTULO 2 Propagação <i>in vitro</i> de porta-enxertos de videira sob diferentes composições de meio de cultura	43
1	INTRODUÇÃO	46
2	MATERIAL E MÉTODOS	47
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS	63
	CAPÍTULO 3 Marcadores microssatélite na análise da variação somaclonal em porta-enxertos de videira	65
1	INTRODUÇÃO	68
2	MATERIAL E MÉTODOS	71
2.1	Material vegetal	71
2.2	Extração de DNA	73
2.3	Análise com marcadores microssatélite	74
2.4	Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida	76
2.5	Análise dos dados	77
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
4	CONCLUSÕES	82
	REFERÊNCIAS	82
	CAPÍTULO 4 Citometria de fluxo na identificação de variação somaclonal em porta-enxertos de videira	86
1	INTRODUÇÃO	89
2	MATERIAL E MÉTODOS	92
2.1	Material vegetal	92
2.2	Citometria de fluxo	93
2.3	Análise dos dados	94

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
4	CONCLUSÕES	101
	REFERÊNCIAS	102
	CAPÍTULO 5 Avaliação sorológica da infecção pelos vírus do enrolamento (GLRaVs) em plantas de <i>Vitis vinifera</i> cv. ‘Cabernet sauvignon’ e <i>Vitis labrusca</i> cv. ‘Bordô’ ao longo do ciclo vegetativo	105
1	INTRODUÇÃO	108
2	MATERIAL E MÉTODOS	111
2.1	Coleta de amostras	111
2.2	Análise sorológica por DAS-ELISA	113
2.3	Análise dos dados	115
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	115
4	CONCLUSÕES	124
	REFERÊNCIAS	125
	CONCLUSÃO GERAL	128

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

Entre as plantas frutíferas, a videira é considerada como uma das espécies mais antigas cultivadas pelo homem. É reconhecida internacionalmente por sua importância econômica, social e cultural. Com o passar dos anos as técnicas de produção de mudas evoluíram, em prol da obtenção de mudas em um espaço de tempo menor que o processo convencional de enxertia no campo. As ferramentas advindas da cultura de tecidos são um exemplo da evolução de técnicas de propagação que tem contribuído para o avanço desta área. Muitas vezes a cultura de tecidos vegetais aliada a outras técnicas modernas, tais como marcadores moleculares e citogenética podem detectar e monitorar variações que ocorrem na molécula de DNA. Essas variações podem ser frequentes e muitas vezes, são provocadas pelo próprio processo de micropropagação, visto que este procedimento causa estresse nos tecidos e órgãos que estão sendo multiplicados em uma condição completamente atípica ao ambiente natural. A identificação de alterações genéticas e fitossanitárias em plantas matrizes de videira contribui para tornar o processo de produção mais eficiente economicamente, favorecendo os viticultores, que podem ofertar produtos de melhor qualidade em maior quantidade.

Tendo em vista a importância do uso de porta-enxertos na viticultura, os quais, por sua vez, apresentam grandes diferenças e potenciais de adaptação às mais diversas condições de clima e solo, somado ao fator de afinidade entre a copa e o porta-enxerto, torna-se fundamental um estudo detalhado, visando determinar e avaliar técnicas eficazes para a produção de material propagativo com qualidade genética e fitossanitária superior.

Nesse contexto, os objetivos desse trabalho foram determinar a melhor condição para multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de videira, avaliar a ocorrência de variações genéticas, induzidas pelo processo de cultivo *in vitro*,

utilizando marcadores microssatélite e citometria de fluxo, além de verificar a evolução da carga do vírus do enrolamento em plantas infectadas de videira, ao longo do ciclo vegetativo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Videira

Videira é uma frutífera cultivada em todo o mundo, tornando-se uma das mais importantes culturas comerciais, em termos de valor econômico (CARIMI, 2005). Pertence à família *Vitaceae*, a qual abrange mais de mil espécies, incluídas em dezenove gêneros, sendo o gênero *Vitis* o único da família com importância econômica, com 107 espécies, das quais 29 são de origem asiática, 34 de origem norte-americanas, e uma única espécie de origem europeia: *Vitis vinifera*.

V. vinifera é a espécie mais cultivada atualmente, enquanto as outras espécies de *Vitis* são geralmente utilizadas como porta-enxertos e fonte de resistência contra doenças em programas de melhoramento. Estima-se que existam cerca de 6000 variedades de *V. vinifera* (ALLEWELDT; DETTWEILER, 1994), das quais menos de 400 são de importância comercial.

A prática agrícola da videira teve início na Ásia Ocidental, no final da Idade do Bronze, onde foram encontrados vestígios da produção de vinho em cavernas e ruínas de cidades pré-históricas. Desde então, a viticultura e a produção de vinhos assumiram importante papel na cultura ocidental. Nas Américas, a videira foi cultivada inicialmente na Antilhas e no México, logo depois se propagando por todo continente americano (GIOVANNINI, 1999). No Brasil, seu cultivo começou nos estados da Bahia e Pernambuco no início da década de 1530, cerca de 100 anos depois, o seu cultivo migrou para o sul do país. Este cultivo apresentou grandes possibilidades de expansão no Brasil, 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).

Nas últimas décadas, tem-se observado uma grande expansão da agricultura para as mais diversas áreas do país, principalmente devido ao esgotamento de áreas tradicionais e ao crescimento do consumo. O cultivo de várias espécies de importância agrônômica, dentre elas a videira, vem assumindo destaque econômico em regiões não tradicionais para o cultivo desta espécie. Foi registrado em 2010, área plantada de aproximadamente 83.700 hectares, com uma produção entre 1.300 a 1.400 mil toneladas, sendo 57% da produção comercializada destinada ao consumo de uvas *in natura* e 43% ao processamento de vinhos e sucos (CAMARGO; TONIETTO; HOFFMAN, 2011). Dentre os principais estados produtores de uvas no Brasil, destacam-se o Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco, Paraná, Santa Catarina, Bahia e Minas Gerais. Embora seja recente e ainda não havendo produtividade considerável, a viticultura também está em desenvolvimento nos estados do Mato Grosso do Sul, Goiás, Espírito Santo, Ceará e Piauí, contribuindo para o crescimento e expansão da atividade vitícola do país (MELO, 2011).

De modo semelhante a outros setores do agronegócio mundial, o setor vitivinícola tem se caracterizado pela crescente competição entre blocos econômicos, a qual tem sido marcada por um ambiente empresarial cada vez mais intenso em tecnologia e gestão. Competir em nível mundial e até mesmo nacionalmente, nesse setor exige, além de atributos de qualidade e diferenciação, capacidade de coordenação estratégica, atualização tecnológica e uma eficiente infraestrutura de suporte e apoio (PROTAS, 2005).

2.2 Produção de mudas

A atividade de produção de mudas de videira tem sido crescente nacionalmente e internacionalmente, devido ao interesse dos produtores na implantação de vinhedos, consorciando com outras culturas em sua propriedade, e também devido ao crescimento de consumidores dos produtos gerados a partir da uva, como: vinhos, sucos, doces, geleias entre outros. Nesta expansão, o Brasil tem participação direta junto ao mercado externo nesta expansão (BORGHEZAN et al., 2003).

Além da produção convencional de mudas de videira, recentemente no Brasil, tem-se verificado também o plantio de vinhedos comerciais por meio da importação de mudas obtidas pela técnica da enxertia de mesa. Os valores dessa prática não estão disponíveis, mas sabe-se que ela é crescente e está estimada em mais de 1 milhão de plantas por ano no sul do país (REGINA, 2002). Dependendo do genótipo, da qualidade da muda e da origem, a muda importada tem chegado ao produtor com o custo unitário variando entre US\$ 0.80 a US\$ 1.50. Além de representar uma evasão de divisas entre 800 mil a 1,5 milhões de dólares por ano, esta prática tem como agravante o constante risco de introdução de doenças e pragas não existentes no Brasil. Assim, a busca constante de inovações com a finalidade de obtenção de mudas de qualidade justifica o emprego de novas tecnologias no sistema produtivo (REZENDE; PEREIRA, 2001).

Diante do atual quadro em que se encontra a vitivinicultura nacional relativamente à origem e condições de oferta de material vegetativo para a instalação de vinhedos, fica evidente a necessidade e a urgência do apoio governamental na implementação de políticas públicas que viabilize a produção de material vegetativo de qualidade (PROTAS, 2005). Estas medidas poderiam promover ao produtor o acesso ao material vegetal de qualidade e a preço acessível, eliminando a necessidade de importação de mudas. Este fato, além de

diminuir o custo de instalação de novos vinhedos, promoverá o crescimento e melhoria de qualidade do setor.

2.2.1 Estaquia e enxertia

A produção de mudas de videira feita por meio da propagação por estaquia é um processo lento e sazonal, pois são usadas estacas herbáceas e lenhosas que são retiradas das plantas matrizes apenas em uma época do ano, sendo pouco eficiente na produção em larga escala, diferentemente da técnica de propagação *in vitro* que possibilita a obtenção de um grande número de plantas saudáveis e geneticamente uniformes (TECCHIO et al., 2007).

O método de produção de muda mais utilizado na viticultura brasileira é o da estaquia de porta-enxertos e posterior enxertia da variedade a ser cultivada. A propagação por estaquia baseia-se no princípio de que é possível regenerar uma planta a partir de uma estaca removida da planta-mãe devido à totipotencialidade das células vegetais. As estacas utilizadas podem ser do tipo herbáceas, quando não possuem tecidos lignificados; lenhosas, quando os tecidos são lignificados; e semi-lenhosas ou semiherbáceas, quando coletadas no início da lignificação (MONTEGUTTI et al., 2008).

As estacas lenhosas são coletadas quando os ramos da planta matriz porta-enxerto estão sem folhas e bem amadurecidos, normalmente durante o período de repouso vegetativo. A propagação por estaquia pode ser realizada a campo, diretamente no local definitivo, o que exige maiores cuidados, ou em recipientes individuais, apresentando esse último à possibilidade de selecionar estacas que apresentarem melhor padrão de enraizamento, resultando em maior uniformização das mudas no campo (CAMARGO, 1998).

O processo de enxertia de videira se generalizou com o aparecimento da filoxera, um pulgão que ataca as raízes e torna praticamente impossível o cultivo

de espécies sensíveis de videira a partir de pé franco como é o caso, por exemplo, da *V. vinifera*, e em regiões onde esta praga está localizada. Como grande parte dos genótipos utilizados na viticultura nacional é sensível a esta praga e devido ao fato da filoxera estar disseminada em grande parte do território nacional, a enxertia utilizando porta-enxertos resistentes é a forma mais eficaz de solucionar o problema (ALIZADEH; SINGH; PATEL, 2010).

Se a preocupação inicial dos melhoristas era a de obter porta-enxertos resistentes aos ataques da filoxera, com os avanços das hibridações interespecíficas, notadamente com o emprego das espécies de gênero *Vitis* originárias, em sua maioria, de diferentes regiões ecológicas da América do Norte (HUGLIN, 1986), foram criadas diversas variedades diferindo nitidamente com relação a outros parâmetros agrônômicos, tais como resistência a seca e adaptabilidade às características físico-químicas dos solos, além de resistências aos nematóides, imposição de maior vigor à variedade copa, melhor afinidade de enxertia e redução no tempo de formação das plantas (TECCHIO et al., 2007). Muitos porta-enxertos foram e ainda estão sendo testados para as regiões tropicais do Brasil, entretanto, poucas opções têm sido efetivamente empregadas em plantios comerciais.

2.2.2 Cultura de tecidos

Há tempos a cultura de tecidos é utilizada com o propósito de modificar os métodos convencionais de propagação, englobando técnicas clássicas, importantes para a agricultura, podendo suprir uma demanda elevada de matéria prima, o que representa um dos maiores impactos da cultura de tecidos na agricultura é conseguir produzir plantas homogêneas, com qualidade fitossanitária garantidas, evitando problemas com mutações espontâneas durante o processo, e o estresse ocasionado pelas condições ambientais e de cultivo.

Dentre as técnicas da cultura de tecidos a micropropagação é a aplicação mais prática e a mais utilizada comercialmente, pois permite produzir um grande número de plantas sadias e geneticamente uniformes a partir de genótipos superiores. A maioria das plantas micropropagadas é obtida pela multiplicação de brotos axilares, podendo no decorrer da regeneração surgir variações incontroláveis e inexplicáveis, conhecidas como variação somaclonal, tornando esta estratégia questionável para a multiplicação clonal (GEORGE, 1993). A multiplicação de brotos, por outro lado, é um método seguro que pode ser usado quando a produção de plantas lenhosas for requerida (RIBEIRO et al., 2002).

Na cultura de tecidos, a partir de uma única planta matriz, podem-se produzir centenas ou milhares de mudas ao longo de todo o ano, ao passo que na propagação vegetativa convencional produz-se um reduzido número de plantas a partir de uma única planta, além de ser restrito apenas a poucos meses do ano.

A micropropagação de videiras consiste basicamente no processo de enraizamento de brotações axilares ou adventícias multiplicadas *in vitro*, para a regeneração de plantas inteiras. Este processo possibilita a rápida multiplicação de plantas, obtenção de plantas matrizes livres de vírus por meio da cultura de meristemas, a propagação de híbridos e a preservação de germoplasma de interesse (COLETTI; MARTINS; GOULART, 2008).

Heloir et al. (1997) dividiram esta técnica em seis etapas, definidas por: i) seleção dos explantes; ii) estabelecimento dos explantes *in vitro*; iii) produção de parte aérea a partir dos explantes; iv) multiplicação da parte aérea através de subcultivos; v) enraizamento dos subcultivos; e vi) transferência dos propágulos para substrato e aclimatização. Desta forma, a micropropagação *in vitro* oferece um grande potencial para a multiplicação rápida e massiva de uma variedade. Os explantes normalmente utilizados são segmentos nodais, ápices meristemáticos e meristemas. Os segmentos nodais constituem-se de microestacas com apenas uma gema lateral mais uma pequena porção dos tecidos adjacentes do caule e

pecíolo, variando de 8 a 25 mm de comprimento (GRAY; BENTON, 1991). Os ápices meristemáticos são retirados da extremidade apical das brotações com cerca de 2 a 4 primórdios foliares e 0,5 a 1,5 mm de comprimento (CHÉE; POOL, 1982). Os meristemas também podem ser retirados da extremidade das brotações, mas possuem um tamanho menor do que os ápices, atingindo no máximo 0,5 mm de comprimento (TRONCOSO et al., 1988), no entanto, meristemas menores do que 0,3 mm dificilmente regeneram novas plantas (SLAVTCHEVA; DIMITROVA, 2007).

É importante destacar que os meios nutritivos são de fundamental importância para o cultivo *in vitro* das culturas. Os mesmos fornecem substâncias essenciais para o crescimento e controlam em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (BORGHEZAN et al., 2003). Os meios de cultura mais utilizados nos trabalhos com a micropropagação de videiras são o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e o DSD1 (SILVA; DOAZAN, 1995).

Em relação à fase de pré-aclimatização Machado et al. (2010) relataram que, tal fase é de grande importância na sequência da técnica de propagação de plantas *in vitro*. Nesta fase procura-se tornar o ambiente *in vitro* mais semelhante ao ambiente externo, e é praticado para aumentar a taxa de sobrevivência das plantas micropropagadas às condições *ex vitro*.

Na viticultura, as técnicas de micropropagação são de grande importância na obtenção em larga escala de material vegetativo de boa qualidade fitossanitária (MHATRE; SALUNKHE; RAO, 2000). Diversos trabalhos têm apontado as técnicas de micropropagação como alternativa na rápida propagação de cultivares da espécie *Vitis rotundifolia* e, especialmente, híbridos de *Vitis* e *Muscadinia* (DHEKNEY et al., 2010).

Além do desenvolvimento e multiplicação considerada normal, de segmentos nodais, gemas axilares e outros explantes utilizados para iniciar a micropropagação, outro viés tem ganhado respaldo no estabelecimento de

protocolos de micropropagação, as técnicas da organogênese e embriogênese somática, podendo por meio destas obter propágulos de forma direta, sem desenvolvimento de calos, ou indireta, com desenvolvimento de calos. Sobre esse assunto, Carimi et al. (2005), desenvolveram um protocolo *in vitro* para indução de calos, a partir de embriogênese somática e regeneração de plantas, onde buscou avaliar diferentes genótipos e o potencial do uso desta técnica para a cultura da videira, utilizando diferentes reguladores de crescimento, esses autores obtiveram resultado satisfatório com o uso de reguladores de crescimento como a benzil amino purina - BAP, durante a indução da embriogênese somática, porém para a regeneração, observou-se que não há necessidade do uso de reguladores.

Já Dhekney et al. (2009), utilizaram folhas de plantas de videiras de diferentes genótipos, a fim de otimizar parâmetros que influenciam a embriogênese somática em *Vitis*, sendo observada por estes autores que a competência embriogênica é dependente de cada espécie e/ou variedade, do tipo de explante, do estágio de desenvolvimento, da composição do meio e da concentração de reguladores de crescimento utilizados no meio.

O processo de embriogênese somática é uma importante ferramenta usada para a obtenção de plantas geneticamente idênticas, que podem ser utilizadas para a transformação genética de plantas (FRANKS et al., 1998; GAMBINO et al., 2005), produção de mudas livres de viroses (GAMBINO; BONDAZ; GRIBAUDO, 2006; GOUSSARD; WIID; KASDORF, 1991), desenvolvimento de sementes sintéticas (DAS et al., 2006), criopreservação (GRAY; COMPTON, 1993) dentre outras aplicações.

O desenvolvimento de protocolos para indução da embriogênese pode beneficiar o melhoramento da videira, amplificando a possibilidade de aplicação da tecnologia de transformação genética a inúmeros genótipos de interesse

comercial, além da otimização da propagação da videira em biofábricas comerciais.

2.2.2.1 Variação somaclonal

Durante o cultivo *in vitro*, os propágulos são submetidos à subcultivos e posteriormente inoculados em um novo meio de cultivo para a multiplicação de novas brotações e conseqüentemente, de um maior número de plantas inteiras no final do processo. Quando a planta é muitas vezes multiplicada ou passa por vários subcultivos, muitas das plantas regeneradas parecem não manter mais os padrões clonais de seu genótipo doador, provavelmente devido a variações inexplicáveis, mudanças genéticas e epigenéticas.

De acordo com Schellenbaum et al. (2008), a maior utilidade de qualquer sistema de micropropagação pode ser limitada devido à ocorrência de mudanças genéticas ainda não completamente elucidadas e que induz a geração de variações somaclonais. Em um programa de micropropagação de porta-enxertos, é de suma importância para a produção de materiais de matrizes, o controle das variações somaclonais de qualquer natureza, sendo externas ou internas na planta. Para evitar a ocorrência dessas variações deve-se acompanhar e monitorar as plantas matrizes, verificar rotineiramente o ambiente e condições as quais elas são mantidas. Através de marcador morfológico pode-se acompanhar a ocorrência ou não de variação somaclonal que possa surgir ao longo de seu estágio de desenvolvimento natural.

Caso seu surgimento não seja detectado na fase inicial de ocorrência, a variação pode ser multiplicada rapidamente e ocasionar à perda das características desejáveis das plantas matrizes nas novas plantas multiplicadas *in vitro*. Além disso, esta instabilidade genética pode ser um risco associado à

aplicação de técnicas de cultivo *in vitro* para a conservação e intercâmbio de germoplasma (BAIRU; AREMU; STADEN, 2011).

A variação somaclonal é gerada por alterações genéticas, epigenéticas ou a combinação de ambas. Os métodos convencionais de propagação *in vitro*, associados ao longo período de exposição a altas temperaturas e a necessidade de manipulação de segmentos apicais contendo tecidos meristemáticos pode aumentar a probabilidade de indução de variação somaclonal (PRADO et al., 2010).

As variações somaclonais são induzidas principalmente pelo estresse provocado durante os subcultivos sucessivos dos explantes *in vitro*. Quando são de origem genética, estas variações ocorrem diretamente no DNA devido à quebra das cromátides, migrações desbalanceadas de cromossomos durante a mitose, inversões, deleções, translocações, duplicações e alterações na sequência de nucleotídeos da fita de DNA (mutações) que são transmitidos de forma hereditária para a progênie. Este fenômeno foi relatado primeiramente por Braun (1959) e tem sido amplamente estudado e revisado, por mais que se tenha obtido grande avanço em seu entendimento as causas de sua ocorrência não foram totalmente elucidadas devido à sua grande complexidade (BAIRU; AREMU; STADEN, 2011).

Variações somaclonais podem ocorrer de forma epigenética, que são as mudanças reversíveis e herdáveis no genoma funcional que não alteram a sequência de nucleotídeos do DNA, incluindo o estudo de como os padrões de expressão são passados para os descendentes; como ocorre a mudança de expressão no espaço temporal de genes durante a diferenciação de um tipo de célula e como fatores ambientais podem mudar a maneira como os genes são expressos (RAPP; WENDEL, 2005 citado por SALVATO, 2007).

De acordo com os autores acima os três mecanismos principais de alterações epigenéticas são: metilação do DNA, modificações de histonas e ação

de RNAs não codificadores. Os padrões de metilação de DNA são os mais estudados e melhor entendidos dentre estes mecanismos, embora modificações de histonas também sejam bastante discutidas. A metilação do DNA está relacionada normalmente ao silenciamento de genes, ela ocorre em 70 a 80% nas ilhas CpG que estão associadas aos promotores gênicos, a conformação da cromatina relaciona-se com a metilação, ou seja, regiões altamente metiladas estão associadas à heterocromatização.

As modificações de histonas melhor estudadas são as acetilações, fosforilações e ubiquitinações, formando o que chamamos de “código de histonas” determinando a conformação da cromatina, porém a ação de RNAs não codificadores está relacionada ao silenciamento pós-transcricional de genes, através do mecanismo de RNA de interferência onde ocorre o bloqueio da tradução ou degradação do mRNA alvo. Além da ação bloqueadora da transcrição, os siRNA podem ser associados à metilação de sequências de DNA. (BIRDI, 2002). A ocorrência destes mecanismos parece estar interligada para a organização estrutural da cromatina tornando-a mais susceptível ou não aos fatores de transcrição. As mudanças epigenéticas são fortemente influenciadas pelo ambiente, a qualquer alteração ambiental e ataque de patógenos. O estresse ambiental, incluindo a hibridação e a poliploidização, são determinantes nesta ocorrência (GRANT-DOWNTON; DICKINSON, 2005).

Na regeneração de plantas, o cultivo de células vegetais e seu desenvolvimento acontecem exclusivamente através de divisões mitóticas com intuito de obter um clone com as mesmas características agronômicas pré-selecionadas. A obtenção de plantas oriundas de um único órgão vegetal daria teoricamente uma população uniforme, porém a ocorrência de variação espontânea e aleatória é um fenômeno inesperado e indesejado, tendo como resultado uma população heterogênea o que torna a clonagem de genótipos superiores ineficaz. Em contrapartida, o aparecimento de variações genéticas

pode ser de grande valia para o melhoramento genético, pois pode permitir o surgimento de características estáveis de interesse, não presentes no genótipo original, que poderão ser usadas na geração de novas variedades. Um bom exemplo disso em videira é o surgimento em 1933, na cidade Jundiaí estado de São Paulo, a variedade Niágara Rosada, a partir de uma mutação espontânea de Niágara Branca que ocorreu no campo. Posteriormente essa mutação foi preservada pela propagação clonal e atualmente a variedade rosada é mais cultivada que sua versão predecessora de fruto branco (SOUZA, 1959 citado por FERRI; POMMER, 1998). Por isso, a indução da variação objetivando a criação de variantes somaclonais de interesse agrônômico, se tornou também uma das ferramentas da biotecnologia vegetal.

No cultivo *in vitro* o aparecimento dessas variações ocorre com certa frequência (YANG et al., 2010), levando pesquisadores a utilizar a cultura de tecidos em combinação com agentes físicos, químicos e biológicos para gerar indivíduos com maior grau de variabilidade genética, tendo potencial de serem fontes para obtenção de novas variedades comerciais (ORBOVICV et al., 2008; RASHEED et al., 2003). A forma mais eficiente e precisa de identificar e monitorar essas variações genéticas em uma cultivar é pelo uso de marcadores moleculares e/ou citometria de fluxo.

2.3 Marcadores moleculares

A aplicação dos marcadores moleculares em videira iniciou-se pela necessidade de detecção da variabilidade genética de bancos de germoplasmas e identificação de constituição genética (“DNA fingerprinting”), evitando assim as classificações não precisas da ampelografia, baseada apenas em parâmetros morfológicos e anatômicos. Posteriormente, começou-se a aplicação de marcadores com o objetivo de se construir mapas genéticos, o uso de

marcadores na seleção assistida para doenças e tolerância a pragas. Logo após seu uso também começou a ser utilizado no monitoramento da variação somaclonal.

Os marcadores moleculares devido as suas atribuições ganharam vasta adoção em laboratórios do mundo inteiro, apesar do pouco tempo de sua implementação como técnica de rotina. Primeiramente foram desenvolvidos marcadores baseados no polimorfismo de isoenzimas, cujo uso iniciou-se em meados da década de 1960 (LEWONTIN; HUBBY, 1966). Logo depois no início da década de 1970 (CAIXETA et al., 2006) surgiu o marcador “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP) ou polimorfismo de comprimento de fragmentos gerados por enzimas de restrição. Este foi o primeiro marcador de polimorfismo ao nível de DNA. A partir da década de 1990, os marcadores de DNA foram impulsionados pela automatização da técnica com as melhorias implantadas na técnica bioquímica “Polimerase Chain Reaction” (PCR) ou reação de polimerização em cadeia.

Com o advento da PCR, surgiram inúmeros marcadores, sendo que os principais são: “Random Amplified Polymorphism DNA” (RAPD) ou polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (WELSH; McCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990); “Amplified Fragment Length Polymorphism” (AFLP) ou marcador de polimorfismo de comprimentos de fragmentos amplificados (VOS et al., 1995); “Simple Sequence Repeat” (SSR) ou sequência simples repetida ou marcadores microssatélite; “Inter Simple Sequence Repeat” (ISSR) (GUPTA et al., 1994; WU et al., 1994; ZIETKIEWICZ et al., 1994); além dos marcadores baseados em sequências de retrotransposon, destacando o marcador *TvvI* (PELSY, 2007). O sequenciamento automático de DNA permitiu uma nova geração de marcadores – o “Single Nucleotide Polymorphism” (SNP) ou polimorfismo de nucleotídeo único; além do polimorfismo baseado na Inserção/Deleção (INDELS).

De acordo com Caixeta et al. (2006) os marcadores moleculares baseados em microssatélites têm sido desenvolvidos para várias espécies de plantas cultivadas, estes estão substituindo rapidamente outros marcadores de vários tipos de estudos genéticos, principalmente devido à sua reprodutibilidade e simplicidade técnica, à pequena quantidade de DNA requerida, ao baixo custo, ao grande poder de resolução e aos altos níveis de polimorfismo. Os marcadores microssatélite constituem uma das classes mais polimórficas de marcadores moleculares disponíveis hoje, estes também apresentam vantagens sobre os demais marcadores baseados em PCR, como o RAPD, porque são co-dominantes e facilmente reproduzíveis, além destas características, os marcadores microssatélite parecem ter distribuição frequente e aleatória, permitindo uma cobertura ampla do genoma.

Estas características são de grande relevância fazendo desses marcadores ferramentas eficientes não só para o mapeamento genômico, mas também para estudos de ligação, identificação de genótipos, proteção de variedades, avaliação de pureza de sementes, utilização e conservação de germoplasma, estudos de diversidade, análise gênica e de loco quantitativos (QTL), análise de *pedigree*, seleção assistida por marcadores, análise de bibliotecas para clonagem de genes, e detecção de variação somaclonal.

2.4 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi originalmente desenvolvida no fim dos anos 50, para contagem e análise de células sanguíneas, porém com a natural evolução técnica e com o aparecimento de novos marcadores fluorescentes, a utilização dessa instrumentação generalizou-se a outras áreas e a estudos com outras células, como células vegetais e microbianas (DOLEZEL, 1997).

Essa tecnologia é baseada na análise das propriedades ópticas (dispersão de luz e fluorescência) de partículas biológicas que fluem numa suspensão líquida dentro de um equipamento denominado citômetro de fluxo. As amostras que se deseja analisar, normalmente tecidos foliares, são trituradas em tampão de extração, para a liberação dos núcleos e em seguida ficam envolvidas e centralizadas num fluxo contínuo de líquido (“sheath-fluid”) e saem desta câmara, uma atrás da outra, de modo que uma única célula seja interceptada pelo laser. Neste momento ocorre um processo de dispersão da luz e/ou emissão de fluorescência (DOLEZEL; BARTOS, 2005). Essa fluorescência é separada pela utilização de uma série de espelhos dicróicos, filtros e fotomultiplicadores (EECKHAUT; LEUS; HUYLENBROECK, 2005). Os circuitos dentro do aparelho convertem esses sinais fluorescentes em valores digitais que são armazenados e exibidos na forma de histogramas (DOLEZEL; GREILHUBER; SUDA, 2007; OCHATT; PATAT-OCHATT; MOESSNER, 2011). Como as partículas são analisadas individualmente em alta velocidade, grandes populações podem ter o conteúdo de DNA mensurado em um curto espaço de tempo (SHAPIRO, 2004). Esta técnica é de grande utilização na determinação do conteúdo de DNA e, por conseguinte, o nível de ploidia, tem conquistado relevante espaço na área vegetal pela geração de informações relacionadas ao genoma, assim como características celulares (MADAIL, 2011).

Segundo Bennet e Leitch (1997) a geração de informação do conteúdo de DNA, pode ser utilizada pela ciência nas mais variadas áreas, e mais recentemente tem se tornado uma importante ferramenta para a compreensão da biodiversidade na escala de genomas.

V. vinifera é uma espécie diplóide ($2n = 2x = 38$) (PEREIRA et al., 2005) propagada vegetativamente. Apresenta de moderada a elevada heterozigotidade, característica esta, conservada durante gerações de multiplicação, devidas a seu modo usual de propagação. No entanto, devido o

uso da micropropagação de microestacas, esporadicamente podem ocorrer mutações deletérias ou não no genoma das plantas em taxas variáveis, dependendo de vários fatores, que vão desde o genótipo até as condições de cultivo *in vitro*. De acordo com Prado et al. (2010), foi possível detectar a ocorrência de variação somaclonal em plantas de *V. vinifera* apenas utilizando a técnica de citometria de fluxo.

2.5 Viroses

A produtividade das culturas está diretamente relacionada com a qualidade fitossanitária das plantas cultivadas em campos de produção. Quando o objetivo é a obtenção de plantas livres de viroses, a cultura de tecidos por meio do cultivo de meristemas pode ser uma forte aliada. Por outro lado, a micropropagação pode se tornar uma forma rápida de disseminação de viroses, visto que a multiplicação de tecidos infectados pode acarretar na produção de materiais também contaminados devido ao processo de propagação vegetativa.

A cultura de meristemas em conjunto com a termoterapia, pode possibilitar a obtenção de clones livres de vírus a partir de meristemas isolados de plantas infectadas (BARLASS et al., 1982; KORUZA; JELASKA, 1993).

Frequentemente se observa em videiras de todas as partes do mundo, doenças que se manifestam por alterações nas folhas, ramos e frutos, acompanhadas de acentuado raquitismo da planta, falência da produtividade, seguidas de declínio e até morte de pomares. O agente causal de tais anomalias permaneceu a mais de um século desconhecido, mas revelou, desde logo, seu caráter infeccioso, capaz de passar de plantas doentes para as sadias, afetando os parreirais geralmente em reboleiras (SOUZA, 1996).

Todas as viroses, mesmo aquelas que não induzem sintomas em determinadas cultivares, interferem, de uma maneira geral, nos processos

fisiológicos da planta de respiração, fotossíntese, reprodução, entre outros, causando prejuízos tais 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, para a cultura da videira, já foram identificados 44 vírus diferentes, pertencentes a 5 famílias e 16 gêneros (MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006). Em material de propagação, já foram encontradas mais de 30 doenças viróticas, alguns desses patógenos são encontrados ocasionalmente na videira e aparentemente não têm expressão econômica. No entanto, embora outros causem prejuízos importantes, podem ocorrer de forma endêmica apenas em algumas regiões do mundo, talvez pelo plantio de cultivares sensíveis ou pelas condições edafoclimáticas regionais que favoreçam a ocorrência de vetores (KUHN et al., 1996).

Entretanto, existe um grupo dessas doenças de grande importância pelos sérios prejuízos causados na viticultura, razão pela qual é 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 nucleico envolto por uma série de proteínas chamada capsídeo. São geralmente transmitidos por enxerto, multiplicação vegetativa e vetores, como: nematóides, cochonilhas, pulgões, tripses. Devido à sua presença na maior parte dos vinhedos e à sua grave incidência econômica, numerosos trabalhos de pesquisa foram realizados nos últimos anos, sobretudo, a partir da década de 60 para elucidar o processo de infecção de videira por vírus (REGINA, 2002).

O grupo dos Nepovirus é o mais disseminado, sendo na Europa denominados degenerativos (*Grapevine Fan Leaf Virus* - GFLV). Outro grupo

de importância constituem os Closterovirus, cujo principal representante em videira é o vírus do enrolamento (*Grapevine Leafroll Virus - GLRV*).

Segundo Kuhn (1984) e Pearson (1996), as viroses consideradas mais importantes e mais difundidas na videira são: 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*).

Embora haja uma 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 a sua baixa capacidade patogênica ou devido ao uso de plantas com tolerância a estas estirpes (KUHN; NICKEL, 1998).

A disseminação natural de 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* (BOSCIA et al., 1993; GOLINO et al., 1995; ROSCIGLIONE et al., 1983) e por nematóides *Xiphinema index* e *Xiphinema italiae* (KUHN, 1984). A disseminação a longa distância ocorre principalmente através do material propagativo infectado, durante o processo de formação das mudas, independente do método de enxertia utilizado.

Todo controle de doenças provocadas por vírus em plantas é ineficaz, a utilização de métodos convencionais curativos como é feito para doenças provocadas por fungos e bactérias é praticamente impossível. Uma vez infectadas, as plantas sempre se manterão infectadas. Os vírus da videira são sistêmicos, isto é, são translocados pela planta através do sistema vascular e deste modo, perpetuam-se na planta após sua implantação. Desta forma, além do uso de material propagativo isento de viroses, o controle de vetores também

assume importância para evitar a infecção das plantas após a instalação do pomar 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 às plantas matrizes, livres de viroses, que servirão como fonte de materiais para a propagação. Geralmente, apenas um número reduzido de plantas cumpre todos os requisitos de pureza genética e qualidade sanitária, podendo com uso da micropropagação obter a multiplicação rápida de várias mudas a partir de apenas uma única planta matriz (REGINA, 2002).

REFERÊNCIAS

ALIZADEH, M.; SINGH, S. K.; PATEL, V. B. Comparative performance of *in vitro* multiplication in four grape (*Vitis* spp.) rootstock genotypes. **International Journal of Plant Production**, Gorgan, v. 4, n. 1, p. 41-50, 2010.

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

BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; STADEN, J. V. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulators**, Netherlands, v. 63, p. 147-173, 2011.

BARLASS, M. et al. Studies on the fragmented shoot apex of grapevine. III. A scanning electron microscope study of adventitious bud formation *in vitro*. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 32, p. 1079-1083, 1982.

BENNET, M.; LEITCH, I. Nuclear DNA amounts in Angiosperms: 583 new estimates. **Annals of Botany**, London, v. 80, n. 2, p. 169-196, 1997.

BIRDI, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development**, New York, v. 16, p. 6-21, 2002.

BORGHEZAN, M. et al. *In vitro* propagation and evaluation of morphophysiological parameters of grapevine rootstocks. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 783-789, 2003.

BOSCIA, D. et al. Properties of a filamentous virus isolated from grapevines affected by corky bark. **Archives of Virology**, New York, v. 130, n. 2, p. 109-120, 1993.

CAIXETA, E. T. et al. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: Suprema, 2006.

CAMARGO, U. A. Cultivares para a viticultura tropical no Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 19, n. 194, p. 15-19, 1998.

CAMARGO, U. A.; TONIETTO, J.; HOFFMANN, A. Progressos na viticultura brasileira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, p. 144-149, 2011. Edição Especial.

CARIMI, F. et al. Somatic embryogenesis from stigmas and styles of grapevine. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Netherlands, v. 41, n. 3, p. 249-252, 2005.

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

COLETTI, L. S.; MARTINS, C. R.; GOULART, M. Micropropagação de porta-enxerto de videira Paulsen 1103 “*in vitro*”, com diferentes concentrações de citocinina. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v. 15, n. 1, p. 102-108, 2008.

DAS, D. K. et al. Encapsulated somatic embryos of grape (*Vitis vinifera* L.): an efficient way for storage and propagation of pathogen-free plant material. **Vitis**, Germany, v. 45, p. 179-184, 2006.

DHEKNEY, S. A. et al. Optimizing Initiation and Maintenance of *Vitis* Embryogenic Cultures. **Hortscience**, Alexandria, v. 44, n. 5, p. 1400-1406, 2009.

DHEKNEY, S. A.; LI, Z. T.; GRAY, D. J. Factors influencing induction and maintenance of *Vitis rotundifolia* Michx. embryogenic cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v. 195, p. 175-180, 2010.

DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, Poland, v. 38, n. 3, p. 285-302, 1997.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 3, p. 99-110, 2005.

DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Flow cytometry with plants an overview. In: **Flow cytometry with plants cells analysis of genes, chromosomes and genomes**. Weinheim: J. Wiley, 2007. p. 41-65.

ECKHAUT, T.; LEUS, L.; HUYLENBROECK, J. V. Exploitation of flow cytometry for plant breeding. **Acta Physiologiae Plantarum**, Pozann, v. 27, n. 4B, p. 743-750, 2005.

FERRI, C. P.; POMMER, C. V. Quarenta e oito anos de melhoramento da videira em São Paulo, Brasil. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 52, n. 1, p. 107-122, 1995.

- FRANKS, T.; HE, D. G.; THOMAS, M. Regeneration of transgenic *Vitis vinifera* L. Sultana plants: a genotypic and phenotypic analysis. **Molecular Breeding**, Netherlands, v. 4, p. 321–333, 1998.
- GAMBINO, G.; BONDAZ, J.; GRIBAUDO, I. Detection and elimination of viruses in callus, somatic embryos and regenerated plantlets of grapevine. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 114, p. 397-404, 2006.
- GAMBINO, G. et al. Molecular characterization of grapevine plants transformed with GFLV resistance genes: I. **Plant Cell Reports**, New Jersey, v. 24, p. 655–662, 2005.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 2nd ed. Edington: Exegetics, 1993. 574 p.
- GIOVANNINI, E. **Produção de uvas para vinho, suco e mesa**. Porto Alegre: Renascença, 1999. p. 364.
- GOLINO, D. A. et al. Transmission studies of grapevine leafroll associated virus and grapevine corky bark associated virus by the obscure mealybug. **American Journal Enology Viticulture**, Davis, v. 46, p. 408, 1995.
- GOUSSARD, P. G.; WIID, J.; KASDORF, G. G. F. The effect of *in vitro* somatic embryogenesis in eliminating fanleaf virus and leafroll associated viruses from grapevines. **South African Journal of Enology and Viticulture**, South Africa, v. 12, p. 77-81, 1991.
- GRANT-DOWNTON, R. T.; DICKINSON, H. G. Epigenetics and its implications for plant biology: the epigenetic network in plants. **Annals of Botany**, London, v. 96, p. 1143–1164, 2005.
- GRAY, D. J.; BENTON, C. M. *In vitro* micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (*Vitis rotundifolia*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v. 27, n. 1, p.7-14, 1991.
- GRAY, D. J.; COMPTON, M. E. Grape somatic embryo dormancy and quiescence: potential of dehydrated synthetic seeds for germplasm conservation. In: Redenbaugh, K. (Ed.). **Synseeds, applications of synthetic seeds to crop improvement**. Boca Raton: CRC, 1993. p. 367– 379.

GUPTA, M. et al. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 89, p. 998–1006, 1994.

HELOIR, M. C. et al. An improved procedure for the propagation *in vitro* of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir) using axillary-bud microcuttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v. 49, n. 3, p. 223-225, 1997.

HUGLIN, P. **Biologie et écologie de la vigne**. Paris: Payot-Lausanne, 1986. p. 371.

KORUZA, B.; JELASKA, S. Influence of meristem culture and virus elimination on phenotypical modifications of grapevine (*Vitis vinifera* L., cv. Refosk). **Vitis**, Germany, v. 32, n. 1, p. 59-60, 1993.

KUHN, G. B. et al. **O cultivo da videira: informações básicas**. 2. ed. Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPV, 1996. p. 60. Circular Técnica, 10.

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

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

LEWONTIN, R. C.; HUBBY, J. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations: amounts of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophyla pseudoobscura*. **Genetics**, Austin, v. 54, p. 595-609, 1966.

MACHADO, M. P. et al. Acclimatization of 'VR043-43' (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*) grapevine rootstock. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, n. 4, p. 419-423, 2010.

MADAIL, R. H. **Descritores morfológicos e conteúdo de DNA na caracterização de acessos de bananeira**. 2011. 104 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

MARTELLI, G. P.; BOUDON-PADIEU, E. **Directory of infectious diseases of grapevines and viroses and virus-like diseases of the grapevine: bibliographi report 1998-2004**. [S. l.: s. n.], 2006. 279 p. (Options méditerranéennes, Série B, 55).

MELO, L. M. R. de. **Viticultura brasileira: panorama 2010**. Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPV, 2011. p. 1-4. Comunicado Técnico.

MHATRE, M.; SALUNKHE, C. K.; RAO, P. S. Micropropagation of *Vitis vinifera* L: towards an improved protocol. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 84, p. 357-363, 2000.

MONTEGUTI, D. et al. Enraizamento de estacas lenhosas de porta-enxertos de videira com uso de fertilizante orgânico. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 1, p. 99, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-479, 1962.

OCHATT, S.; PATAT-OCHATT, E.; MOESSNER, E. Ploidy level determination within the context of *in vitro* breeding. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 104, n. 3, p. 329-341, 2011.

ORBOVICV, C. et al. Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. **Euphytica**, Wageningen, v. 161, p. 329-335, 2008.

PARISH, L. Production, distribution and inspection of fruit trees free from virus and other systemic diseases. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 17, p. 14-18, 1995.

PEARSON, R. C.; GOHEEN, A. C. **Compendium of grape disease**. 4th ed. St. Paul, 1998. p. 93.

PELSY, F. Untranslated leader region polymorphism of Tv1, a retrotransposon family, is a novel marker useful for analyzing genetic diversity and relatedness in the genus *Vitis*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 116, n. 1, p. 15-27, 2007.

PEREIRA, F. M.; NACHTIGAL, J. C. A cultura da videira no Brasil. In: FORO INTERNACIONAL DE CULTIVO PROTEGIDO, 1., 1997. **Anais...** Botucatu: [s. n], 1997. p. 194-225.

PEREIRA, H. S. et al. Genomic analysis of Grapevine Retrotransposon 1 (Gret 1) in *Vitis vinifera*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 111, n. 5, p. 871-878, 2005.

PRADO, M. J. et al. Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis regenerated plants of *Vitis vinifera* by flow cytometry and microsatellite markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 103, p. 49–59, 2010.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A.; MELO, L. M. R. A viticultura brasileira: realidade e perspectivas. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 1., 2002, Andradás. **Anais...** Andradás: [s. n.], 2002. p. 17-32.

PROTAS, J. F. S. **Programa de desenvolvimento estratégico da vitivinicultura do Rio Grande do Sul – Visão 2005**. Disponível em: <<http://www.ibravim.org.br/visao2005.doc>>. Acesso em: 20 set. 2011.

RAPP, R. A.; WENDEL, J. F. Epigenetics and plant evolution. **New Phytologist**, Cambridge, v. 168, p. 81–91, 2005.

RASHEED, S. et al. Agronomical and physiochemical characterization of somaclonal variants in *Indica basmati* rice. **Pak Journal Biology Science**, Pakistan, v. 6, p. 844–848, 2003.

REGINA, M. A. Produção de mudas de videira pela enxertia de mesa. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 216, p. 25-35, 2002.

REGINA, M. A. Produção e certificação de mudas de videira na França 2: técnica de produção de mudas pela enxertia de mesa. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 590-596, 2002.

REZENDE, L. P.; PEREIRA, F. M. Produção de mudas de videira ‘Rubi’ pelo método de enxertia de mesa em estacas herbáceas dos porta-enxertos IAC 313 ‘Tropical’ e IAC 766 ‘Campinas’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 662-667, 2001.

RIBEIRO, L. S. et al. Multiplicação *in vitro* de brotações de várias cultivares de *Coffea arabica* L. em diferentes meios de cultura. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 5, p. 949-954, 2002.

ROSCIGLIONE, B. et al. Mealybug transmission of grapevine vírus A. **Vitis**, Siebeldingen, v. 22, p. 331-347, 1983.

SALVATO, F.; LABATE, C. A. **Epigenética**. 2007. Disponível em: <<http://www.genetica.esalq.usp.br/semina.php>>. Acesso em: 4 fev. 2012.

SCHELLENBAUM, P. et al. Variation in DNA methylation patterns of grapevine somaclones (*Vitis vinifera* L.). **BMC Plant Biology**, London, v. 8, p. 78, 2008.

SHAPIRO, H. M. The evolution of Cytometers. **Cytometry Part A**, Hoboken, v. 58, p. 13-20, 2004.

SILVA, A. L.; DOAZAN, J. P. Une méthode d'irradiation aux rayons gamma appliquée à des portegreffes de vigne *in vitro*. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, Bordeaux, v. 29, p. 1-9, 1995.

SLAVTCHEVA, T.; DIMITROVA, V. Gas exchange of *in vitro* and ex vitro grown grapevine plants. **Photosynthetica**, Czech Republic, v. 39, n.1, p. 29-33, 2007.

SOUSA, J. S. I. Mutações somáticas na videira niagara. **Bragantia**, Campinas, v. 18, p. 387-423, 1959.

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

TECCHIO, M. A. et al. Avaliação do enraizamento, desenvolvimento de raízes e parte aérea de porta-enxertos de videira em condições de campo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1857-1861, 2007.

TRONCOSO, A. et al. The use of *in vitro* culture and tubular container system to propagate selected grapevine plants for sherry wine production. **Acta Horticulturae**, Belgium, v. 227, p. 358-362, 1988.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J. G. K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, p. 6531-6535, 1990.

WU, K. et al. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p. 3257-3258, 1994.

YANG, W. R. et al. *In vitro* regeneration of *Lilium tsingtauense* Gilg. and analysis of genetic variability in micropropagated plants using RAPD and ISSR techniques. **Propagation Ornamental Plants**, Sofia, v. 10, p. 59–66, 2010.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR): anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, San Diego, v. 20, p. 176–183, 1994.

CAPÍTULO 2

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE PORTA-ENXERTOS DE VIDEIRA SOB DIFERENTES COMPOSIÇÕES DE MEIO DE CULTURA

RIBEIRO, A. P., CANÇADO, G. M. A.; NETO, J. V.; ROCHA, H. S.;
FERREIRA, J. L., BOREM, A., PASQUAL, M.

RESUMO

A micropropagação da videira pode ser uma importante alternativa para a obtenção de material vegetativo com boa qualidade fitossanitária e genética. A técnica consiste no processo de enraizamento de brotações multiplicadas *in vitro*. Este processo permite a multiplicação de plantas matrizes livres de vírus e doenças e pode ser utilizado para a preservação de germoplasma. O objetivo desse trabalho foi avaliar diferentes condições de cultivo *in vitro* para onze porta-enxertos de videira. Inicialmente foram avaliadas seis composições de meio de cultura: 1) MS sem carvão ativado; 2) MS com carvão ativado; 3) MS ½ força sem carvão ativado; 4) MS ½ força com carvão ativado; 5) DSD1 sem carvão ativado; e 6) DSD1 com carvão ativado. Posteriormente, avaliou-se o efeito da adição dos reguladores de crescimento GA₃ e AIB ao meio MS. Os resultados indicam que o melhor meio para cultivo *in vitro* da videira é o MS na sua composição original sem a adição de carvão ativado. Os meios DSD1 são ineficientes para manter o desenvolvimento da videira por períodos superiores a 40 dias. Já a adição de AIB não promove nenhum resultado significativo no desenvolvimento das videiras cultivadas *in vitro*, enquanto a adição de GA₃ inibe o enraizamento das microestacas e induz a formação de calos.

Palavras-chave: *Vitis* spp. MS. DSD1. Giberelinas. Auxinas. Micropropagação.

ABSTRACT

The large scale multiplication of grapevine *in vitro* might be an important alternative for the production of grapevine clones with improved phytosanitary and genetic qualities. The technique consists basically of the regeneration and multiplication *in vitro* of plants. This process allows the multiplication of plants free of virus and other diseases and can be used to germplasm conservation. The objective of this work was to evaluate different conditions of *in vitro* growth using eleven genotypes of grapevine rootstocks. The first experiment consisted of six different culture mediums: 1) MS less coal; 2) MS plus coal; 3) MS ½ concentration less coal; 4) MS ½ concentration plus coal; 5) DSD1 less coal; and 6) DSD1 plus coal. In the second experiment were evaluated the effects of growth regulators GA₃ and AIB in the MS medium. The results indicate that the optimum culture medium for *in vitro* propagation of grapevine rootstocks was the MS in its original composition less coal. The medium DSD1 with or without coal, was the ineffective for the development and multiplication of the grapevine rootstocks, mainly after 40 days. The AIB growth regulator did not promoted significant responses in the number and development of the grapevines *in vitro*, while the GA₃ addition inhibited the rooting and induced the formation of callus.

Keywords: *Vitis* spp., MS, DSD1, Gibberellins, Auxins, Micropropagation.

1 INTRODUÇÃO

A propagação da videira é tradicionalmente realizada por meio de estacas herbáceas e lenhosas, sendo este processo lento e sazonal, visto que as estacas são retiradas das plantas matrizes apenas em uma época definida do ano (THOMAS; SCHIEFELBIEN, 2001) com reduzida eficiência para a produção em larga escala ao longo de todo ano. Além disso, pelo sistema convencional, é possível produzir apenas uma quantidade limitada de material propagativo (borbulhas ou estacas) a partir de uma única planta matriz (PIRES; BIASI, 2003). Desta forma, a propagação *in vitro* oferece uma alternativa interessante para a multiplicação rápida e massiva de videira, possibilitando a obtenção de um grande número de plantas saudáveis e geneticamente uniformes.

Para a manipulação *in vitro* visando produção em massa, um dos pré-requisitos é o meio de cultura. Os meios nutritivos utilizados para a cultura de tecidos de plantas fornecem substâncias essenciais para o crescimento e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento (CALDAS et al., 1998). No entanto, as exigências nutricionais para o crescimento ótimo do tecido vegetal *in vitro*, variam com a espécie, estágio de desenvolvimento, com o órgão de onde foi removido o explante e até mesmo com a variedade utilizada (PASQUAL, 2001). Dessa forma, é importante determinar a composição de meio de cultura mais adequada para o estabelecimento, multiplicação e enraizamento de cada variedade. Outro fator importante que merece destaque na propagação *in vitro* é a presença de reguladores de crescimento no meio, tais como auxinas, citocininas e giberelinas, cada um com suas particularidades, seja para brotação, multiplicação ou enraizamento, sendo considerados elementos fundamentais neste processo.

As giberelinas estimulam a divisão e o alongamento celular, podendo promover o crescimento de órgãos vegetais pelo aumento do tamanho de células

já existentes ou recentemente divididas (DAVIES, 1998). Já as auxinas estão envolvidas na regulação de vários processos fisiológicos como dominância apical, formação de raízes laterais e adventícias, abscisão foliar, desenvolvimento de gemas florais e indução da diferenciação vascular (RIBEIRO et al., 2006). Para a regeneração, os explantes são capazes de responder a estímulos realizados por meio do balanço hormonal entre reguladores de crescimento e composição de meios de cultura. Pelas razões mencionadas e a fim de explorar a propagação *in vitro* da videira o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta dos propágulos de onze genótipos de porta-enxertos de videira ao estímulo de diferentes reguladores de crescimento e composições de meios de cultura.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados propágulos de onze genótipos de porta-enxertos de videira, cujas plantas estavam mantidas *in vitro* em sala de crescimento do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) localizado em Caldas, MG. Os genótipos utilizados foram: SO4; IAC 572; IAC 766; R110; Kober 5BB; 101-14; 3309; Paulsen 1103; Traviú; Rupestris Du Lot; Gravesac.

Estacas semi-lenhosas coletadas de plantas matrizes no campo foram armazenadas por cerca de seis meses a 10 °C e submetidas ao tratamento em solução aquosa contendo 3 g/L do fungicida Captan (Ortocid[®]) por 2 min. Posteriormente as estacas tiveram sua base imersa em frasco com água destilada, e mantidas por 15 a 21 dias (dependendo do genótipo) em ambiente fechado com temperaturas entre 22 a 26 °C, umidade relativa entre 65 a 75% e fotoperíodo de 16 h de luz para indução das brotações. As brotações novas e sadias foram excisadas e segmentos nodais contendo pelo menos duas gemas foram selecionados. A desinfestação dos explantes foi realizada como se segue:

imersão por 10 min sob agitação constante em água destilada e autoclavada contendo 0,1% de Tween 20; imersão por 30 seg sob agitação em álcool 70%; imersão por 15 min com agitação em solução de 1,5% hipoclorito de sódio e 0,1% de Tween 20 em água destilada e autoclavada; e por fim, tríplice lavagem em água destilada e autoclavada. Os propágulos foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo antibiótico Ampicilina (1mg/mL), 30 g/L sacarose, 7 g/L ágar-ágar e pH ajustado para 5,7. Após o estabelecimento foram transferidos para frascos contendo 50 mL do mesmo meio para a fase de multiplicação e posterior utilização nos experimentos.

Experimento 1: Efeitos das diferentes composições do meio de cultura. Neste experimento foram testados diferentes composições de meio de cultivo, distribuídos em seis tratamentos descritos a seguir: 1) meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962); 2) meio MS e 0,1% de carvão ativado; 3) meio MS ½ força (metade da concentração dos sais e vitaminas); 4) meio MS ½ força e 0,1% de carvão ativado; 5) meio DSD1 (SILVA; DOAZAN, 1995); e 6) meio DSD1 e 0,1% de carvão ativado. As culturas foram mantidas em temperatura de 26 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro, intensidade luminosa de 72 ± 5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (intensidade medida no topo dos tubos) e umidade relativa de 60-70% por um período de 90 dias. Todos os meios continham 30 g/L de sacarose, 7 g/L ágar-ágar e o pH ajustado para 5,7.

Os seguintes parâmetros foram avaliados: i) dias para o início do enraizamento; ii) número de folhas após 20, 40, 60 e 80 dias de cultivo; iii) peso da matéria fresca da parte aérea; iv) peso da matéria seca da parte aérea; v) peso da matéria fresca do sistema radicular; vi) peso da matéria seca do sistema radicular; vii) área foliar utilizando o software Image Tool[®] (TEXAS HEALTH SCIENCE CENTER. USA); viii) área radicular utilizando o software SIARCS[®] (EMBRAPA, BRASIL); e ix) presença ou ausência de calos.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com dez repetições por tratamento, sendo que cada repetição foi constituída por uma planta em tubo de ensaio contendo 10 mL de meio. Os dados foram analisados pela técnica de estatística multivariada, análise de agrupamento, e através da análise de variância, com teste F para verificar os efeitos principais e da interação entre os fatores. Confirmado efeito significativo foi aplicado o teste de Tukey, a 5% de probabilidade, para comparar as médias, utilizando o software Statistica[®] (STATSOFT, TULSA, USA).

Experimento 2: Efeitos da adição de reguladores de crescimento. Neste experimento foram testados os efeitos da adição de AIB e GA₃ no desenvolvimento de propágulos cultivados *in vitro*, distribuídos em cinco tratamentos descritos a seguir: 1) Meio MS sem adição de reguladores de crescimento; 2) MS + 10 µM de AIB; 3) MS + 10 µM de GA₃; 4) MS + 20 µM de AIB; e 5) MS + 20 µM de GA₃. Utilizou-se o meio MS na sua composição completa baseado nos resultados previamente obtidos no Experimento I. As soluções estoque dos reguladores de crescimento AIB e GA₃ (SIGMA-ALDRICH, USA) foram preparadas a partir de soluções esterilizadas por filtração em membrana de náilon de 0,22 µm (MILLIPORE, USA) e adicionadas ao meio após a autoclavagem. As culturas foram mantidas nas mesmas condições citadas anteriormente, por um período de 90 dias. Os parâmetros avaliados, o delineamento experimental e as análises estatísticas realizadas foram como descrito para o Experimento 1.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os meios de cultura baseados na formulação descrita por Murashige e Skoog (1962) obtiveram a melhor resposta para a maioria dos nove parâmetros que foram avaliados no primeiro experimento (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 Área foliar após 80 dias de cultivo *in vitro* de 11 genótipos de porta-enxerto de videira sob diferentes meios de cultura. Onde: G1: SO4; G2: IAC 572; G3: R110; G4: IAC 766; G5: Kober 5BB; G6: 101-14; G7: 3309; G8: Paulsen 1103; G9: Traviú; G10: Rupestris Du Lot; e G11: Gravesac.
Fonte: Laboratório de Biotecnologia Vegetal, EPAMIG, Caldas, MG (2011)

Experimento I												
Área Foliar (Kpixels)												
	MS - Carvão		MS + Carvão		MS1/2 - Carvão		MS1/2 + Carvão		DSD1 - Carvão		DSD1 + Carvão	
G1	98,49 ± 19,95	Acd	94,72 ± 23,29	Abcd	70,34 ± 9,63	Ab	89,27 ± 18,11	Abc	56,10 ± 12,88	Aa	34,79 ± 5,94	Aa
G2	112,02 ± 16,87	Abcd	111,46 ± 20,66	Aabcd	72,69 ± 16,99	Ab	74,19 ± 21,23	Ac	37,65 ± 8,83	Aa	33,63 ± 6,91	Aa
G3	83,38 ± 18,07	Acd	90,08 ± 24,74	Abcd	53,47 ± 15,19	Ab	85,89 ± 13,84	Abc	33,30 ± 5,76	Aa	34,95 ± 3,66	Aa
G4	104,28 ± 18,01	Acd	27,21 ± 9,10	Ad	64,85 ± 16,96	Ab	42,04 ± 11,87	Ac	32,75 ± 10,08	Aa	44,56 ± 7,92	Aa
G5	155,58 ± 30,45	Aabc	148,62 ± 13,61	Aab	110,83 ± 12,65	ABab	119,36 ± 13,93	ABabc	32,96 ± 5,52	Ba	37,33 ± 3,09	Ba
G6	49,00 ± 8,85	Ad	35,77 ± 7,61	Acd	100,19 ± 17,45	Aab	63,79 ± 17,54	Ac	36,60 ± 6,04	Aa	33,83 ± 5,39	Aa
G7	156,50 ± 13,19	Aabc	128,03 ± 23,38	Aabc	134,19 ± 27,05	Aab	189,96 ± 11,97	Aa	19,02 ± 2,08	Ba	18,10 ± 1,90	Ba
G8	202,25 ± 30,26	Aab	201,59 ± 24,98	Aa	194,64 ± 17,11	Aa	173,41 ± 14,76	Aab	48,03 ± 12,47	Ba	42,75 ± 9,22	Ba
G9	141,29 ± 20,21	ABabcd	96,33 ± 29,45	ABCbcd	143,74 ± 23,22	Aab	136,28 ± 17,39	ABabc	44,54 ± 15,47	BCa	31,39 ± 7,77	Ca
G10	115,30 ± 28,18	ABCbcd	165,49 ± 30,18	Aab	173,15 ± 21,36	Aa	131,58 ± 19,31	ABabc	39,26 ± 4,56	BCa	31,37 ± 7,60	Ca
G11	211,95 ± 14,29	Aa	163,23 ± 25,71	Aab	128,45 ± 16,76	Aab	129,07 ± 25,46	Aabc	24,02 ± 3,09	Ba	21,37 ± 4,77	Ba

Médias com letras maiúsculas, seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey e médias com letras minúsculas, seguidas por letras diferentes na mesma coluna, diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. Os valores de médias são seguidos pelo valor do erro padrão da média.

Tabela 2 Área radicular após 80 dias de cultivo *in vitro* de 11 genótipos de porta-enxerto de videira sob diferentes meios de cultura. Onde: G1: SO4; G2: IAC 572; G3: R110; G4: IAC 766; G5: Kober 5BB; G6: 101-14; G7: 3309; G8: Paulsen 1103; G9: Traviú; G10: Rupestris Du Lot; e G11: Gravesac. Fonte: Laboratório de Biotecnologia Vegetal, EPAMIG, Caldas, MG (2011)

Experimento I												
	Área Radicular (Kpixels)											
	MS - Carvão		MS + Carvão		MS1/2 - Carvão		MS1/2 + Carvão		DSD1 - Carvão		DSD1 + Carvão	
G1	1,682 ± 0,72	Ab	2,197 ± 1,04	Ab	1,039 ± 0,32	Abc	1,739 ± 0,55	Ad	1,298 ± 0,39	Aa	1,040 ± 0,44	Aa
G2	1,718 ± 0,48	Ab	3,092 ± 1,03	Aab	0,406 ± 0,22	Abc	0,234 ± 0,11	Ad	0,447 ± 0,24	Aa	0,848 ± 0,25	Aa
G3	3,462 ± 1,77	Ab	4,483 ± 1,90	Aab	0,906 ± 0,40	Abc	2,075 ± 0,67	Acd	1,283 ± 0,59	Aa	0,731 ± 0,30	Aa
G4	2,985 ± 0,86	Ab	0,060 ± 0,04	Ab	1,265 ± 0,35	Abc	0,659 ± 0,32	Ad	1,749 ± 0,23	Aa	2,095 ± 0,50	Aa
G5	2,323 ± 1,01	Ab	4,233 ± 1,14	Aab	2,307 ± 0,47	Abc	3,210 ± 1,27	Abcd	2,212 ± 0,62	Aa	1,811 ± 0,53	Aa
G6	0,999 ± 0,50	Ab	0,564 ± 0,36	Ab	2,522 ± 1,13	Abc	1,404 ± 0,95	Ad	1,510 ± 0,66	Aa	0,743 ± 0,29	Aa
G7	3,350 ± 0,93	BCb	3,403 ± 1,05	BCab	6,439 ± 1,92	Bab	9,647 ± 1,51	Aa	0,947 ± 0,33	BCa	0,282 ± 0,16	Ca
G8	12,026 ± 2,41	Aa	8,136 ± 1,55	Aa	11,218 ± 2,63	Aa	7,846 ± 1,64	ABabc	2,034 ± 0,44	Ba	2,296 ± 0,61	Ba
G9	4,234 ± 1,01	Ab	1,952 ± 0,80	Ab	6,575 ± 1,58	Aab	5,681 ± 1,36	Aabcd	4,763 ± 0,78	Aa	1,798 ± 0,38	Aa
G10	2,769 ± 1,30	BCb	5,581 ± 1,33	ABCab	10,962 ± 1,67	Aa	8,311 ± 1,43	ABab	3,453 ± 0,58	BCa	1,211 ± 0,43	Ca
G11	4,252 ± 0,76	Ab	4,176 ± 1,17	Aab	3,32 ± 1,07	Abc	4,385 ± 1,02	Aabcd	0,273 ± 0,25	Aa	0,601 ± 0,48	Aa

Médias com letras maiúsculas, seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey e médias com letras minúsculas, seguidas por letras diferentes na mesma coluna, diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. Os valores de médias são seguidos pelo valor do erro padrão da média.

Os dendogramas obtidos a partir da análise multivariada dos tratamentos considerando todos os parâmetros (Figura 1) indicam que os tratamentos com a constituição baseada no meio MS foram superiores aos tratamentos com a constituição baseada no meio DSD1, claramente indicado pelo agrupamento dos tratamentos meio DSD1 e meio DSD1 com 0,1% de carvão ativado em uma ramificação distinta do dendograma, enquanto os demais meios se agruparam em outra ramificação. O genótipo Paulsen 1103 cultivado no meio MS completo e sem a presença de carvão ativado foi o que obteve a melhor resposta de crescimento, sendo que no agrupamento dos genótipos ele (G8) se destacou dos demais genótipos conforme se observa na Figura 2, não se agrupando aos demais. Além disso, as médias dos tratamentos de área foliar e área radicular observada para esse genótipo foram superiores às médias observadas para os demais genótipos testados (Tabela 1 e 2) mostrando o caráter de resposta dependente do genótipo.

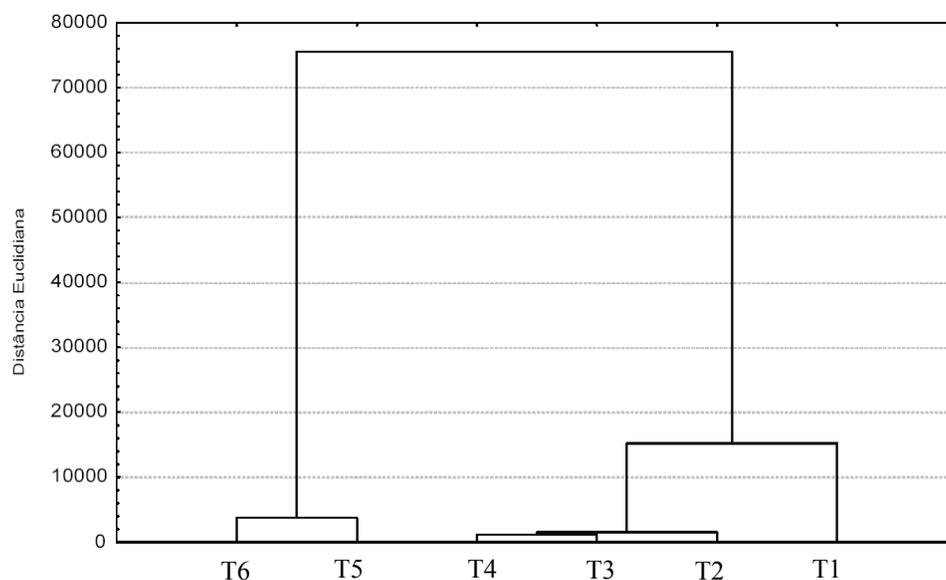


Figura 1 Dendrograma da distância euclidiana de nove parâmetros em análise multivariada para os tratamentos T1: MS sem carvão ativado; T2: MS com carvão ativado; T3: MS ½ força sem carvão ativado; T4: MS ½ força com carvão ativado; T5: DSD1 sem carvão ativado; T6: DSD1 com carvão ativado. Os genótipos avaliados foram: 1) Gravesac; 2) Rupestris; 3) Traviú; 4) Paulsen 1103; 5) 3309; 6) 101-14; 7) Kober 5BB; 8) IAC 766; 9) R110; 10) IAC 572; 11) SO4. Os parâmetros utilizados na análise multivariada foram: 1) início do enraizamento (dias); 2) número de folhas após 20, 40, 60 e 80 dias; 3) comprimento da parte aérea após 90 dias (cm); 4) peso de matéria fresca da parte aérea após 90 dias (g); 5) peso de matéria fresca da raiz após 90 dias (g); 6) peso de matéria seca da parte aérea após 90 dias (g); 7) peso de matéria seca da raiz após 90 dias (g); 8) área radicular (pixels); 9) área foliar (pixels)
 Fonte: Laboratório de Biotecnologia Vegetal, EPAMIG, Caldas, MG (2011)

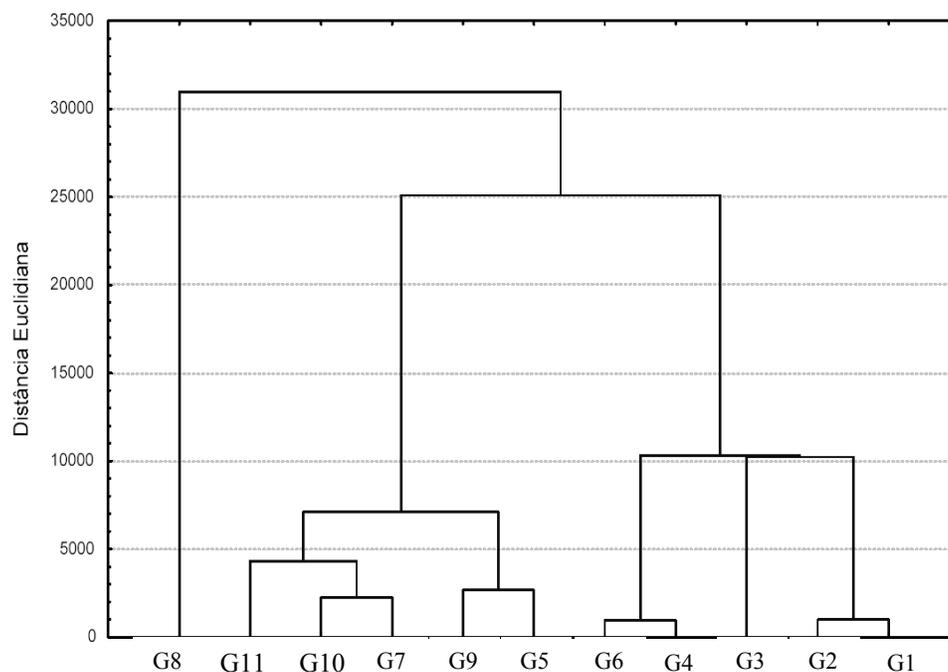


Figura 2 Dendrograma da distância euclidiana de nove parâmetros em análise multivariada para os genótipos G1: Gravesac; G2: Rupestris; G3: Traviú; G4: Paulsen 1103; G5: 3309; G6: 101-14; G7: Kober 5BB; G8: IAC 766; G9: R110; G10: IAC 572; G11: SO4. Os tratamentos avaliados foram: 1) MS sem carvão ativado; 2) MS com carvão ativado; 3) MS ½ força sem carvão ativado; 4) MS ½ força com carvão ativado; 5) DSD1 sem carvão ativado; 6) DSD1 com carvão ativado. Os parâmetros utilizados na análise multivariada foram: 1) início do enraizamento (dias); 2) número de folhas após 20, 40, 60 e 80 dias; 3) comprimento da parte aérea após 90 dias (cm); 4) peso de matéria fresca da parte aérea após 90 dias (g); 5) peso de matéria fresca da raiz após 90 dias (g); 6) peso de matéria seca da parte aérea após 90 dias (g); 7) peso de matéria seca da raiz após 90 dias (g); 8) área radicular (pixels); 9) área foliar (pixels)

Fonte: Laboratório de Biotecnologia Vegetal, EPAMIG, Caldas, MG (2011)

Para o parâmetro de número de folhas após 20, 40, 60 e 80 dias, o tratamento MS na composição original e na ausência de carvão ativado mostrou-

se ligeiramente superior aos demais tratamentos, isso na avaliação de todos os onze genótipos de forma agrupada (Figura 3). Interessante observar que, após 40 dias de cultivo *in vitro*, os tratamentos com o meio DSD1, paralisaram o desenvolvimento de novas folhas, o que sugere que o meio DSD1 não possui uma formulação de sais e nutrientes capaz de suprir o desenvolvimento dos propágulos por períodos maiores de tempo.

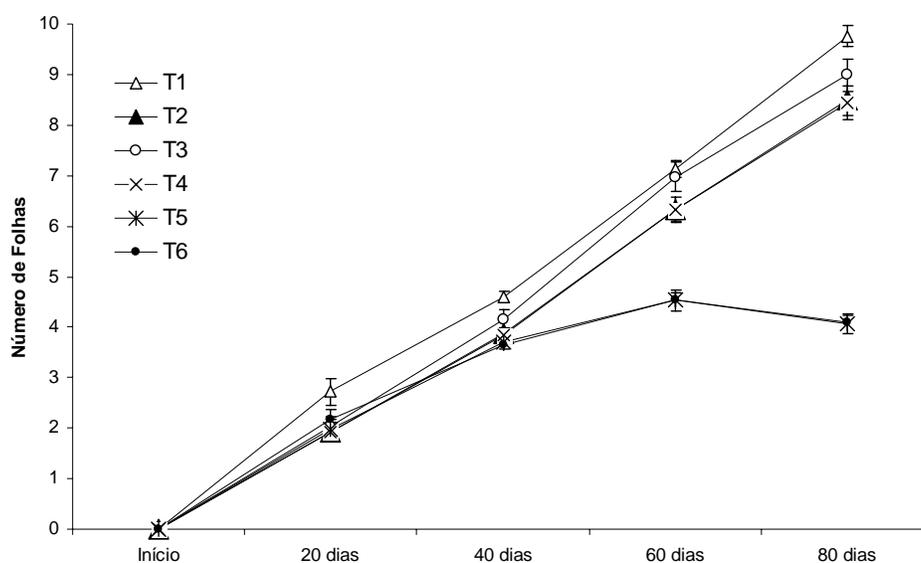


Figura 3 Número de folhas de propágulos de porta-enxerto de videira, cultivadas *in vitro* após período de 20, 40, 60 e 80 dias. Onde T1: MS sem carvão ativado; T2: MS com carvão ativado; T3: MS ½ força sem carvão ativado; T4: MS ½ força com carvão ativado; T5: DSD1 sem carvão ativado; T6: DSD1 com carvão ativado. As médias foram obtidas a partir de 110 parcelas (10 repetições para cada um dos 11 genótipos) para cada tratamento. As barras verticais representam o erro padrão da média

Fonte: Laboratório de Biotecnologia Vegetal, EPAMIG, Caldas, MG (2011)

A quantidade de nitrogênio disponível no meio DSD1 é bem inferior à quantidade de nitrogênio disponível no meio MS, mesmo quando esse último é utilizado na metade da concentração original. A concentração do nitrato de amônia, que no DSD1 é de apenas 100 mg/L, no meio MS na sua concentração

original é de 1.650 mg/L, ou seja, cerca de dezesseis vezes superior. O nitrogênio é essencial para diversos processos metabólicos, tais como síntese de proteínas e bases nitrogenadas componentes dos ácidos nucleicos (TORRES et al., 2001) e a limitação de sua disponibilidade pode reduzir ou mesmo paralisar o desenvolvimento.

A partir dos resultados obtidos no primeiro experimento, ficou claro que para trabalhos de rotina em laboratório, o meio MS na sua composição original, ou mesmo o meio MS na metade de sua concentração, são mais adequados para o cultivo da videira do que o meio DSD1 proposto por Silva e Doazan (1995).

No caso do carvão ativado, embora os efeitos benéficos da adição desse composto na adsorção e quelação de substâncias tóxicas que inibem o crescimento sejam relatados por diversos autores (KAJIKI; SHEPHERD, 2006; PASQUAL 2001), não se observou significativamente o efeito benéfico da adição desse composto no crescimento dos genótipos avaliados, quando comparado aos meios de cultura sem sua adição (Figura 1 e 3; Tabelas 1 e 2). Uma possível explicação pode ser o fato de que os segmentos nodais de videira não apresentaram sinais visíveis de exsudação de compostos fenólicos nos meios sem a adição de carvão, o que tornou desnecessário a adição do mesmo. Além disso, o carvão devido suas propriedades quelantes pode ter reduzido a disponibilidade de alguns dos compostos e nutrientes essenciais para o desenvolvimento dos propágulos *in vitro*, o que explicaria o baixo desempenho dos meios com carvão quando comparados aos meios sem esse composto (Tabelas 1 e 2).

No segundo experimento observou-se que a micropropagação de segmentos nodais de videira, com cerca de duas a três gemas, obtidos de brotações oriundas de estacas semi-lenhosas colhidas na estação anterior, não necessitam da adição de reguladores de crescimento. Segundo Alasania et al. (2007) a adição da auxina AIA em meio de cultura afetou negativamente o

desenvolvimento da cultivar 'Chkhaveri' *in vitro*. Segundo os autores, a elevada concentração endógena de auxinas no tecido das microestacas é suficiente para o desenvolvimento. Os resultados indicam que para o AIB nenhuma resposta positiva e significativa foi obtida para os parâmetros avaliados, tanto para a concentração de 10 μM ou 20 μM (Tabela 3 e 4), quando comparado com a testemunha onde não foi adicionado AIB no meio. No caso do GA_3 , observou-se que a adição dessa giberelina fortemente inibiu a formação de raízes, induzindo ainda, a formação de calos na base do segmento nodal, tanto para as concentrações de 10 μM como de 20 μM .

Avaliando as médias obtidas para a área foliar (Tabela 3), verifica-se que o genótipo 101-14 (G6) apresentou o melhor resultado para os tratamentos controle, 10 e 20 μM de AIB. A adição de GA_3 teve efeito negativo na área foliar para todos os genótipos de videira testados (Tabela 3) indicando que a adição desse regulador de crescimento prejudicou o desenvolvimento das plântulas, tanto na concentração de 10 como de 20 μM . Isso pode estar relacionado ao fato desse regulador de crescimento fortemente inibir o enraizamento, o que provavelmente prejudicou a absorção de nutrientes no meio e conseqüentemente, o desenvolvimento dos propágulos.

Tabela 3 Área foliar após 80 dias de cultivo *in vitro* de 11 genótipos de porta-enxerto de videiros cultivados *in vitro* sob diferentes meios de cultura. Onde: G1: SO4; G2: IAC 572; G3: R110; G4: IAC 766; G5: Kober 5BB; G6: 101-14; G7: 3309; G8: Paulsen 1103; G9: Traviú; G10: Rupestris Du Lot; e G11: Gravesac
 Fonte: Laboratório de Biotecnologia Vegetal, EPAMIG, Caldas, MG (2011)

Experimento II										
	Área Foliar (Kpixels)									
	Controle		10 µM AIB		10 µM GA ₃		20 µM AIB		20 µM GA ₃	
G1	184,18 ± 22,6	Aa	184,44 ± 27,7	Aab	45,49 ± 8,7	Ba	76,05 ± 20,9	Bab	34,66 ± 4,4	Ba
G2	147,55 ± 31,6	Aab	92,49 ± 32,5	ABbc	70,45 ± 29,4	ABa	50,76 ± 22,6	ABb	28,11 ± 4,7	Ba
G3	119,63 ± 23,9	Aab	98,89 ± 24,7	Abc	59,73 ± 9,4	Aa	125,99 ± 4,5	Aab	52,74 ± 11,3	Aa
G4	107,73 ± 17,2	Aab	105,71 ± 24,0	Abc	76,34 ± 14,1	Aa	87,74 ± 24,0	Aab	42,26 ± 4,3	Aa
G5	181,90 ± 30,6	Aa	125,35 ± 13,3	ABabc	58,13 ± 4,1	Ba	75,62 ± 20,5	Bab	37,15 ± 4,2	Ba
G6	178,32 ± 20,1	Aa	230,44 ± 17,7	Aa	54,46 ± 5,8	Ba	172,97 ± 18,9	Aa	43,49 ± 4,8	Ba
G7	167,94 ± 25,2	Aab	134,420 ± 24,4	ABabc	38,54 ± 3,9	Ba	123,48 ± 26,1	ABab	32,48 ± 2,4	Ba
G8	157,17 ± 20,3	Aab	114,48 ± 18,3	ABbc	50,73 ± 8,3	Ba	129,17 ± 23,8	ABab	47,89 ± 4,8	Ba
G9	99,43 ± 13,8	Aab	106,51 ± 15,7	Abc	40,75 ± 2,6	Aa	48,54 ± 7,8	Ab	33,04 ± 3,1	Aa
G10	66,34 ± 9,4	Ab	51,22 ± 18,7	Ac	87,93 ± 27,5	Aa	35,15 ± 3,9	Ab	25,43 ± 3,5	Aa
G11	114,95 ± 20,5	Aab	129,47 ± 20,8	Aabc	58,26 ± 8,6	Aa	74,17 ± 15,2	Aab	41,27 ± 4,6	Aa

Médias com letras maiúsculas, seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey e médias com letras minúsculas, seguidas por letras diferentes na mesma coluna, diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. Os valores de médias são seguidos pelo valor do erro padrão da média.

Tabela 4 Área radicular após 80 dias de cultivo *in vitro* de 11 genótipos de porta-enxerto de videira cultivados *in vitro* sob diferentes meios de cultura. Onde: G1: SO4; G2: IAC 572; G3: R110; G4: IAC 766; G5: Kober 5BB; G6: 101-14; G7: 3309; G8: Paulsen 1103; G9: Traviú; G10: Rupestris Du Lot; e G11: Gravesac
 Fonte: Laboratório de Biotecnologia Vegetal, EPAMIG, Caldas, MG (2011)

Experimento II										
Área Radicular (Kpixels)										
	Controle		10 µM AIB		10 µM GA ₃		20 µM AIB		20 µM GA ₃	
G1	2,417 + 0,73	ABabc	5,161 + 2,13	Aabc	0,000 + 0,0	Ba	1,316 + 0,75	ABabc	0,000 + 0,0	Ba
G2	0,671 + 0,17	Abc	1,036 + 0,49	Ac	0,129 + 0,11	Aa	0,693 + 0,67	Abc	0,000 + 0,0	Aa
G3	2,302 + 0,60	Aabc	2,395 + 0,90	Ac	0,040 + 0,03	Aa	2,930 + 2,22	Aabc	0,000 + 0,0	Aa
G4	1,802 + 0,61	Abc	1,950 + 0,51	Ac	0,431 + 0,19	Aa	1,168 + 0,44	Aabc	0,161 + 0,1	Aa
G5	0,815 + 0,31	Abc	1,499 + 0,55	Ac	0,000 + 0,0	Aa	0,329 + 0,18	Ac	0,000 + 0,0	Aa
G6	5,601 + 2,09	Aab	7,752 + 1,03	Aab	0,076 + 0,0	Ba	5,622 + 1,59	Aab	0,000 + 0,0	Ba
G7	4,672 + 0,98	ABabc	8,846 + 2,01	Aa	0,000 + 0,0	Ba	5,860 + 1,66	Aa	0,000 + 0,0	Ba
G8	7,357 + 1,22	Aa	3,998 + 1,41	ABabc	0,219 + 0,19	Ba	4,063 + 1,95	Babc	0,030 + 0,0	Ba
G9	3,132 + 0,82	Aabc	3,635 + 0,0	Abc	0,000 + 0,0	Aa	0,299 + 0,16	Ac	0,000 + 0,0	Aa
G10	0,102 + 0,06	Ac	1,404 + 1,35	Ac	1,067 + 0,75	Aa	0,239 + 0,20	Ac	0,000 + 0,0	Aa
G11	2,788 + 0,61	Aabc	5,260 + 1,51	Aabc	0,245 + 0,17	Aa	0,410 + 0,26	Ac	0,239 + 0,16	Aa

Médias com letras maiúsculas, seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey e médias com letras minúsculas, seguidas por letras diferentes na mesma coluna, diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. Os valores de médias são seguidos pelo valor do erro padrão da média.

Dentre os genótipos estudados, os que apresentaram melhor resposta para os índices de área radicular foram o Paulsen 1103 (G8) para os tratamentos com ausência de regulador de crescimento, 20 μM de AIB e 10 μM de AIB, respectivamente (Tabela 4), seguido pelos genótipos 101-14 (G6), 3309 (G7), Traviú (G9), Gravesac (G11), SO4 (G1) e R110 (G3). Com exceção dos genótipos Traviú e Gravesac cultivados na presença de 20 μM de AIB, os demais genótipos não apresentaram inibição de crescimento radicular pela adição de AIB. No entanto, a diferença observada no meio com ausência e com a presença do AIB não foi estatisticamente significativa, indicando que não houve efeito positivo da adição do AIB (Tabela 4). A semelhança da área foliar, a adição de GA_3 no meio de cultura prejudicou a formação de raízes em todos os genótipos estudados (Tabela 4). Vários genótipos não apresentaram sinais de início de enraizamento, mesmo aos 80 dias de cultivo, e muitos desenvolveram calos na base dos segmentos nodais.

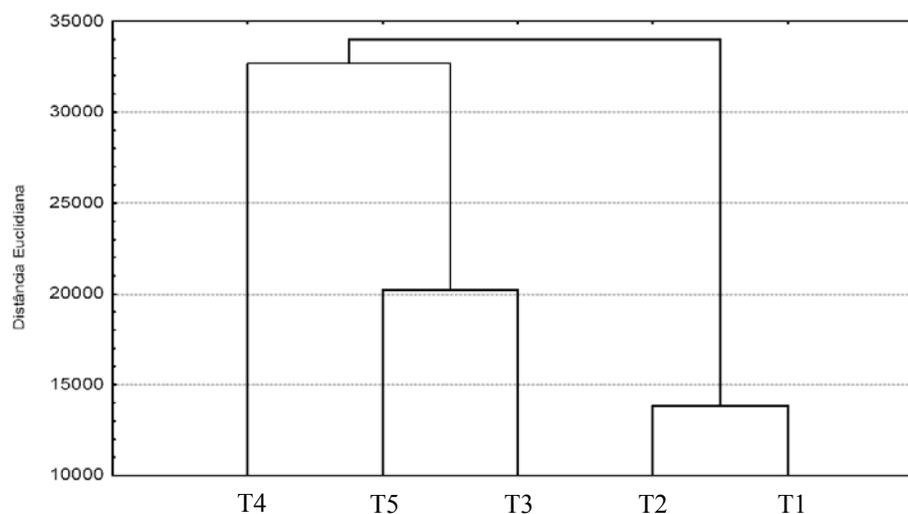


Figura 4 Dendrograma da distância euclidiana de nove parâmetros em análise multivariada para os tratamentos T1: MS sem fitorregulador de crescimento; T2: MS mais 10 μM de AIB; T3: MS mais 20 μM de AIB; T4: MS mais 10 μM de GA_3 ; T5: MS mais 20 μM de GA_3 . Os genótipos avaliados foram: 1) Gravesac; 2) Rupestris; 3) Traviú; 4) Paulsen 1103; 5) 3309; 6) 101-14; 7) Kober 5BB; 8) IAC 766; 9) R110; 10) IAC 572; 11) SO4. Os parâmetros utilizados na análise multivariada foram: 1) início do enraizamento (dias); 2) número de folhas após 20, 40, 60 e 80 dias; 3) comprimento da parte aérea após 90 dias (cm); 4) peso de matéria fresca da parte aérea após 90 dias (g); 5) peso de matéria fresca da raiz após 90 dias (g); 6) peso de matéria seca da parte aérea após 90 dias (g); 7) peso de matéria seca da raiz após 90 dias (g); 8) área radicular (pixels); 9) área foliar (pixels)

Fonte: Laboratório de Biotecnologia Vegetal, EPAMIG, Caldas, MG (2011)

Na figura 4, observa-se que os tratamentos com 10 e 20 μM de GA_3 , associado ao tratamento com 20 μM de AIB se associaram em um ramo distinto ao dos tratamentos controle e 10 μM de AIB para os nove parâmetros avaliados, indicando que não houve efeito benéfico da adição dos reguladores de crescimento. O genótipo 101-14 (G6), seguido pelos genótipos IAC 572 (G10) e R110 (G9), foram os que apresentaram melhor desempenho global, respectivamente (Figura 5).

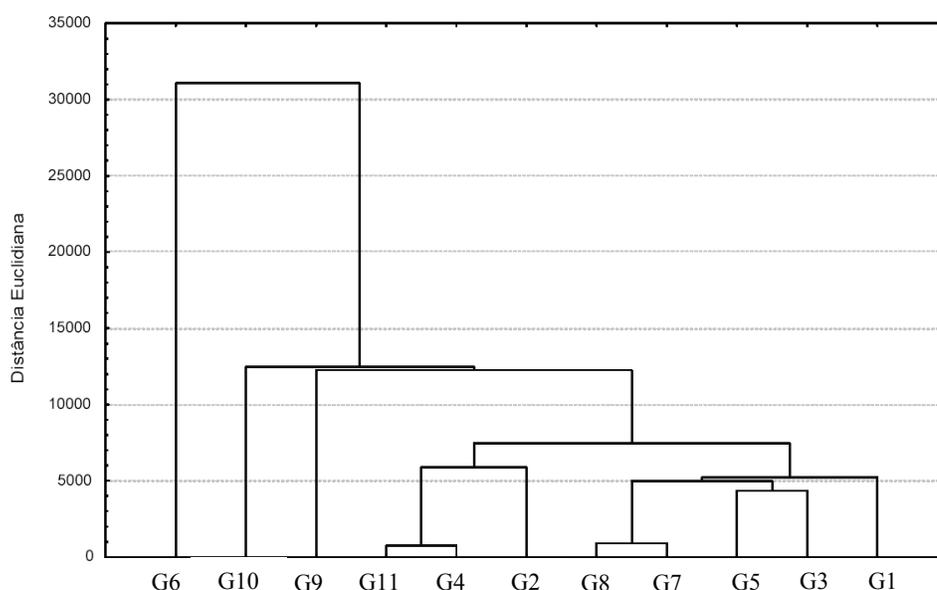


Figura 5 Dendrograma da distância euclidiana de nove parâmetros em análise multivariada para os genótipos G1: Gravesac; G2: Rupestris; G3: Traviú; G4: Paulsen 1103; G5: 3309; G6: 101-14; G7: Kober 5BB; G8: IAC 766; G9: R110; G10: IAC 572; G11: SO4. Os tratamentos avaliados foram: 1) MS sem fitorregulador de crescimento; 2) MS mais 10 μM de AIB; 3) MS mais 20 μM de AIB; 4) MS mais 10 μM de GA_3 ; 5) MS mais 20 μM de GA_3 . Os parâmetros utilizados na análise multivariada foram: 1) início do enraizamento (dias); 2) número de folhas após 20, 40, 60 e 80 dias; 3) comprimento da parte aérea após 90 dias (cm); 4) peso de matéria fresca da parte aérea após 90 dias (g); 5) peso de matéria fresca da raiz após 90 dias (g); 6) peso de matéria seca da parte aérea após 90 dias (g); 7) peso de matéria seca da raiz após 90 dias (g); 8) área radicular (pixels); 9) área foliar (pixels)
 Fonte: Laboratório de Biotecnologia Vegetal, EPAMIG, Caldas, MG (2011)

4 CONCLUSÕES

O meio MS na sua composição original e na ausência de carvão ativado apresenta melhor resposta para o conjunto de parâmetros avaliados durante a propagação *in vitro* dos genótipos de videira testados;

O meio DSD1, na presença ou ausência de carvão ativado, é ineficiente para suprir o desenvolvimento dos propágulos de videira por períodos acima de 40 dias de cultivo *in vitro*;

A adição de AIB no meio de cultivo não melhora o desenvolvimento dos propágulos ou do processo de enraizamento dos explantes caulinares de videira cultivados *in vitro*, quando comparado ao meio na ausência desse regulador de crescimento;

A adição de GA₃ no meio de cultura inibe o processo de enraizamento e estimula o desenvolvimento de calos na base dos explantes caulinares de videira cultivados *in vitro*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da IFS, FAPEMIG, FINEP, EMBRAPA, CAPES e CNPq.

REFERÊNCIAS

ALASANIA, N. et al. Effect of Different Growth Media on *in vitro* Propagation of Grapevine Cultivar “Chkhaveri”. **Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences**, Georgia, v. 175, n. 3, p. 94-96, 2007.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPH/ABCTP, 1990. p. 37-70.

DAVIES, P. J. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: _____. **Plant hormones and their role in plant growth and development**. 2nd ed. Dordrecht: Kluwer Academic, 1988. p. 1-11.

KAJIKI, F. O.; SHEPHERD, S. L. K. Micropropagação da espécie nativa *Baccharis tridentata* Vahl. (*Asteraceae*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 42-47, 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, p. 473-479, 1962.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais**: tecnologia e aplicações. Meios de cultura. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. p. 74.

PIRES, E. J. P.; BIASI, L. A. Propagação da videira. In: POMMER, C. V. (Ed). **Uva**: tecnologia da produção, pós-colheita e mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003. p. 295-350.

RIBEIRO, M. N. O. et al. Efeitos do AIB e GA₃ na micropropagação de *Zantedeschia aethiopica*. **Ceres**, Viçosa, MG, v. 53, n. 309, p. 568-573, 2006.

SILVA, A. L.; DOAZAN, J. P. Une méthode d'irradiation aux rayons gamma appliquée à des portegreffes de vigne *in vitro*. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, Bordeaux, v. 29, n. 1, p. 1-9, 1995.

THOMAS, P.; SCHIEFELBEIN, J. Combined *in vitro* and *in vivo* propagation for rapid multiplication of grapevine cv. Arka Neelamani. **HortScience**, Alexandria, v. 36, n. 3, p. 1107-1110, 2001.

TORRES, A. C. et al. **Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 2001. Circular Técnica, 24.

CAPÍTULO 3

MARCADORES MICROSSATÉLITE NA ANÁLISE DA VARIAÇÃO SOMACLONAL EM PORTA-ENXERTOS DE VIDEIRA

RESUMO

As técnicas de biologia molecular têm sido empregadas rotineiramente em diversos tipos de análises, particularmente o uso de marcadores moleculares para estudos genéticos aprofundados, bem como estudos de características de interesse. Os marcadores moleculares do tipo microssatélite são bastante empregados como, por exemplo, para estudo de herdabilidade e fidelidade genética, avaliando-se a incidência de polimorfismos dentro de uma mesma espécie e variedades. Neste trabalho utilizou-se marcadores microssatélite para identificar a ocorrência de variação somaclonal em cinco genótipos de porta-enxertos de videira, mais utilizados para produção de mudas enxertadas: SO4, Kober 5BB, 101-14, Paulsen 1103 e Gravesac. As amostras das plantas analisadas compreendem os diferentes estágios de propagação clonal por cultura de tecidos, são elas: plantas cultivadas em banco de germoplasma *in vivo* no campo, plantas micropropagadas e cultivadas em sala de crescimento *in vitro* e plantas aclimatizadas em casa-de-vegetação. Utilizou-se cinco marcadores microssatélite pertencentes ao 'Core set', VVS2, VVMD7, VVMD5, VVMD25 e VRZag62, destes somente o VVMD7 detectou polimorfismo para plântulas *in vitro*, confirmando que este tipo de marcador é eficaz na detecção da ocorrência da variação somaclonal em plantas micropropagadas.

Palavras-chave: SSR. Micropropagação. *Vitis sp.* Cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

The molecular biology techniques have been routinely used in several types of analyzes, particularly the use of molecular markers for detailed genetic studies, as well as studies of characteristics of interest. The microsatellite molecular markers are extensively used, for example, to study the heritability and genetic fidelity by assessing the incidence of polymorphisms within a species and varieties. In this work, it was used microsatellite markers to identify the occurrence of somaclonal variation in five genotypes of grapevine rootstocks, most used for production of plantlets for grafting: SO4, Kober 5BB, 101-14, Paulsen 1103, and Gravesac. Plant samples analyzed included the different stages of clonal propagation by tissue culture: plants grown in the germplasm bank in the field; plants *in vitro* cultivated; and acclimated plants growing under green-house conditions. It were used five microsatellite markers from the grapevine 'Core set' identified as VVS2, VVMD7, VVMD5, VVMD25 and VRZag62. Among these markers, only VVMD7 detected genetic polymorphism in polymorphism in plantlets cultivated *in vitro*, confirming that this type molecular marker are effective in the for detection of occurrence of somaclonal variation in micropropagated plants.

Keywords: SSR. Micropropagation. *Vitis sp.* Culture *in vitro*.

1 INTRODUÇÃO

A técnica da micropropagação pode ser utilizada em videiras, buscando multiplicá-las a partir de gemas axilares, possibilitando uma rápida multiplicação de plantas saudáveis em grande escala, viabilizando a implantação de vinhedos em período curto de tempo e preservando a qualidade genética e fitossanitária das plantas.

De acordo com Coelho (1999), a variabilidade genética que pode ocorrer durante o processo de micropropagação é considerada como um grande limitante para a utilização corriqueira da técnica de cultivo *in vitro* para propagação em larga escala da videira. O uso desta técnica ainda requer estudos mais específicos para avaliar a frequência com que tais eventos ocorrem e a intensidade com que influenciam as características agronômicas dos genótipos multiplicados. Portanto, a variação somaclonal é a variação genética que ocorre espontaneamente, geralmente em plantas regeneradas pelo cultivo *in vitro* (BAIRU; AREMU; STADEN, 2011). Esse fenômeno de ocorrência natural tem sido proposto como fonte de variabilidade que efetivamente pode ser explorada em programas de melhoramento, inclusive, visando obtenção de plantas resistentes a doenças.

As alterações genéticas ocorrem de forma aleatória no genoma e podem ser detectadas ainda no estágio de cultivo *in vitro* ou selecionadas por meio de “roguing” de plantas no campo, identificadas visualmente devido alterações morfológicas facilmente detectáveis (DAUB, 1986; LARKIN et al., 1983). No entanto, quanto mais precocemente forem identificadas plantas que apresentam variações somaclonais, menor será o risco envolvido com sua multiplicação.

O desenvolvimento *in vitro* e *ex situ* são regidos pela constituição genética, bem como pelas condições ambientais e suas interações. Embora o cultivo em condições de laboratório seja mais uniforme, não necessariamente é o

mais adequado ao desenvolvimento, podendo expor as plantas a condições contínuas de estresse ambiental.

Durante o processo de propagação da videira pode ocorrer alterações nas células causada por dois tipos de modificações: variação somaclonal genética e variação somaclonal epigenética. Ambas podem provocar alterações temporárias ou não nas células, sendo geradas por efeitos ambientais e/ou genéticos (KARP, 1994; PIERIK, 1987). Devido à ocorrência dessas variações, não é possível garantir no processo de propagação da videira, que a planta filha terá as mesmas características sendo igual da planta mãe.

As variações genéticas estão diretamente associadas à multiplicação celular, podendo ocorrer espontaneamente ou induzidas por fatores ambientais, através da ocorrência de eventos que alteram a conformação genética da planta, como: mutações, deleções, inversões, duplicações, entre outros (BAIRU; AREMU; STADEN, 2011).

As alterações epigenéticas são qualquer atividade reguladora de genes que não envolvem mudanças na sequência do DNA e que podem persistir por uma ou mais gerações como é o caso do processo de micropropagação de plantas (RAPP, 2005). Têm sido verificadas notáveis similaridades entre este evento e as variações provocadas pela metilação de DNA e por elementos de transposição (genes que sofrem alteração de posição no genoma devido ação de transposases), processos estes envolvidos na regulação da expressão gênica de plantas superiores.

Uma alternativa para controlar e identificar estas variações surgiu após o desenvolvimento da tecnologia de marcadores moleculares que permitiu a análise de diferenças genéticas sutis entre genótipos relativamente próximos, assim como a detecção de variação somaclonal. Dos vários tipos de marcadores de DNA, marcadores microssatélites ou SSR (single sequence repeats) são os mais utilizados para a identificação genética de variedades. Estes marcadores

são particularmente úteis porque são reprodutíveis; são co-dominantes, ou seja, permitem a identificação de locos em heterozigose e são multialélicos (CAIXETA et al., 2006).

Considerar a ocorrência e compreender as causas da variação somaclonal em videira é fundamental para melhorar a eficiência e a qualidade da propagação clonal dessa espécie, assim como avaliar a ocorrência desse fenômeno em prol do desenvolvimento de novas variedades de videira em programa de melhoramento genético. Seu uso pode ser vantajoso para a obtenção de variedades com características desejáveis como, por exemplo, frutos maiores, maior número de bagas por cacho, maior conteúdo açúcar, entre outras, pois essas características podem ser alteradas como resultado da ocorrência de variação somaclonal.

Existem condições que favorecem o aumento da taxa de variação somaclonal tais como fatores ambientais e condições de estresses em que as plantas se encontram, como o cultivo *in vitro* (REISCH, 1983). Do ponto de vista prático, o que interessa ao melhorista não é um simples aumento da variabilidade genética, mas se esta maior variabilidade pode auxiliar a obtenção de novas cultivares com características e desempenho agronômico superior.

Da mesma forma que características desejáveis podem surgir devidas à variação somaclonal, a ocorrência das mesmas também pode resultar num acúmulo de mutações deletérias, que impedem a utilização do material obtido como matéria-prima para o melhoramento. Na verdade, as variações somaclonais, geram com muito mais frequência mutações deletérias do que benéficas, sendo que em muitos casos as mutações podem ser letais ou comprometer completamente a habilidade da planta competir no ambiente externo.

Em plantas de propagação sexuada, é possível a identificação das mutações favoráveis por meio de cruzamentos controlados com linhagens com

elevada taxa de homozigose. Para plantas de propagação vegetativa, isto nem sempre é possível e desejável, devido à elevada heterozigose usualmente encontrada em variedades de plantas multiplicadas por propagação vegetativa. Portanto, a aplicação da mutagênese *in vitro* em espécies de propagação assexuada pode ser bastante efetiva para criação de novos genótipos. No entanto, para que se tenha controle destes eventos é desejável empregar condições que minimizem a variação somaclonal, muito embora tanto a variação somaclonal quanto a mutagênese induzida são eventos completamente aleatórios cuja ocorrência não pode ser eficientemente controlada.

O presente trabalho teve como objetivo identificar, detectar e avaliar a ocorrência de variação somaclonal em plântulas de porta-enxertos de videira cultivadas em diferentes etapas do processo micropropagação, através de marcadores microssatélite.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Os materiais vegetais utilizados neste trabalho foram 5 variedades de porta-enxertos de videira, denominados: SO4, Kober 5BB, 101-14, 1103 Paulsen e Gravesac, sendo que as plantas matrizes eram mantidas em banco de germoplasma no campo, as plântulas *in vitro* subcultivadas 8 vezes mantidas em sala de crescimento com temperatura e umidade relativa controlada e, as plantas aclimatizadas mantidas em casa-de-vegetação, no Laboratório de Biotecnologia Vegetal localizado na Fazenda Experimental da EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais) no município de Caldas-MG. Os tipos de amostras e variedades utilizadas na avaliação por marcador molecular SSR estão descritas na Tabela 1:

Tabela 1 Relação e identificação da origem das amostras das variedades de porta-enxertos utilizadas
 Fonte: Laboratório de Biotecnologia Vegetal, EPAMIG, Caldas, MG (2011)

Tipo de Amostra	Descrição	Identificação numérica das amostras por genótipo inseridas no gel				
		SO4	Kober 5BB	101-14	1103 Paulsen	Gravesac
		1 a 10	11 a 20	21 a 30	31 a 40	41 a 50
Planta Matriz no Campo	Matriz 1	1	11	21	31	41
Brotação de estaca-clone	Planta 1	2	12	22	32	42
Brotação de estaca-clone	Planta 2	3	13	23	33	43
Plantas cultivadas <i>in vitro</i>	Bulk 1 de 10 plantas	4	14	24	34	44
Plantas cultivadas <i>in vitro</i>	Bulk 2 de 10 plantas	5	15	25	35	45
Aclimatizada em Casa-de-vegetação	Planta 1	6	16	26	36	46
Aclimatizada em Casa-de-vegetação	Planta 2	7	17	27	37	47
Aclimatizada em Casa-de-vegetação	Planta 3	8	18	28	38	48
Aclimatizada em Casa-de-vegetação	Planta 4	9	19	29	39	49
Aclimatizada em Casa-de-vegetação	Planta 5	10	20	30	40	50

2.2 Extração de DNA

Foram utilizadas folhas coletadas de plantas de acordo com a origem de cada amostra (campo, brotação de estacas, cultivo *in vitro* e casa-de-vegetação), as folhas retiradas foram colocadas em um envelope de papel perfurado e devidamente identificado e armazenadas em ultrafreezer sob temperatura de -80°C.

Posteriormente foram liofilizadas de acordo com o método descrito por Nunes et al. (2011). De cada amostra foram utilizados, aproximadamente 0,5 g de tecido foliar que foram macerados na presença de nitrogênio líquido. Em seguida foram adicionados 1 mL de tampão de extração [Tris-HCl 100 mM, EDTA 50 mM, CTAB 2% (p/v), PVP 0,1% (p/v), mercaptoetanol 0,2% (v/v)], os extratos foram transferidos para tubos de polipropileno de 2 mL e incubados a 65°C durante 1 hora em banho-maria, com constante agitação. Passado este tempo, foram adicionados 400 µL de clorofórmio:álcool isoamílico na proporção de 24:1 e agitados durante 5 minutos. Em seguida o extrato foi centrifugado a 13.000 rpm durante 10 minutos e a fase aquosa do sobrenadante foi transferida para um novo tubo. Foram adicionados 400 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), agitados durante 5 minutos e novamente centrifugados a 13.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para novos tubos e adicionado 1 mL de isopropanol gelado e 100 µL de acetado de amônia (7,5 M) e novamente foram agitados. As amostras foram incubadas a -20°C “overnight” e em seguida centrifugadas a 13.000 rpm durante 30 minutos para a formação dos “pellets” de DNA, que foram então lavados 3 vezes com etanol 70%, secos a temperatura ambiente e logo em seguida, ressuspensos em 200 µL de TE [Tris-HCl 10mM (pH 8,0), EDTA 1mM]. Finalmente as amostras foram tratadas com RNase-A e incubadas a 37°C por 1 hora.

As amostras de DNA foram visualizadas na presença de luz UV após eletroforese em gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídio (0,3 µg/mL) e imerso em tampão TBE [Tris-Borato 90 mM (pH8,0) EDTA 10 mM] para verificar a qualidade do DNA, conforme exemplificado na Figura 1. A quantificação do DNA foi realizada através da leitura das absorbâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm. Para verificar a contaminação das amostras com proteínas foi realizada leitura das absorbâncias a 280 nm e calculada a relação entre as absorbâncias a 260 e 280 nm. Foram consideradas adequadas amostras cuja relação variou de 1,5 a 2.

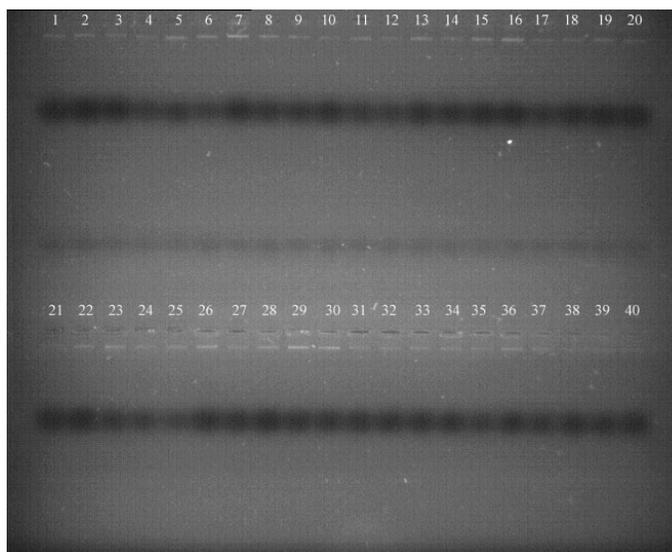


Figura 1 DNA's Normalizados para 50 µg/µL em Gel de Agarose 0,7%
Fonte: Laboratório de Biotecnologia Vegetal, EPAMIG, Caldas, MG (2011)

2.3 Análise com marcadores microssatélite

Neste trabalho foram utilizados 5 marcadores microssatélites previamente caracterizados como sendo polimórficos para o gênero *Vitis*. A Tabela 2 descreve a sequência dos iniciadores, o tamanho esperado dos alelos e a referência bibliográfica do desenvolvedor do marcador.

Tabela 2 Relação dos iniciadores SSR utilizados neste estudo, suas sequências, referência e tamanho dos alelos
Fonte: EPAMIG, Caldas, MG (2011)

Iniciador	Sequência (5' → 3')	Tamanho esperado dos alelos	Referência
VVS2 – Direto	CAGCCGTAAATGTATCCATC	129-155	Thomas e Scott (1993)
VVS2 - Reverso	AAATTCAAATTTCTAATTCAACTGG		
VVMD7 -Direto	AGAGTTGCGGAGAACAGGAT	232-263	Bowers et al. (1996)
VVMD7 -Reverso	CGAACCTTCACACGCTTGAT		
VVMD5 - Direto	CTAGAGCTACGCCAATCCAA	226-246	Bowers et al. (1996)
VVMD5 -Reverso	TATACCAAAAATCATATTCCTAAA		
VVMD25 -Direto	TTCCGTAAAGCAAAAGAAAAAGG	243-275	Bowers et al. (1999)
VVMD25 -Reverso	TTGGATTTGAAATTTATTGAGGGG		
VRZag62 -Direto	GGTGAAATGGGCACCGAACACACGC	185-203	Sefc et al. (1999)
VRZag62 -Reverso	CCATGTCTCTCCTCAGCTTCTCAGC		

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 30 µL, contendo 50ng de DNA, 6 µL de tampão de reação 5X, MgCl₂ (1,125mM), DNTps (200µM), 0,6 µM de cada iniciador (Sigma) e 1,6 U DNA polimerase (GoTaq Flex, USA).

As reações foram conduzidas em termociclador (Labnet, Multigene Gradient, USA) programado para um passo inicial de desnaturação de 5 minutos a 94 °C seguido por 37 ciclos de desnaturação a 94 °C por 50 segundos, pareamento dos iniciadores por 50 segundos, temperatura de pareamento variável de acordo com cada iniciador, e extensão do iniciador a 72 °C por 1

minuto. Foi realizado um passo de extensão final a 72 °C por 5 minutos. As amplificações foram realizadas utilizando-se um sistema “touchdown” em que a temperatura de pareamento dos iniciadores sofreu um decréscimo de 1°C por ciclo durante os 5 primeiros ciclos de amplificação, variando de 62 a 57 °C. Do sexto ciclo em diante a temperatura de pareamento dos iniciadores foi fixada em 57 °C. Para confirmar o funcionamento adequado das reações de amplificação, alíquotas de 2 µL do produto da amplificação foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,7 % corado com brometo de etídio (0,3 µg/mL) imerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM (pH 8,0) EDTA 10 mM).

Para confirmar a qualidade final dos produtos das reações de amplificação, alíquotas de 2 µL das amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,7% imerso em tampão TBE [Tris-Borato 90 mM (pH8,0) EDTA 10 mM] e corado com brometo de etídio (0,3 µg/mL) e visualizadas em luz UV, como pode ser observado na Figura 1.

2.4 Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida

Depois de confirmado o sucesso das reações de amplificação em géis de agarose a 0,7%, o produto da reação foi submetido a uma eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 6%, numa potência de 60 W por tempo variável de acordo com o tamanho esperado dos alelos. Após a corrida, os géis foram corados com nitrato de prata de acordo com o método descrito por Creste, Tulmann Neto e Figueira (2001). Inicialmente o gel em processo de coloração passou por uma etapa de fixação durante 10 minutos em solução de etanol (10%) e ácido acético (1%). Em seguida foi lavado com 2 L de água ultra-pura (Milli-Q) e submetido a uma pré-coloração com ácido nítrico a 1,5%. Passou então por nova lavagem em água ultra-pura e em seguida foi corado em solução de nitrato de prata (0,2%) durante 20 minutos. A revelação foi realizada com solução de

carbonato de sódio (3,5%) contendo 800 µL de formaldeído 37% (adicionado pouco antes da revelação) durante 20 minutos. Finalmente o gel foi imerso em solução de parada composta de ácido acético (1,5%) durante 5 minutos. Todas as etapas foram realizadas sobre mesa agitadora e em capela de exaustão. Depois de secar “overnight” à temperatura ambiente, o gel foi digitalizado em Scanner HP2710[®], e as imagens devidamente armazenadas para posterior análise.

2.5 Análise dos dados

A análise dos géis foi realizada visualmente, após os produtos da amplificação serem separados em gel de poliacrilamida desnaturante. A ocorrência ou não de variação somaclonal nas amostras estudadas foi determinada pela existência ou não de polimorfismo no padrão de bandas geradas para cada um dos locos estudados pelo marcador microsatélite.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As principais causas da variação no número de repetições nos locos microsatélite são o deslizamento da DNA polimerase durante o processo de replicação do DNA e a ocorrência de permutação desigual. O polimorfismo no tamanho dos fragmentos pode ser causado pelo diferente número de repetições das sequências simples, pela mudança no elemento repetitivo, ou por substituições, inserções e deleções de nucleotídeos nas regiões que flanqueiam os marcadores microsatélite (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998).

Em videira os primeiros trabalhos com marcadores microsatélite foram realizados por Thomas e Scott (1993) para a identificação de cultivares. Após este trabalho, outros pesquisadores começaram a desenvolver estudos com estes marcadores, o que levou ao desenvolvimento de marcadores microsatélite

especificamente recomendados para a videira. This et al. (2004) propuseram a utilização de 6 locos microssatélites como referência para a identificação de variedades de videira (“Core Set”).

A partir de cinco iniciadores utilizados neste trabalho que são descritos na literatura como identificadores de variedades de *Vitis*, foi realizado o estudo da detecção da variação somaclonal em porta-enxertos de videira ao longo do sistema de produção de plantas micropropagadas, comparando o perfil genético de plantas matrizes com as estacas que serviram como fontes de explantes, as suas sub-gerações de cultivo *in vitro* e as plântulas aclimatizadas, como pode ser observado em imagens digitalizadas de gel de poliacrilamida.

Dos iniciadores descritos na Tabela 2, a detecção de variação somaclonal só foi constatada para o marcador microssatélite VVMD7, nos genótipos Kober 5BB e 101-14, conforme ilustrado nas Figuras 2, 3 e 4.

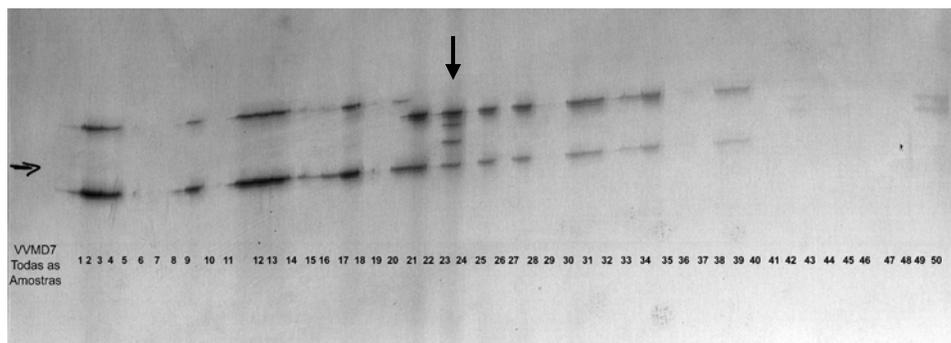


Figura 2 Gel desnaturante de poliacrilamida 6% com o padrão de bandas geradas pelo marcador microssatélite VVMD7 para todas amostras identificadas conforme a descrição na Tabela 1. A seta indica a amostra 23: plantas cultivadas *in vitro* - bulk 1 do genótipo Kober 5BB, que apresentou polimorfismo genético comparada ao perfil genético produzido pela planta matriz

Fonte: Laboratório de Biotecnologia Vegetal, EPAMIG, Caldas, MG (2011)

Conforme indicado na Figura 2 é perceptível visualmente a ocorrência da variação somaclonal na amostra 23 indicada pela seta, o que denota a duplicação do alelo nessa amostra. A amostra 23 refere-se ao Bulk de planta

micropropagadas *in vitro* do genótipo Kober 5BB. Baseado neste resultado, posteriormente foi feita a abertura do Bulk, analisando as plantas individualmente com a finalidade de identificar em qual(is) amostra(s) ocorreu a variação somaclonal.

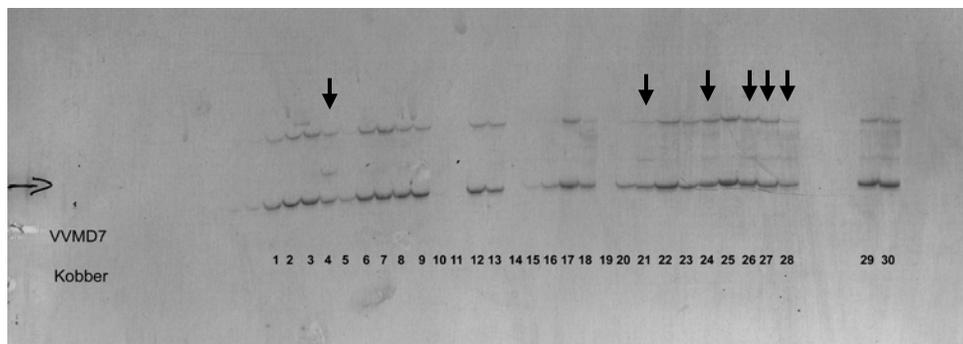


Figura 3 Gel desnaturante de poliacrilamida 6% com padrão de bandas geradas pelo marcador microssatélite VVMD7 para as amostras 4 e 21 que são plantas cultivadas *in vitro* e as amostras 26, 27, 28 plantas aclimatizadas em casa-de-vegetação do genótipo Kober 5BB

Fonte: Laboratório de Biotecnologia Vegetal, EPAMIG, Caldas, MG (2011)

Pela figura 3 é possível observar a ocorrência da variação somaclonal nas amostras 4 e 21 que se referem às plantas cultivadas *in vitro* e nas amostras 24, 26, 27 e 28 que são as plantas aclimatizadas. Esse resultado confirma que as variações genéticas em videira ocorrem de forma espontânea durante o seu processo propagativo, e que sua ocorrência durante a micropropagação *in vitro* pode ser facilmente detectada, como indica o resultado gerado por apenas um marcador microssatélite que teoricamente amostra apenas um único loco no genoma. Baranek et al. (2009) argumentam que a ocorrência do fenômeno de variação somaclonal em clones de videira é um efeito indesejável, pela mudança genética que pode ocorrer geneticamente nas plantas, acarretando em alterações morfológicas e agrônomicas que podem não ser necessariamente desejáveis. No entanto, a geração de variabilidade genética, mesmo que ao acaso, pode ser utilizada em benefício do melhoramento genético dessa espécie.

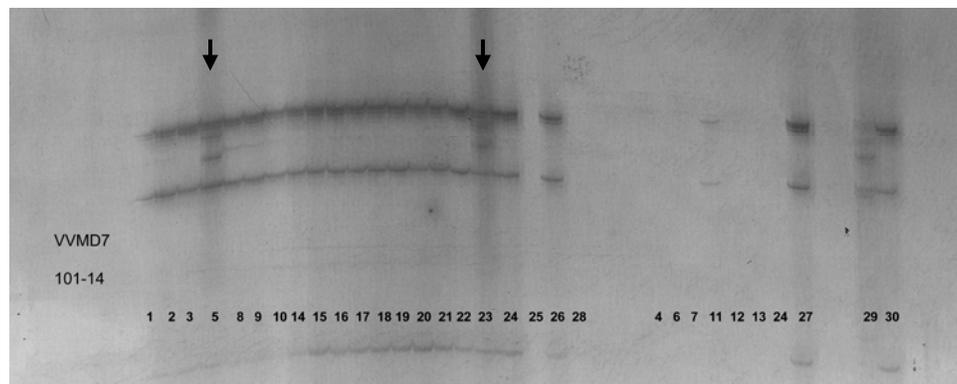


Figura 4 Gel desnaturante de poliacrilamida 6% com padrão de bandas geradas pelo marcador microssatélite VVMD7 para as amostras 5 e 23 de plantas cultivadas *in vitro* do genótipo 101-14

Fonte: Laboratório de Biotecnologia Vegetal, EPAMIG, Caldas, MG (2011)

A técnica de cultivo *in vitro* pode ser uma grande aliada para a produção de mudas de videira em larga escala, necessitando de menor espaço físico e menor período de tempo do que os métodos convencionais, no entanto, no que se refere a homogeneidade do material propagado, a multiplicação pode ser limitada devido à ocorrência de alterações genéticas, muito embora os eventos de variação somaclonal também possam ocorrer nos métodos convencionais. A Figura 4 indica a ocorrência da variação somaclonal nas amostras 5 e 23 que são plântulas cultivadas *in vitro* para o marcador microssatélite VVMD7 no genótipo 101-14. Schellenbaum et al. (2008) relataram a ocorrência de variação genética em *Vitis vinifera*, assim como outros trabalhos realizados com diversas culturas entre elas: a *Gerbera jamesonii* Bolus (BHATIA et al., 2009), *Pinus pinaster* Ait (MARUM et al., 2009), *Robinia ambigua* L. (GUO et al., 2006), *Sorghum bicolor* L. (ZHANG et al., 2010) indicando realmente que a variação somaclonal ocorre de forma bastante disseminada em diversas espécies vegetais.

Alguns estudos indicam a taxa de ocorrência de variantes somaclonais aumenta à medida que se aumenta o número de subcultivos *in vitro* (PETOLINO

et al., 2003). Quando se deseja evitar o aparecimento de variações em culturas de longa duração, tal como biofábricas comerciais, é rotina fazer a substituição das plantas matrizes periodicamente para suprimento de novos explantes, além de limitar o número de subcultivos após estabelecido o cultivo na condição *in vitro*. Este procedimento já é utilizado rotineiramente em culturas que fazem uso comercial do processo de multiplicação e cultivo *in vitro* como a cultura da bananeira (HAUTEA et al., 2004) e da batata (ALBANI; WILKINSON, 1998).

O genótipo também pode exercer influência na taxa de incidência de variações somaclonais, já que a constituição genética atua diretamente na resposta de um determinado genótipo às condições de estresse ambiental. Como o processo de cultivo *in vitro* promove no tecido ou no órgão da planta uma condição de grande estresse, a resposta de cada genótipo vai variar segundo sua habilidade de lidar com esse estresse, o que foi observado neste trabalho para algumas plântulas em alguns dos genótipos estudados, tais como Kober 5BB e 101-14 que apresentaram variações genéticas para o marcador VVMD7.

Já para os iniciadores VVS2, VRZag62, VVMD5 e VVMD25 não foram encontradas variações genéticas em nenhuma das amostras avaliadas conforme ilustrado nas figuras 5 e 6.

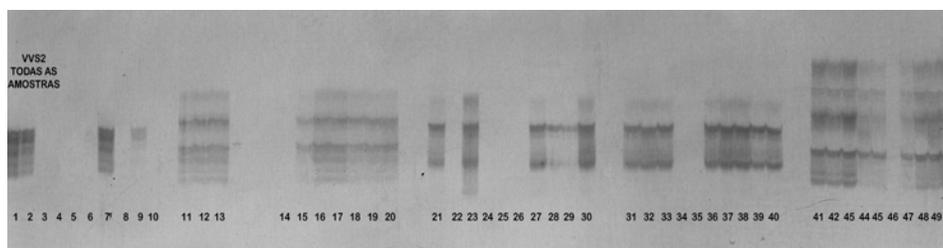


Figura 5 Gel desnaturante de poliacrilamida 6% com padrão de bandas geradas pelo marcador microssatélite VVS2 para as 50 amostras de videira estudadas, numeradas conforme descrição na Tabela 1

Fonte: Laboratório de Biotecnologia Vegetal, EPAMIG, Caldas, MG (2011)

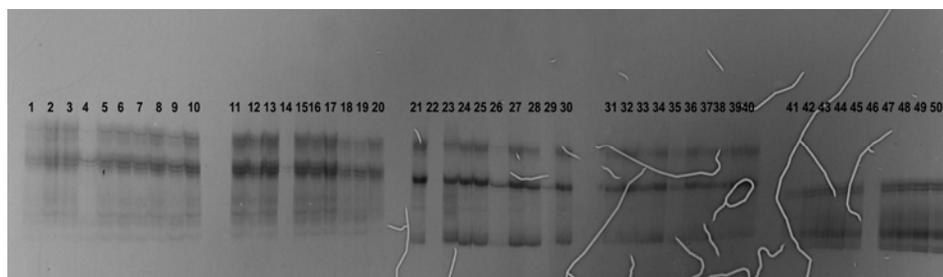


Figura 6 Gel desnaturante de poliacrilamida 6% com padrão de bandas geradas pelo marcador microssatélite VRZag62 para as 50 amostras de videira estudadas, numeradas conforme descrição na Tabela 1

Fonte: Laboratório de Biotecnologia Vegetal, EPAMIG, Caldas, MG (2011)

4 CONCLUSÕES

O marcador microssatélite VVMD7 foi eficiente na detecção de polimorfismo em amostras de plantas cultivadas *in vitro*, dos genótipos Kober 5BB e 101-14.

O processo de micropropagação ao longo de oito subcultivos para porta-enxertos de videira gera variação somaclonal, devido a condição estressante em que a planta esta sendo cultivada.

A variação somaclonal foi verificada apenas em algumas amostras. Como a natureza do processo de variação somaclonal é aleatória e independente, pode ser que nos outros genótipos cultivados *in vitro* a mesma ocorreu em outros locos ou até mesmo não aconteceu.

REFERÊNCIAS

ALBANI, M. C.; WILKINSON, M. J. Inter simple sequence repeat polymerase chain reaction for the detection of somaclonal variation. **Plant Breeding**, Berlin, v. 117, p. 573–575, 1998.

- BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; STADEN, J. V. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulators**, Netherlands, v. 63, p. 147-173, 2011.
- BARANEK, M. et al. Genetic changes in grapevine genomes after stress induced by *in vitro* cultivation, thermotherapy and virus infection, as revealed by AFLP. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 32, p. 834-839, 2009.
- BHATIA, R. et al. Assessment of clonal fidelity of micropropagated gerbera plants by ISSR markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 119, p. 208-211, 2009.
- BOWERS, J. E.; DANGL, G. S.; MEREDITH, C. P. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. **American Journal Enology Viticulture**, Davis, v. 50, p. 243-246, 1999.
- BOWERS, J. E. et al. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). **Genome**, Ottawa, v. 39, p. 628-633, 1996.
- CAIXETA, E. T. et al. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: Suprema, 2006.
- COELHO, M. C. F. **Germinação de sementes e propagação in vitro de sucupira branca** *Pterodon pubescens* (Benth.). 1999. 119 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 19, p. 299-306, 2001.
- DAUB, M. E. Tissue culture and the selection of resistance to pathogens. **Annual Rev Phytopathology**, North Caroline, v. 24, p. 159-186, 1986.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p. 220.

GUO, W. et al. Efficient micropropagation of *Robinia ambigua* var. *idahoensis* (*Idaho Locust*) and detection of genomic variation by ISSR markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht , v. 84, p. 343–351, 2006.

HAUTEA, D. M.; et al. Analysis of induced mutants of Philippine bananas with molecular markers. In: JAIN, S. M.; SWENNEN, R. (Ed.). **Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations**. Enfield: Science Publishers, 2004. p. 45–58.

KARP, A. Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. (Ed.). **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. p. 139–152.

LARKIN, P. J. et al. Heritable somaclonal variation in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 67, n. 5, p. 443-455, 1983.

MARUM, L. et al. Analysis of genetic stability at SSR loci during somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*). **Plant Cell Reports**, New Jersey, v. 28, p. 673–682, 2009.

NUNES, C.F. et al. An improved method for genomic DNA extraction from strawberry leaves. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1383-1389, 2011.

PETOLINO, J. F. et al. Plant cell culture: a critical tool for agricultural biotechnology. In: VINCI, V. A.; PAREKHSR (Ed.). **Handbook of industrial cell culture: mammalian, microbial and plant cells**. **Humana Press**, New Jersey, p. 243–258, 2003.

PIERIK, R. L. M. **In vitro culture of higher plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1987.

RAPP, R. A.; WENDEL, J. F. Epigenetics and plant evolution. **New Phytologist**, Cambridge, v. 168, p. 81–91, 2005.

REISCH, B. Genetic variability in generated plants. **Handbook of Plant Cell Culture**, Kansas, v. 1, p. 748-769, 1983.

SCHELLENBAUM, P. et al. Variation in DNA methylation patterns of grapevine somaclones (*Vitis vinifera* L.). **BMC Plant Biology**, London, v. 8, p. 78, 2008.

SEFC, K. M. et al. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. **Genome**, Ottawa, v. 42, n. 3, p. 367-373, 1999.

THIS, P. et al. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 109, p. 1448–1458, 2004.

THOMAS, M. R.; SCOTT, N. S. Microsatellites repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysis as sequenced-targged sites (STSs). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 86, p. 985-990, 1993.

ZHANG, M. et al. Tissue culture induced variation at simple sequence repeats in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) is genotype-dependent and associated with down-regulated expression of a mismatch repair gene, MLH3. **Plant Cell Reports**, New York, v. 29, p. 51–59, 2010.

CAPÍTULO 4

CITOMETRIA DE FLUXO NA IDENTIFICAÇÃO DE VARIAÇÃO SOMACLONAL EM PORTA-ENXERTOS DE VIDEIRA

RESUMO

A videira é uma das frutíferas de grande importância econômica para vários países do mundo, e há algumas décadas para o Brasil também, havendo o crescimento da implantação de vinhedos em várias regiões. O método de propagação da videira é por via assexuada, já que é uma espécie lenhosa. O uso da micropropagação contribui para o aumento da taxa de multiplicação do material vegetal *in vitro*, que pode acarretar em mudanças na estrutura e quantidade de cromossomo. Neste estudo foi avaliado a existência de alterações no conteúdo de DNA, que podem ser oriundas da variação somaclonal. Esse efeito foi avaliado pela técnica de citometria de fluxo em cinco porta-enxertos: SO4, Kober 5BB, 101-14, 1103 Paulsen, Gravesac sendo as amostras provenientes de plantas matrizes do banco de germoplasma e plantas multiplicadas *in vitro*. O resultado obtido foi analisado pelo teste de médias, indicando a existência de diferenças no conteúdo de DNA das plantas matrizes de todos os genótipos quando comparados com as plantas cultivadas *in vitro* em sala de crescimento. Este resultado pode influenciar diferentes respostas no comportamento e desenvolvimento destas plantas tornando inviável a utilização da micropropagação quando as alterações não são benéficas para as características esperadas.

Palavras-chave: Micropropagação. Conteúdo de DNA. *Vitis sp.*

ABSTRACT

The grapevine is one fruit tree of great economic importance worldwide. Whereas, in Brazil this crop became significant economically only a few decades ago. This fact coincides with the implantation of vineyards in various growing regions. The multiplication of grapevine plants is mainly by asexual methods due to their woody species. The use of micropropagation contributes to increase the rate of multiplication of the plant material *in vitro*. However, this procedure may cause changes in the structure and amount of DNA, and also in the chromosome numbers. The aim of this study was the detection of DNA content variations by flow cytometry. These variations were verified in five rootstock accessions: SO4, Kober 5BB, 101-14, Paulsen 1103 and Gravesac. The samples comprise both plants kept in the field and plants cultivated *in vitro*. The result obtained was analyzed by the statistical significance test, indicating differences in DNA content of all plants grown *in vitro* in comparison with their original genotype counterparts kept in field. This result may lead to different responses in behavior and development of these plants in the field environment, and means that are not contributing to getting more quality plants in less time, making impossible the use of micropropagation when the answers are not beneficial to the expected characteristics.

Keywords: Micropropagation. DNA content. *Vitis sp.*

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por materiais para plantio com qualidade, e características semelhantes à planta de origem, faz com que o uso da micropropagação seja uma alternativa para a multiplicação massal de diferentes culturas. Para videira a micropropagação é utilizada com diversos objetivos, dentre os quais a multiplicação rápida de plantas, propagação de novos híbridos e obtenção de matrizes livres de patógenos, tornando-se uma alternativa viável para a multiplicação desta cultura (BIASI; PASSOS; POMMER, 1998; COLETTI; MARTINS; GOULART, 2008; DZAZIO; BIASI; ZANETTE, 2002; SILVA et al., 1997; TORREGROSA, 1995; TORREGROSA; BOUQUET, 1996).

A videira (*Vitis vinifera* L.) é uma das mais antigas culturas do mundo, sendo uma espécie diplóide ($2n = 38$), cujas plantas são lenhosas e suas variedades são multiplicadas sexuadamente por meio de mudas, porém a alta taxa de multiplicação do material vegetal *in vitro*, pode ocasionar mudanças na estrutura e quantidade cromossômica, dependendo da variedade como foi detectado por Prado et al. (2010) em *Vitis vinifera* cv. ‘Albariño’, ‘Treixadura’, ‘Torrontés’, ‘Mencia’, ‘Bracellao’ e ‘Merenzao’ que são variedades de grande importância na Espanha.

Varição somaclonal é um termo que descreve a aparição aleatória de modificações em um determinado material genético cultivado *in vitro*, sendo vista como fonte adicional de variedade de grande importância para plantas propagadas vegetativamente (LARKIN; SCOWCROFT, 1981), mas esta modificação nem sempre é desejável, havendo variações somaclonais que são prejudiciais ao desenvolvimento e produtividade de determinadas plantas, devido ao estresse por ambiente ou outra alteração em seu ciclo que tenha ocorrido.

De acordo com Kaeppler, Kaeppler e Rhee (2000 citado por BAIRU; AREMU; STADEN, 2011), existem dois tipos de variação que se diferem, sendo variações temporárias oriundas de efeitos epigenéticos ou fisiológicos, que são reversíveis e não herdáveis (KAEPLER; KAEPLER; RHEE, 2000), e as variações permanente herdáveis, das quais podem ser aproveitadas no melhoramento, estas variações podem ser a expressão de uma variação pré-existente ou resultado da modificação genética induzida por uma combinação de fatores (GEORGE, 1993; LARKIN; SCOWCROFT, 1981).

Existem algumas origens conhecidas para as variações pré-existentes, dentre elas a utilização de tecido quimérico no cultivo *in vitro* (GEORGE, 1993), onde seria induzida a regeneração de material genético não homogêneo; o rearranjo cromossômico causado por distúrbios no processo de divisão celular e consequente modificação de sua estrutura (AL-ZAHIM; FORD-LLOYD; NEWBURY, 1999; HAO; DENG, 2002; MUJIB et al., 2007); problemas no controle do ciclo da célula (LARKIN; SCOWCROFT, 1981) e a ativação de elementos transpositores (GAO et al., 2009).

As condições de cultivo *in vitro* são estressantes para as células vegetais e os fatores que constituem sua metodologia (tipo de explante, genótipo utilizado, quantidade e concentração de reguladores, número de subcultivos, método de propagação) tem efeito direto sobre a frequência do aparecimento de variações somaclonais induzidas. Existem algumas tecnologias que permitem a detecção de variações ainda na fase *in vitro*, uma dessas técnicas é a citometria de fluxo.

A citometria de fluxo permite estimar a quantidade de DNA presente no material a ser analisado, podendo assim verificar perda ou acréscimo de material genético, sendo estes, diagnóstico de mutação. De acordo com Guimarães (2009) nos eucariotos, o crescimento e a divisão celular, são processos cíclicos, sendo a mitose dividida em fases G1, S e G2. Durante a fase G1, período de

crescimento celular, uma célula diplóide apresenta conteúdo de DNA celular igual a 2C, ou seja, possui duas cópias de cada cromossomo. Na fase S ocorre uma duplicação do material genético e posteriormente, na fase G2, ocorre nova fase de crescimento celular, na qual o conteúdo de DNA nuclear é 4C. A partir desta fase, a célula está pronta para dividir-se em duas células filhas (mitose), nas quais cada núcleo possuirá, novamente, o conteúdo de DNA original, 2C, portanto em uma população de células em expansão, o número de núcleos na fase G1 é maior do que na fase G2, dessa maneira, os histogramas obtidos pelos citômetros de fluxo em uma análise de ploidia apresentam picos de maior intensidade no canal referente à fase G1 do ciclo celular do que os picos referentes à fase G2.

A quantificação do DNA de uma célula baseia-se na quantidade de fluorescência emitida pelo núcleo quando esse é corado com um fluorocromo específico para o DNA, porém de acordo com Marie e Brow (1993) as medições do conteúdo de DNA nuclear não são perfeitas e apresentam variações que, geralmente, estão relacionadas com o método de isolamento dos núcleos, com a coloração específica para o DNA e com a leitura no citômetro de fluxo.

Essas variações são expressas na forma do coeficiente de variação (CV). É considerado que o CV é um critério muito importante na validação das medições citológicas e definem um intervalo de valores entre 1% e 2% para análises de precisão e 3% para análises de rotina.

Atualmente a necessidade de obter informações do decorrer de processos citogenéticos que ocorrem em plantas, são dados que contribuem não só para a verificação de variação somaclonal, mas também para a interpretação nos estudos evolutivos de espécies frutíferas como do gênero *Vitis*. O aparecimento e utilização de uma diversidade de técnicas e ferramentas com este propósito é de grande importância para o aceleração de programas de melhoramento, que podem demorar de anos a décadas.

Baseado nestas justificativas, este trabalho tem objetividade de avaliar as ocorrências de variação somaclonal, por meio da comparação de conteúdo de DNA de plantas matrizes de porta-enxertos de videira e plantas cultivadas *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Foram utilizados neste trabalho variedades de porta-enxertos de videira cultivados no campo e sala de crescimento do Laboratório de Biotecnologia Vegetal localizado na Fazenda Experimental da EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais) no município de Caldas-MG.

As amostras compreendem material coletado em plantas matrizes consideradas testemunhas (controle) no banco de germoplasma de porta-enxertos de videira da EPAMIG; plantas cultivadas *in vitro* por 8 gerações mantidas em sala de crescimento com temperatura, luz e umidade relativa controlada. A identificação das amostras e variedades está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 Relação e identificação das amostras e variedades de porta-enxertos utilizadas
 Fonte: Laboratório de Biotecnologia Vegetal, EPAMIG, Caldas, MG (2011)

Identificação	Amostra	Variedade	Pedigree
M1	Plantas matrizes	SO4	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i>
M2	no campo		
1 à 20	Plantas cultivadas <i>in vitro</i>		
M3	Plantas matrizes	Kober 5BB	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i>
M4	no campo		
21 à 40	Plantas cultivadas <i>in vitro</i>		
M5	Plantas matrizes	101-14	<i>V. riparia</i> x <i>V.</i> <i>rupestris</i>
M6	no campo		
41 à 60	Plantas cultivadas <i>in vitro</i>		
M7	Plantas matrizes	Paulsen 1103	<i>V. rupestris</i> x <i>V.</i> <i>berlandieri</i>
M8	no campo		
61 à 80	Plantas cultivadas <i>in vitro</i>		
M9	Plantas matrizes	Gravesac	161-49 x 3309
M10	no campo		
81 à 100	Plantas cultivadas <i>in vitro</i>		

2.2 Citometria de fluxo

Foram utilizados aproximadamente 50 mg de folhas jovens de cada uma das plantas analisadas, juntamente com uma amostra correspondente do padrão interno, neste caso, folhas de ervilha (*Pisum sativum*) que apresenta 9,09 pg de DNA. As amostras foliares mantidas em gelo, foram picadas com auxílio de um bisturi, em placa de Petri, contendo 1 mL de tampão WPB (LOUREIRO et al., 2007) gelado para a liberação de núcleos. A suspensão de núcleos foi aspirada através de duas camadas de gaze com o auxílio de pipeta plástica para filtração dos fragmentos de tecido foliar e a fração coletada foi então filtrada em filtros de malha de 50 µm. Esta suspensão foi mantida em recipiente com gelo para que não houvesse deterioração dos núcleos. Em seguida foram adicionados à suspensão 25 µL do fluorocromo iodeto de propídeo e 5 µL de RNase em cada

amostra. Foram analisados 10 mil núcleos para cada amostra, com três repetições.

2.3 Análises dos dados

A análise foi realizada no citômetro FACSCalibur[®] quatro cores (Becton Dickinson, USA) e os histogramas foram obtidos com o software Cell Quest e analisados estatisticamente no software WinMDI 2.8[®]. O conteúdo de DNA nuclear (pg) das plantas foi estimado por comparação com a posição em relação ao pico na fase G1 da mitose com o padrão interno de referência (*P. sativum*). Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias agrupadas pelo teste de Scot-Knott a 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As variações somaclonais podem ser detectadas pela diferença no conteúdo de DNA, ocorrendo duplicações, e/ou mutações que pode ser observado durante a fase G1 do ciclo celular como demonstrado na Figura 1 no histograma de distribuição de fluorescência. Observam-se dois picos representando a fase G1 da interfase nas células de porta-enxerto de videira e da ervilha (padrão de referência interno). O conteúdo de DNA foi calculado em função da razão entre os valores médios do canal em que os picos foram formados em relação ao conteúdo de DNA do padrão de referência. O coeficiente de variação foi aproximadamente 1,57.

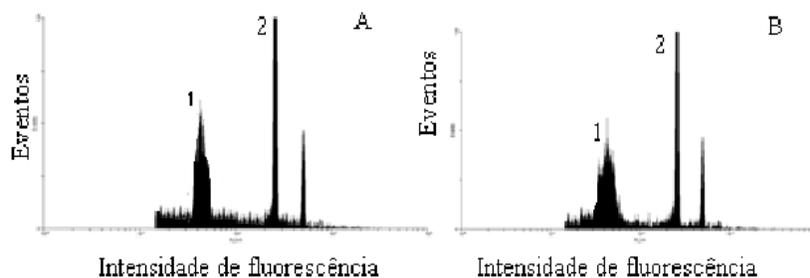


Figura 1 Histograma de citometria de fluxo na quantificação de DNA de porta-enxerto de videira obtido com o tampão de extração WPB. O primeiro pico G1 representa planta matriz de porta-enxerto 101-14 de *Vitis* e o segundo pico é o da ervilha (*P. sativum* L.), onde A) Planta Matriz – M5 e B) planta cultivada *in vitro* 57.

Fonte: UFLA, Lavras, MG (2012)

A variação hereditária celular pode ser resultado de mutações, alterações epigenéticas, ou a combinação de ambos os mecanismos.

De acordo com Kaepler, Kaepler e Rhee (2000), a diferença dos mecanismos ocorrendo mutações ou alterações epigenéticas, é devido que as mutações genéticas são essencialmente irreversíveis e provavelmente que persistam na progênie de plantas regeneradas, enquanto as alterações epigenéticas não são transmitidas pela reprodução sexual.

Modificações e variações no conteúdo de DNA já foram detectadas utilizando da citometria de fluxo com grande sucesso em culturas de importância comercial, como por exemplo aveia (*Avena sativa*) (CHOL; LEMAUX; CHO, 2001), limão (*Citrus limon*) (ORBOVIC et al., 2008), laranja (*Citrus sonensis*) (HAO; DENG, 2002), morango (*Fragaria X ananassa*) (NEHRA et al., 1992), algodão (*Gossypium hirsutum*) (JIN et al., 2008), tomate (*Lycopersicum esculentum*) (VAN DEN BULK et al., 1990), banana (*Musa acuminata*) (GIMÉNEZ et al., 2001), tabaco (*Nicotiana tabacum*) (VYSKOT et al., 1991),

batata (*Solanum tuberosum*) (SHARMA et al., 2007) e trigo (*Triticum aestivum*) (HENRY; MARCOTTE; DE BUYSER, 1996).

Posteriormente foi realizada a comparação da quantidade de DNA das plantas matrizes com as plantas cultivadas *in vitro* das variedades estudadas neste trabalho, e os resultados apresentados por meio da significância das médias pelo teste de Scott-Knott, estão descritos nas Tabelas 2, 3, 4, 5 e 6.

Tabela 2 Conteúdo de DNA estimado por citometria de fluxo para variedade SO4 de porta-enxertos de videira
Fonte: UFLA, Lavras, MG (2012)

Amostra	Conteúdo de DNA (pg) ¹	M SK ²	CV
M1	1,42	a	3,28
M2	1,57	b	1,57
1	1,54	b	3,35
2	1,56	b	3,19
3	1,60	b	1,95
4	1,73	c	3,07
5	1,69	c	2,62
6	1,65	c	2,28
7	1,57	b	2,24
8	1,73	c	2,34
9	1,80	c	2,52
10	1,72	c	3,36
11	1,52	b	2,79
12	1,61	b	2,12
13	1,49	a	2,27
14	1,64	b	2,01
15	1,46	a	1,72
16	1,67	c	2,77
17	1,59	b	1,88
18	1,57	b	2,10
19	1,66	c	1,61
20	1,67	c	1,97
CV (%)			3,92

¹ Valor médio do conteúdo de DNA.

² Médias seguidas por letras iguais pertencem ao mesmo grupo pelo teste de agrupamento Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O conteúdo de DNA em plantas cultivadas *in vitro* pode ser alterado e modificado devido à condição estressante de ambiente fechado, com temperatura e umidade relativa, estáveis e controladas, sendo que o mecanismo biológico está regulado para condições de seu habitat natural. Isto pode ser comprovado para a variedade SO4 de plantas cultivadas *in vitro*, que apresentaram diferenças no conteúdo de DNA em relação às amostras provenientes das plantas matrizes de campo M1 e M2.

Tabela 3 Conteúdo de DNA estimado por citometria de fluxo para variedade Kober 5BB de porta-enxertos de videira
Fonte: UFLA, Lavras, MG (2012)

Amostra	Conteúdo de DNA (pg) ¹	M SK ²	CV
M3	1,49	b	2,31
M4	1,41	b	3,39
21	1,70	b	1,70
22	1,53	b	2,12
23	1,46	b	2,33
24	1,74	b	2,02
25	1,63	b	3,04
26	1,82	b	1,92
27	1,51	b	2,81
28	1,64	b	2,40
29	1,48	b	1,97
30	1,78	b	2,24
31	1,66	b	2,46
32	1,64	b	1,96
33	1,60	b	1,99
34	1,32	b	2,98
35	1,35	b	2,31
36	0,93	a	2,47
37	0,76	a	2,65
38	1,32	b	3,51
39	0,79	a	3,14
40	1,58	b	3,25
CV (%) 15,90			

¹ Valor médio do conteúdo de DNA.

² Médias seguidas por letras iguais pertencem ao mesmo grupo pelo teste de agrupamento Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Para a variedade Kober 5BB houve diferenças na intensidade do conteúdo de DNA somente de algumas plantas *in vitro*, 36, 37 e 39, e o restante mostrou uma estimativa de conteúdo de DNA igual às plantas matrizes, afirmando que não há mudanças a nível genético/celular do material cultivado *in vitro* (perda de DNA) quando comparado a matriz do campo para esta variedade.

Tabela 4 Conteúdo de DNA estimado por citometria de fluxo para variedade 101-14 de porta-enxertos de videira
Fonte: UFLA, Lavras, MG (2012)

Amostra	Conteúdo de DNA (pg) ¹	M SK ²	CV
M5	2,01	c	1,63
M6	1,85	c	1,85
41	1,66	c	2,78
42	1,72	c	3,42
43	1,70	c	3,48
44	1,59	c	2,68
45	1,72	c	2,24
46	1,72	c	2,50
47	1,69	c	3,18
48	0,98	b	3,84
49	1,49	c	3,38
50	1,58	c	2,46
51	1,74	c	2,70
52	1,31	b	2,47
53	1,80	c	2,54
54	1,57	c	2,47
55	1,60	c	2,61
56	1,60	c	2,36
57	0,71	a	3,80
58	1,08	b	2,58
59	0,99	b	3,63
60	1,69	c	2,73
CV (%) 12,61			

¹ Valor médio do conteúdo de DNA.

² Médias seguidas por letras iguais pertencem ao mesmo grupo pelo teste de agrupamento Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Como pode ser observado na Tabela 4, a variedade 101-14 teve diferença no conteúdo de DNA entre as plantas cultivadas *in vitro*, somente para

cinco amostras, sendo a amostra 57, com conteúdo bem inferior à demais, e as amostras 48, 52, 58 e 59 com conteúdo semelhante mas não igual às matrizes. E o restante das amostras sendo estatisticamente igualadas a plantas matrizes, confirmando que durante o processo da micropropagação ocorre a perda de DNA, porém em diferentes intensidades.

Tabela 5 Conteúdo de DNA estimado por citometria de fluxo para variedade Paulsen 1103 de porta-enxertos de videira.
Fonte: UFLA, Lavras, MG (2012)

Amostra	Conteúdo de DNA (pg) ¹	M SK ²	CV
M7	1,17	a	2,05
M8	1,29	a	3,07
61	1,71	b	2,89
62	1,69	b	2,09
63	1,24	a	2,96
64	1,34	a	2,45
65	1,03	a	2,77
66	1,00	a	2,94
67	1,36	a	2,74
68	1,19	a	2,30
69	1,73	b	2,18
70	1,16	a	2,45
71	1,38	a	2,18
72	1,77	b	2,07
73	0,91	a	2,84
74	1,99	b	2,44
75	1,25	a	3,06
76	1,34	a	2,28
77	0,99	a	2,58
78	1,62	b	2,55
79	1,67	b	2,93
80	1,20	a	3,08
CV (%) 29,46			

¹ Valor médio do conteúdo de DNA.

² Médias seguidas por letras iguais pertencem ao mesmo grupo pelo teste de agrupamento Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Na variedade 1103 Paulsen, foi observado que há diferença das amostras de plantas cultivadas *in vitro* 61, 62, 69, 72, 74, 78 e 79 com relação às demais,

através do incremento na quantidade de DNA, sendo o restante das amostras com conteúdo de DNA igual estatisticamente às matrizes, demonstrando que ocorreu pouca variação.

Tabela 6 Conteúdo de DNA estimado por citometria de fluxo para variedade Gravesac de porta-enxertos de videira
Fonte: UFLA, Lavras, MG (2012)

Amostra	Conteúdo de DNA (pg) ¹	M SK ²	CV
M9	1,58	b	2,65
M10	1,18	a	3,05
81	1,55	b	2,72
82	1,63	b	2,52
83	1,28	a	2,47
84	1,42	b	3,69
85	1,66	b	2,26
86	1,71	b	2,47
87	1,25	a	3,20
88	1,59	b	2,66
89	1,21	a	2,63
90	0,98	a	3,27
91	1,77	b	2,13
92	0,72	a	2,40
93	0,79	a	2,94
94	0,98	a	2,85
95	1,01	a	2,56
96	1,02	a	2,80
97	1,04	a	2,91
98	1,54	b	2,37
99	1,45	b	2,55
100	1,72	b	2,86
CV (%) 25,39			

¹ Valor médio do conteúdo de DNA.

² Médias seguidas por letras iguais pertencem ao mesmo grupo pelo teste de agrupamento Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A quantidade de DNA na variedade Gravesac foi extremamente variável e oscilante entre os indivíduos de plantas cultivadas *in vitro*, e matrizes de campo, formando 2 grupos, tendo ocorrido acréscimo e perda de DNA.

Conforme pode ser observado pelo teste de Scott-Knott, ocorreram variações através de estimativa nos conteúdos de DNA nas amostras analisadas,

da planta matriz com relação às plantas cultivadas *in vitro*, esta diferença pode ser tanto de perda, quanto de ganho de DNA. Estas variações que ocorreram no DNA, podem ser devido a fatores externos e internos, que afetam a planta durante a divisão celular. Para uma confirmação mais precisa é necessário realizar testes citogenéticos com estas plântulas *in vitro* provenientes de muitos subcultivos, onde possivelmente poderá ser detectada alguma aberração cromossômica, duplicação, ou outra anormalidade indesejável ou favorável dependendo do propósito da pesquisa.

Alguns autores como Beemster et al. (2003), discutem a questão de que as células não são autônomas e que seu crescimento e desenvolvimento é regulado por uma cascata sinalizadora e de substâncias que são sintetizadas por algum grupo na célula. Isto é considerando a complexidade do ciclo celular no controle do crescimento de plantas e morfogênese, problemas no controle pode acarretar em erros fisiológicos não esperados, sugerindo que qualquer operação que pode alterar o processo normal do ciclo celular resulta em variação somaclonal.

4 CONCLUSÕES

Através da utilização da técnica de citometria de fluxo é possível avaliar o conteúdo de DNA, das plantas cultivadas *in vitro* dos genótipos estudados.

É identificado variação no de DNA em amostras de plantas *in vitro*, sendo o maior valor obtido pelo genótipo 1103 Paulsen, enquanto no restante há perda de DNA de plantas *in vitro*, quando comparadas com as plantas matrizes.

Para afirmar que ocorre a variação somaclonal nos genótipos analisados é necessário um estudo mais aprofundado por meio de testes citogenéticos, avaliando em nível cromossômico se houve duplicação, deleção entre outros fenômenos.

REFERÊNCIAS

AL-ZAHIM, M. A.; FORD-LLOYD, B. V.; NEWBURY, H. J. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. **Plant Cell Reports**, New York, v. 18, p. 473–477, 1999.

BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; STADEN, J. V. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulators**, Netherlands, v. 63, p. 147-173, 2011.

BIASI, L. A.; PASSOS, I. R. S.; POMMER, C. V. Micropropagação do porta-enxerto de videira Jales. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 10, p. 1587-1594, 1998.

CHOL, H. W.; LEMAUX, P. G.; CHO, M. J. High frequency of cytogenetic aberration in transgenic oat (*Avena sativa* L.) plants. **Plant Science**, Netherlands, v. 160, p. 763–772, 2001.

COLETTI, L.; MARTINS, C. R.; GOULART, M. Micropropagação de porta-enxerto de videira Paulsen 1103 “*in vitro*” com diferentes concentrações de citocinina. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v. 15, p. 102-108, 2008.

DZAZIO, P. M.; BIASI, L. A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira ‘420-A’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 759-764, 2002.

GAO, D. Y. et al. Detection of DNA changes in somaclonal mutants of rice using SSR markers and transposon display. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 98, p. 187–196, 2009.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 2nd ed. Edington: Exegetics, 1993. 574 p.

GIMÉNEZ, C. et al. Somaclonal variation in banana: cytogenetic and molecular characterization of the somaclonal variant CIEN BTA-03. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Oxford, v. 37, p. 217–222, 2001.

GUIMARÃES, N. C. C. **Identificação de variantes somaclonais em bananeiras ‘Prata Anã’, utilizando técnicas moleculares e citogenéticas.**

2005. 63 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Agrobioquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

HAO, Y. J.; DENG. Occurrence of chromosomal variations and plant regeneration from long-term-cultured citrus callus. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Oxford, v. 38, p. 472–476, 2002.

HENRY, Y.; MARCOTTE, J. L.; DE BUYSER, J. The effect of aneuploidy on karyotype abnormalities in wheat plants regenerated from short- and long-term somatic embryogenesis. **Plant Science**, Netherlands, v. 114, p. 101–109, 1996.

JIN, S. et al. Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. **Plant Cell Reports**, New York, v. 27, p. 1303-1316, 2008.

KAEPPLER, S. M.; KAEPPLER, H. F.; RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant Molecular Biology**, Netherlands, v. 43, p. 179–188, 2000.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 60, p. 197-214, 1981.

LOUREIRO, J. et al. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. **Annual Botany**, London, v. 100, p. 875–888, 2007.

MARIE, D.; BROW, S. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biology of the Cell**, Paris, v. 78, n. 1/2, p. 41-51, 1993.

MUJIB, A. et al. Callus induction, somatic embryogenesis and chromosomal instability in tissue cultureraised hippeastrum (*Hippeastrum hybridum* cv. United Nations). **Propagation Ornamental Plants**, Botucatu, v. 7, p. 169–174, 2007.

NEHRA, N. S. et al. The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 29, p. 257–268, 1992.

ORBOVIC, V. et al. Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. **Euphytica**, Netherlands, v. 161, p. 329–335, 2008.

PRADO, M. J. et al. Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis regenerated plants of *Vitis vinifera* by flow cytometry and microsatellite markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 103, p. 49–59, 2010.

SHARMA, S. et al. Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds: a comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment. **Planta**, Berlin, v. 226, p. 1449–1458, 2007.

SILVA, A. L. et al. Cultura in vitro do porta-enxerto de videira var. 043-43 resistente a fusariose. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE FRUTÍFERAS, 1., 1997, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: [s. n.], 1997. p. 51-53.

TORREGROSA, L. Biotechnologies de la vigne: les techniques de regeneration in vitro (synthèse) . **Progrès Agricole et Viticole**, Lisboa, v. 112, p. 479-489, 1995.

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

VAN DEN BULK, R. W. et al. Somaclonal variation in tomato: effect of explant source and a comparison with chemical mutagenesis. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 80, p. 817–825, 1990.

VYSKOT, B. et al. Genome modifications in protoplast-derived tobacco plants: phenotypic evaluation and RFLP Analysis. **Biology Plantarum**, Netherlands, v. 33, p. 455–460, 1991.

CAPÍTULO 5

**AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DA INFECÇÃO PELOS VÍRUS DO
ENROLAMENTO (GLRaVs) EM PLANTAS DE *Vitis vinifera* cv.
'CABERNET SAUVIGNON' E *Vitis labrusca* cv. 'BORDÔ' AO LONGO
DO CICLO VEGETATIVO**

RESUMO

A propagação da videira é realizada através de estaquia e ou enxertia, estes métodos facilitam a rápida disseminação de doenças, contribuindo para a baixa produtividade durante a implantação de novos vinhedos. Doenças virais são as principais ameaças ao desenvolvimento da atividade vitícola nacional e internacional, sendo os vírus do enrolamento dos tipos GLRaV-1, GLRaV-2 e GLRaV-3, os mais encontrados em vinhedos brasileiros, principalmente da região Sul do país. Estes vírus são de rápida disseminação na planta, pois estão presentes no floema das mesmas, ocasionando o definhamento das plantas. O objetivo deste estudo foi estudar a avaliação da carga viral destes vírus pelo teste sorológico DAS-ELISA, durante o ciclo vegetativo, sendo coletadas amostras de tecidos de nervuras e limbo foliar periodicamente a cada 45 dias em das plantas de *V. vinífera* cv. 'Cabernet sauvignon' e *V. labrusca* cv. 'Bordô', totalizando a avaliação de 8 plantas com 3 repetições cada. Foi detectada a presença dos vírus estudados nas plantas que expressavam a sintomatologia associada a presença e ação dos mesmos, observando que a carga viral teve variação durante o ciclo vegetativo, principalmente em plantas da cv. 'Bordô', mas confirmando que a ação do vírus é mais abundante no início do estágio de senescência da planta.

Palavras-chave: *Vitis*. Vírus Enrolamento. ELISA.

ABSTRACT

The propagation of the grapevine is done through cuttings or grafting, and these methods facilitate the rapid spread of disease, contributing to low productivity in new vineyards. Viral diseases are the main threat for the development of national and international viticulture, and winding viruses of the types GLRaV-1, GLRaV-2 and GLRaV-3 are the most found in vineyards in Brazil, mainly in the southern region of the country. These viruses rapidly spread in plants, as they are present in the phloem, causing plants to wither. In this study we evaluate the presence and development of these viruses by using serological DAS-ELISA within the growth cycle of plants, previously known as contaminated. Tissue samples from veins and leaf blade were periodically collected in intervals of 45 days for *V. vinifera* cv. 'Cabernet sauvignon' and *V. labrusca* cv. 'Bordô' totaling the evaluation of eight plants with three replicates. We have detected the presence of viruses in all plants studied, indicated by presence of characteristic symptoms, noting that the viral load changed during the growth, especially in cv. 'Bordô'. Results confirmed that the action of the virus is most abundant in the early stage of the plant senescence period.

Keywords: *Vitis*. Leafroll virus. ELISA.

1 INTRODUÇÃO

O cultivo da videira é feito com plantas obtidas pela multiplicação vegetativa (estaquia e enxertia), conseqüentemente deixando os vinhedos expostos às doenças causadas por patógenos, que são difundidos principalmente pelo material de propagação. A multiplicação agâmica da videira, além de facilitar a disseminação dessas doenças, propicia o seu acúmulo no material vegetativo durante as sucessivas multiplicações. Esse fato contribui decisivamente para a baixa produtividade e definhamento dos vinhedos comerciais, podendo inviabilizar sua exploração econômica e conseqüentemente, provocando o abandono da atividade vitivinícola, causando implicações sociais negativas (KUHN, 1992).

As doenças virais continuam sendo uma das principais ameaças à qualidade e rendimento de produção de videira. Até o momento, mais de 56 vírus que infectam a videira já foram identificados nos países vitícolas do mundo (BONFIGLIOLI; HOSKINS; EDWARDS, 2001).

Os sintomas causados pelo vírus, independentemente da cultivar, aparecem geralmente a partir da base dos ramos, e com o avanço do ciclo vegetativo, ocorre o enrolamento sucessivo das demais folhas em direção à extremidade dos ramos. Dependendo do nível de infecção, os sintomas podem se restringir às folhas da base, porém as plantas com sintomas severos tornam-se totalmente definhadas.

O vírus do enrolamento (*Grapevine leafroll*) é uma doença que atinge os parreirais das principais regiões vitícolas do mundo, considerado como uma das doenças virais mais destrutivas em videira revisto por Tsai et al. (2008). A maioria dos vírus associados ao *Grapevine leafroll* (GLRaVs), como GLRaV-1 e GLRaV-3 pertencem ao gênero Ampelovirus, família Closteroviridae

(MARTELLI et al., 2002), enquanto GLRaV-2 pertence ao gênero Closterovirus, dentro da mesma família (ABOU-GHANEM et al., 1998).

O enrolamento é também considerado a doença viral mais importante economicamente da videira, sendo responsável por 10 a 70% de perdas na produção de uva (WALKER et al., 2004).

Sabe-se que os vírus da videira, assim como em outras culturas, são disseminados principalmente através de material de propagação infectado. No entanto, há evidências crescentes de que a doença do enrolamento é transmitida no campo por vetores, tais como cochonilhas e outros insetos. Espécies de *Coccidae* e *Pseudococcidae* foram capazes de transmitir tanto GLRaV-1 como GLRaV-3 de plantas de videira infectadas para plantas saudáveis durante a estação de crescimento vegetativo (SFORZA et al., 2003).

O enrolamento de folhas é uma doença viral de ocorrência muito generalizada em pomares de videira e estão associados a efeitos indesejáveis para a atividade vitícola, dos quais destacam o atraso na maturação dos frutos, decréscimo na produtividade, alterações na pigmentação do fruto e redução no acúmulo de açúcares, estes sintomas aparecem sempre nas folhas da base dos ramos, evoluindo para as demais folhas, podendo provocar o completo definhamento das plantas (FAJARDO et al., 2005).

O sintoma mais característico da doença do enrolamento provocado pelos vírus é a presença de mosaico no limbo foliar e a epinastia dos bordos da folha, que giram para baixo. Segundo Kuhn e Nickel (1998), esses sintomas podem ser observados precocemente e com relativa facilidade em folhas das variedades viníferas (*Vitis vinifera*) tintas e brancas. Nas viníferas tintas, o limbo toma uma coloração vermelho-violácea, permanecendo o tecido ao longo das nervuras principais com a cor verde normal, embora em plantas muito afetadas a coloração violácea possa atingir todo o tecido foliar. Nas viníferas brancas infectadas, o limbo toma uma leve coloração amarelo-pálida, às vezes mais

pronunciada no tecido ao longo das nervuras principais. Se a infecção é severa, as plantas afetadas podem ser facilmente detectadas, pois seu desenvolvimento fica completamente comprometido e geralmente as plantas apresentam aspecto encarquilhado e seco. Já no caso de estirpes menos agressivas do vírus, a diferenciação entre plantas doentes e sadias de viníferas brancas torna-se mais difícil, ocorrendo apenas um leve enrolamento das folhas e clorose entre as nervuras principais. Nas variedades viníferas, tanto as brancas como as tintas, o limbo das folhas das plantas infectadas tem aspecto rugoso, quebradiço e de consistência mais grossa do que nas folhas de plantas sadias (KUHN; NICKEL, 1998; MARTELLI, 1993; MARTELLI; WALTER, 1998).

As amostras utilizadas na execução de testes sorológicos e moleculares podem ser coletadas tanto no período de crescimento vegetativo (folhas) como de dormência (sarmentos) das plantas (SANTA CATARINA, 2002), mas ainda existe uma grande carência de estudos que avaliem a melhor época do ciclo e melhor tipo de tecido para coletar amostras para detecção de viroses nas diferentes cultivares de videira e para os diferentes tipos de vírus que infectam a videira.

Para a diagnose das viroses estabelecidas nos programas de certificação a metodologia mais indicada é a técnica sorológica baseada na reação anticorpo-antígeno e denominada ELISA (“Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay”). Quando necessário, podem ser recomendado outro método de diagnose, como a detecção molecular por RT-PCR (“Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction”).

O objetivo de programas de indexação biológica é detectar a presença de viroses em plantas de variedades de interesse mediante o uso de diferentes tipos possíveis de enxertia, em casa de vegetação ou a campo, utilizando plantas indicadoras que apresentam resposta sintomatológica conhecida (GARAU et al., 1997).

Já o teste de ELISA baseia-se no princípio básico da sorologia, em que o antígeno é reconhecido por um anticorpo (imunoglobulina) específico, formando o complexo anticorpo-antígeno, associado a propriedades colorimétricas (ALMEIDA, 1995), sendo muito sensível (consegue detectar entre 20 a 100 ng de partículas virais), preciso (a reação geralmente é específica para o vírus de interesse) e rápido quando comparado a outros métodos como a indexação biológica que pode necessitar de meses para gerar resultados (GARNSEY; CAMBRA, 1993).

O método baseado em RT-PCR embora seja extremamente sensível, muitas vezes não pode ser considerado excludente na diagnose de infecção, caso não haja amplificação do material genético do vírus, visto que diversos fatores podem dificultar a amplificação do DNA, tais como temperatura de anelamento de iniciadores e qualidade e quantidade do RNA viral utilizado para sintetizar seu respectivo cDNA.

Os objetivos desse trabalho foram acompanhar a evolução da infecção por três vírus do enrolamento (GLRaVs) em clones de *V. vinifera* cv. ‘Cabernet Sauvignon’ e *V. labrusca* cv. ‘Bordô’ em diferentes períodos do desenvolvimento vegetativo e em diferentes amostras de tecido da parte aérea.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de amostras

Durante dois anos consecutivos (2008 e 2009) avaliações sorológicas para identificação de vírus foram realizadas em 41 variedades de videira cultivadas no campo da Fazenda Experimental de Caldas - Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), localizado em Caldas, MG, Brasil.

Após a identificação e confirmação de plantas de videira positivamente infectadas com diferentes tipos e combinações do vírus do enrolamento, foram colhidas estacas lenhosas a partir de plantas infectadas de *V. vinifera* cv. ‘Cabernet Sauvignon’ e *V. labrusca* cv. ‘Bordô’ também conhecida regionalmente pelo sinônimo de ‘Folha de Figo’.

As estacas com cerca de 30 cm de comprimento e contendo cerca de 4 brotações laterais, foram coletadas cerca de 2 a 3 meses após o final do ciclo reprodutivo e armazenadas a 10 °C por dois meses para quebrar a dormência das brotações laterais. Antes do plantio das estacas em sacolas plásticas contendo substrato para o enraizamento, as mesmas foram previamente imersas por cerca de 12 h em água e em seguida tratadas com o fungicida Ortocide® por 5 min.

Para cada planta de videira amostrada, foram gerados três clones para compor o grupo de três repetições biológicas para cada uma das plantas infectadas. Os clones foram cultivados e mantidos em vasos individuais contendo 10 Kg de solo e distribuídos em delineamento ao acaso no interior de viveiro protegido por tela anti-afídeo. As variedades de videira e os seus respectivos vírus que as infectam estão indicados na Tabela 1.

Três clones adicionais coletados de uma planta de *V. labrusca* cv. ‘Bordô’ que supostamente não apresentaram infecção com nenhum dos vírus estudados foram utilizados como controle negativo.

Tabela 1 Descrição das variedades de videira, vírus, tipos de amostra de tecido e dias de coleta

Fonte: Laboratório de Biotecnologia Vegetal, EPAMIG, Caldas, MG (2011)

Planta	Variedade	Vírus	Nº de clones	Amostra	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª
					Período de Coletas em Dias					
1	Cabernet Sauvignon	GLRaV-3	3	Limbo Foliar Peciolo	-	-	-	135	-	182
2	Cabernet Sauvignon	GLRaV-3	3	Limbo Foliar Peciolo	-	-	-	135	-	182
3	Bordô	GLRaV-1 GLRaV-2 GLRaV-3	3	Limbo Foliar Peciolo	49	-	108	135	169	182
4	Bordô	GLRaV-2	3	Limbo Foliar Peciolo	-	77	108	135	-	182
5	Bordô	GLRaV-2	3	Limbo Foliar Peciolo	-	77	108	135	-	182
6	Bordô	GLRaV-1 GLRaV-2	3	Limbo Foliar Peciolo	49	77	108	135	-	182
7	Bordô	GLRaV-2	3	Limbo Foliar Peciolo	-	-	108	135	169	182
8	Bordô	Controle Negativo	3	Limbo Foliar Peciolo	49	77	108	135	169	182

2.2 Análise sorológica por DAS-ELISA

Todas as amostras coletadas de 41 cultivares diferentes de videira mantidas na Fazenda Experimental da EPAMIG em Caldas, foram testadas sorologicamente durante a estação de crescimento vegetativo em 2008 e 2009 para a presença dos vírus GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-6, GVA (“*Grapevine Virus A*”), GFkV (“*Grapevine Fleck Virus*”) e GFLV (“*Grapevine Fanleaf Virus*”). Como não foram detectadas a presença dos vírus GLRaV-6, GVA, GFkV e GFLV, as amostras das plantas infectadas com vírus do enrolamento e do suposto controle negativo só foram testadas para os vírus GLRaV-1, GLRaV-2 e GLRaV-3.

Anti-soros comerciais foram adquiridos da empresa Bioreba (Suíça) para os vírus testados e foi utilizado o protocolo sugerido pelo fabricante para a realização do sanduíche duplo do anticorpo (DAS-ELISA). Dois tipos de amostras de folhas foram coletados para verificar a presença de antígeno para os vírus descritos acima. Um tipo de amostra consistia da mistura de tecido do pecíolo e das nervuras principais das folhas e o outro tipo de tecido era constituído apenas pelo limbo foliar.

O teste DAS-ELISA consiste em revestir a placa de poliestireno contendo 96 poços, com tampão de cobertura acrescentando em cada poço 200 μ L [Carbonato-Bicarbonato 50 mM (pH 9,6); NaN_3 0,02%] contendo anticorpo de captura na diluição de 1:1000 (v/v). Em seguida, as placas foram incubadas a 30 °C durante 4 horas e então lavadas 3 vezes com tampão de lavagem [tampão fosfato 10 mM (pH 7,4); NaCl 140 mM; KCl 3 mM; e Tween-20 0,05%]. As placas foram secas debruço sobre papel absorvente e em temperatura ambiente. Logo em seguida foram aplicadas 200 μ L do extrato proteico em cada poço e as placas foram incubadas a 4 °C “overnight”. Posteriormente, foram lavadas novamente três vezes com o mesmo tampão descrito anteriormente e colocadas em repouso para secar. Em cada poço foram adicionados 200 μ L do tampão do conjugado [Tris-HCl 20 mM (pH 7,4); NaCl 137 mM; KCl 3 mM; MgCl_2 1mM; PVP 2%; Tween-20 0,02%] contendo o conjugado na diluição de 1:1.000 (v/v) e as placas foram incubadas a 30 °C por 5 horas. Foram realizadas novas lavagens conforme descrito anteriormente e adicionados 200 μ L do substrato (p-nitro-fenil-fosfato, 1 mg/mL) diluídos em tampão apropriado [Dietanolamina 1M (pH 9.8); NaN_3 0,02%]. Após a adição do substrato a absorbância foi determinada no comprimento de onda visível de 405 e 492 nm utilizando uma leitora automática de placas de ELISA (Anthos Zenyth[®] - 340rt, Winooski, Vermont, EUA). As amostras foram avaliadas após o início da reação da seguinte forma:

60 minutos para vírus GLRaV-3 e 120 minutos para os vírus GLRaV-1 e GLRaV-2.

2.3 Análise dos dados

De acordo com o fabricante dos kits para a detecção viral, foram consideradas positivas as amostras cujos valores de absorbância foram superiores ao dobro da média dos controles negativos. Foram calculados os valores de média e o erro padrão para cada grupo de repetições biológicas e em seguida foram gerados os gráficos em software SigmaPlot[®] para a interpretação da carga viral ao longo do ciclo vegetativo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do DAS-ELISA apresentados nas Figuras 1, 2, 3, 4 e 5, demonstram a variação da carga viral dos vírus GLRaV-1, GLRaV-2, e GLRaV-3 ao longo do crescimento vegetativo das plantas, durante o período em dias em que foi realizada a coleta das amostras do limbo foliar e de pecíolo e nervuras.

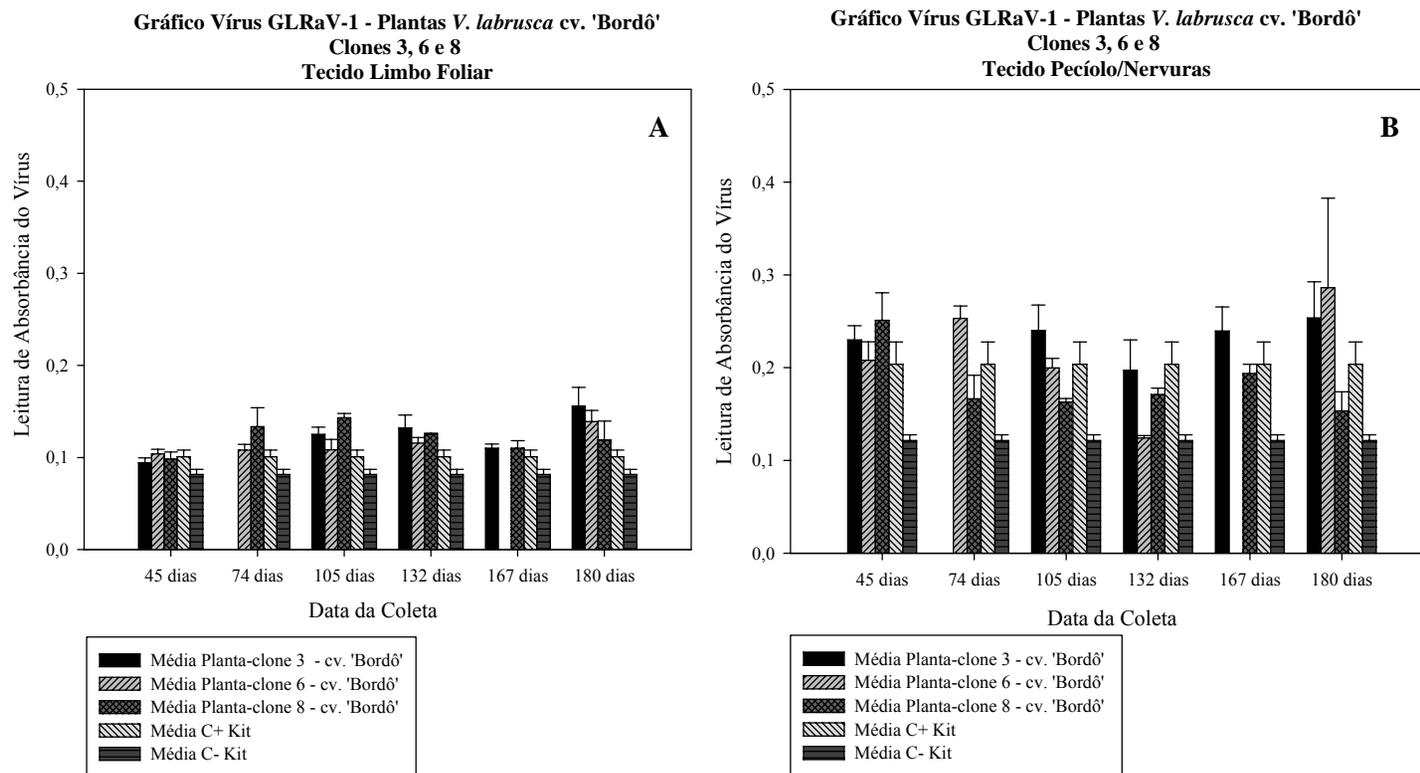


Figura 1 Média e erro padrão da absorbância da carga viral do vírus GLRaV-1 em amostra de tecido do limbo foliar (A) e pecíolo/nervuras (B) ao longo do ciclo vegetativo dos clones 3, 6 e 8 da cultivar 'Bordô' (*V. labrusca*)
 Fonte: Laboratório de Biotecnologia Vegetal, EPAMIG, Caldas, MG (2011)

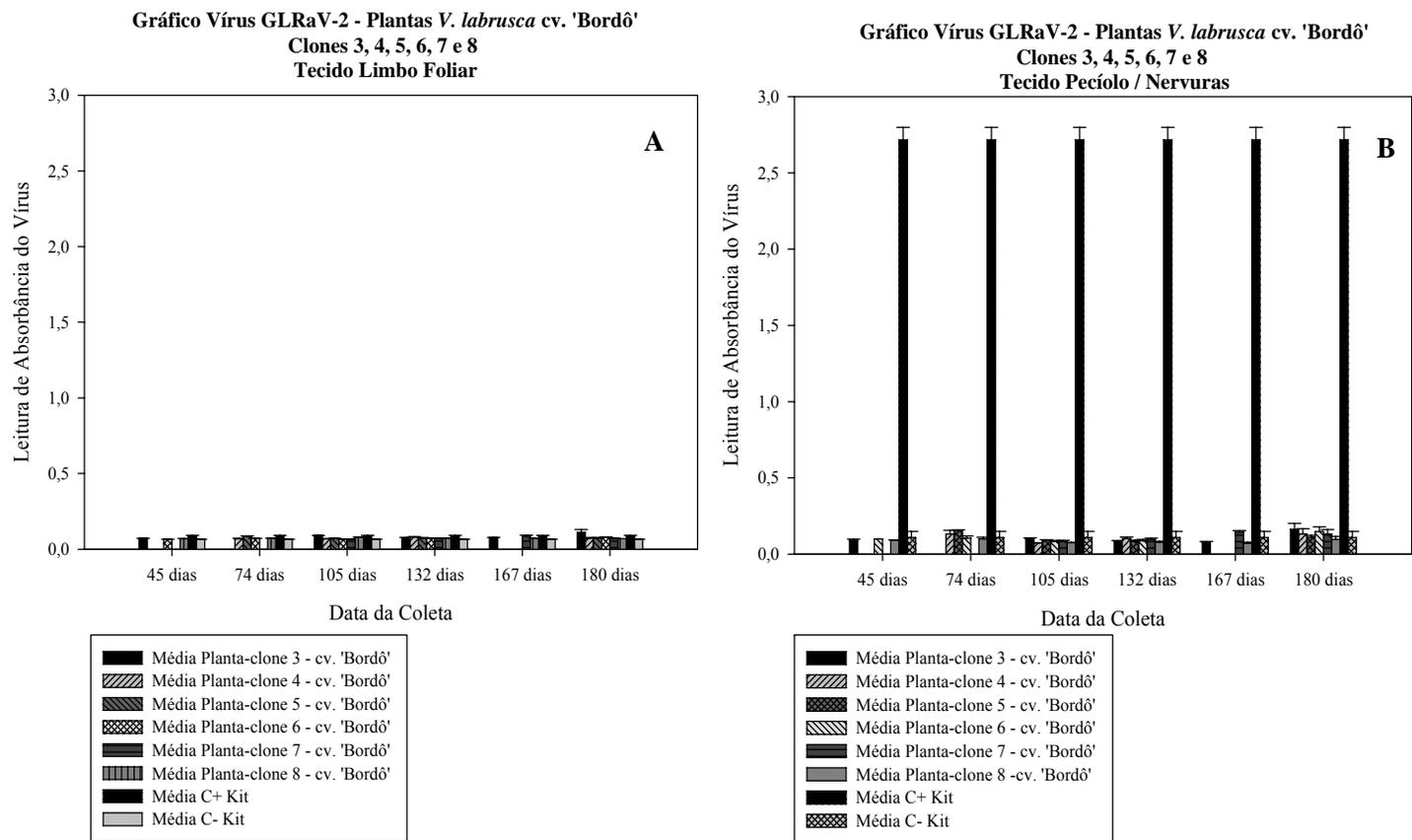


Figura 2 Média e erro padrão da absorbância da carga viral do vírus GLRaV-2 em amostras de tecido do limbo foliar (A) e amostras do pecíolo e nervuras das folhas (B) ao longo do ciclo vegetativo dos clones da cultivar 'Bordô' (*V. labrusca*)
Fonte: Laboratório de Biotecnologia Vegetal, EPAMIG, Caldas, MG (2011)

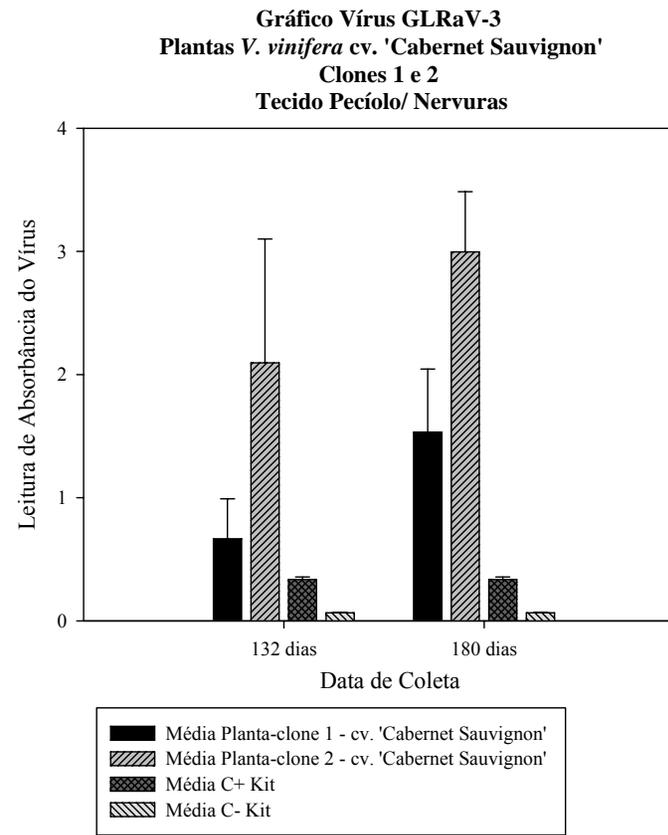
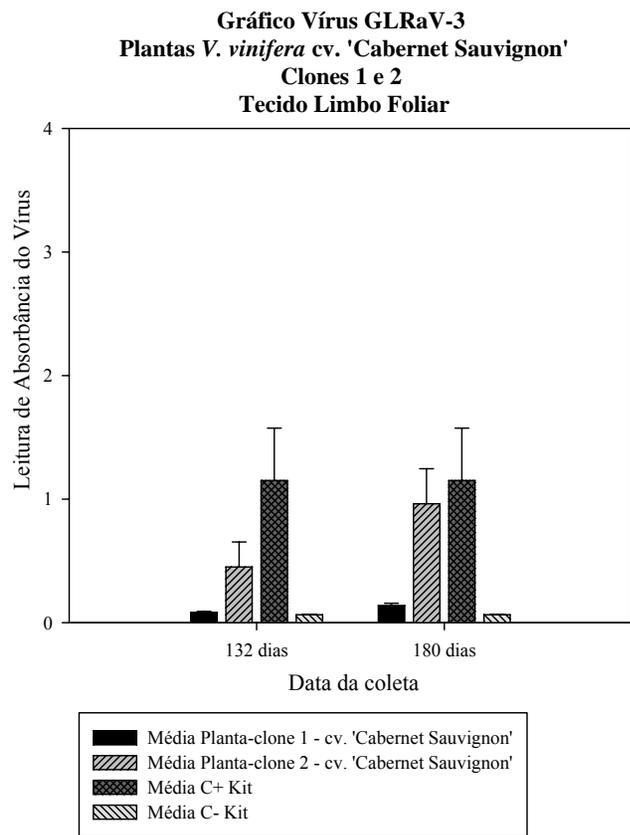


Figura 3 Média e erro padrão da absorbância da carga viral do vírus GLRaV-3 em amostras tecido do limbo foliar (A) e amostras do pecíolo e nervuras das folhas (B) ao longo do ciclo vegetativo dos clones 1 e 2 da cultivar 'Cabernet Sauvignon' (*V. vinifera*)

Fonte: Laboratório de Biotecnologia Vegetal, EPAMIG, Caldas, MG (2011)

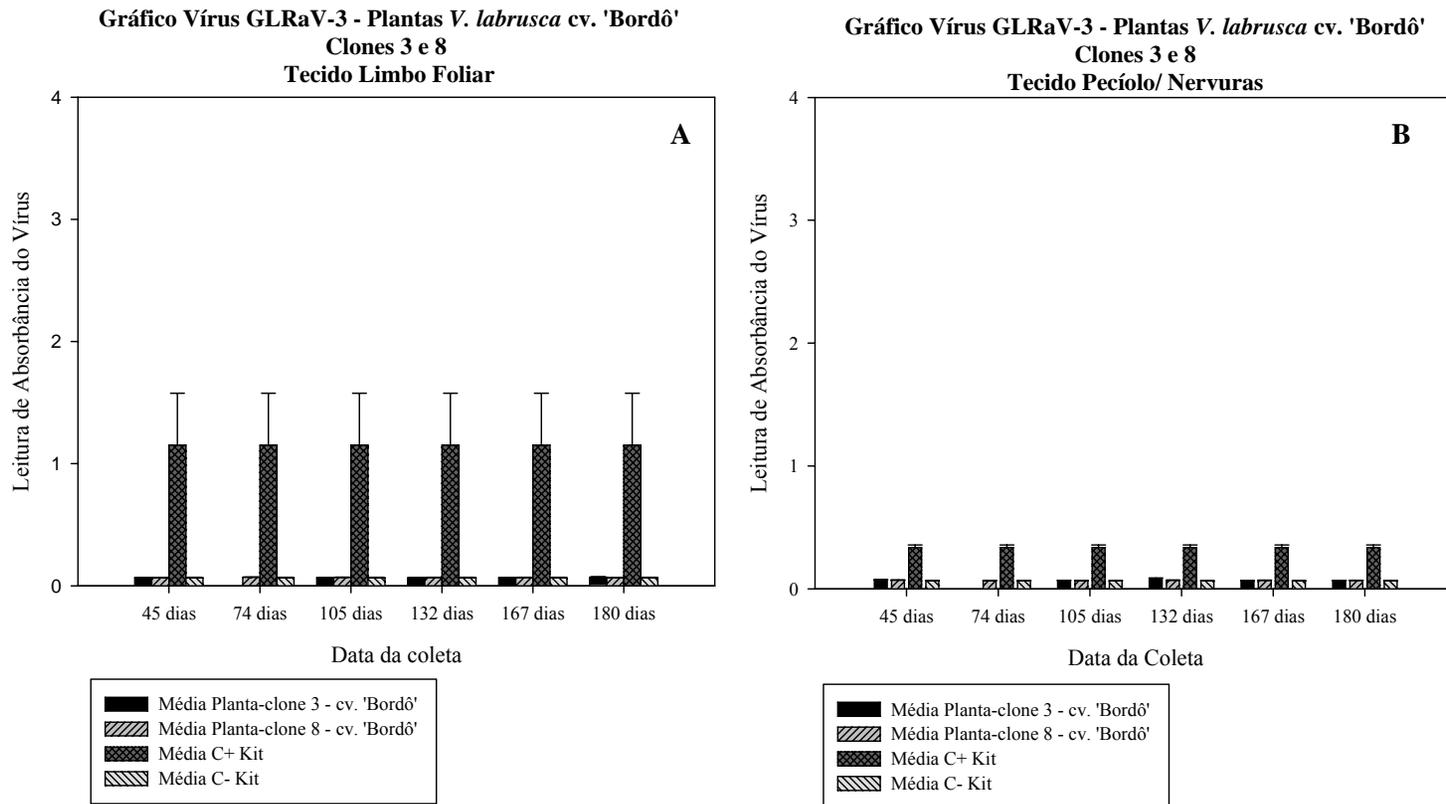


Figura 4 Média e erro padrão da absorbância da carga viral do vírus GLRaV-3 em amostras tecido do limbo foliar (A) e amostras do pecíolo e nervuras das folhas (B) ao longo do ciclo vegetativo dos clones 3 e 8 da cultivar 'Bordô' (*V. labrusca*)
Fonte: Laboratório de Biotecnologia Vegetal, EPAMIG, Caldas, MG (2011)

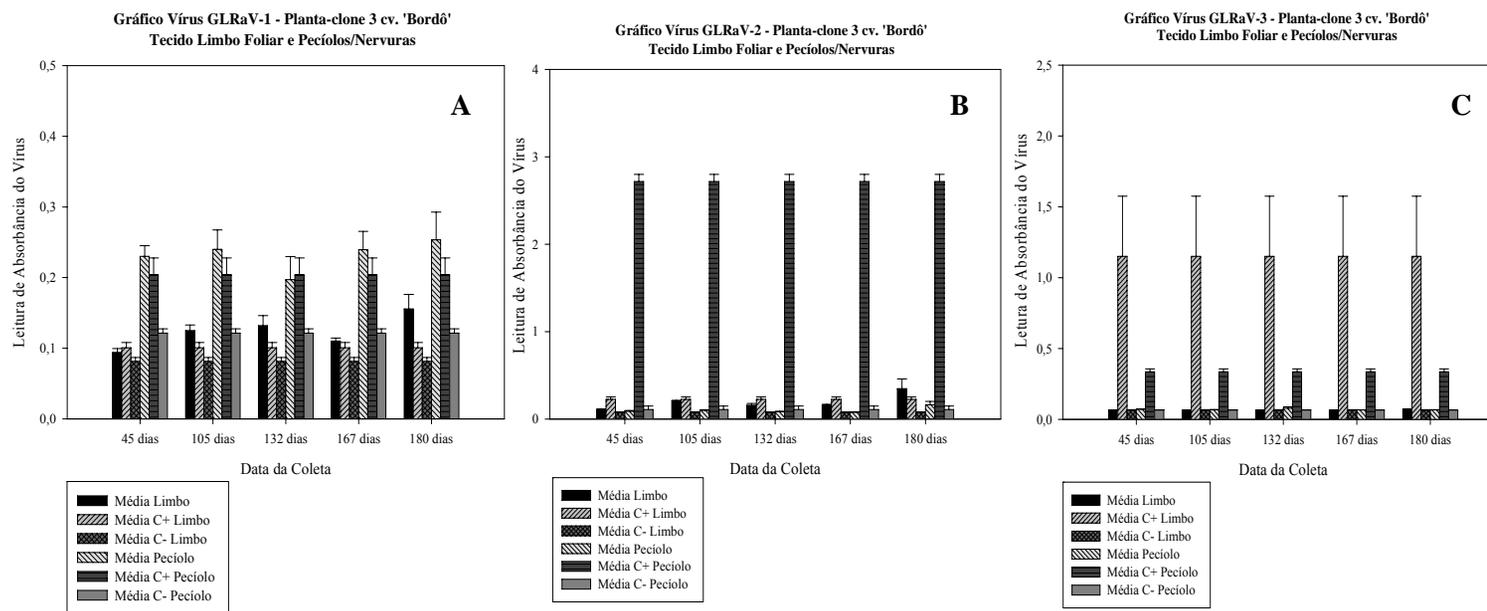


Figura 5 Média e erro padrão da absorbância da carga viral dos vírus GLRaV-1, GLRaV-2 GLRaV-3 em amostras de tecido do limbo foliar e amostras do pecíolo e nervuras das folhas ao longo do ciclo vegetativo dos clones da planta 3, 'Bordô' (*V. labrusca*)

Fonte: Laboratório de Biotecnologia Vegetal, EPAMIG, Caldas, MG (2011)

O vírus GLRaV-1 está presente nos clones de ‘Bordô’ identificados pelos números 3, 6 e 8, sendo esse diagnóstico confirmado pelos resultados sorológicos gerados pelo DAS-ELISA. Por se tratar da espécie *V. labrusca*, a sintomatologia provocada no aspecto morfológico e anatômico da planta é muito mais tênue do que a sintomatologia observada na espécie *V. vinifera*. Enquanto as plantas infectadas de *V. labrusca* apresentam apenas o sintoma de mosaico foliar em estágios mais tardios do desenvolvimento, as plantas de *V. vinifera* são severamente afetadas pelos vírus do enrolamento, ainda em estágios precoces do desenvolvimento vegetativo. No caso desse experimento, as plantas infectadas de *V. vinifera* tiveram seu desenvolvimento comprometido de forma tão severa pelos vírus do enrolamento que foi impraticável coletar amostras foliares durante todo o ciclo vegetativo, visto que os clones não foram capazes de produzir material vegetal na quantidade suficiente para a coleta de amostras.

Essa diferença marcante e contrastante entre o comportamento de plantas infectadas de *V. labrusca* e *V. vinifera* reforça a necessidade do emprego de métodos precisos e eficientes para a detecção de viroses, tal qual o método DAS-ELISA aplicado nesse trabalho.

Na Figura 1 que apresenta a variação da carga viral do vírus GLRaV-1 em cultivares da videira ‘Bordô’, nos diferentes tecidos amostrados que foram limbo foliar e nervuras (pecíolo e nervuras), observa-se que a média obtida para as três repetições do clone número 3, ocorreu um grande aumento da carga viral. Diferentemente, para a média das três repetições do clone de número 6, observou-se apenas um pequeno aumento para as amostras obtidas de pecíolo e nervuras. Já para as amostras de limbo foliar, ocorreram variações maiores na média do clone número 6.

Assim como para o vírus GLRaV-1, o vírus GLRaV-2 comportou-se de forma semelhante no que se refere as análises com as plantas identificadas como positivas para o mesmo. Foi observada a variação da carga viral de forma

relevante nos clones de videira de número 5 e 7, durante o período em que foi realizada a coleta das amostras.

Aos 74 dias após o início do ciclo vegetativo, sintomas virais foram observados e confirmados pelos testes sorológicos. Entre 105 e 132 dias começou a ser observado o decréscimo na carga viral, para os clones 5 e 7 respectivamente. Uma hipótese plausível para explicar essa curva de aumento e subsequente declínio na quantidade de vírus detectado ao longo do ciclo pode ser devido a taxa de multiplicação celular nas plantas de videira ao longo do ciclo.

A divisão celular nos estágios iniciais de desenvolvimento da planta de videira ocorre de forma mais rápida do que a multiplicação de partículas virais no interior das células, o que dificulta ou mesmo impede que os vírus faça o uso do maquinário metabólico da célula vegetal para promover sua replicação durante o ciclo lisogênico. À medida que o desenvolvimento da videira avança, a divisão celular intensa que ocorre nas plantas de videira é substituída pelo crescimento celular, que é basicamente o aumento do volume e expansão das células vegetais. Durante essa etapa, os vírus encontram condições favoráveis para sua multiplicação no tecido vegetal.

Para a maioria das cultivares de videira as folhas senescem e caem durante o período de dormência no inverno. No entanto, antes que ocorra a senescência é disparado um intenso processo de morte celular programada, que provoca a necrose dos tecidos da folha. Consequentemente, devido esse intenso processo de morte celular, a carga viral também sofre severa redução, explicando o fato observado nas amostras coletadas mais próximas ao final do ciclo vegetativo da videira (entre 167 e 180 dias), que apresentaram carga viral inferior ao de amostras coletadas durante o meio do ciclo vegetativo.

Os resultados comprovam que há grande variação na carga viral em plantas clones de 'Bordô' durante o período de desenvolvimento das mesmas.

Conforme já relatado anteriormente, as plantas de ‘Cabernet Sauvignon’ tiveram o desenvolvimento do ciclo vegetativo extremamente comprometido pela infecção viral com GLRaV-3. Esse efeito severo da virose sobre essa cultivar impediu que as coletas de amostras fossem realizadas nos períodos regulares previamente definidos, possibilitando apenas a coleta de duas amostras durante o ciclo vegetativo, indicados na Tabela 1.

A primeira coleta de amostra nessa variedade só foi possível no 135º dia de cultivo ao passo que para os clones da cultivar ‘Bordô’, as primeiras coletas foram realizadas no 49º dia. Além disso, devido a elevada carga viral detectada nos clones de ‘Cabernet Sauvignon’, as leituras do DAS-ELISA tiveram que ser feitas após 60 minutos de incubação, pois em tempo maiores, devido ao título elevado da combinação anticorpos-antígenos do vírus, ocasionou leituras superiores a escala máxima da absorbância da leitora de ELISA. Esse fato foi observado tanto para as amostras de ‘Cabernet Sauvignon’ provenientes de tecido do limbo foliar como dos tecidos de pecíolos e nervuras.

É importante ressaltar que para todos os vírus, as três repetições da planta-clone de número 8 cv. ‘Bordô’, utilizado como possível controle negativo apresentaram desenvolvimento vegetativo vigoroso ao longo de todo o tempo em que foi realizado o experimento, o que refletiu no número de amostras foliares coletadas, totalizando seis coletas. Porém neste clone foi detectado a presença dos vírus GLRaV-1 e GLRaV-2 (Figura 1 e 2), desconsiderando a hipótese de planta negativa para estes vírus. Em análises realizadas previamente por Sant’ana (2010) na mesma planta, foi observado que esta não tinha a presença dos vírus GLRaV-1, -2, -3, -6, GFkV, GVA e GVLV. A atual detecção dos vírus GLRaV-1 e -2, pode ser devido ao desenvolvimento vegetativo e a proliferação do vírus na célula, ocorrendo o aumento de sua carga viral na planta, que antes não era detectado pelo DAS-ELISA. Para nenhum dos clones infectados foi possível fazer o mesmo número de coletas de amostras, pois as

plantas tiveram seu vigor e desenvolvimento comprometido em diferentes magnitudes, dependendo da espécie de videira, do tipo de vírus e da ocorrência de mais de um vírus na mesma planta (complexo viral).

O enrolamento das folhas causa sérios prejuízos à videira, afetando o número, o peso e o tamanho dos cachos, além de reduzir o teor de açúcares dos frutos, a longevidade da planta e a qualidade de seus produtos (KUHN; NICKEL, 1998). Diferentes autores têm verificado decréscimo na produção de frutos (CABALEIRO; SEGURA; GARCÍA-BERRIOS, 1999; KOVACS et al., 2001; KUHN, 1989; WALTER; LEGIN, 1986); queda no número de cachos por planta (CREDI; BABINI, 1997; KUHN, 1989); diminuição no peso dos ramos podados, que demonstra a perda de vigor da planta e seu definhamento, diminuindo sua longevidade (KUHN, 1989); redução no conteúdo de açúcar nos frutos como consequência do amadurecimento irregular ou retardado dos frutos, causando prejuízos para a vinificação (CABALEIRO; SEGURA; GARCÍA-BERRIOS, 1999; CREDI; BABINI, 1997; KOVACS et al., 2001; WALTER; LEGIN, 1986; WOLPERT; VILAS, 1992); e prejuízo na qualidade final de vinhos e sucos (KUHN, 1989).

4 CONCLUSÕES

Este trabalho preenche lacunas importantes para a elucidação do processo de evolução da doença do enrolamento em plantas infectadas de videira com vírus do enrolamento, assim como suas inter-relações nos casos em que se observa a ocorrência de complexos virais. Deste modo, a informação aqui gerada pode subsidiar o desenvolvimento de práticas de amostragem para a detecção de doenças causadas por vírus em videira.

A definição do tipo de tecido ou órgão, além do exato momento em que os vírus se manifestam com maior intensidade no ciclo vegetativo da videira é

uma informação de grande aplicabilidade tanto para os estudos sobre a cinética da infecção viral ao longo do desenvolvimento da planta, como também para definir o melhor momento e melhor tipo de tecido para averiguar a presença ou não de contaminação por vírus, corroborando com o manejo adequado de plantas matrizes utilizadas para confecção de mudas de videira.

Na videira a detecção precoce da existência de infecções por vírus e a substituição de plantas contaminadas por plantas saudáveis é uma estratégia que beneficia a atividade vitícola a médio e longo prazo, pois torna os parreirais mais longevos, mais resistentes a incidência de estresse bióticos e abióticos, tais como doenças fúngicas e estresse hídrico, e com produtividade e qualidade de frutos mais estável ao longo dos anos.

REFERÊNCIAS

ABOU-GHANEM, N. et al. Some properties of Grapevine leafroll-associated virus 2 and molecular organization of the 3' region of the viral genome. **Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 80, p. 37-46, 1998.

ALMEIDA, A. M. R. **Noções de sorologia aplicadas à fitovirologia**. Londrina: EMBRAPACNPS, 1995. p. 105.

BONFIGLIOLI, R.; HOSKINS, N.; EDWARDS, F. Grapevine Leafroll Viruses in New Zealand Viticulture. **Riversun Tech Bull Issue**, New Zealand, n. 5, p. 8, 2001.

CABALEIRO, C.; SEGURA, A.; GARCÍA-BERRIOS, J. Effects of *grapevine leafroll-associated virus 3* on the physiology and must of *Vitis vinifera* L. cv. Albariño following contamination in the field. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis. v. 50, n. 1, p. 40-44, 1999.

CREDI, R.; BABINI, A. R. Effects of virus and virus-like infections on growth, yield, and fruit quality of Albana and Trebbiano Romagnolo grapevines. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis. v. 48, n. 1, p. 7-12, 1997.

GARAU, R. et al. Indexing for the identification of virus and virus-like diseases of the grapevine. In: WALTER, B. (Ed.). **Sanitary selection of the grapevine: protocols for detection of viruses and virus-like diseases**. Paris: INRA, 1997. p. 97-117.

GARNSEY, S. M.; CAMBRA, M. Serology: enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In: MARTELLI, G. P. (Ed.). **Graft-transmissible diseases of grapevines: handbook for detection and diagnosis**. Roma: FAO, 1993. p. 169-192.

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

KUHN, G. B. Efeitos causados pelo vírus do enrolamento da folha da videira na cultivar Cabernet Franc. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, n. 3/4, p. 280-283, 1989.

KUHN, G. B. Intumescimento dos ramos da videira (“corky bark”), doença constatada no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 4, p. 399-406, 1992.

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

MARTELLI, G. P. et al. The family Closteroviridae revised. **Archives of Virology**, Wien, v. 147, p. 2039-2044, 2002.

MARTELLI, G. P. True virus diseases: leafroll. In: _____. **Graft transmissible diseases of grapevines: handbook for detection and diagnosis**. Roma: [s. n.], 1993. p. 37-44.

MARTELLI, G. P.; WALTER, B. Virus certification of grapevines. In: HADIDI, A.; KHETARPAL, R. K.; KOGANEZAWA, A. (Ed.). **Plant virus disease control**. St. Paul: [s. n.], 1998. p. 261-276.

SANTA CATARINA. Secretaria de Estado do Desenvolvimento Rural e da Agricultura. Portaria nº 008/2002/GABS – SDA, de 5 de abril de 2002. **Diário Oficial de Santa Catarina**, Florianópolis, n. 16.887, 17 maio 2002. p. 25-29.

SANT’ANA, G. C. **Técnicas sorológicas e moleculares na avaliação genética e fitossanitária de mudas e matrizes de videira**. 2010. 117 p. Dissertação

(Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

SFORZA, R.; BOUDON-PADIEU, E.; GREIF, C. New mealybug species vectoring grapevine leafroll-associated viruses-1 and -3 (GLRaV-1 and -3). **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 109, p. 975-981, 2003.

TSAI, C. W. et al. Transmission of *Grapevine leafroll-associated virus 3* by the Vine Mealybug (*Planococcus ficus*). **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 10, p. 1093-1098, 2008.

WALKER, J. T. S. et al. Modelling the spread and economic impact. **Horticulture Research Client Reports**, New Zealand, v. 1, p. 127-136, 2004.

WALTER, B.; LEGIN, R. Connaissances actuelles sur les viroses de l'enroulement de la vigne. **Le Vigneron champenois**, Paris, v. 9, n. 3, p. 436-446, 1986.

WALTER, B.; MARTELLI, G. P. Clonal and sanitary selection of the grapevine. In: WALTER, B. (Ed.). **Sanitary selection of the grapevine: protocols for detection of viruses and virus-like diseases**. Paris: INRA, 1997. p. 43-95.

WOLPERT, J. A.; VILAS, E. P. Effect of mild leafroll disease on growth, yield, and fruit maturity indices of Riesling and Zinfandel. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 43, n. 3, p. 367-369, 1992.

CONCLUSÃO GERAL

A atividade vitivinícola é de grande importância para a economia de diversos países, dentre eles o Brasil. Sua prática vem passando por avanços ao longo das últimas décadas, em prol do crescimento e qualidade da cadeia produtiva. O desenvolvimento de protocolos para a micropropagação de plantas isenta de viroses e com características genéticas preservadas é um importante exemplo de como a Biotecnologia Moderna pode contribuir com o desenvolvimento da agropecuária.

Com o advento de novas técnicas e ferramentas biotecnológicas, é possível hoje melhorar a qualidade e quantidade do material propagativo a ser disponibilizado aos viticultores.

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo aplicar tecnologias já validadas e disponíveis na área biotecnológica, tais como o cultivo axênico de plântulas em ambiente *in vitro*, caracterização da estabilidade e diversidade genética utilizando marcadores de DNA e citometria de fluxo e a identificação e mensuração da infecção por vírus utilizando métodos sorológicos, agregando informação técnica-científica para a cultura da videira.

Foram abordados os aspectos que envolvem a propagação da videira pelo método de cultivo *in vitro* desde o estudo para otimização do procedimento de cultivo, passando pela mensuração da ocorrência de variações somaclonais possivelmente oriundas do estresse provocado pelo cultivo *in vitro* sucessivo até a detecção de vírus que podem ser facilmente disseminados pelo processo de propagação vegetativa.

Os resultados apresentados e as metodologias testadas geraram informações relevantes que poderão ser estendidas para programas de certificação sanitária da videira.