

GUSTAVO CÉSAR SANT'ANA

**TÉCNICAS SOROLÓGICAS E MOLECULARES NA AVALIAÇÃO
GENÉTICA E FITOSSANITÁRIA DE MUDAS E MATRIZES DE VIDEIRA**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Genética e
Melhoramento, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010**

GUSTAVO CÉSAR SANT'ANA

**TÉCNICAS SOROLÓGICAS E MOLECULARES NA AVALIAÇÃO
GENÉTICA E FITOSSANITÁRIA DE MUDAS E MATRIZES DE VIDEIRA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 11 de Junho de 2010

Pesq. Juliano Lino Ferreira

Prof^a. Mara Garcia Tavares

**Pesq. Geraldo Magela de A. Cançado
(Coorientador)**

**Pesq. Eveline Teixeira Caixeta
(Coorientadora)**

**Prof. Aluízio Borém de Oliveira
(Orientador)**

A minha mãe Maria Helena, dedico.

"E sem saber que era impossível, ele foi lá e fez"

Jean Maurice Eugène Clément Cocteau (1889-1963)

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Patrícia M. Rosado pelo carinho e pela compreensão nos momentos difíceis e por cuidar com muito amor da nossa pequena Luíza.

À minha mãe Maria Helena que sempre me incentivou e forneceu todas as condições necessárias para que eu pudesse me dedicar aos estudos durante toda a minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de realização do curso.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), em especial ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Núcleo Tecnológico Uva e Vinho, pelas excelentes condições oferecidas para a realização deste trabalho.

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

À Fundação de Amparo a 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 Prof. Aluizio Borém pela oportunidade e pelos valiosos ensinamentos transmitidos ao longo deste curso.

Ao Dr. Geraldo Magela de Almeida Cançado, pela confiança depositada, por garantir todas as condições necessárias para realização deste trabalho e por me ensinar muitas coisas que vão além da pesquisa.

À Dra. Eveline Teixeira Caixeta por sua disponibilidade e pelo valioso auxílio na implantação da técnica de marcadores moleculares microsatélites.

Ao Dr. Juliano Lino Ferreira não só pela enorme ajuda com os géis de poliacrilamida e com a análise dos dados, mas também por ter tornado minha estadia em Caldas mais agradável e divertida.

À Dra. Bárbara Dantas Fontes Soares pela contribuição na implementação das técnicas e nas análises de detecção de viroses.

Ao Dr. Thor Vinícios Martins Fajardo e ao técnico Marcos da EMBRAPA Uva e Vinho pelos valiosos ensinamentos sobre as viroses da videira.

Ao Dr. Hermínio Souza Rocha pela parceria e pela supervisão da parte inicial do trabalho.

Aos colegas da UFV Rafael Hermano, Wellington (Azul) e Camilo Vital pela amizade.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da EPAMIG de Caldas Rafaeli, Bruna, Sâmera, Monique, Aurinete, Franciane, Ana Paula, Gustavo Freitas, Alisson e Claudinéia.

Aos pesquisadores Dr. Murillo de Albuquerque Regina, Dra. Renata Vieira da Mota, Daniel Angelucci de Amorim e ao gerente Cesar Augusto de Oliveira Fabrino do Núcleo Tecnológico EPAMIG Uva e Vinho pelas valiosas informações e colaboração.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Gustavo César Sant'Ana, filho de Maria Helena Cardoso Sant'Ana e Renato Antônio Sant'Ana, nasceu no dia 12 de março de 1980 em Viçosa, MG.

Em 2002 ingressou no curso de Ciências Biológicas da UFV, se formando bacharel e licenciado em março de 2007.

Em março de 2008 iniciou o mestrado em Genética e Melhoramento da UFV, submetendo-se a defesa de tese no dia 11 de junho de 2010.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1. A videira e a viticultura no Brasil	1
2. Importância da identificação varietal	2
3. Utilização de marcadores moleculares em videira	5
4. Marcadores Microsatélites em Videira	10
5. As viroses da videira.....	14
6. “Gapevine leafroll Associated Virus”	17
7. “Grapevine Fanleaf Virus”	19
8. “Grapevine virus A”	21
9. “Grapevine fleck vírus”	22
10. Métodos para detecção viral	23
11. Referências Bibliográficas	27
CAPÍTULO I	38
Análise da Diversidade Genética e “DNA Fingerprinting” em Acessos de Videira Utilizando Marcadores Moleculares Microsatélites.....	38
RESUMO	39
ABSTRACT	40
1. INTRODUÇÃO	41
2. MATERIAIS E MÉTODOS	43
2.1. Material Vegetal.....	43
2.2. Extração de DNA	44
2.3. Análises dos Marcadores Microsatélites.....	45
2.4. Eletroforese em Gel Desnaturante de Poliacrilamida	46
2.5. Análises dos Dados.....	47

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
3.1. Análise dos Marcadores Microsatélites	49
3.2. Análise da Diversidade Genética.....	57
4. CONCLUSÕES.....	65
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
CAPÍTULO II	70
Identificação e Avaliação da Incidência de Víroses em Variedades de Videira	70
RESUMO	71
ABSTRACT	72
1. INTRODUÇÃO	73
2. MATERIAIS E MÉTODOS	76
2.1. Material Vegetal.....	76
2.2. Preparação das amostras.....	78
2.3. Análises de DAS-ELISA.....	78
2.3. Teste de Diluições do Extrato Protéico	79
2.4. Avaliação da Carga Viral ao Longo do Ciclo Vegetativo	79
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
3.1. Diluições dos Extratos Protéicos	81
3.2. Análise do Desenvolvimento da Reação em Função do Tempo	87
3.3. Avaliação dos Clones ‘Bordô’	90
3.4. Avaliação de Matrizes e de Mudas	92
3.5. Análise da variação da carga viral ao longo do ciclo vegetativo	94
4. CONCLUSÕES.....	99
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
CONCLUSÕES GERAIS.....	103

RESUMO

SANT'ANA, Gustavo César, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2010. **Técnicas sorológicas e moleculares na avaliação genética e fitossanitária de mudas e matrizes de videira**. Orientador: Aluizio Borém de Oliveira. Co-orientadores: Geraldo Magela de Almeida Cançado e Eveline Teixeira Caixeta.

A videira é a frutífera perene de maior importância econômica a nível mundial. Apesar de não figurar entre os maiores produtores mundiais, o Brasil vem apresentando um crescente desenvolvimento no setor, e a área de produção tem aumentado acentuadamente com a renovação dos vinhedos e novos plantios. Para a implantação e renovação dos vinhedos, os viticultores brasileiros têm enfrentado sérios problemas relacionados à falta de mudas com qualidade genética e fitossanitária testadas por empresas nacionais especializadas. Assim, a inexistência de um sistema público ou privado de certificação de mudas, com a finalidade de impedir a difusão de material propagativo de qualidade genética e fitossanitária duvidosas, dificulta o desenvolvimento da viticultura nacional. Os objetivos desse trabalho foram (I) a identificação genética ("DNA fingerprinting") e estudo da diversidade genética de variedades copa e de porta-enxerto de videira cultivados no estado de Minas Gerais, utilizando marcadores moleculares do tipo SSR, para dar suporte ao programa de certificação genética de mudas de videira da EPAMIG; e (II) identificar e mapear a ocorrência de viroses na coleção de plantas matrizes de videira do Núcleo Tecnológico EPAMIG Uva e Vinho, que são utilizadas para produção de mudas enxertadas e analisar a evolução da carga viral de plantas infectadas ao longo do ciclo produtivo das plantas. Os sete marcadores microssatélites utilizados permitiram a diferenciação de 26 genótipos entre as 27 variedades estudadas. Foram identificados 101 alelos com uma média de 14,43 alelos por *locus*, confirmando a eficiência dos marcadores para a detecção de polimorfismos genéticos. A heterozigosidade esperada variou de 0,832 a 0,9205, com média 0,8873, enquanto a heterozigosidade observada variou de 0,7692 a 1,000, com média 0,8943. O excesso de heterozigotos se explica pelo fato da seleção de indivíduos superiores para qualidade e

produtividade em videira ter sido realizada precocemente durante o processo de melhoramento da cultura e perpetuado pela multiplicação vegetativa. Além disso, a videira é sensível à depressão endogâmica sendo as melhores performances obtidas com indivíduos heterozigotos. Os *loci* que apresentaram os maiores valores de conteúdo de informação polimórfica (PIC) foram VVS2 (0,92), VVMD27 (0,918) e VrZAG62 (0,918). Já os que apresentaram os menores valores foram o VVMD25 (0,832) e o VrZAG79 (0,845). Considerando os 7 *loci* analisados, a probabilidade de identidade atingiu um valor relativamente baixo ($1,27 \times 10^{-12}$), demonstrando uma grande eficiência dos *loci* utilizados para a diferenciação das variedades. A análise agrupou corretamente a maioria das variedades de acordo com o *pedigree*. Na análise das coordenadas principais, o grupo formado pelas 4 variedades copa americanas apresentou o maior nível de estruturação. Apesar de não ter ocorrido uma clara estruturação em relação aos grupos das viníferas e dos porta-enxertos, foi possível notar uma tendência de agrupamento das variedades pertencentes ao mesmo grupo. Em relação ao estudo das viroses, foram analisadas plantas matrizes de seis variedades copa, ('Syrah', 'Chardonnay', 'Cabernet Sauvignon', 'Merlot', 'Bordô' e 'Niágara Rosada'), quatro variedades de porta-enxertos ('Traviú', '1103 Paulsen', 'IAC 572' e 'IAC 766') e 9 combinações de mudas enxertadas produzidas a partir das plantas matrizes. Foram também analisados 12 clones da variedade 'Bordô' pertencentes a um programa de seleção clonal desenvolvido na EPAMIG. As plantas foram testadas para os seguintes vírus: GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-6, GVA, GFkV e GFLV. Os clones Bordô apresentaram uma alta taxa de infecção pelo GLRaV-2, que foi detectado em 91,66 % das amostras avaliadas. O GLRaV-1 foi detectado nos clones 3 e 17 e o GLRaV-3 nos clones 3 e 7. Analisando plantas matrizes e as mudas produzidas a partir delas, apenas o GLRaV-3 foi detectado, estando presente nas matrizes de Niágara Rosada, nos porta-enxertos IAC 572 e IAC 766, e nas mudas Niágara Rosada/IAC 766 e Niágara Rosada/IAC 572. A análise da variação da carga viral ao longo do ciclo vegetativo evidenciou um aumento da concentração de partículas virais ao longo do ciclo vegetativo da videira para os 3 vírus analisados (GLRaV-1, GLRaV-2 e GLRaV-3).

ABSTRACT

SANT'ANA, Gustavo César, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, June 2010. **Serological and molecular techniques in genetic and phytosanitary evaluation of grapevine plants.** Adviser: Aluizio Borém de Oliveira. Co-advisers: Geraldo Magela de Almeida Cançado and Eveline Teixeira Caixeta.

The grapevine is a perennial fruit of greater economic importance worldwide. Although not among the world's largest producer, Brazil has been showing a growing development in the industry, and production area has increased markedly with the renovation of the vineyards and new plantings. For the deployment and renewal of vineyards wine growers in Brazil have faced serious problems related to lack of plantlets with the genetic and phytosanitary quality tested by national specialised companies. Thus, the lack of a private or official certification program of plants, in order to prevent the spread of propagation material of dubious genetic and sanitary quality, has hindered the development of the national viticulture. The aim of this work was (I) the genetic characterization (DNA fingerprinting) and the analysis of the genetic diversity of 27 grape varieties cultivated in Minas Gerais, Brazil, using SSR molecular markers; and (II) to identify and map the occurrence of viruses in the grapevine Core collection of EPAMIG Grape and Wine, which are used for production of grafted plants, and analyzing the evolution of viral titer of infected plants along the grape phenological cycle by means of DAS-ELISA serological method. Among the 27 cultivars analyzed, 26 different SSR profiles were detected. In this work were identified 101 alleles in 7 *loci* analyzed with average of 14.43 alleles per *locus*, confirming the high power of these markers for genetic polymorphism detection. The expected heterozygosity ranged from 0.832 to 0.9205 with average 0.8873 while the observed heterozygosity ranged from 0.7692 to 1.000 with average of 0.8943. The high number of heterozygous individuals might be due the breeding selection followed by genotype maintenance through vegetative propagation. Grapes are known to be very sensitive to inbreeding depression and the higher performance is mainly observed in heterozygous individuals. The *loci* with highest polymorphisms content (PIC) were VVS2 (0.92), VVMD27 (0.918) and VrZAG62 (0.918) while the *loci* with lowest values of PIC were

VVMD25 (0.832) and VrZAG79 (0.845). Considering the 7 *loci* analyzed the PI accumulation was very low (1.27×10^{-12}) indicating the high efficiency of these *loci* for grapevine genotypes differentiation. The dendrogram showed four main groups and they were in agreement with the genetic similarity (pedigree) of these varieties. In the principal coordinate analysis, the group formed for 4 Americans varieties showed the highest level of genetic structuration. Despite no clear division was observed between vinifers and rootstocks groups during the structuration, the results indicates a tendency of clustering among the varieties belonging to the same group. Regarding the study of viruses plants of six canopy varieties ('Syrah', 'Chardonnay', 'Cabernet Sauvignon', 'Merlot', 'Bordo' and 'Niagara Rosada'), four rootstock varieties ('Traviú', '1103 Paulsen', 'IAC 572' and 'IAC 766') and nine combinations of seedlings produced from grafted plants. Twelve 'Bordo' clones belonging to a clonal selection breeding program based of EPAMIG were also analyzed. The plants were tested for the following viruses: GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-6, GVA, GFkV and GFLV. 'Bordo' clones had a high rate of infection with GLRaV-2, which was detected in 91.66% of samples. The GLRaV-1 were detected in two clones (3 and 17), whereas the GLRaV-3 were also detected in two clones (3 and 07). Analyzing mother plants and seedlings produced from them, from a set of 7 seven virus studied, only GLRaV-3 was detected, being present in 'Niagara Rosada' mother plants and in two rootstocks ('IAC 572' and 'IAC 766'). The variation in viral titer along the phenological cycle showed an increase in the concentration of viral particles of the three viruses analyzed (GLRaV-1, GLRaV-2, and GLRaV-3).

INTRODUÇÃO GERAL

1. A videira e a viticultura no Brasil

A videira é a frutífera perene de maior importância econômica a nível mundial. Em 2008 a superfície mundial ocupada pelo cultivo da videira foi de 7.871.000 ha (Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2009). O Brasil é o 9º colocado entre os países maiores produtores de uvas de mesa e o 27º em produção de vinhos (Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2009). Apesar de não figurar entre os maiores produtores mundiais, o Brasil vem apresentando um crescente desenvolvimento no setor, sendo que a produção de uvas sofreu um acréscimo de aproximadamente 48,4% nos últimos 10 anos. A atividade é desenvolvida desde as regiões frias e subtropicais do sul, tradicionalmente produtora de uvas para elaboração de vinhos finos e de mesa, até as regiões tropicais secas do nordeste, irrigadas para a produção de uvas de mesa e, recentemente, também para a produção de vinhos finos. No país vêm ocorrendo rápidas transformações no setor, principalmente devido ao aumento do consumo de vinhos finos derivados de variedades nobres de *Vitis vinifera*. A área de produção tem aumentado acentuadamente com a renovação dos vinhedos e novos plantios (SILVA, 2002). Os principais estados produtores são o Rio Grande do Sul (705.228t), São Paulo (193.023 t), Pernambuco (156.685 t) e Bahia (120.629 t) (AGRIANUAL, 2009). Atualmente a uva está entre as principais frutas exportadas pelo Brasil, gerando cerca de 169,7 milhões de dólares para a balança comercial brasileira em 2008 (IBRAF, 2009).

Para a implantação e renovação dos vinhedos, os viticultores brasileiros têm enfrentado sérios problemas relacionados à falta de mudas com qualidade genética e fitossanitária testadas por empresas nacionais especializadas (SILVA, 2002). Isso levou o setor vitivinícola a optar pela crescente importação de mudas, principalmente da França, Itália e África do Sul. Entretanto, a importação de mudas gera graves problemas tais como: não concordância das estações do ano no Brasil em relação aos países de origem das mudas, gerando a necessidade de armazenamento em câmaras frias, o que pode ser desfavorável para o seu crescimento e vigor; outro

problema está relacionado à introdução de patógenos e a adaptação de porta-enxertos europeus aos solos brasileiros, tipicamente ácidos ou álicos; por fim, um terceiro problema diz respeito ao elevado custo das mudas importadas, que dificulta sua aquisição pela maioria dos produtores (SILVA, 2002). Assim, a inexistência de um sistema oficial ou privado de certificação de mudas, com a finalidade de impedir a difusão de material propagativo de qualidade genética e fitossanitária duvidosas, dificulta o desenvolvimento da viticultura nacional. A Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), na Fazenda Experimental de Caldas, produz e fornece aos produtores, mudas enxertadas de várias cultivares de videira (Figura 1), com qualidade genética e fitossanitária testadas pelas técnicas abordadas nessa tese.

2. Importância da identificação varietal

Uma questão crucial para a produção de mudas com qualidade genética é a identificação acurada das variedades a serem produzidas. A videira tem sido cultivada a cerca de 5.000 anos (Zohary e Hopf 2000) e a prática da propagação vegetativa favoreceu a dispersão de muitas variedades para diversas regiões do mundo (Dion 1977; Fregoni 1991). Como consequência, algumas variedades possuem atualmente mais de 100 sinônimos (diferentes nomes para a mesma variedade), e vários homônimos (diferentes variedades com o mesmo nome) (Borrego et al., 2002; <http://www.genres.de/idb/vitis/>). A presença de sinônimos, homônimos e variedades sem nomes são problemas significativos nas coleções de videira existentes no mundo (Dettweiler et al., 2000). Deste modo, a identificação acurada dos acessos é um requisito básico para o correto manejo e uso racional do germoplasma de videira.

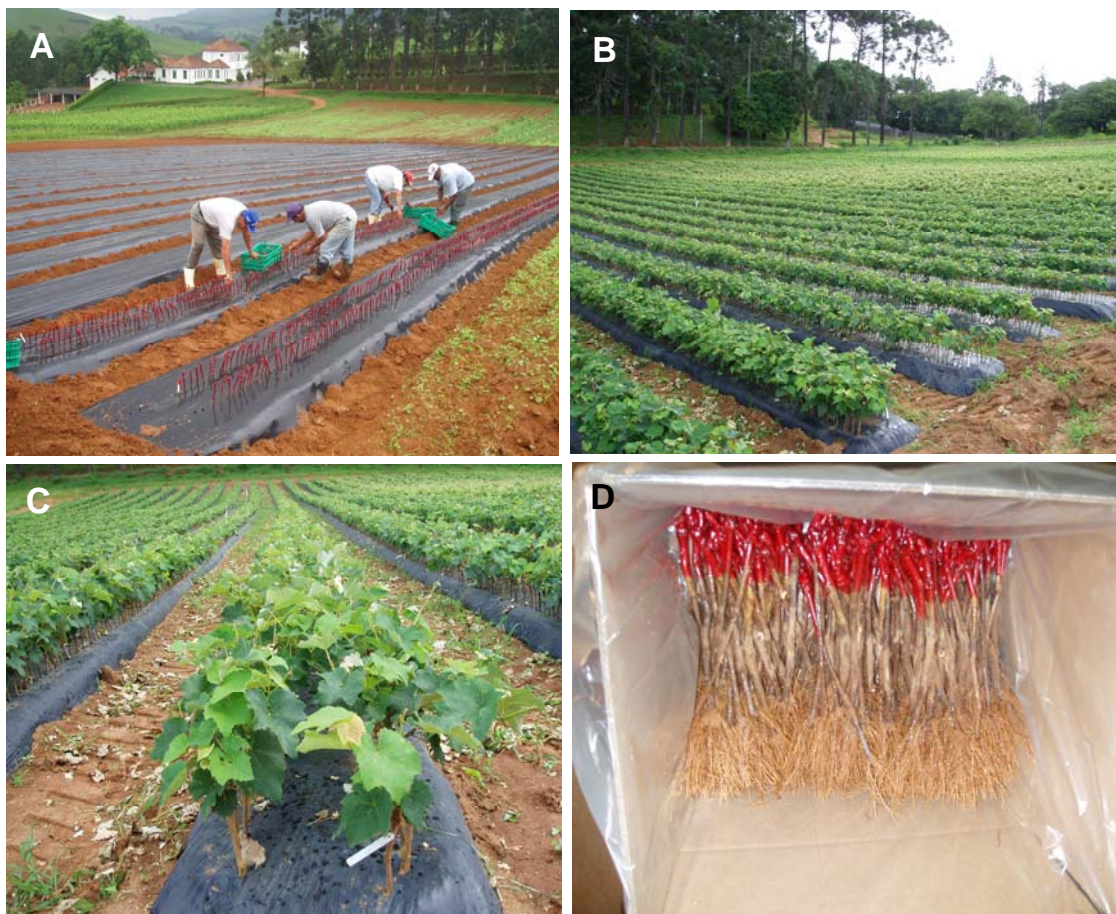


Figura – 1: Produção de mudas enxertadas de videira da EPAMIG. (A) Plantio de estacas enxertadas nos canteiros; (B) Campo de produção de mudas em estágio pré-colheita; (C) Detalhe das mudas com sucesso no pegamento do enxerto; e (D) Mudanças colhidas, aparadas, protegidas por cera de enxertia e embaladas para transporte. Fotos: Núcleo Tecnológico Epamig Uva e Vinho, Fazenda Experimental de Caldas, Caldas – MG (2009).

A identificação e a caracterização das variedades de videira são também de considerável interesse para os viveiristas, agricultores, empresas vinícolas e gestores dos bancos de germoplasma, pois a qualidade e a quantidade da produção são determinadas pela variedade cultivada (Asensio et al., 2002). Algumas variedades são mais demandadas devido a suas qualidades intrínsecas tais como, resistência a alguma doença ou produto de maior aceitação pelo mercado consumidor. Além disso, a caracterização de variedades, linhagens ou híbridos tem sido de grande importância na proteção do direito intelectual, sendo utilizada como prova legal em processos jurídicos nos países em que já vigoram as leis de proteção de cultivares. No caso específico do germoplasma brasileiro de videira, a falta de conhecimento sobre a diversidade genética existente tem constituído um entrave à utilização e integração de outras formas de conservação de germoplasma (por exemplo, *in vitro*), além de dificultar a produção e o gerenciamento das informações demandadas pelos usuários.

O gênero *Vitis* é muito diverso, compreendendo de 40 a 60 espécies na Ásia, cerca de 34 na América do Norte e uma única espécie na Europa, a *Vitis vinifera*, que é, a espécie mais cultivada atualmente. As outras espécies do gênero *Vitis*, com exceção da *Vitis labrusca* que é utilizada para produção de sucos e vinhos populares, são geralmente utilizadas como porta-enxertos e fontes de resistência contra doenças fúngicas no melhoramento desta cultura. Estima-se que existam cerca de 6.000 variedades de *V. vinifera*, das quais menos de 400 são de importância comercial (Alleweldt e Dettweiler, 1994). A maioria dos recursos genéticos de *Vitis vinifera* é mantida em coleções de germoplasma (Galet, 2000), embora espécies selvagens ainda sejam encontradas e coletadas em centros de diversidade ou em regiões tradicionais de cultivo. O estudo da diversidade genética das coleções de germoplasma de videira pode facilitar a classificação correta dos acessos, a seleção de amostras representativas que capturem a diversidade genética da coleção, a detecção de padrões de diferenciação em toda a coleção e direcionar programas de melhoramento para obter melhores combinações de alelos de importância agrônômica.

A identificação de variedades de videira é tradicionalmente realizada por meio da ampelografia, que se baseia na análise e comparação de

caracteres morfológicos de folhas, caules, cachos e frutos (Galet 1991; Boursiquot e This 1996; IPGRI UPOV OIV 1997; Galet 2000). Entretanto, o número de especialistas em ampelografia é cada vez menor e existe uma série de restrições em relação a este método de identificação. Uma vez que as características levadas em consideração na ampelografia são observadas principalmente na morfologia de folhas completamente expandidas, este método possui a limitação de ser aplicado apenas durante o período vegetativo em que as plantas apresentam folhas completamente desenvolvidas. Entretanto, o material vegetal utilizado para a propagação da videira é obtido na forma de estacas lenhosas, colhidas durante a fase de dormência da planta (folhas senescentes ou ausência de folhas), o que torna a identificação varietal do material propagativo baseada em caracteres morfológicos imprecisa ou mesmo impossível. Assim, se ocorrerem erros na identificação, este fato só poderá ser verificado após o completo desenvolvimento da planta ou durante a fase de produção, cerca de dois anos após o plantio. Além disso, os fenótipos das plantas são altamente influenciados pelas condições ambientais e pelo estado nutricional e sanitário das mesmas. Portanto, diferenças ambientais podem causar variações nas características morfológicas que são consideradas na ampelografia. Conseqüentemente, clones de uma mesma variedade podem diferir consideravelmente em termos de fenótipo (Franks et al., 2002; Riaz et al., 2002).

Outro problema é que o número total de cultivares de videira presentes em coleções ampelográficas em todo mundo é superior a 15.000, e o número de cultivares utilizados atualmente também é muito grande. Por isso, mesmo que as plantas estejam em excelentes condições, é extremamente difícil diferenciar todas as variedades com base em caracteres morfológicos (Sefc et al., 2002; Aradhya et al., 2003).

3. Utilização de marcadores moleculares em videira

Para superar as limitações da ampelografia, diversos tipos de marcadores moleculares foram desenvolvidos para analisar, caracterizar e identificar variedades de videira (This et al., 2004). A partir da década de 1960, métodos baseados na detecção de polimorfismos genético através do

padrão eletroforético de isoenzimas foram utilizados em análises de diversidade genética, uma vez que tais enzimas são codificadas por diferentes alelos em um ou mais locos gênicos. Entretanto, a expressão das enzimas pode ser muito influenciada pelas condições ambientais e pelo estágio de desenvolvimento das plantas. Sendo assim, apenas sistemas enzimáticos que não apresentavam variações em diferentes condições podiam ser utilizados como marcadores adequados, o que reduzia o número de marcadores disponíveis e, conseqüentemente, restringia o grau de polimorfismo possível de ser obtido através da análise de isoenzimas (Sefc et al., 2001).

Posteriormente, novas técnicas baseadas na detecção de polimorfismos nas sequências de DNA foram desenvolvidas e amplamente utilizadas com a finalidade de detecção de polimorfismos genéticos. As tecnologias de análise molecular da variabilidade do DNA permitem determinar pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente denominados “marcadores moleculares” (Borem e Caixeta, 2008). O desenvolvimento de marcadores moleculares contribuiu muito para o avanço da pesquisa genética, permitindo a detecção de polimorfismo de DNA, apresentando um padrão Mendeliano de herança que é passível de ser utilizado em diferentes áreas da genética e do melhoramento de plantas (Borem e Caixeta, 2008), tais como estudos populacionais, evolução, estruturação e análise sintênica.

Estas técnicas apresentam várias vantagens em relação às baseadas em caracteres morfológicos e em isoenzimas, tais como exclusão de influências ambientais, possibilidade de realização em qualquer estágio de desenvolvimento e utilizando qualquer tecido ou órgão da planta, além de requerer apenas pequenas quantidades de material vegetal (Hodgkin et al, 2001; Karp, 2002).

Inicialmente, a utilização de enzimas de restrição no estudo direto do DNA permitiu a análise e a comparação do comprimento de fragmentos gerados pela clivagem do material genético. Após a separação por eletroforese é realizada a detecção por hibridização na sequência homóloga com uma sonda clonada e previamente conhecida (Griffiths et al., 2000). As variações nos nucleotídeos do DNA devido à mutação de ponto, deleção,

inserção, duplicação e inversão, podem criar ou eliminar sítios de reconhecimento por enzimas de restrição, gerando fragmentos de diferentes tamanhos, portanto polimórficos, entre indivíduos da mesma espécie (Lander et al., 1989). Esta técnica é denominada de RFLP (“Restriction Fragment Length Polimorphism” ou Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição) e foi desenvolvida por Botstein et al (1980). A grande vantagem dos marcadores RFLP é a sua ampla distribuição no genoma, permitindo uma cobertura adequada e proporcionando a construção de densos mapas genéticos de ligação, que possibilitam a realização de análises genéticas e moleculares e várias aplicações no melhoramento de plantas, como clonagem posicional de genes e mapeamento de QTLs (“*Quantitative Trait Loci*” ou Locos Controladores de Características Quantitativas), além de ter expressão co-dominante (Nodari et al., 1993). Os marcadores RFLP foram também utilizados para diferenciar, caracterizar e identificar os acessos de videira (Striem et al., 1990; Bourquin et al., 1993; Bowers e Meredith, 1996). Entretanto, o elevado custo, a necessidade de instalações apropriadas ao manuseio e descarte de material radioativo e o tempo necessário na geração destes marcadores restringem seu uso como metodologia de rotina (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Outra desvantagem é a quantidade relativamente elevada de DNA necessária para esse tipo de análise, que varia entre 20 a 40 µg, o que pode ser um limitante dependendo do organismo e tecido utilizados.

Posteriormente, com o desenvolvimento da técnica conhecida como PCR (“Polymerase Chain Reaction” ou Reação em Cadeia da Polimerase) descrita por Kary Mullis (Prêmio Nobel em 1993) em 1987, surgiram novos tipos de marcadores moleculares baseados na amplificação do DNA. A partir de então, a PCR vem sendo amplamente utilizada em diversas áreas da biologia, tanto em pesquisa básica como na aplicada (Saiki et al., 1988). As vantagens dessa técnica são muitas, das quais vale destacar a pequena quantidade de DNA necessária para executar a reação, que é da ordem de nanogramas. Com o advento da PCR, estudos de evolução molecular, diferenciação de grupos taxonômicos, identificação de genes específicos, entre outros, se tornaram mais fáceis e acessíveis (Borem e Caixeta, 2008).

Utilizando a PCR como sistema básico de análise, novas técnicas de genética molecular foram desenvolvidas.

O primeiro tipo de marcador molecular baseado em PCR utilizado foi o RAPD (“Randomly Amplified Polymorphic DNA” ou Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso, Williams et al., 1990). É uma técnica de fácil e rápida execução além de apresentar custo relativamente baixo e permitir a detecção de polimorfismos genéticos entre organismos. Outra grande vantagem é que não necessita de conhecimento prévio da sequência do genoma do organismo estudado, visto que os iniciadores (“primers”) são arbitrários. O princípio desta técnica se baseia na amplificação via PCR de sequências de DNA utilizando-se como oligonucleotídeos iniciadores, sequências com composição aleatória de 10 nucleotídeos. A reação de amplificação ocorre em condições de baixa estringência, possibilitando a ocorrência de pareamento entre os oligonucleotídeos iniciadores e o DNA alvo, mesmo que não haja uma total complementaridade de bases entre as duas sequências, embora o terminal 3’ precise formar pareamento com a fita molde de DNA para que seja reconhecido pela enzima Taq DNA polimerase. Na reação de amplificação, quando os oligonucleotídeos iniciadores são submetidos a condições apropriadas de temperatura (37 a 42 °C) eles hibridizam com sequências genômicas complementares levando à amplificação da região alvo (Karp, 2002). Para que ocorra a amplificação de um fragmento RAPD, é necessário que existam no genoma dois sítios complementares ao iniciador, posicionados em direções opostas e separados entre si por no máximo 4.000 pares de base. Como os iniciadores RAPD possuem sequências aleatórias, eles podem parear com várias regiões complementares a sua sequência e por isso revelar diversos *loci* num mesmo genoma (Karp, 2002). Cada iniciador utilizado promove a síntese simultânea de diversos fragmentos de DNA em vários pontos do genoma. Polimorfismos ao nível de DNA são detectados pela presença ou ausência de um determinado fragmento amplificado que produzem um padrão de bandas específico conhecido como impressão digital genômica (“DNA fingerprint”). Os “fingerprints” permitem distinguir diferentes espécies e até mesmo indivíduos de populações distintas da mesma espécie.

O fato desse tipo de marcador ser dominante (não diferencia indivíduos heterozigotos de indivíduos homozigotos dominantes) impossibilita que análises de relações de parentesco entre organismos diplóides sejam realizadas a partir do cálculo das frequências alélicas. Os dados gerados são de natureza binária e, portanto, requerem tratamentos estatísticos apropriados, em que são geradas matrizes binárias utilizadas para se calcular coeficientes de parentesco. As principais vantagens dos marcadores RAPD em relação a outros tipos de marcadores moleculares são a simplicidade e facilidade de execução, rapidez na obtenção dos dados e possibilidade de se mapear genomas sem a necessidade de se ter qualquer conhecimento prévio em termos de sequência para se desenhar iniciadores específicos e a necessidade de pequenas quantidades de DNA. Por outro lado eles apresentam algumas limitações como baixa reprodutibilidade em diferentes ambientes laboratoriais, baixo conteúdo informativo por *locus* e, devido a sua natureza dominante, não permite a distinção entre indivíduos homozigotos e heterozigotos (Borem e Caixeta, 2008).

Em videira, os marcadores RAPD têm sido utilizados principalmente na caracterização e identificação de variedades (Defontaine, 1992; Gogorcena et al., 1993; Büscher et al., 1994; Botta et al., 1995; Grando et al., 1995, 1996; Loureiro et al., 1998; Ye et al., 1998; Fanizza et al., 1999; Tessier et al., 1999; Pinto-Carnide et al., 2003).

Em 1993, Zabeau e Vos, desenvolveram outro tipo de marcador molecular denominado AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism” ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados). Esta técnica combina propriedades dos marcadores RFLP e RAPD: a distribuição aleatória de sítios de restrição entre genomas e a amplificação aleatória de fragmentos empregando-se iniciadores de sequências arbitrárias. Uma característica importante desta técnica é a capacidade de acessar simultaneamente muitas regiões diferentes distribuídas aleatoriamente ao longo do genoma permitindo o estudo de vários *loci* ao mesmo tempo (Mueller e Wolfenbarger, 1999). A análise de AFLP é baseada na amplificação seletiva via PCR de um subconjunto de fragmentos genômicos gerados após digestão com uma enzima de corte raro combinada com uma

enzima de corte frequente. As principais vantagens dessa tecnologia é o grande número de fragmentos que são gerados simultaneamente (elevada capacidade multiplex), aumentando o poder de detecção de variabilidade genética; a amostragem ampla e aleatória do genoma; e a não necessidade de conhecimento prévio do genoma estudado. Por esta razão, ela tem sido utilizada em estudos da diversidade genética entre indivíduos (Muluvi et al., 1999; Loh et al., 2000) e na construção de mapas genéticos e mapeamento de genes de interesse em diferentes espécies (Hart et al., 1999). As principais desvantagens desta técnica são: a complexidade no padrão de polimorfismo genético gerado, o que pode complicar a análise (embora uma etapa de pré-amplificação com adaptadores contendo uma base degenerada reduza a complexidade do perfil de bandas geradas); a semelhança do RAPD pode ter problemas de reprodutibilidade; técnica de difícil implementação e automação; custo relativamente alto comparado a outros marcadores; e é uma técnica considerada como dominante: Os dados gerados são de natureza binária (ausência ou presença), o que faz com que os AFLPs sejam marcadores dominantes e com baixo conteúdo de informação genética por *locus*. Em videira, no caso específico da identificação clonal e seleção assistida das variedades, é necessário à construção de mapas genéticos altamente saturados. Nestes casos, os AFLPs são ferramentas poderosas devido ao grande número de marcadores que podem ser gerados por indivíduo (Dalbo et al., 2000, 2001). Além disso, marcadores AFLPs têm sido utilizados para diferenciar, caracterizar e identificar acessos do gênero *Vitis* (Sensi et al., 1996; Cervera et al., 1998).

4. Marcadores Microsatélites em Videira

Recentemente os marcadores microsatélites, também conhecidos como SSR (“Simple Sequence Repeats” ou Repetições de Sequências Simples), têm se tornado o tipo de marcador molecular mais utilizado para a identificação de variedades de videira em todo o mundo (Sefc et al., 2001; Laiadi et al., 2009). Suas propriedades têm permitido, também, sua utilização em mapeamento genômico, estudo de filogenias, reconstrução de genealogias e análises de diversidade genética.

Os microssatélites foram inicialmente isolados e descritos de forma independente por três grupos de pesquisadores, como sendo pequenas sequências contendo de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em tandem (Litt e Luty, 1989; Weber e May, 1989; Tautz, 1989). Esse tipo de sequência tem sido detectado nos genomas de todos os organismos eucariotos analisados até o presente momento (Hancock, 1999). Essas sequências são frequentes e distribuídas ao acaso no genoma, apresentando tamanhos variáveis e formando *locus* genéticos altamente polimórficos.

Os marcadores moleculares SSR, que também são baseados na técnica de PCR, se caracterizam por serem codominantes, multialélicos, amplamente distribuídos pelo genoma e altamente polimórficos. O conteúdo informativo é relativamente alto, uma vez que essas sequências repetitivas apresentam altas taxas de evolução molecular. As principais causas da variação no número de repetições desses *loci* são: o deslizamento da DNA polimerase durante o processo de replicação do DNA e a ocorrência de “crossing-over” 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 microssatélites. Esses polimorfismos podem ser detectados através da amplificação das sequências microssatélite por PCR utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores com sequências complementares a regiões conservadas que flanqueiam as sequências repetitivas, e posterior eletroforese do produto da amplificação em gel de poliacrilamida ou de agarose de alta resolução. A visualização das bandas no gel pode ser realizada através de coloração com brometo de etídeo, “syber green”, nitrato de prata ou por autoradiografia após utilização de iniciadores marcados com radioisótopos ou fluorescência na reação de PCR (Borém e Caixeta, 2008).

Em videira, os marcadores SSR foram utilizados inicialmente por Thomas et al. (1993) para identificar cultivares. Estes autores demonstraram que os microssatélites eram abundantes e polimórficos o suficiente para permitir a identificação e caracterização de diferentes variedades de *Vitis vinifera* e se mantinham conservados em outras espécies de *Vitis* e *Muscadinia*. Eles também demonstraram que os microssatélites em videira,

a semelhança de outras espécies agronômicas, são codominantes e segregam de acordo com o padrão de herança mendeliano, sendo, portanto, adequados também para mapeamento genético desta espécie.

Posteriormente outros grupos de pesquisadores desenvolveram novos marcadores SSR para videira, o que levou a obtenção de diversos iniciadores específicos para *Vitis* (Browers et al., 1996, 1999; Sefc et al., 1999; Lefort et al., 2002), culminando com a formação, em 1997, do “Vitis Microsatellite Consortium” (VMC). Este consórcio é constituído por 21 grupos de pesquisa localizados em 12 países, e resultou no desenvolvimento de 333 novos marcadores SSR obtidos a partir de bibliotecas genômicas enriquecidas (Riaz et al., 2007). Recentemente foram desenvolvidos 118 novos marcadores SSR isolados a partir de bibliotecas genômicas enriquecidas para repetições (AC)_n (Di Gaspero et al., 2005). This et al. (2004) propuseram a utilização de 6 locos microssatélites como referência para a identificação de variedades de videira. Os dados obtidos por este grupo estão disponíveis na base de dados <http://www.genres.de/eccdb/vitis/>. Este conjunto de 6 *loci* é composto pelos seguintes marcadores: VVMD5, VVMD7 (Browers et al., 1996), VVMD27 (Browers et al., 1999), VrZag62, VrZag79 (Sefc et al., 1999) e VVS2 (Thomas e Scott, 1993). Estes são também recomendados pelo “Office de la Vigne et du Vin” para elaboração de uma base de dados única contendo informações sobre os alelos de todas as variedades de *Vitis*. Atualmente estão disponíveis várias bases de dados contendo informações a respeito da genotipagem de videira por marcadores microssatélites, tais como: “Grape Microsatellite Collection”, <http://www.ismaa.it/areabioav/gmc.html>; “Greek Vitis Database”, <http://www.biology.uch.gr/gvd> e “Swiss Vitis Microsatellite Database” – SVMD, www.unine.ch/nccr/svmd/.

Nos últimos 15 anos, os microssatélites têm sido aplicados à videira com as seguintes finalidades: genotipagem (Botta et al., 1995; Sefc et al., 1998; Laiadi et al., 2009); estudos de pedigree (Bowers e Meredith, 1996; Sefc et al., 1997, 2000; Crespan et al., 2001; Imazio et al., 2002; Lefort et al., 2002; Siret et al., 2002; Ortiz et al., 2004); identificação de QTLs, seleção assistida e mapeamento genético (Doligez et al., 2002; Riaz et al., 2002, 2004; Grando et al., 2003; Adam - Blondon et al., 2004; Moreira, 2005); e

identificação de sinônimos e homônimos (Boccaci et al., 2005; Constantini et al., 2005; Vouillamoz et al., 2006, Meneghetti et al., 2009).

Com relação ao último item, a utilização de microssatélites pode auxiliar na confirmação e definição de sinônimos, ou seja, podem identificar genótipos iguais conhecidos por diferentes nomes. Por exemplo, no perfil dos microssatélites de uvas viníferas italianas foram encontrados sinônimos entre as variedades 'Refosco di faedis' e 'Refoscone' (Cipriani et al., 1994), assim como entre as variedades 'Favorita', 'Pigato' e 'Vermentino' (Botta et al., 1995). Na parte Oriental-Sul da Áustria, uma variedade denominada de 'Morillon' foi considerada um sinônimo da 'Chardonnay', pois o perfil dos microssatélites das duas variedades mostrou-se idêntico (Sefc et al., 1998). Thomas et al. (1994), estudando os porta-enxertos '5A Teleki' e 'Kober 5BB' demonstraram que eles possuem o mesmo perfil de DNA, indicando que os dois diferentes nomes foram equivocadamente dados ao mesmo porta-enxerto no passado. Martin et al. (2006) analisando 56 variedades tradicionais da Espanha e Portugal, concluíram que a variedade 'Tinta Roriz' de Portugal é um sinônimo da 'Tempranillo' da Espanha. Os casos acima exemplificam bem o potencial prático do uso de marcadores microssatélites em programas de certificação genética de mudas de videira.

No caso de estudos de pedigree, um resultado interessante foi a descoberta da origem da variedade 'Cabernet Sauvignon' através dos marcadores microssatélites (Bowers e Meredith, 1997; Sefc et al., 1997). Neste estudo os autores constataram que 'Cabernet Sauvignon' teria sido originado a partir do cruzamento entre 'Cabernet Franc' e 'Sauvignon Blanc'.

No exame da variedade conhecida como 'Petit Syrah' na Califórnia, foi demonstrado que a maioria dos acessos com este nome é idêntico ao da variedade 'Durif' (Meredith et al., 1999). Estudos com microssatélites em 25 *loci* confirmaram e identificaram a variedade 'Syrah' como um provável parente da variedade 'Durif'. Boccaci et al. (2005) analisando 8 *loci* microssatélites identificou graus de parentesco entre as variedades 'Fortana' e 'Lambrusco Maestri' e entre 'Uva Tosca' e 'Lambrusco Montericco'.

Os marcadores SSR têm se mostrado como uma técnica muito eficiente para auxiliar no manejo racional de coleções e bancos de germoplasma, possibilitando o "fingerprinting", caracterização molecular de

genótipos e análises de similaridade genética em diversos países como Portugal (Lopes et al., 2006; Almadanim et al., 2007), Espanha (Ibáñez et al., 2003; Martin et al., 2006; Fernández–González et al., 2007), Itália (Constantini et al., 2005), Áustria (Sefc et al., 1998), Irã (Fatahi et al., 2003; Ramesani et al., 2009), Bulgária (Dzhambazova et al., 2009), Hungria (Galbács et al., 2009), Índia (Upadhyay et al., 2007), Estados Unidos (Lamboy e Alpha, 1998, Dangl et al., 2001), Peru e Argentina (Martinez et al., 2006), Chile (Narváez et al., 2001) e mais recentemente, no Brasil (Leão et al., 2009).

A diferenciação e a estrutura genética entre videiras de 7 diferentes regiões de cultivo na Europa foram analisadas utilizando-se 9 *loci* SSR e permitiu a detecção de altos níveis de variabilidade genética entre os conjuntos gênicos de todas as regiões, mesmo no caso de regiões vizinhas com Portugal e Espanha. Esses dados sugerem a possibilidade de se conhecer a população que deu origem aos cultivares com “backgrounds” genéticos desconhecidos a partir de informações sobre seus genótipos (Sefc et al., 2000).

Outro estudo desenvolvido por Aradhya et al. (2003), utilizando 8 *loci* SSR, permitiu o agrupamento de 222 acessos de *Vitis vinifera* e 22 acessos silvestres em 16 subgrupos dentro de três grupos de acordo com a origem geográfica (*occidentalis*, *pontica* e *orientalis*), possibilitando ainda uma certa diferenciação entre uvas viníferas e de mesa, além de demonstrar que os tipos moscatéis constituem um grupo distinto dentro das viníferas.

5. As viroses da videira

Outra questão essencial para a produção de mudas de videira com qualidade é a necessidade de se utilizar plantas comprovadamente livres de viroses. No Brasil, a inexistência de um sistema oficial de controle e certificação da qualidade de mudas tem favorecido a transmissão de diversas doenças, principalmente viroses, através de materiais vegetativos contaminados (Kuhn, 1989; Silva et al., 2002). As viroses representam um dos mais importantes problemas fitossanitários da viticultura mundial. Em geral essas doenças se caracterizam por induzir a lenta e gradual

degenerescência da planta, causando constantes perdas na produção, podendo levar a perdas totais em variedades sensíveis (Amorim e Kuniyuki, 1997; Moreira et al., 2004).

No Brasil, as práticas culturais e a importação de novos materiais propagativos têm favorecido a ocorrência viroses, gerando prejuízos significativos à produção de uvas no país. Portanto, é de grande importância o conhecimento a respeito dos principais vírus associados a esta cultura que ocorrem em cada região do país, e isso exige o desenvolvimento e utilização de métodos apropriados para realizar a detecção de cada tipo de vírus. Por não produzirem sintomas perceptíveis em muitas variedades de videira, eles podem ser propagados indefinidamente, se perpetuando e ocasionando altas taxas de infecção dos materiais vegetais utilizados (Fjardo et al., 2003; Martelli e Boudon-Padieu, 2006). Embora alguns vírus não promovam o aparecimento de sintomas visíveis de fácil reconhecimento, os mesmos, dependendo da intensidade de carga viral, afetam o metabolismo celular das plantas infectadas provocando maior susceptibilidade a outros estresses bióticos e abióticos, além de atraso de ciclo, aborto de inflorescências e baixa produção. A ação sinérgica de diferentes vírus na mesma planta, conhecida como complexo virial, também é bastante deletéria ao metabolismo da planta.

Por ser propagada vegetativamente, a videira favorece a disseminação dos vírus, o que leva ao aparecimento de doenças complexas, causadas pelo acúmulo de diferentes vírus em uma mesma planta. Muitas dessas doenças já foram identificadas e caracterizadas enquanto outras ainda necessitam de estudos complementares para definir sua natureza etiológica. Enquanto algumas ocorrem de forma ocasional na videira, outras causam prejuízos econômicos importantes, e estão restritas a determinadas regiões ou países, provavelmente favorecidas por características regionais como o plantio de cultivares sensíveis ou devido a condições edafoclimáticas que sejam favoráveis a ocorrência de vetores (Fajardo et al., 2003; Martelli e Boudon-Padieu, 2006).

Nas principais regiões vitícolas do Brasil, onde os vinhedos foram formados utilizando-se materiais propagativos introduzidos há muitos anos, principalmente a partir do continente europeu, a ocorrência de viroses é

comum. Na época em que esses materiais foram introduzidos no país, pouca ou nenhuma seleção sanitária era realizada, o que facilitava a distribuição de material infectado entre regiões e países, especialmente os porta-enxertos, nos quais a infecção viral geralmente é latente (Fajardo et al., 2003). A disseminação é facilitada, em grande parte, no momento da aquisição de porta-enxertos pelos produtores, devido ao fato do material vegetativo ser originados de vinhedos mais antigos da própria região ou introduzidos de outras regiões.

A videira é a espécie lenhosa que apresenta o maior número de viroses (Walter e Martelli, 1997). Até então foram relatados 53 vírus (Tabela-1) e cinco doenças cujos agentes etiológicos são suspeitos de serem vírus (Martelli e Boudon-Padieu, 2006). No Brasil foram relatados até o momento 10 vírus da videira: GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-5, GLRaV-6, GVA, GVB, RSPaV, GFkV e GFLV. Entre os vírus que afetam a videira destacam-se os pertencentes das famílias *Closteroviridae*, *Comoviridae* e *Tymoviridae* (Martelli e Boudon-Padieu, 2006).

Tabela 1- Taxonomia dos vírus conhecidos de videira (Martelli, 2003).

<i>Família</i>	<i>Gênero</i>	Número de viroses
Comoviridae	<i>Nepovirus</i>	16
	<i>Fabavirus</i>	1
Bromoviridae	<i>Alfavirus</i>	1
	<i>Cucumovirus</i>	1
	<i>Ilarvirus</i>	2
Tombusviridae	<i>Tombusvirus</i>	2
	<i>Carmovirus</i>	1
Closteroviridae	<i>Closterovirus</i>	2
	<i>Ampelovirus</i>	7
	Gênero ainda não definido	1
Tymoviridae	Gênero ainda não definido	2
	<i>Marafivirus</i>	2
Bunyaviridae	<i>Tospovirus</i>	1
Família não definida	<i>Sobemoviru</i>	1
Família não definida	<i>Necrovirus</i>	1
Família não definida	<i>Potexvirus</i>	1
Família não definida	<i>Foveavirus</i>	1
Família não definida	<i>Tobamovirus</i>	2
Família não definida	<i>Vitivirus</i>	4
Família não definida	<i>Trichovirus</i>	1
Família não definida	<i>Idaeovirus</i>	1

6. “Gapevine leafroll Associated Virus”

O enrolamento da folha da videira é atribuído a nove espécies de “Gapevine leafroll Associated Virus” (GLRaV-1 a 9), sorologicamente distintas e pertencentes a família *Closteroviridae*, as quais individualmente ou em mistura, estão associadas com a manifestação dos sintomas da doença. A família *Closteroviridae* é constituída por vírus de plantas que são constituídos de partículas filamentosas, possuem genoma composto de RNA fita simples, e apresentam transmissão semi-persistente por insetos. Essa família é constituída por três gêneros: *Closterovirus*, *Ampelovirus* e *Crinivirus*, que possuem como vetores afídeos, cochonilhas e moscas-brancas respectivamente. Do gênero *Crinivirus* não há relato de plantas de videira infectadas por esses vetores (Karasev, 2000 ; Martelli et al., 2002).

Exceto GLRaV-2, que pertence ao gênero *Closterovirus*, todas as demais espécies estão incluídas no gênero *Ampelovirus* (Karasev, 2000; Martelli et al., 2002; Fauquet et al., 2005). As espécies de vírus que causam o enrolamento das folhas podem infectar muitas das variedades de videira e são restritas ao gênero *Vitis*. Os *Ampelovirus* são constituídos de partículas alongadas e flexuosas com 1.400 a 2.200 nm e possuem genoma monopartido composto por RNA fita simples de 16,9 a 19,5 Kb e peso molecular das subunidades da proteína capsidial de 25 a 39 KDa (Martelli et al., 2002; Prosser et al., 2007; Alrwahnih et al., 2008).

O único representante do gênero *Colteroviridae* capaz de infectar a videira é o GLRaV-2 (Karasev, 2000 ; Martelli et al., 2002). A organização genômica do GLRaV-2 é muito semelhante a de outro *Closterovirus*, o “Beet yeallows virus”, espécie tipo deste gênero e similar ao vírus da tristeza em citros. Tal similaridade foi confirmada por meio da análise de proteínas geneticamente relevantes, o que permitiu classificar com segurança o GLRaV-2 como pertencente ao gênero *Closterovirus* (Abor-Ghanem et al., 1998).

No Brasil, a ocorrência dos vírus GLRaV-1, GLRaV-2 e GLRaV-3 já foi observada no Rio Grande do Sul (Kuhn et al., 1998), em São Paulo (Kuniyuki et al., 2002) e em Minas Gerais (identificados neste trabalho), e existem indícios de que o GLRaV-3 seja o de ocorrência mais frequente nos vinhedos brasileiros (Kuniyuki et al., 2005). Em São Paulo foi também

detectado o GLRaV-5 (Kuniyuki et al., 2008). O GLRaV-6 foi detectado por Kuniyuki et al (2003) em amostras de plantas cultivadas em quatro estados brasileiros (SP, PE, MG e RS). Este vírus foi detectado com baixa incidência, com exceção nas cultivares 'Cardinal' (100 %) e 'Red Glob' (42,8 %). Embora o número de amostras analisadas não tenha sido muito alto, os dados obtidos indicam que este vírus se apresenta geograficamente bem distribuído, ocorrendo em todas as regiões onde estas duas cultivares estão presentes. Devido à insuficiência de instituições ou empresas capacitadas para realizar a detecção de viroses de videira no Brasil, assim como de outras espécies agrônômicas, acredita-se que o quadro atual de disseminação destas viroses seja subestimado para todas as regiões que cultivam a videira no Brasil.

Os sintomas causados pela virose do enrolamento das folhas variam de acordo com as condições climáticas, época do ano, espécie e estirpe do vírus, estágio fenológico da planta e com a variedade de videira infectada. Podem ser facilmente reconhecidos em cultivares sensíveis, principalmente no final do ciclo vegetativo, antes da queda das folhas, pelo enrolamento das bordas das folhas para baixo (encarquilhamento), o que pode ser observado nas variedades tintas e brancas de *Vitis vinifera*. No entanto, casos de infecção em que as bordas das folhas não se enrolam também ocorrem (Kuhn, 1989; Martelli e Boudon-Padieu, 2006). Estes sintomas aparecem inicialmente nas folhas da base dos ramos evoluindo gradualmente para as demais folhas, podendo levar ao definhamento completo da planta. Nas variedades tintas as folhas adquirem uma coloração avermelhada sendo que as nervuras permanecem verdes (Figura 2). Nas plantas muito afetadas, observa-se a maturação irregular e atrasada dos cachos e das bagas. Um agravante para a disseminação das viroses é o fato de que as variedades de videira americanas (*V. labrusca*), algumas híbridas e nos porta-enxertos não apresentarem os sintomas visuais característicos das viroses, sendo a infecção considerada como latente (Fajardo et al., 2003). No entanto, o dano causado pela infecção por vírus no metabolismo celular das plantas ocorre muito antes que qualquer sintomatologia possa ser detectada visualmente. Por isso é essencial o emprego de materiais vegetativos isentos de viroses.

A transmissão dos GLRaV-1 e GLRaV-3 ocorre através de cochonilhas cotonosas (*Planococcus ficu*, *P. citri*, *Pseudococcus longispinus*, *P. calceolariae*, *P. affinis*, *Heliococcus bohemicus* e *Phenacoccus aceris*) e pelas cochonilhas de carapaça (*Pulvinaria vitis* e *Parthenolecanium corni*) (Kuniyuki, 2005). Já o GLRaV-5 e o GLRaV-9 são transmitidos por *Pseudococcus longispinus*. As cochonilhas têm sido relatadas como os principais vetores dos vírus da videira (Charles et al., 2006). Os demais vírus associados ao enrolamento da folha não possuem vetores conhecidos (Martelli e Boudon-Padieu, 2006).

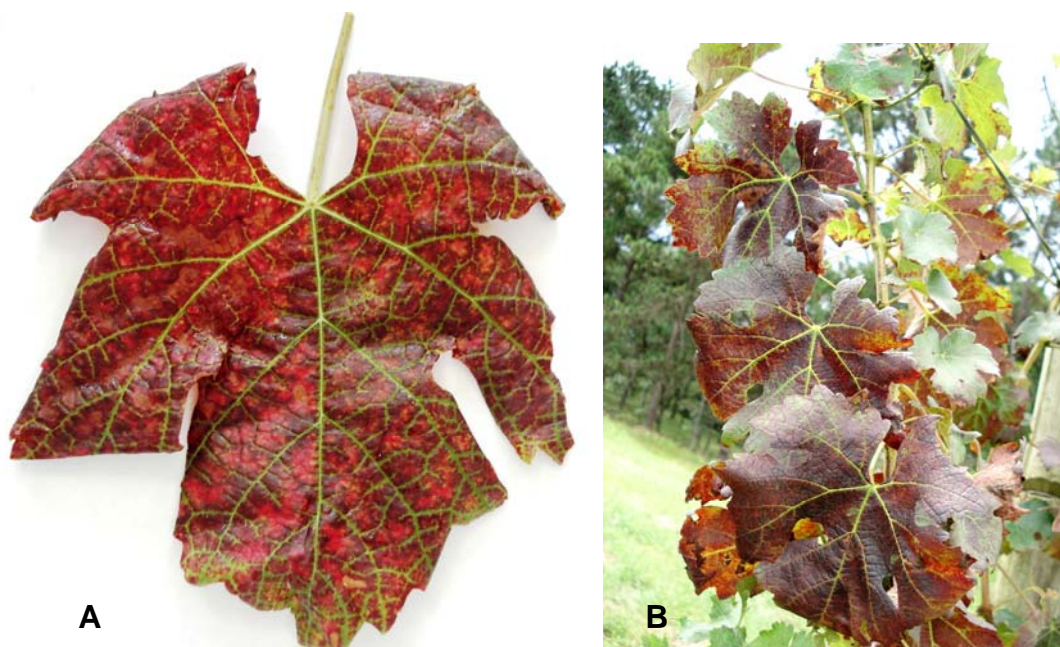


Figura -2: Folha de ‘Cabernet Sauvignon’ com sintomas severos de enrolamento da folha da videira (GLRaV-3) (A) e um ramo da mesma planta (B). (Fotos: Núcleo Tecnológico EPAMIG Uva e Vinho, Caldas – MG, 2009).

7. “Grapevine Fanleaf Virus”

O “Grapevine Fanleaf Virus” (GFLV) é outro importante vírus da videira que pertence ao gênero *nepovirus* sendo o agente etiológico da doença conhecida como degenerescência da videira (Martelli e Boudon-Padieu, 2006). São partículas poliédricas de 30 nm de diâmetro, possuem genoma bipartido de RNA fita simples, senso positivo, com uma molécula de RNA com 7.342 nucleotídeos e outra com 3.774 nucleotídeos, encapsulados separadamente, mas ambas necessárias para a infecção. A proteína

capsidial possui 54 kDa e é codificada pelo RNA 2 (Murphy et al., 1995). A incidência nas regiões vitícolas do Brasil aparentemente é pouco expressiva (Fajardo et al., 2000). Entretanto em países como Estados Unidos e em muitos países europeus a doença é considerada como uma das mais importantes em termos de prejuízos para a viticultura. O GFLV pode ser transmitido por nematóides *Xiphinema index* e *X. italiae*, que são parasitas radiculares de difícil eliminação dos solos. Em restos de raízes de plantas infectadas que permanecem no solo, esses vírus continuam viáveis durante alguns anos servindo como fonte de inóculos em áreas infestadas por nematóides. Os danos causados pela doença variam de acordo com a sensibilidade da variedade afetada e com a estirpe do vírus (Kuniyuki et al., 1994; Martelli e Savino, 1998). Os cultivares mais sensíveis, quando infectados, apresentam um declínio progressivo, com queda acentuada na produção, perda de qualidade da uva, diminuição na pega do enxerto e no enraizamento das mudas. A doença pode afetar todos os órgãos da videira, sendo que nas folhas os sintomas característicos são deformações com distribuição anormal das nervuras, ângulo do pecíolo muito aberto ou fechado, assimetria foliar com formação de dentes pontiagudos nas bordas e redução do tamanho. Além desses sintomas é também comum a ocorrência, nas folhas, de manchas translúcidas, de formas variadas, observadas principalmente na primavera. Nos ramos os sintomas se caracterizam pela presença de entrenós curtos, bifurcação, achatamentos e nós duplos, proliferação de gemas e brotação fraca e atrasada. Nos cachos notam-se bagas menores e em menor número, com atraso ou não ocorrência de maturação (Pearson e Goheen, 1998, Fajardo et al., 2000), (Figura 3).

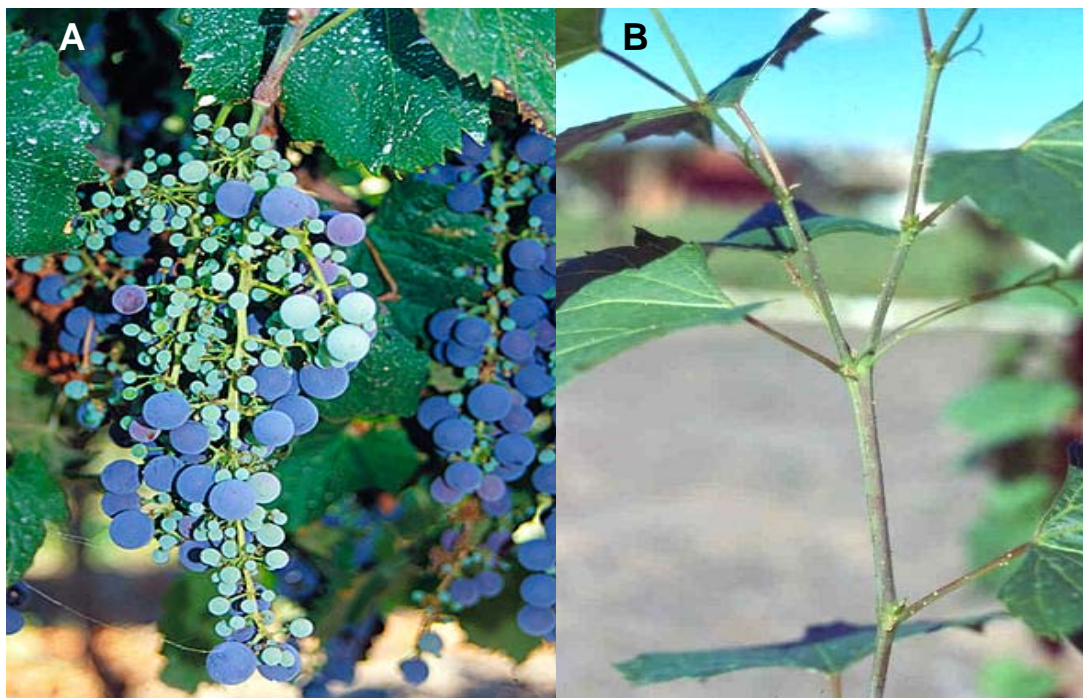


Figura - 3: Cacho de uvas com maturação irregular e atrasada (A) e bifurcação do ramo causados pela virose da degenerescência de videira. (Fotos: A - IVO-UC Davis, 2010; B – Gilmar Kuhn, EMBRAPA).

8. “Grapevine virus A”

O gênero *Vitivirus* possui três espécies que infectam a videira: “Grapevine virus A” (GVA), “Grapevine vírus B” (GVB) e “Grapevine virus D” (GVD). Recentemente Nakaune et al (2008) caracterizaram uma nova espécie de *Vitivirus* infectando videiras no Japão, denominado “Grapevine virus E” (GVE). Com base em novas informações sorológicas e moleculares, o GVC foi excluído do gênero *Vitivirus* por estar erroneamente classificado neste gênero (Masri et al., 2006).

O GVA, causador da doença conhecida com caneluras do tronco ou acanalura do lenho da videira, possui partículas alongadas com cerca de 800 nm de comprimento e genoma monopartido de RNA fita simples com aproximadamente 7.400 nucleotídeos. Sua proteína capsidial possui peso molecular de 22 kDa (Minafra e Hadidi, 1994; Minafra et al., 1994; Martelli et al., 1997; Fajardo et al., 2003). Em cultivares sensíveis, como por exemplo, o porta-enxerto ‘Kober 5BB’, podem ser observadas acanaluras sob a casca do tronco da videira na superfície do lenho, que correspondem ao local onde a casca penetra no tronco, prejudicando a formação de vasos condutores de seiva e facilitando a penetração de outros patógenos (Figura 4).

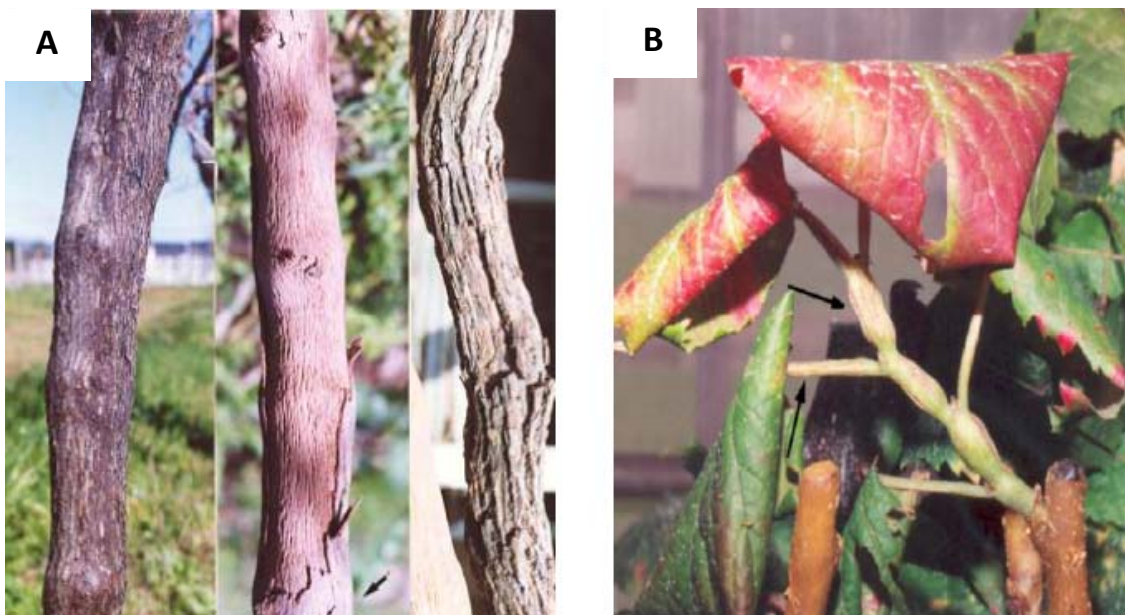


Figura 4 – Sintomas de infecção por GVA: (A) Videiras com acanaluras do lenho; e (B) Planta com intumescimento dos ramos. (Fotos: Gilmar Kuhn, EMBRAPA).

As folhas das cultivares tintas podem apresentar avermelhamento em função da má formação dos vasos condutores (Kuniyuki, 2001). A disseminação do GVA ocorre através da propagação de material infectado e a transmissão se dá através da enxertia.

9. “Grapevine fleck vírus”

O “Grapevine fleck vírus”, agente etiológico da mancha das nervuras da videira, pertence ao gênero *Muculavirus* e são limitados ao floema das plantas infectadas, não podem ser transmitidos mecanicamente e não possuem vetor conhecido, sendo transmitidos principalmente por material propagativo infectado. Possui partículas isométricas com 30 nm de diâmetro, genoma monopartido de RNA fita simples com 7.500 nucleotídeos e proteína capsidial com 28 kDa de peso molecular (Sabanadzovic et al., 1996). Os sintomas característicos da doença (Figura 5) aparecem em folhas jovens e intermediárias do porta-enxerto ‘Rupestris St. George’, como manchas translúcidas sem forma definida que acompanham as nervuras, principalmente as de 3^a e 4^a ordens. Tais manchas aparecem distribuídas em parte ou em toda lâmina foliar, podendo ocorrer em grande número ou

reduzidas a poucas manchas. É também comum a ocorrência de seio peciolar excessivamente aberto e assimetria com distorção e deformação das folhas. Plantas muito afetadas se desenvolvem menos e podem apresentar folhas com as bordas voltadas para cima. Na maioria das cultivares comerciais o vírus ocorre de forma latente (Martelli et al., 2002; Fajardo et al., 2003). O GFkV é capaz de infectar um grande número de espécies e variedades de *Vitis*, podendo ser facilmente transmitido por união de tecidos (enxertia), mas não através de sementes ou mecanicamente, além de não possuir vetor conhecido (Martelli et al., 2002).



Figura 5 – Folha de videira com mancha das nervuras causada pelo GFkV. (Foto: Gilmar Kuhn, EMBRAPA).

10. Métodos para detecção viral

No caso da videira são comuns infecções múltiplas envolvendo complexos virais, o que inviabiliza o diagnóstico baseado em sintomas observados no campo. Além disso, muitas variedades não manifestam sintomas evidentes. Por outro lado existem fatores que podem induzir sintomas semelhantes aos causados pelos vírus, como deficiência ou excesso de determinados nutrientes e ataque por outros tipos de patógenos ou pragas. Sendo assim, a utilização de técnicas apropriadas para diagnóstico de viroses em videira é de extrema importância para garantir a segurança fitossanitária de materiais propagativos. As técnicas mais

utilizadas para a identificação de viroses em videira são os testes biológicos, sorológicos e os moleculares.

No teste biológico as plantas a serem avaliadas são enxertadas (hipobioto) em plantas indicadoras (epibioto) e observa-se a porção da planta indicadora até que se manifestem os sintomas característicos. Apesar de ser bastante sensível para a detecção das doenças, o teste biológico não permite a identificação precisa e específica do vírus causador dos sintomas (Osman et al., 2007). Além disso, a reação das plantas indicadoras pode variar de acordo com as condições ambientais e a manifestação dos sintomas pode levar até mais de dois anos para ocorrer, o que torna o teste demorado e oneroso (Kuhn e Fajardo, 2004). Outra desvantagem é a necessidade de infraestrutura adequada como casas de vegetação revestidas por tela antiafídica para evitar infecções cruzadas por insetos vetores.

O método sorológico mais utilizado para identificação de viroses em videira é conhecido como ELISA (“Enzyme Linked Imunosorbant Assay” ou Ensaio Imunoabsorvente de Ligação de Enzimas), especialmente o tipo direto de duplo sanduíche (DAS-ELISA), que é um dos métodos mais difundidos para o diagnóstico de vírus em plantas. A presença do antígeno, no caso a proteína viral, presente na seiva infectada, é detectada indiretamente através de uma reação colorimétrica que ocorre devido a ação de uma enzima, em geral uma fosfatase alcalina ou uma peroxidase, conjugada a um anticorpo, na presença de um substrato apropriado (Boscia et al., 1997).

O teste de ELISA é relativamente simples, acurado, rápido, sensível e fácil de executar (Boscia et al., 1997). Embora possa se caracterizar como uma técnica de baixo custo, no Brasil o teste ainda é considerado como muito caro devido a inexistência de empresas nacionais fabricantes de kits de diagnóstico e a necessidade de importação dos mesmos a custos elevados. O ELISA apresenta uma série de vantagens em relação ao teste biológico, tais como sensibilidade suficiente para detectar baixas concentrações de antígeno viral, possibilidade de trabalho em larga escala, possibilidade de obtenção de medidas quantitativas de carga viral, possibilidade de padronização e automação, durabilidade dos reagentes e

simplicidade dos equipamentos utilizados (Clark e Adams, 1977). Os anticorpos podem ser purificados a partir do soro de uma cobaia imunizada e estes, irão reagir especificamente com o antígeno para o qual eles foram formados. Várias enzimas possuem a capacidade de se ligarem a moléculas de anticorpo formando uma molécula conjugada que além de possuir atividade enzimática também é sorologicamente ativa.

Algumas proteínas, como as que constituem o capsídio viral, têm a capacidade de se adsorverem fortemente a superfície de determinados plásticos como poliestireno e cloretos de polivinil (Garnsey e Cambra, 1991) e esta propriedade é fundamental para execução de teste de ELISA. Tais materiais são frequentemente referidos como adsorventes ou como a fase sólida dos protocolos de ELISA. Esta ligação a materiais imunoadsorventes não é específica e nem é uma reação sorológica e quando o extrato de uma planta é colocado em uma placa de ELISA, vários tipos de proteínas tanto virais como da planta se adsorvem à superfície da placa. Os componentes não reativos podem ser removidos através de lavagens e a adsorção indesejada de antígenos ou anticorpos a placa pode ser evitada utilizando-se detergentes iônicos como, por exemplo, o Tween-20 nas soluções sob incubação. O tampão de revestimento das placas com anticorpo de captura não contém Tween-20, que só é incorporado nos passos subsequentes do teste (Garnsey e Cambra, 1991).

Nos últimos anos, graças à disponibilidade de sequências completas ou parciais de ácidos nucleicos virais em bancos de dados, a detecção de diversos vírus da videira tem sido realizada utilizando-se métodos moleculares baseados em PCR (Engel et al., 2010, Osman et al, 2007). A técnica conhecida como RT-PCR (“Reverse Transcriptase-PCR”) tem sido uma das mais utilizadas, uma vez que a maioria dos vírus que infectam a videira possui material genético constituído por RNA fita simples. Essa técnica apresenta uma sensibilidade que pode ser de 100 a 1.000 vezes superior aos métodos sorológicos de detecção viral (Martin et al., 2000). O princípio de técnica basea-se na amplificação via PCR de um fragmento específico de cDNA sintetizado a partir do RNA viral pela ação da enzima transcriptase reversa. Geralmente nas reações de amplificação são utilizados pares de oligonucleotídeos iniciadores com sequências

complementares a regiões conservadas do genoma viral, permitindo a amplificação da sequência flanqueada pelos iniciadores. O fragmento amplificado pode ser facilmente visualizado através da eletroforese de uma alíquota do produto da amplificação em gel de agarose ou poliacrilamida e posterior coloração com brometo de etídeo.

Apesar da alta sensibilidade, a RT-PCR apresenta alguns fatores limitantes que dificultam a sua utilização em testes de rotina, sobre um grande número de amostras. A necessidade de transcrição do RNA viral em cDNA e sua posterior amplificação por PCR leva a necessidade de que o RNA extraído da planta a ser analisada esteja livre de polissacarídeos e compostos fenólicos, que estão presentes em grandes quantidades em tecidos foliares da videira, uma vez que tais compostos podem inibir a ação tanto da transcriptase reversa quanto da Taq polimerase (Marinho, 2001). Outro fator que limita a utilização da RT-PCR em larga escala é o alto custo, devido aos preços elevados dos equipamentos e reagentes necessários para a realização da técnica. Um agravante é o fato que a ausência de bandas geradas para o vírus em estudo, não necessariamente exclui a hipótese de que a planta esteja contaminada, visto que por questões intrínsecas das reações de geração do cDNA e da amplificação por PCR, vários fatores podem prevenir a amplificação da sequência viral, não sendo portanto o resultado negativo considerado como conclusivo. Uma forma de contornar essa limitação é a inclusão de controles positivos para avaliar a qualidade das reações.

11. Referências Bibliográficas

- ABOU-GHANEM, N.; SABANADZOVIC, S.; MINAFRA, A.; SALDARELLI, P.; MARTELLI, G. P. Some properties of Grapevine leafroll-associated virus 2 and molecular organization of the 3' region of the viral genome. **Journal of Plant Pathology**. 80: 37-46. 1998.
- ADAM-BLONDON, A-F.; ROUX, C; CLAUX, D; BUTTERLIN, G; MERDINOGLU, D; THIS, R. Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics. **Theoretical Applied Genetics**. 109:1017-1027. 2004.
- AGRRIANUAL, 2009. **Anuário de Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria. 502 p., 2009.
- ALLEWELDT, G.; DETTWEILER, E. **The genetic resources of Vitis: world list of grapevine collection**, 2nd edn. BAZ IRZ Geilweilerhof, Siebeldingen. 1994.
- ALRWAHNIH, M.; OSMAN, F.; ROWHANI, A. Molecular characterization of Californian isolates Grapevine Leafroll-Associated Viruses 7 (GLRaV-7) and development detection methods. **Proceedings of the 2nd Annual National Viticulture Research Conference**, University of California, Davis. p. 1-2. 2008.
- AMORIM, L.; KUNYUKI, H. Doenças da videira. In: Kimati, H., Amorim, L., Bergamin, A., Camargo, L. E. A., Rezende & J.A.M. (Eds) **Manual de Fitopatologia**, vol.2: Doenças de plantas cultivadas. São Paulo. Agronômica Ceres. 1997. p.736-757.
- ARADHYA, M. K.; DANGL, G. S.; PRINS, B. H.; BOURSQUOT, J. M.; WALKER, M. A.; MEREDITH, C. P.; SIMON, C. J. Genetic structure and differentiation in cultivated grape, *Vitis vinifera* L. **Genetical Research**. 81: 179-192. 2003.
- ASENSIO, M.L.; VALDES, E.; CABELLO, F. Characterisation of some Spanish White grapevine cultivars by morphology and aminoacid analysis. **Scientia Horticulturae**. 93: 289-299. 2002.
- BOCCACCI, P.; MARINONI, D.T; GAMBINO, G.; BOTTA, R.; SCHNEIDER, A. Genetic Characterization of Endangered Grape Cultivars of Reggio Emilia Province. **American Journal of Enology and Viticulture**. 56: 411-416. 2005.
- BOREM, A.; CAIXETA, E. T. Marcadores Moleculares. 2a. ed. v. 1. 532 p. 2008.
- BORREGO, J. ; ANDRÉS, M. T. ; GOMÉZ, J. L.; IBÁÑEZ, J. Genetic Study of Malvasia and Torrontes Groups through Molecular Markers. **American Journal of Enology and Viticulture**. 53: 125-130. 2002.

- BOSCIA, D.; MINAFRA, A.; MARTELLI, G. P. Filamentous viruses of the grapevine: Putative trichovirus and capilloviruses. In: Monette, P.L. (Ed.) *Filamentous Viruses of Woody Plants*. Research Signpost. Trivandrum, India. 1997. p.19-28.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNIC, K. M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**. 32: 314–331. 1980.
- BOTTA, R.; SCOOT, N. S.; EYNARD, I.; THOMAS, M. R. Evaluation of microsatellite sequence-tagged site markers for characterizing *Vitis vinifera* cultivars. **Vitis**. 34: 99-102. 1995.
- BOURQUIN, J. C; OTTEN, L.; WALTER, B. Identification of grape vine rootstocks by RFLP. **Comptes Rendus de l'académie des Sciences**. 312: 593-598. 1991.
- BOURSIQUOT, J. M.; THIS, P. Les nouvelles techniques utilisées en ampélographie: informatique et marquage. In: La viticulture à laube du IIIème Millénaire. **Journal international des sciences de la vigne et du vin**, pp. 13-23, 1996.
- BOWERS, J. E.; MEREDITH, C. P. The parentage of a classic wine grape, Cabernet Sauvignon. **Nature Genetics**. 16: 84-87. 1997.
- BÜSCHER, N.; ZYPRIAN, E.; BACHMANN, O.; BLAICH, R. On the origin of the grapevine variety Müller-Thurgau as investigated by the inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Vitis**. 33: 15-17. 1994.
- CERVERA, M. T.; CABEZAS, J. A.; SANCHA, J. C.; MARTINEZ, DE TODA F.; MARTINEZ-ZAPATER, J. M. Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). **Theoretical and Applied Genetics**, 97:51-59. 1998.
- CHARLES, J. G.; COHEN, D.; WALKER, J. T. S.; FORGIE, S. A.; BELL, V. A.; BREEN, K. C. **A Review of Grapevine Leafroll associated Virus type 3 (GLRaV-3) for the New Zealand wine industry**. Havelock North: Hort Research Client Report, 2006. 83p.
- CIPRIANI, G.; FRAZZA, G.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R. Grapevine application of microsatellite marker fingerprinting using microsatellite repeats. **Vitis**. 33: 211-215. 1994.
- CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**. 34:475-83. 1977.
- CONSTANTINI, L.; MONACO, A.; VOUILLAMOZ, J. F.; FORLANI, M. AND GRANDO, M. S. Genetic relationships among local *Vitis vinifera* cultivars from Campânia (Italy). **Vitis**. 44: 25-34. 2005.

- CRESPAN, M.; MILANI, N. The Muscats: A molecular analysis of synonyms, homonyms and genetic relationships within a large family of grapevine cultivars. **Vitis**. 40: 23-30. 2001.
- DALBO, M. A.; YE, G. N.; WEEDEN, N. F. WILCOX, W. F.; REICH, B. I. Marker-assisted selection for powdery mildew resistance in grapes. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. 126: 83-89. 2001.
- DALBO, M. A.; YE, G.N.; WEEDEN, N. F.; STEINKELLNER, H.; SEFC, K. M.; REICH, B.I. A gene controlling sex in grapevines placed on a molecular marker-based genetic map. **Genome**. 43: 333-340. 2000.
- DEFONTAINE, A. La PCR: un outil original pour caractériser les variétés. **Viticulture**, 47-48. 1992.
- DETTWEILER, E.; JUNG, A.; ZYPRIAN, E.; TÖPFER, R. Grapevine cultivar Müller-Thurgau its true to type descent. **Vitis**. 39: 63-65. 2000.
- DI GASPERO, G.; CIPRIANI, G.; MARRAZO, M. T.; ANDREETTA, D.; CASTRO, M. J. P.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R. Isolation of (AC)_n-microsatellites in *Vitis vinifera* L. and analysis of genetic background in grapevines under marker-assisted selection. **Molecular Breeding**. 15: 11-20. 2005.
- DION, R. Histoire de la vigne et du vin en France des origines au XIX^e siècle. Flammarion, Paris, p. 768. 1977.
- DOLIGEZ, A.; BOUQUET, A.; DANGLLOT, Y.; LAHOUE, F.; RIAZ, S.; MEREDITH, C. P.; EDWARDS, K. J.; THIS, P. Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight. **Theoretical and Applied Genetics**, 106:1213–1224. 2002. Genetic diversity in native Bulgarian grapevine germoplasm (*Vitis vinifera* L.) based on nuclear chloroplast microsatellite polymorphisms. **Vitis**. 38: 115-121. 2009.
- DZAMBAZOVA T., TSVETKOV I., ATANASSOV I., RUSANOV K., MARTINEZ ZAPATER J.M., ATANASSOV A., HVARLEVA T. Genetic diversity in native Bulgarian grapevine germoplasm (*Vitis vinifera* L.) based on nuclear and chloroplast microsatellite polymorphisms. **Vitis**. 48: 115-121. 2009.
- ENGEL, E. A.; ESCOBAR, P. F.; ROJAS, L. A.; RIVERA, P. A.; FIORE, N.; VALENZUELA, P. D. T. A diagnostic oligonucleotide microarray for simultaneous detection of grapevine viruses. **Journal of Virological Methods**. 163: 445-451. 2010.
- FAJARDO, T. V. M.; KUHN, G. B.; NICKEL, O. **Doenças virais**. In: Fajardo, T.V.M. (Ed.). Uva para Processamento Fitossanidade. Série Frutas do Brasil, 35. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília. 2003. p.45-62.

- FAJARDO, T. V. M.; KUHN, G. B; EIRAS, M.; NICKEL, O. Caracterização parcial de um isolado do Grapevine fanleaf virus . **Fitopatologia Brasileira**. 25: 505-511. 2000.
- FANIZZA, G.; COLLONA, G.; RESTA, P.; FERRARA, G. The effect of the number of RAPD markers on the evaluation of genotypic distances in *Vitis vinifera*. **Euphytica**.107: 45-50. 1999.
- FATHI, R.; EBADI, A.; BASSIL, N.; MEHLEMBACHER, S. A.; ZAMANI, Z. Characterization of Iranian grapevine cultivars using microsatelittes markers. **Vitis**. 42: 185-192. 2003.
- FAUQUET, C. M.; MAYO M. A.; MANILOFF. J.; DESSELBERGER, U.; BALL, A. L (Eds.) **Virus Taxonomy**. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London.ElsevierAcademicLondon. Elsevier Academic Press. 2005.
- FERNÁNDEZ-GONZÁLES, M.; MENA, A.; IZQUIERDO, P.; MARTÍNEZ, J. Genetic characterization of grapevines (*Vitis vinifera* L.) cultivars from Castilla la Mancha (Spain) using microsatelittes markers. **Vitis**. 46: 126-130. 2007.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas. 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 220 p. 1998.
- FRANKS, T.; BOTTA, R.; THOMAS, M. R. Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. **Trends Applied Genetics**. 104:192-199. 2002.
- FREGONI, M. Origines de la vigne et de la viticulture. Musumeci, Quart Italie, p. 160. 1991.
- GALBÁCS, Z.; MOLNÁR, S.; HALÁSZ, G.; KOZMA, P.; HOFFMANN, S.; KOVÁCS, S.; VERES, A.; GALLI, Z.; SZOKE, A.; HESZKY.; KISS, E. Identification of grapevine cultivars using microsatellite-based DNA barcodes. **Vitis**. 48: 17-24. 2009.
- GALET, P. Dictionnaire encyclopédique des cépages. Paris: Hachette. 2000.
- GALET, P. Précis d'ampélographie pratique. In: Galet P (ed) Imprimerie Déhan, 6^{ème} edn. Montpellier, p 257. 1991.
- GARNSEY, S. M.; CAMBRA, M. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for citrus pathogens, p. 193-216. In: C. N. Roistacher (ed.). **Graft-Transmissible Diseases of Citrus. Handbook for Detection and Diagnosis**. FAO, Rome. 1991.
- GENRES. European VitisDatabase.Web site at: (<http://www.genres.de/eccdb/vitis/>). Data da consulta: 05/08/2009.
- GORGOCENA, Y.; ARULSEKAR, S.; DANDEKAR, A. M.; PARFITT, D. E. Molecular markers for grape characterization. **Vitis**. 32: 183-185. 1993.

- GRANDO, M. S.; BELLIN, D.; EDWARDS, K. J.; POZZI, C.; STEFANINI, M.; VELASCO, R. Molecular linkage maps of *Vitis vinifera* L. and *Vitis riparia* Mchx. **Theoretical and Applied Genetics**. 106: 1213–1224. 2003.
- GRANDO, M. S.; DE MICHELI, L.; BIASETTO, L.; SCIENZA, A. RAPD markers in wild and cultivated *Vitis vinifera*. **Vitis**. 34: 37–39. 1995.
- GRANDO, M. S.; De MICHELI, L.; SCIENZA, A. Characterization of Vitisgermplasm using random amplified polymorphic DNA markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**. 43: 187-192. 1996.
- GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. **An Introduction to Genetic Anaysis**. 7 th ed. New York: W H Freeman &Co. 2000.
- HODGKIN, T.; ROVLGLIONI, R.; DE VICENTI, M. C.; DUDNICK, N. Molecular Methods in the conservation and use of plant genetic resources. **Acta Horticulturae**. 546: 107-118. 2001.
- IBÁÑEZ, J.; ANDRÉS, M. T.; MOLINO, A.; BORREGO, J. Genetic study of key spanish grapevine varieties using microsatellite analysis. **American Journal of Enology and Viticulture**. 54: 22-29. 2003.
- IMAZIO, S.; LABRA, M.; GRASSI, F.; WINFIELD, M.; BARDINI, M.; SCIENZA, A. Molecular tools for clone identification: the case of the grapevine cultivar “Traminer”. **Plant Breeding**. 121: 531-535. 2002.
- IBRAF. Frutas frescas: exportações. Disponível em: http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp. Acesso: 20/04/2010.
- IPGRI UPOV AND OIV. Descriptores para la Vid (*Vitis* spp.) Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales, Gêneve, Switzerland; **Oficina Internacional de la Vinã y del Vino**, Paris, France; International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 1997.
- KARASEV, A. V. Genetic diversity and evolution of closterovirus. **Annual Review of Phytopatology**. 38: 293-324. 2000.
- KARP, A. The new genetic era: will it help us in managing genetic diversity? In: ENGELS, J. M. M.; RAMANATHA, R. V.; BROWN, A. H. D.; JACKSON, M. T. (Ed). *Managing plant genetic diversity*. Wallingford: CAB International; Rome: IPGRI, 2002. Cap. 4, p. 43-56.
- KUHN, G. B. Efeitos causados pelo vírus do enrolamento da folha da videira no cultivar Cabernet Franc. **Fitopatologia Brasileira**. 14: 280-283. 1989.
- KUHN, G. B.; FAJARDO, T.V.M. **Viroses da Videira no Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. Capacitação técnica em viticultura. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/viticultura/viroses.html>. Acesso em: 05/02/2010.
- KUHN, G. B.; NICKEL, O. Viroses e sua importância econômica na viticultura brasileira. **Informe Agropecuário**. 19 :85-91. 1998.

- KUNIYUKI, H.; GASPAR, J. O.; REZENDE, J. A. M. Ocorrência do Grapevine leafroll-associated virus 6 em vinhedos do Brasil. **Summa Phytopathologica**. 29: 288-289. 2003.
- KUNIYUKI, H.; REZENDE, J. A. M.; GASPAR, J. O.; YUKI, V. A. Detecção do Grapevine leafroll-associated virus 5 no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**. 34: 366-367. 2008.
- KUNIYUKI, H.; REZENDE, J. A. M.; WILLINK, M. C. G.; NOVO, J. P. S.; YUKI, V. A. Transmissão do “*Grapevine leafroll-associated*” vírus 3 pela cochonilha *Pseudococcus longispinus* Targioni-Tozetti (Hemiptera: Pseudococcidae). **Summa Phytopathologica**. 31: 65-68. 2005.
- LABRA, M.; IMAZIO, S.; GRASSI, F.; ROSONI, M.; CITTERIO, S.; SGORBATI, S.; SCIENZA, A.; FAILA, O. Molecular approach to assess the origin of cv. Marzemino. **Vitis**. 42: 137-140. 2003.
- LAIADI, Z.; BENTCHIKOU, M. M.; BRAVO, G.; CABELLO, F.; MARÍNEZ-ZAPATER. Molecular identification and genetic relationships of Algerian grapevine cultivars maintained at the germoplasm collection of Skikda (Algeria). **Vitis**. 48: 25-32. 2009.
- LANDER, E. S.; BOTSTEIN, D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**. 121: 185-199. 1989.
- LEÃO, P. C. S. ; Riaz, S. ; GRAZIANI, R. ; DANGL, G. S. ; MOTOIKE, S. Y. ; WALKER, M. A. . Characterization of a brazilian grape germplasm collection using microsatellite markers. **American Journal of Enology and Viticulture**. 60: 517-524. 2009.
- LEFORT, F.; KYVELOU, J.; ZERVOU, M.; EDWARDS, K. J.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, A. Characterization of new microsatellite loci from *Vitis vinifera* and their conservation in some species and hybrids. **Molecular Ecology Notes**. 2: 20-21. 2002.
- LEFORT, F.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, A. The Greek *Vitis* database: A multimedia Web-backed Genetic Database for Germplasm Management of *Vitis* Resources in Greece. **Journal of Wine Research**. 11: 233-242. 2000.
- LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**. 44: 397-401. 1989.
- LOUREIRO, M. D.; MARTINEZ, M. C.; BOURSQUOT, J. M. AND THIS, P. Molecular markers analysis of *Vitis vinifera* “Albarino” and some similar grapevine cultivars. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. 123: 842-848. 1998.
- MARINHO, V. L. A. Técnicas imunológicas e moleculares no diagnóstico de vírus de plantas. In: LUZ, W. C. (Ed). **Revisão anual de patologia de plantas**. 9: 383-401. 2001.

- MARTELLI G.P., BOUDON-PADIEU E. Directory of infectious diseases of grapevines and viroses and virus-like diseases of the grapevine, Bibliographic report 1998-2004. Options méditerranéennes, Serie B: Studies and Research 55, 279 p. 2006.
- MARTELLI, G. P. Grapevine virology highlights 2000-2003. Extended abstracts, 14th Meeting of ICVG, Locorotondo. 2003: 3-10. 2003.
- MARTELLI, G. P.; AGRANOVSKY, A. A.; BAR-JOSEPH, M.; BOSCIA, D.; CANDRESSE, T.; COUTTS, R. H. A.; DOLJA, V. V.; FALK, B. W.; GONSALVES, D.; JELKMANN, W.; KARASEV, A. V.; MINAFRA, A., NAMBA, S.; VETTEN, H. J.; WISLER, G. C.; YOSHIKAWA, N. The family *Closteroviridae* revised. **Archives of Virology**. 147: 2039-2043. 2002.
- MARTELLI, G. P.; MINAFRA, A.; SALDARELLI, P. *Vitivirus*, a new genus of plant viruses. **Archives of Virology**. 142:1929-1932. 1997.
- MARTIN, J. P; SANTIAGO, J. L.; PINTO-CARNIDE, O; LEAL, F.; MARTINEZ, M. DEL C.; ORTIZ, J. M. Determination of relationships among autochthonous grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.) in the Northwest of the Iberian Peninsula by using microsatellite markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**. 53: 1255-1261. 2006.
- MASRI, S.; RAST, H.; JOHNSON, R.; MONETTE, P. (Grapevine virus C and grapevine leafroll associated virus 2 are serologically related and appear to be the same virus. **Vitis**. 45: 93-96. 2006.
- MELLO, L. M. R. Vitivinicultura brasileira: Panorama 2007. EMBRAPA Uva e Vinho: Artigos técnicos. 2008.
- MENEGHETTI, S.; COSTACURTA, A.; CRESPIA, M.; MAUL, E.; HACK, R.; REGNER, F. Deepening inside the homonyms of 'Wildbacher' by means of SSR markers. **Vitis**, 48: 123:129. 2009.
- MEREDITH, C. P.; BOWERS, J. E. RIAZ, S.; HANDLEY, V.; BANDMAN, E. B. AND DANGL, G. S. The identity and parentage of the variety known in California as Petite Syrah. **American Journal of Enology and Viticulture**. 50: 236-242. 1999.
- MOREIRA, A. E., GASPAR, J. O., CAMARGO, L. E. A.; KUNIYUKI, H. Caracterização do gene da proteína capsidial do *Grapevine virus A* em videiras afetadas pela acanaladura do lenho de Kober no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**. 29: 205-208. 2004.
- MOREIRA, F. M. **Identificazione di QTL per la resistenza a *Plasmopara viticola* e *Uncinula necator* in vite**. Tesi di dottorato di ricerca in Biologia Vegetale e Produttività delle Piante Coltivate, Università degli Studi di Milano. 2005.
- MUELLER, U. G.; WOLFENBARGER, L. L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Tree**. 14: 389-394. 1999.
- MULUVI, G. M.; SPRENT, J. I.; SORANZO, N.; PROVAN, J.; ODEE, D.; FOLKARD, G.; MCNICOL, J. W.; POWELL, W. Amplified fragment length

- polymorphism (AFLP) analysis of genetic variation in *Moringa oleifera* Lam. **Molecular Ecology**. 8: 463-470. 1999.
- MURPHY, F.A., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., GHABRIAL, S.A., JARVIS, A.W., MARTELLI, G.P., MAYO, M.A., SUMMERS, M.D. Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. **The Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Springer, Vienna. 1995.
- NAKAUNE, R.; INOUE, K.; NASU, H.; KAKOGAWA, K.; NITTA, H.; IMADA, J.; NAKANO, M. Detection of viruses associated with rugose wood in Japanese grapevines and analysis of genomic variability of *Rupestris stem pitting-associated virus*. **Journal of General Plant Pathology**. 74:156-163. 2008.
- NODARI, R. O.; TSAI, S. M.; GILBERTSON, R. L.; GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean. II. Development of an RFLP-based linkage map. **Theoretical and Applied Genetics**. 85: 513-520. 1993.
- ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE LA VIÑA Y EL VINO. Estadística. Informe del director general sobre la situación de la vitivinicultura em 2009. http://news.reseau-concept.net/pls/news/p_entree?i_sid=&i_type_edition_id=20869&i_section_id=&i_lang=33. Acesso em: 21/12/2009.
- ORTIZ, J. M.; MARTIN, J. P.; BORREGO, J.; CHAVEZ, J.; RODRIGUES, I.; MUNOZ, G.; CABELLO, F. Molecular and morphological characterization of a *Vitis* gene bank for the establishment of a base collection. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 51: 403-409. 2004.
- OSMAN, F., LEUTENEGGER, C., GOLINO, D., ROWHANI, A. Comparison of low-density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan RT-PCR in detection of grapevine viruses. **Journal of Virological Methods**. 149: 292-299. 2008.
- OSMAN, F.; LEUTENEGGER, C.; GOLINO, D.; ROWHANI, A. Real-time RT-PCR (TaqMan®) assays for the detection of Grapevine Leafroll associated viruses 1 5 and 9. **Journal of Virological Methods**. 141: 22-29. 2007.
- PEAKALL R.; SMOUSE P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**. 6:288-295. 2006.
- PEARSON, R. C.; GOHEEN, A. C. **Compendium of grape disease**. St. Paul: APS, 4th ed. 93 p. 1998.
- PINTO-CARNIDE, O.; MARTIN J. P.; LEAL, F.; CASTRO, I.; GUEDES-PINTO, H.; ORTIZ, J. M. Characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars from northern Portugal using RAPD and microsatellite markers. **Vitis**. 42: 23 25. 2003.

- PROSSER, S. W.; GOSZCZYNSKI, D. E.; MENG, B. Molecular analysis of double-stranded RNAs reveals complex infection of grapevines with multiple viruses. **Virus Research**. 124:151-159. 2007.
- RIAZ, S.; DOLIGEZ, A.; HENRY, R. J.; WALKER, M. A. Grape. In: KOLE, C. (Ed) **Genome mapping and molecular breeding in plants: fruits and nuts**. Berlin: Springer-Verlag. v. 4, p. 63-101. 2007.
- RIAZ, S.; GARRISON, K. E.; DANGL, G. S.; BOURSQUOT, J. M.; MEREDITH, C. Genetic divergence and chimerism within ancient asexually propagated winegrape cultivars. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. 127:508-514. 2002.
- SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOEFFEL, S.; SHCARF, S. J.; HIGUCHI, G.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**. 239: 487-491. 1988.
- SEFC, K. M.; GUGGENBERGER, S.; REGNER, F.; LEXER, C.; GLOSSL, J.; STEINKELLNER, H. Genetic analysis of grape berries and raisins using microsatellite markers. **Vitis**. 37: 123-125. 1998.
- SEFC, K. M.; LEFORT, F.; GRANDO, M. S.; SCOOT, K. D.; STEINKELLNER, H. & THOMAS, M.R. Microsatellites markers for grapevine: a state of the art. **Molecular Biology & Biotechnology of Grapevine**. Cap. 17. 1-30p. 2001.
- SEFC, K. M.; REGNER, F.; GLÖSSI, J.; STEINKELLNER, H. Genotyping of grapevine and rootstock using microsatellite markers. **Vitis**. 37: 15-20. 1998a.
- SEFC, K. M.; REGNER, F.; TURETSCEIK, E.; GLOSSL, J.; STEINKELLNER, H. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. **Genome**. 42: 367-373. 1999.
- SEFC, K. M.; STEINKELLNER, H.; WAGNER, H. W.; GLOSSL, J.; REGNER, F. Application of microsatellite markers to parentage studies in grapevine. **Vitis**. 36: 179-183. 1997.
- SENSI, E.; VIGNANI, R.; RODHE, W. AND BIRICOTTI, S. Characterization of genetic biodiversity with *Vitis vinifera* L. Sangiovese and Colorino genotypes by AFLP and ISTR DNA marker technology. **Vitis**. 35: 183-188. 1996.
- SILVA, A. L. Programa de certificação de mudas de videira em Santa Catarina. IN: **SIMPÓSIO MINEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA**, 1, 2002, Andradas. Anais. Caldas: EPAMIG-FECD, 2002. 340 p.: 215-231.
- SIRET, R.; GIGAUD, O.; ROSEC, J. P. e THIS, P. Analysis of grape *Vitis vinifera* L. DNA in must mixtures and experimental mixed wines using microsatellites markers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50: 3822-3827. 2002.

- SOUSA, J. R. I. **Uvas para o Brasil**. São Paulo: Melhoramentos, 1969. 456 p.
- STRIEM, M. J.; SPIEGEL-ROY, P.; BEN-HAYYIM, G.; BECKMANN, J.; GIDONI, D. Genomic DNA fingerprinting of *Vitis vinifera* by the use of multi-loci probes. **Vitis**. 29: 223-227. 1990.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**. 17: 6463-6471. 1989.
- TESSIER, C.; DAVID, J.; THIS, P.; BOURSQUOT, J. M.; CHARRIER, A. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. **Theoretical and Applied Genetics**. 89: 171-177. 1999.
- THIS, P.; JUNG, A.; BOCCACCI, P.; BORREGO, J.; BOTTA, J.; COSTANTINI, L.; CRESPIAN, M.; DANGL, G. S.; EISENHELD, C.; FERREIRA-MONTEIRO, F.; GRANDO, S.; IBÁÑEZ, J.; LACOMBE, T.; LAUCOU, V.; MAGALHÃES, R.; MEREDITH, C. P.; MILANI, N.; PETERLUNGER, E.; REGNER, F.; ZULINI, L.; MAUL, E. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**. 109: 1448-1458. 2004.
- THOMAS, M. R.; CAIN, P.; SCOTT, N. S. DNA typing of grapevines: a universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness. **Plant Molecular Biology**. 25: 939-949. 1994.
- THOMAS, M. R.; SCOTT, N. S. Microsatellites repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysis as sequenced-targeted sites (STSs). **Theoretical and Applied Genetics**. 86: 985-990. 1993.
- VOUILLAMOZ; J. F.; SCHNEIDER; A.; GRANDO, M. S. Microsatellite analysis of Alpine grape cultivars (*Vitis vinifera* L.): alleged descendants of Pliny the Elder's Raetica are genetically related. **Genetic Resources and Crop Evolution**. 54: 1095-1104. 2006.
- WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics**. 44: 388-396. 1989.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIC, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**. 18: 6531-6535. 1990.
- YE, G. N.; SOYLEMEZOGLU, G.; WEEDEN, N. F.; LAMBOY, W. F.; POOL, R. M.; REISCH, B. I. Analysis of the relationship between grapevine cultivars, sports and clones via DNA fingerprinting. **Vitis**. 37:33–38. 1998.
- ZABEAU, M.; VOS, P. Selective restriction fragment length amplification: a general method for DNA fingerprinting. In: **European Patent Application EP 534858A1**. 1993.

ZOHARY D.; HOPF, M. The domestication of the plants in the old world: the origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe and Nile Valley, 3rd edn. Oxford University Press, Oxford. 2000.

CAPÍTULO I

Diversidade Genética e “DNA Fingerprinting” em Acessos de Videira Utilizando Marcadores Moleculares Microssatélites

RESUMO

Os objetivos desse trabalho foram a caracterização molecular (“DNA fingerprinting”) e o estudo da diversidade genética de 27 variedades de videira cultivadas no estado de Minas Gerais, utilizando marcadores moleculares do tipo SSR. Os 7 marcadores utilizados permitiram a diferenciação de 26 genótipos. Foram identificados 101 alelos com uma média de 14,43 alelos por *locus*, confirmando a eficiência dos marcadores para a detecção de polimorfismos genéticos. A heterozigosidade esperada variou de 0,832 a 0,9205, com média 0,8873, enquanto a heterozigosidade observada variou de 0,7692 a 1,000, com média 0,8943. O excesso de heterozigotos se explica pelo fato da seleção de indivíduos superiores para qualidade e produtividade em videira ter sido realizada precocemente durante o processo de melhoramento da cultura e perpetuado pela multiplicação vegetativa. Além disso, a videira é sensível à depressão endogâmica sendo as melhores performances obtidas por indivíduos heterozigotos. Os *loci* que apresentaram os maiores valores de conteúdo de informação polimórfica (PIC) foram VVS2 (0,92), VVMD27 (0,918) e VrZAG62 (0,918). Já os que apresentaram os menores valores foram VVMD25 (0,832) e VrZAG79 (0,845). Considerando os 7 *loci* analisados, a probabilidade de identidade atingiu um valor relativamente baixo ($1,27 \times 10^{-12}$), demonstrando uma grande eficiência dos marcadores utilizados para a diferenciação das variedades. O dendrograma agrupou corretamente a maioria das variedades de acordo com o pedigree. Na análise das coordenadas principais, o grupo formado pelas quatro variedades copa americanas apresentou o maior nível de estruturação. Apesar de não ter ocorrido uma clara estruturação em relação aos grupos das viníferas e dos porta-enxertos, foi possível notar uma tendência de agrupamento das variedades pertencentes ao mesmo grupo.

Palavras chave: Genotipagem, Sequência Simples Repetitiva, germoplasma, *Vitis* spp.

ABSTRACT

Genetic Diversity and DNA Fingerprinting in Grapevine Accessions Using Microsatellites Molecular Markers

The aim of this work was the DNA fingerprinting and the analysis of the genetic diversity of 27 grape varieties cultivated in Minas Gerais, Brazil, using SSR molecular markers. Among the 27 cultivars analyzed, 26 different SSR profiles were detected. In this work were identified 101 alleles in seven *loci* analyzed with average of 14.43 alleles per *locus*, confirming the high power of these markers for genetic polymorphism detection. The expected heterozygosity ranged from 0.832 to 0.9205 with average 0.8873 while the observed heterozygosity ranged from 0.7692 to 1.000 with average of 0.8943. The high number of heterozygous individuals might be due the breeding selection followed by genotype maintenance through vegetative propagation. Grapes are known to be very sensitive to inbreeding depression and the higher performance is mainly observed in heterozygous individuals. The *loci* with highest polymorphisms content (PIC) were VVS2 (0.92), VVMD27 (0.918) and VrZAG62 (0.918) while the *loci* with lowest values of PIC were VVMD25 (0.832) and VrZAG79 (0.845). Considering the seven *loci* analyzed the PI accumulation was very low (1.27×10^{-12}) indicating the high efficiency of these *loci* for grapevine genotypes differentiation. The dendrogram showed four main groups and they were in agreement with the pedigree of these varieties. In the principal coordinate analysis, the group formed for four Americans varieties showed the highest level of genetic structuration. Despite no clear division was observed between vinifers and rootstocks groups during the structuration, the results indicates a tendency of clustering among the varieties belonging to the same group.

Key Words: Genotyping, Simple Sequence Repeats, germplasm, *Vitis* spp.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil a viticultura ocupa uma área de aproximadamente 76.370 ha (AGRIANUAL, 2009) e a produção se concentra nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste, sendo que os principais estados produtores são Rio Grande do Sul, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Pernambuco, Bahia e Minas Gerais (Mello, 2008). A maior parte das uvas produzidas no Brasil é constituída por variedades européias (*Vitis vinifera*) e híbridos americanos, embora diversos híbridos desenvolvidos por programas de melhoramento no país também sejam cultivados com sucesso (Leão et al., 2009). No estado de Minas Gerais, a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) possui uma série de genótipos de videira mantidos em coleções no campo, dentre os quais se encontram as principais variedades copa de viníferas, americanas e de porta-enxertos utilizados comercialmente no Brasil.

A identificação acurada das variedades de videira é fundamental para o manejo e utilização racional do germoplasma, sendo também de considerável interesse para viveiristas, agricultores, empresas vinícolas e curadores dos bancos de germoplasma, pois a qualidade e a quantidade da produção são determinadas pela variedade cultivada (Asensio et al., 2002). No caso específico do germoplasma brasileiro de videira, a falta de conhecimento sobre a fidelidade genética existente tem constituído um entrave à utilização e conservação de germoplasma, além de dificultar o intercambio de informações entre pesquisadores. O estudo da diversidade genética pode facilitar a classificação correta dos acessos, a seleção de amostras representativas que capturem a diversidade genética da coleção e a detecção de padrões de diferenciação em toda a coleção.

A identificação de variedades de videira é tradicionalmente realizada através da ampelografia, que se baseia na análise e comparação de caracteres morfológicos de folhas, caules, cachos e frutos (Galet, 1991; Boursiquot e This, 1996; IPGRI UPOV OIV, 1997; Galet, 2000). Entretanto, o número de especialistas em ampelografia é cada vez menor e existe uma série de restrições em relação a este método de identificação. Uma vez que principalmente características de folhas completamente expandidas são

levadas em consideração na identificação baseada em caracteres morfológicos, esse método só pode ser aplicado durante o período vegetativo de plantas completamente desenvolvidas. Entretanto, o material vegetal utilizado para a propagação da videira é obtido na forma de estacas lenhosas sem folhas, o que torna a identificação do material propagativo quase impossível. Além disso, o fenótipo das plantas é significativamente influenciado pelas condições ambientais e pelo estado nutricional e sanitário das mesmas. Portanto, diferenças ambientais podem causar variações nas características morfológicas consideradas na ampelografia (Sefc et al., 2001, Aradhya et al., 2003). Clones de uma mesma variedade podem diferir consideravelmente em termos de fenótipo, mesmo que eles apresentem perfis de DNA idênticos (Riaz et al., 2002).

Para superar essas limitações da ampelografia, diversos tipos de marcadores moleculares foram desenvolvidos para analisar, caracterizar e identificar variedades de videira (This et al., 2004). Recentemente os marcadores microssatélites, também conhecidos como SSR (“Simple Sequence Repeats” – Repetições de Sequências Simples), têm se tornado o tipo de marcador molecular mais utilizado para a identificação de variedades de videira em todo o mundo (Sefc et al., 2001; Laiadi et al., 2009; Meneghetti et al., 2009). Suas características positivas têm permitido seu uso também no mapeamento genômico, reconstrução de genealogias, filogenia e análises de diversidade genética (Bowers e Meredith, 1996; Ortiz et al., 2004; Leão et al., 2009).

Os objetivos desse trabalho foram a caracterização molecular (“DNA fingerprinting”) e estudo da diversidade genética de variedades copa e de porta-enxerto de videira cultivados no estado de Minas Gerais, utilizando marcadores moleculares do tipo SSR. Este trabalho visa para dar suporte ao programa de certificação genética de mudas de videira da EPAMIG.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal

Foram utilizadas 27 variedades de videira da coleção mantida a campo no Núcleo Tecnológico EPAMIG Uva e Vinho, localizado na Fazenda Experimental no município de Caldas, sul do estado de Minas Gerais. As variedades utilizadas no trabalho estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Variedades de videira analisadas.

Copas				
Número	Nome	Origem	Espécie	Pedigree
1	Moscato	Itália	<i>V. vinifera</i>	?
2	Chardonnay	França	<i>V. vinifera</i>	Pinot Noir x Gouais Blanc
3	Syrah	França	<i>V. vinifera</i>	Dureza x Mondeuse
4	Cabernet Sauvignon	França	<i>V. vinifera</i>	Cabernet Franc x Sauvignon Blank
5	Merlot	França	<i>V. vinifera</i>	Magdeleine Noire des Charentes x Cabernet Franc
6	Cabernet Franc	França	<i>V. vinifera</i>	?
7	Pinot Noir	França	<i>V. vinifera</i>	?
8	Sauvignon Blanc	França	<i>V. vinifera</i>	Traminer x ?
9	Niágara Rosada	Brasil	<i>V. labrusca</i>	Mutação da Niágara Branca
10	Niágara Branca	EUA	<i>V. labrusca</i>	Concord (<i>V. labrusca</i>) x Cassady (<i>V. vinifera</i> x <i>Vitis labrusca</i>)
11	Bordô	EUA	Híbrido	Isabella x <i>V. labrusca</i>
12	Violeta	Brasil	Híbrido	BRS Rúbea x IAC 1398-21
Porta-enxertos				
Número	Nome	Origem	Espécie	Pedigree
13	Gravesac	França	Híbrido	161-49 x 3309
14	Kober 5BB	Austria	Híbrido	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i>
15	Rupestris du Lot	França	<i>Vitis rupestris</i>	<i>V. rupestris</i>
16	101-14	França	Híbrido	<i>V. riparia</i> x <i>V. rupestris</i>
17	R99	França	Híbrido	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. rupestris</i> (<i>Berlandieri Las Sorres</i> x <i>Rupestris du Lot</i>)
18	420 A	Itália	Híbrido	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i>
19	1045 - Paulsen	Itália	Híbrido	<i>V. berlandieri</i> x (<i>V. rupestris</i> x <i>V. Vinifera</i>)
20	161-49	França	Híbrido	<i>V. riparia</i> x <i>V. berlandieri</i>
21	R110	EUA	Híbrido	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. rupestris</i>
22	3309	Itália	Híbrido	<i>V. riparia</i> x <i>V. rupestris</i>)
23	1103 Paulsen	França	Híbrido	<i>V. rupestris</i> x <i>V. berlandieri</i>
24	SO4	Alemanha	Híbrido	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i>
25	Traviú	França	Híbrido	<i>V. riparia</i> x (<i>V. rupestris</i> x <i>V. cordifolia</i>)
26	IAC766	Brasil	Híbrido	106-6 x <i>V. caribea</i>
27	IAC572	Brasil	Híbrido	[(<i>V. tiliaefolia</i> x <i>V. riparia</i> x <i>V. rupestris</i> ('101-14 Mgt'))]

2.2. Extração de DNA

Amostras compostas por cerca de 10 folhas jovens foram coletadas no campo, transportadas em gelo e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da extração do DNA genômico. A extração de DNA foi realizada de acordo com o método descrito por Doyle e Doyle (1990), incluindo pequenas modificações. De cada amostra, cerca de 0,2 g de tecido foliar 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 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora em banho-maria, com agitação suave a cada 10 minutos. Foram adicionados 400 μL de clorofórmio:álcool isoamílico na proporção de 24:1 e agitados gentilmente 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 novos tubos. Foram adicionados 400 μL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), agitados gentilmente 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). As amostras foram incubadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ “overnight” e em seguida centrifugadas a 13.000 rpm durante 40 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 100 μL de TE [Tris-HCl 10mM (pH 8,0), EDTA 1mM]. Finalmente as amostras foram tratadas com RNase-A e incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora.

As amostras de DNA foram visualizadas em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e imerso em tampão TBE [Tris-Borato 90 mM (pH8,0) EDTA 10 mM] para verificar a qualidade do DNA. 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.

2.3. Análises dos Marcadores Microssatélites

Foram utilizados sete marcadores microssatélites previamente descritos na literatura como polimórficos para o gênero *Vitis*. São eles: VVS2 (Thomas e Scott 1993), VVMD7 (Bowers et al., 1996), VVMD27, VVMD28, VVMD31 (Bowers et al., 1999), VrZAG62 e VrZAG79 (Sefc et al., 1999), cujas sequências estão descritas na Tabela 2. Nesse estudo foram utilizados 5 dos 6 iniciadores do “core set” de microssatélites do projeto GENRES 081 (Dettweiler et al. 2000; This et al. 2004; <http://www.genres.de/vitis/>), além de outros amplamente utilizados na genotipagem da videira. O “core set” de microssatélites é composto pelos marcadores: VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62 e VrZAG79 que são utilizados para o “screening” das coleções de videira da Europa.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 30 µL, contendo 50 ng de DNA, 6 µL de tampão de reação 5X, MgCl₂ (1,5mM), DNTPs (200 µM de cada), 0,5 µM de cada iniciador (Sigma, USA) e 0,75 U de Taq DNA polimerase (Go Taq Flexi, Promega, USA). As reações foram conduzidas em termociclador com gradiente (Multigene Gradient, Labnet International, USA) programado para uma etapa inicial de desnaturação de 5 minutos a 94 °C seguido por 37 ciclos de desnaturação a 94 °C por 50 segundos, anelamento dos iniciadores por 50 segundos (temperatura variável) e extensão dos iniciadores 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 a qualidade final dos produtos das reações de amplificação, alíquotas de 7 µL das amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% imerso em tampão TBE [Tris-Borato 90 mM (pH8,0) EDTA 10 mM] e corado com brometo de etídeo (0,2 µg/mL).

Tabela 2 - Relação dos iniciadores SSR utilizados neste estudo, suas sequências, referências bibliográficas e tamanho esperado dos alelos (pares de base).

Inciadores	Sequência	Referência	Tamanho dos alelos
VVS2 – <i>Forward</i>	CAGCCGTAAATGTATCCATC	Thomas e Scott (1993)	129-155
VVS2 - <i>Reverse</i>	AAATTCAAATTCTAATTCAACTGG		
VVMD7 - <i>Forward</i>	AGAGTTGCGGAGAACAGGAT	Bowers et al. (1996)	232-263
VVMD7 - <i>Reverse</i>	CGAACCTTCACACGCTTGAT		
VVMD27 - <i>Forward</i>	GTACCAGATCTGAATACATCCGTAAGT	Bowers et al. (1999)	173-194
VVMD27 - <i>Reverse</i>	ACGGGTATAGAGCAAACGGTGT		
VVMD28 - <i>Forward</i>	AACAATTCAATGAAAAGAGAGAGAGAGA	Bowers et al. (1999)	221-279
VVMD28 – <i>Reverse</i>	TCATCAATTTTCGTATCTCTATTTGCTG		
VVMD 31 - <i>Forward</i>	CAGTGTTTTTCTTAAAGTTTCAAGG	Bowers et al. (1999)	196-224
VVMD 31 - <i>Reverse</i>	CTCTGTGAAAGAGGAAGAGACGC		
VRZag62 - <i>Forward</i>	GGTGAAATGGGCACCGAACACACGC	Sefc et al. (1999)	185-203
VRZag62 - <i>Reverse</i>	CCATGTCTCTCCTCAGCTTCTCAGC		
VRZag79 - <i>Forward</i>	AGATTGTGGAGGAGGAACAAACCG	Sefc et al. (1999)	236-260
VRZag79 - <i>Reverse</i>	TGCCCCCATTTTCAAACCTCCCTTCC		

2.4. Eletroforese em Gel Desnaturante de Poliacrilamida

Uma vez confirmado o sucesso das reações de amplificação em géis de agarose a 0,8%, o produto da reação foi submetido a uma eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 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 et al. (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 1,5%. Passou então por nova lavagem e 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 fotografado sobre negatoscópio.

2.5. Análises dos Dados

A partir dos perfis alélicos gerados com os sete marcadores microssatélites para as 27 variedades de videira, foi construída uma matriz, na qual cada alelo de cada loco foi designado numericamente de 1 até o número máximo de alelos no *locus*. Utilizando o aplicativo computacional “Genealex 6” (Peakall e Smouse, 2006) foram estimados os seguintes parâmetros: Probabilidade de Identidade (para cada *locus* e acumulada) (Waits et al., 2001), número de *locus* com alelo exclusivo para cada variedade, dispersão gráfica pelo método da Análise das Coordenadas Principais. O mesmo aplicativo computacional foi utilizado para analisar a variabilidade genética entre e dentro dos grupos através da Análise Molecular de Variância (AMOVA) (Excoffier et al., 2005).

Por meio do aplicativo “Convert” (Glaubitz, 2004) foi estimada a frequência alélica para todos os *loci* individualmente. Este software foi também utilizado para converter a matriz dos dados para o formato de outros aplicativos – “PopGene32” (Yeh e Boyle, 1997) e “Structure 2.3.1” (Pritchard et al., 2000).

O PopGene32 foi utilizado para calcular o número de alelos por *locus*; a heterozigosidade esperada, estimativa através da proporção esperada de heterozigotos sobre acasalamento ao acaso (Nei, 1973); e heterozigosidade observada, estimada a partir da proporção de heterozigotos observados em um dado *locus*.

O cálculo dos valores de conteúdo de informação polimórfica (PIC), a matriz de dissimilaridade genética baseada na distância “C.S. Chord” (Cavalli-Sforza e Edwards, 1967) e uma árvore filogenética obtida pelo método de agrupamento Vizinheiro Mais Próximo (Saitou e Nei, 1987) foram feitos utilizando o programa “Powermarker Version 3.25” (Liu e Muse, 2005).

Para averiguar a estruturação genética dos 27 genótipos analisados neste estudo, utilizou-se o método bayesiano através do programa “Structure 2.3.1” para definir o número de grupos (K) mais provável. Empregou-se o modelo de ausência de mistura (“non admixture model”) e frequências alélicas independentes, usando “Burn-in 5.000”, seguido de extensão de 50.000 repetições durante a análise. Foram efetuadas 20 simulações por k, com k variando de 1 a 12. O teste estatístico Δk foi realizado usando o aplicativo “Structure Harvester” (disponível “online” em http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/) baseado no critério de Evanno et al. (2005). Este critério baseia-se na média e no desvio padrão do $\text{LnP}(D)$ estimado em cada uma das 20 interações por k. Os valores de Δk_i foram estimados através da fórmula:

$$\Delta k_i = \text{ABS} (k_{i+1} - (2 * k_i) + k_{i-1}) / \text{desvio padrão de } K_i$$

Onde:

i: corresponde ao número de grupos simulados, indo de i = 1 até i = 12.

ABS = corresponde ao módulo

Esse valor de Δk é estimado para cada k, sendo selecionado o que apresentar maior valor. Após escolhido o Δk ótimo, escolhe-se a simulação de menor valor de $\text{LnP}(D)$ dentre as 20 simulações feitas para a obtenção do mesmo. Cada cor do gráfico gerado representa um possível grupo de indivíduos estruturados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise dos Marcadores Microssatélites

Os sete marcadores microssatélites utilizados nesse trabalho permitiram a diferenciação de 26 genótipos entre as 27 variedades de videira analisadas. Apenas as variedades 'Niágara Rosada' e 'Niágara Branca' apresentaram o mesmo perfil alélico, resultado que era esperado devido à origem genética similar de ambos os genótipos.

As frequências alélicas para cada *locus* estão apresentadas na Tabela 3. Considerando todas as 27 variedades analisadas, os alelos mais frequentes foram o VVMD25-12 (Freq. = 0,30) e o VVMD25-11 (Freq. = 0,24). A distribuição das frequências alélicas para cada *locus* permitiu a avaliação da eficiência de cada um dos marcadores para a diferenciação das variedades de videira estudadas. Foi possível observar que os *loci* que apresentam distribuições mais equitativas das frequências alélicas foram mais eficientes para a identificação varietal, o que está de acordo com Tessier et al. (1999). Nesse trabalho foram analisadas 224 variedades de videira, e os autores observaram que o poder discriminante de um marcador não depende somente do número de padrões gerados, mas principalmente da distribuição das frequências alélicas. Portanto, mesmo que dois marcadores gerem o mesmo número de padrões, eles podem apresentar poderes discriminantes muito diferentes. Por outro lado, dois marcadores que gerem números diferentes de padrões podem apresentar poderes discriminantes semelhantes.

Tabela 3 – Frequências alélicas para os 7 loci analisados.

VVMD7		VVMD25		VVMD27		VVMD28		VVS2		Zag62		Zag79	
Alelos	Frequencia	Alelos	Frequencia	Alelos	Frequencia	Alelos	Frequencia	Alelos	Frequencia	Alelos	Frequencia	Alelos	Frequencia
VVMD7-1	0.0370	VVMD25-1	0.0400	VVMD27-1	0.0217	VVMD28-1	0.0370	VVS2-1	0.0227	Zag62-1	0.1136	Zag79-1	0.0385
VVMD7-2	0.0741	VVMD25-2	0.0200	VVMD27-2	0.0435	VVMD28-2	0.0741	VVS2-2	0.0227	Zag62-2	0.0227	Zag79-2	0.0192
VVMD7-3	0.0556	VVMD25-3	0.0400	VVMD27-3	0.0217	VVMD28-3	0.0556	VVS2-3	0.0227	Zag62-3	0.1136	Zag79-3	0.1731
VVMD7-4	0.1111	VVMD25-4	0.0200	VVMD27-4	0.0217	VVMD28-4	0.0370	VVS2-4	0.0682	Zag62-4	0.0909	Zag79-4	0.0769
VVMD7-5	0.0370	VVMD25-5	0.0400	VVMD27-5	0.0870	VVMD28-5	0.1296	VVS2-5	0.0227	Zag62-5	0.0909	Zag79-5	0.1923
VVMD7-6	0.0556	VVMD25-6	0.0800	VVMD27-6	0.0217	VVMD28-6	0.1667	VVS2-6	0.0682	Zag62-6	0.0682	Zag79-6	0.1731
VVMD7-7	0.0741	VVMD25-7	0.0200	VVMD27-7	0.0217	VVMD28-7	0.1481	VVS2-7	0.0455	Zag62-7	0.0682	Zag79-7	0.0577
VVMD7-8	0.0185	VVMD25-8	0.0400	VVMD27-8	0.0217	VVMD28-8	0.0556	VVS2-8	0.0455	Zag62-8	0.0682	Zag79-8	0.2115
VVMD7-9	0.0741	VVMD25-9	0.0400	VVMD27-9	0.1087	VVMD28-9	0.0370	VVS2-9	0.0682	Zag62-9	0.0682	Zag79-9	0.0192
VVMD7-10	0.1852	VVMD25-10	0.0600	VVMD27-10	0.1522	VVMD28-10	0.0370	VVS2-10	0.1136	Zag62-10	0.0455	Zag79-10	0.0385
VVMD7-11	0.0741	VVMD25-11	0.2400	VVMD27-11	0.0870	VVMD28-11	0.0556	VVS2-11	0.0227	Zag62-11	0.1136	–	–
VVMD7-12	0.1111	VVMD25-12	0.3000	VVMD27-12	0.0870	VVMD28-12	0.1111	VVS2-12	0.0682	Zag62-12	0.0227	–	–
VVMD7-13	0.0741	VVMD25-13	0.0200	VVMD27-13	0.0652	VVMD28-13	0.0370	VVS2-13	0.1136	Zag62-13	0.0455	–	–
VVMD7-14	0.0185	VVMD25-14	0.0200	VVMD27-14	0.0435	VVMD28-14	0.0185	VVS2-14	0.0455	Zag62-14	0.0455	–	–
–	–	VVMD25-15	0.0200	VVMD27-15	0.0652	–	–	VVS2-15	0.1136	Zag62-14	0.0227	–	–
–	–	–	–	VVMD27-16	0.0217	–	–	VVS2-16	0.0227	–	–	–	–
–	–	–	–	VVMD27-17	0.0435	–	–	VVS2-17	0.1136	–	–	–	–

Alguns parâmetros genéticos deduzidos a partir dos resultados estão apresentados na Tabela 4. Para os 7 *loci* foi obtido um total de 101 alelos. O número de alelos por *locus* variou de 10, para o *locus* VrZag79, a 19, para o *locus* VVS2, com uma média de 14,43 alelos por *locus*. Estes valores são significativamente superiores aos encontrados em outros estudos similares a esse. Num estudo em que foram analisadas 65 amostras correspondentes a 35 genótipos de *V. vinifera*, Santana et al. (2008) observaram uma média de 8,67 alelos por *locus*. Bowers et al. (1999) detectaram uma média de 11 alelos por *locus* analisando 350 variedades francesas de videira. Já Sefc et al. (2000), analisando um conjunto de 164 variedades, encontraram em média 9,8 alelos por *locus*. Nesses dois trabalhos, o número relativamente baixo de alelos por *locus* pode ser explicado pelo fato de que, em ambos os casos, os conjuntos de variedades analisados, apesar de mais numerosos, são constituídos exclusivamente por variedades viníferas de origem européia e pertencentes a uma mesma espécie (*V. vinifera*).

Portanto, pode-se concluir que o conjunto de variedades de videira analisadas no presente trabalho, apesar de não ser muito numeroso, apresenta uma diversidade genética relativamente alta, possivelmente por incluir variedades viníferas de origem européia, variedades copa de origem americana e, principalmente, por incluir 15 variedades de porta-enxertos que na maioria dos casos são variedades híbridas originadas a partir de cruzamentos interespecíficos. Resultados semelhantes a esse estudo foram obtidos por This et al. (2004) que, analisando 46 variedades de videira, encontraram em média 17 alelos por *locus*. De acordo com esses autores, o elevado número de alelos por *locus* encontrado foi devido a combinação de variedades de *V. viníferas* e porta-enxertos híbridos interespecíficos que constituíram o conjunto de variedades analisadas.

Tabela 4 – Parâmetros genéticos para os sete marcadores nas 27 variedades analisadas. Onde: PI: probabilidade de identidade; He: heterozigosidade esperada; Ho: heterozigosidade observada; e PIC: conteúdo de informação polimórfica.

<i>Locus</i>	Tamanho de amostra	Nº de alelos	PI	He	Ho	PIC
VVMD7	27	14	0,017	0.9040	0.9259	0,904
VVMD25	25	15	0,045	0.8320	0.8800	0,832
VVMD27	23	17	0,013	0.9178	1,000	0,918
VVMD28	27	14	0,019	0.8992	1,000	0,899
VVS2	22	19	0,012	0.9205	1,000	0,92
VrZAG62	22	15	0,013	0.9184	1,000	0,918
VrZAG79	26	10	0,043	0.8454	0.7692	0,845
Média	-	14,43	0,023143	0.8873	0.8943	0,890857
Total	-	101	1,27 x 10⁻¹²	-	-	-

A heterozigosidade esperada variou de 0,832 para o *locus* VVMD25 a 0,9205 para o *locus* VVS2, com média igual a 0,8873. A heterozigosidade observada variou de 0,7692 para o *locus* VrZAG79 a 1,000 para os *loci* VVMD27, VVMD28, VVS2 e VrZAG62, com média igual a 0,8943. Dos 7 marcadores analisados seis apresentaram valores de heterozigosidade observada superiores aos valores esperados para a condição de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Esse excesso de indivíduos heterozigotos pode ter sido causado pela seleção para qualidade e produtividade feita em gerações precoces e que foi preservado ao longo da multiplicação vegetativa que é comumente utilizada para a propagação dessa espécie. Uma vez que a videira é bastante sensível à depressão por endogâmia, em geral, as melhores performances são obtidas com indivíduos heterozigotos (Lopes et al., 1999). Apenas no caso do *locus* VrZAG79 a heterozigosidade observada foi inferior a esperada, o que está de acordo com resultados obtidos em um trabalho com abordagem similar onde foi utilizado esse mesmo *locus* microssatélite (Santana et al., 2008).

Os *loci* que apresentaram os maiores valores de conteúdo de informação polimórfica (PIC) foram VVS2 (PIC = 0,92), VVMD27 (PIC = 0,918) e VrZAG62 (PIC = 0,918). Já os que apresentaram os menores valores foram o VVMD25 (PIC = 0,832) e o VrZAG79 (PIC = 0,845). O menor

conteúdo informativo observado para esses 2 *loci* se deve ao fato de que as frequências alélicas não serem distribuídas de forma equitativa, sendo que poucos alelos concentraram grande parte das frequências alélicas, o que levou a um desvio da condição de máximo conteúdo informativo de um *locus*. A condição de máximo conteúdo informativo ocorre quando todos os alelos apresentam frequências iguais (Sefc et al., 1999; Tessier et al., 1999). No caso do *locus* VVMD25, apenas dois alelos (VVMD25-11 e VVMD25-12) concentraram 54% das frequências alélicas. Já no caso do *locus* VrZAG79, quatro alelos (VrZAG79-3, VrZAG79-5, VrZAG79-6, VrZAG79-8) concentraram 74,9% das frequências alélicas. Essas distribuições das frequências alélicas observadas nesses dois *loci* explicam o fato deles apresentarem os menores valores de PIC, indicando que eles geram o menor conteúdo informativo sobre o conjunto de variedades analisadas neste trabalho.

Os gráficos da Figura 1 mostram as frequências para os *locus* VVS2, que apresentou o maior valor de PIC, e VVMD25, que apresentou o menor valor de PIC. Como pode ser observado, no caso do *locus* VVMD25, apesar do número relativamente alto de alelos (15), houve uma distribuição pouco equitativa das frequências alélicas. Já para o *locus* VVS o número de alelos também foi alto (17), mas a distribuição das frequências alélicas foi mais equitativa, o que explica sua maior eficiência para a diferenciação dos genótipos analisados.

Os menores valores de probabilidade de identidade (PI) foram observados com os *loci* VVS2 (0,012), VrZAG62 (0,013) e VVMD27 (0,013). Os *loci* que apresentaram maiores valores de PI foram VVMD25 (0,045) e VrZAG79 (0,043). Estes valores estão em perfeita concordância com os valores de PIC, ou seja, os *loci* que apresentaram maiores valores de PIC são os mesmos que apresentaram menores valores de PI (VVS2, VrZAG62 e VVMD27) e os que apresentaram menores valores de PIC são os mesmos que apresentaram maiores valores de PI (VVMD25, VrZAG79). Dessa forma, observou-se que há uma tendência de concordância entre os diferentes parâmetros que medem o conteúdo informativo de cada *locus*, o que

demonstra que os dados obtidos foram bastante robustos no que se refere a caracterização dos genótipos estudados e que os marcadores microssatélites utilizados foram muito eficientes em relação a capacidade de distinção varietal.

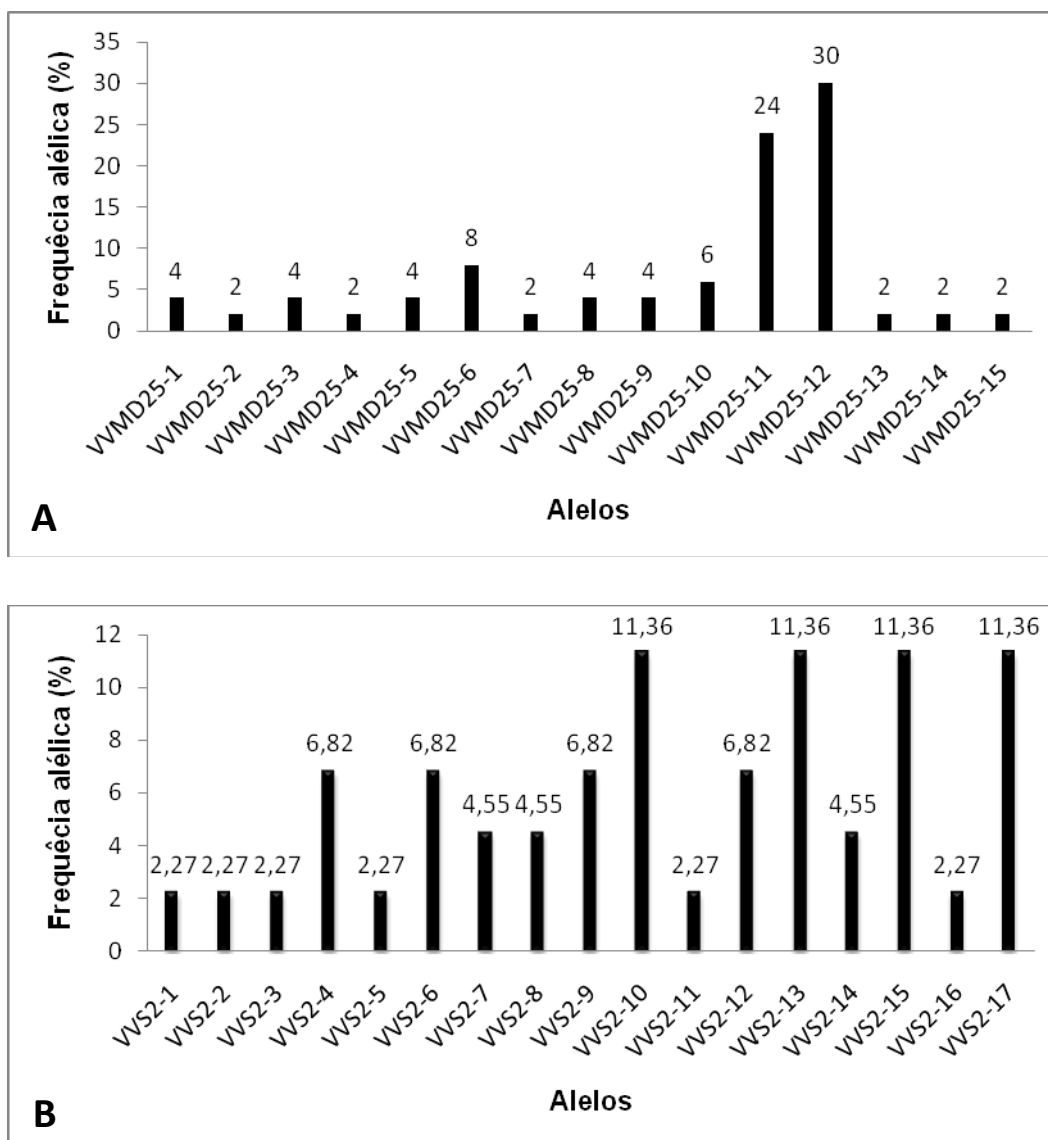


Figura 1 – Gráfico mostrando a distribuição das frequências alélicas em 2 *loci* SSR (A: VVMD25 e B: VVS2).

Para verificar o número mínimo de marcadores necessários para diferenciar todos os genótipos foi construído um gráfico (Figura 3) relacionando a PI em função do número de *loci* considerados. Inicialmente foi considerado o *locus* com menor valor de PI individual (VVS2). Em

seguida foi calculada a PI acumulada da combinação dos 2 *loci* com menores valores de PI individuais (VVS2 e VVMD25), e assim por diante. Assim, foram calculados valores de PI para as 7 combinações de 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 *loci* que foram mais eficientes para a distinção entre os genótipos analisados.

Como pode ser verificado no gráfico da Figura 2, considerando-se apenas a combinação dos dois *loci* com menores valores de PI individuais (VVS2 e VrZAG62), a probabilidade de identidade atingiu um valor relativamente baixo ($PI = 1,56 \times 10^{-4}$). Considerando a combinação dos sete *loci* utilizados, a PI acumulado foi igual a $1,27 \times 10^{-12}$, demonstrando uma grande eficiência dos *loci* utilizados para a diferenciação das variedades analisadas.

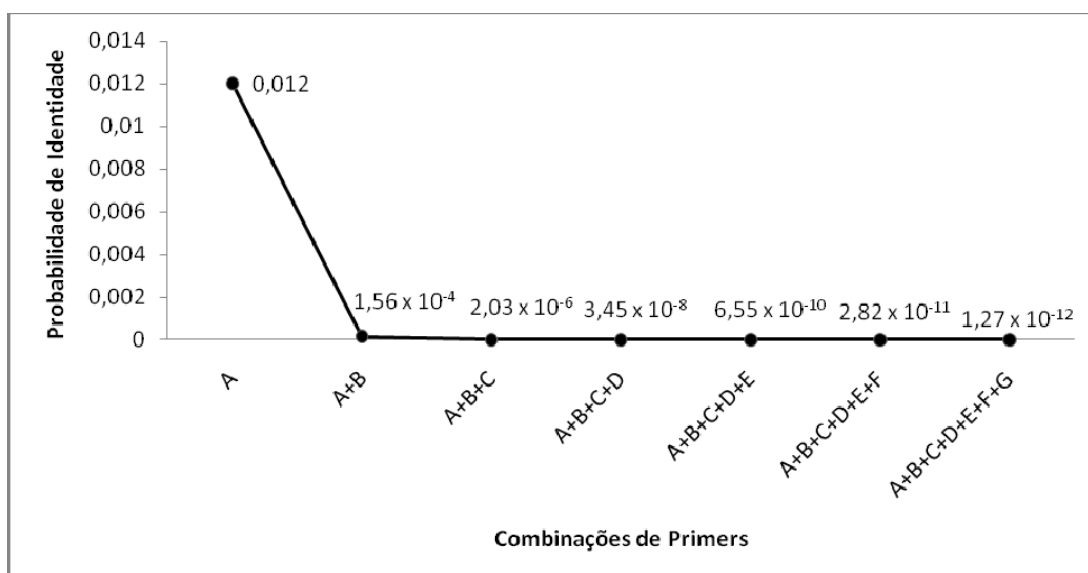


Figura 2 – Gráfico mostrando a variação da PI em função do número de *loci* considerados. (A=VVS2; B=VrZAG62; C=VVMD27; D=VVMD7; E= VVMD28; F=VrZAG79; G=VVMD25).

Considerando-se todos os sete marcadores, foram identificados nove alelos exclusivos das variedades viníferas, 6 exclusivos das variedades copa americanas e 39 exclusivos dos porta-enxertos. Como os três grupos apresentam números de indivíduos bastante distintos (oito viníferas, quatro americanas e 15 porta-enxertos), o número absoluto de alelos exclusivos não permite a comparação da abundância de alelos exclusivos em cada

grupo. Para possibilitar esta comparação, foram calculadas as relações entre o número de alelos exclusivos de cada grupo e o número de indivíduos que compõem o grupo ($R = Ae/N$). Para as 8 variedades viníferas o R é 1,125, para as 4 variedades americanas o R é 1,5 e para os 15 porta-enxertos o R é 2,714. O valor de R para os porta-enxertos foi bem maior que os demais, indicando que a grande quantidade de alelos exclusivos dos porta-enxertos não é devida somente ao maior número de indivíduos que compõem o grupo, mas também se deve a grande diversidade genética entre as variedades que compõem o grupo. Esses resultados estão de acordo com o esperado, uma vez que o grupo dos porta-enxertos é composto por variedades híbridas originadas a partir de cruzamento entre espécies na maioria das vezes distintas geneticamente.

Como pode ser observado na Tabela 5, exceto para a variedade 'Pinot Noir', cada um dos genótipos identificados apresentou alelo exclusivo em pelo menos 1 *locus*. As variedades 'R110' e 'IAC 572' foram as que apresentaram o maior número de *loci* com alelos exclusivos (6 *loci*) enquanto as variedades 'Chardonnay' e 'Cabernet Franc' foram as que apresentaram o menor número (1 *locus*).

Tabela 5 – Número de *locus* que apresentaram alelos exclusivos para cada variedade.

Variedade	Nº de <i>loci</i> que apresentaram alelos exclusivos	<i>Loc</i> i que apresentaram alelos exclusivos
Pinot Noir	0	-
Cabernet Franc	1	VVS2
Chardonnay	1	VVMD28
3309	2	VVMD27, VVS2
Bordô	2	VVMD7, VVMD27
Merlot	2	VVS2, VrZAG62
Rupestris du Lot	2	VVMD27, VrZAG62
Syrah	2	VVMD28, VrZAG62
Gravesac	3	VVMD7, VVMD27, VVS2
Moscato	3	VVMD25, VVMD27, VrZAG62
Niágara Branca	3	VVMD7, VVMD27, VrZAG79
Niágara Rosada	3	VVMD7, VVMD27, VrZAG79
1103 Paulsen	3	VVMD7, VVMD25, VVMD28
SO4	3	VVMD7, VVMD28, VrZAG62
Traviú	3	VVMD7, VVMD25, VVMD27
Cabernet Sauvignon	4	VVMD25, VVMD27, VVS2, VrZAG62

IAC766	4	VVMD7, VVMD25, VVMD28, VVS2
R99	4	VVMD25, VVMD27, VVS2, VrZAG62
Sauvignon Blanc	4	VVMD25, VVMD27, VVS2, VrZAG62
101-14	5	VVMD7, VVMD27, VVMD28, VVS2, VrZAG62
1045 Paulsen	5	VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVS2, VrZAG 62
161-49	5	VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVS2
420 A	5	VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVS2, VrZAG 62
Kober 5BB	5	VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVS2, VrZAG62
Violeta	5	VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVS2, VrZAG62
IAC572	6	VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVS2, VrZAG62, VrZAG79
R110	6	VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVS2, VrZAG62, VrZAG79

3.2. Análise da Diversidade Genética

A matriz de dissimilaridade genética baseada no índice C.S.Chord evidenciou a existência de um alto nível de variabilidade genética entre as variedades. A dissimilaridade genética variou de 0 a 0,9003, com média igual a 0,79. O menor grau de dissimilaridade genética foi observado entre as variedades ‘Niágara Rosada’ e ‘Niágara Branca’ (0) que mostraram perfis alélicos idênticos para todos os *loci* analisados, o que era esperado, uma vez que a ‘Niágara Rosada’ foi originada a partir de uma mutação espontânea da ‘Niágara Branca’. No Brasil, a variedade ‘Niágara Branca’ foi introduzida no ano de 1894, disseminando-se a partir da região de Jundiaí, São Paulo. Em 1933 surgiu, por mutação somática em uma planta de ‘Niágara Branca’ no campo, a ‘Niágara Rosada’ que, em menos de dez anos, promoveu radical transformação na produção vitícola paulista (SOUSA, 1969). Dessa forma, pode-se inferir que o nível de dissimilaridade genética entre essas duas variedades é tão baixo que seria necessária uma cobertura muito mais ampla do genoma, utilizando um grande número de marcadores para a identificação de polimorfismo ao nível de DNA entre esses dois genótipos. Outra opção seria o uso de marcadores com distribuição mais ampla no genoma do que os microssatélites, tal como o polimorfismo de base única (SNP – “Single Nucleotide Polymorphism”)

utilizando os dados disponíveis do sequenciamento genômico e de ESTs da videira ou marcadores com maior poder multiplex, tal como o polimorfismo do comprimento do fragmento amplificado (AFLP).

A análise de agrupamento pelo método do vizinho mais próximo com base na matriz de dissimilaridade evidenciou a formação de quatro grupos (Figura 3).

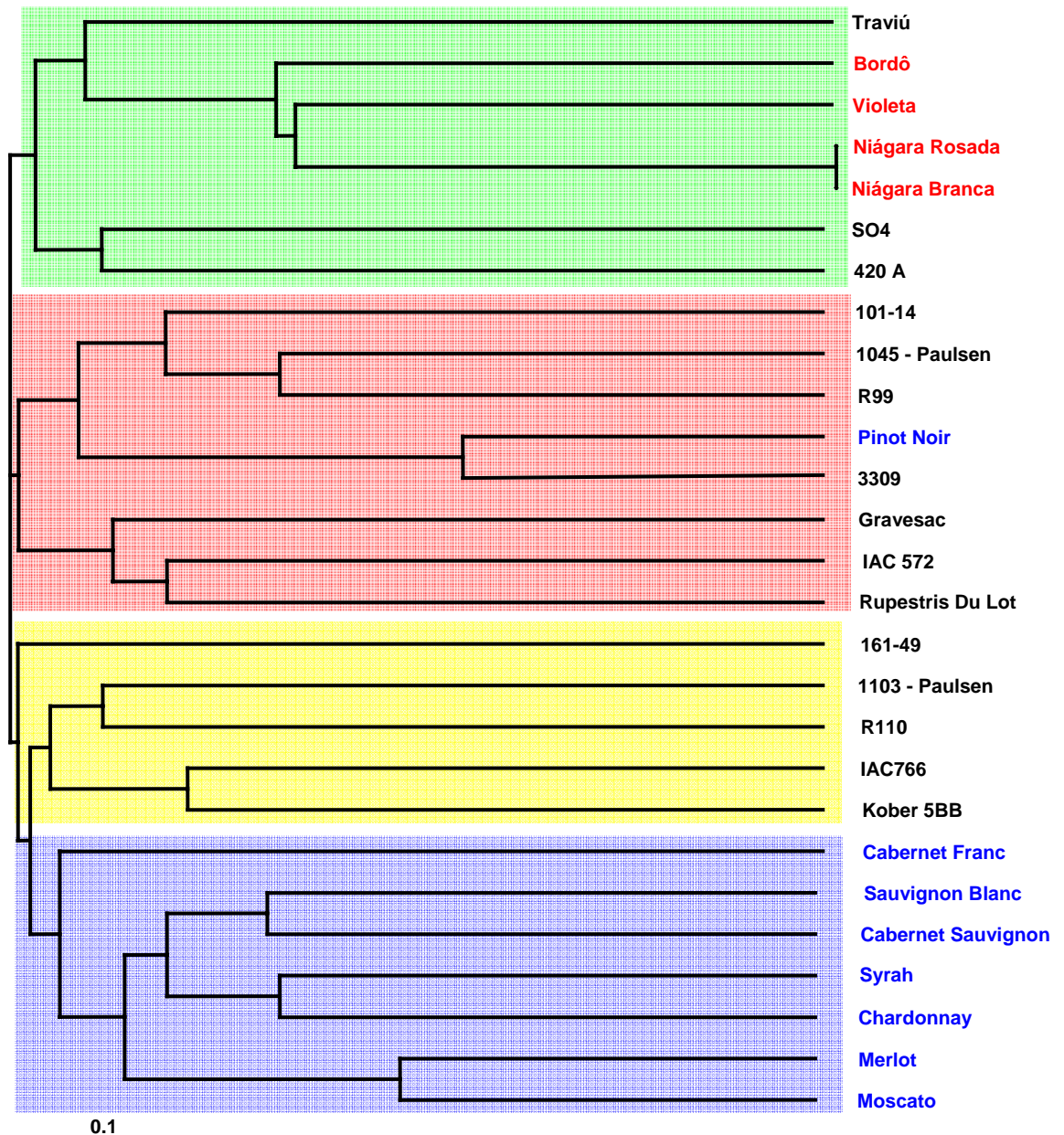


Figura 3 – Dendrograma obtido pelo método do vizinho mais próximo ilustrando as relações filogenéticas entre 27 variedades de videira e dividido em quatro grupos de similaridade genética. Os nomes das variedades viníferas estão descritos em azul, das copas americanas em vermelho e dos porta-enxertos em preto.

O grupo 1 (sombreado em verde), formado por sete variedades, apresentou-se dividido em dois subgrupos. O primeiro subgrupo ficou constituído pelas quatro variedades copa americanas ('Niágara Rosada', 'Niágara Branca', 'Bordô' e 'Violeta') e pelo porta-enxerto 'Traviú'. As variedades 'Niágara Rosada', 'Niágara Branca' são variedades americanas da espécie *Vitis labrusca*. Já as variedades 'Bordô' e Violeta são variedades híbridas, sendo que ambas possuem variedades da espécie *V. labrusca* como genitoras. O porta-enxerto 'Traviú', que foi o que mostrou menor similaridade com os outros membros deste subgrupo, é um híbrido originado a partir de cruzamentos envolvendo 3 espécies (*V. riparia*, *V. rupestris* e *V. cordifolia*). O outro subgrupo ficou constituído por dois porta-enxertos, 'SO4' e '420 A', que são variedades híbridas, ambas originadas a partir do cruzamento entre *V. berlandieri* e *V. riparia*.

O grupo 2 (sombreado em rosa) ficou formado por sete variedades de porta-enxertos mais a vinífera 'Pinot Noir', que provavelmente não foi agrupada corretamente porque, no caso dessa variedade, não foram obtidos produtos de amplificação para 4 dos 7 *loci* testados, sendo possível obter os dados de somente para três *loci*. Dentro desse grupo ocorreu a formação de dois subgrupos. Um dos subgrupos é composto pelos porta-enxertos '101-14', '1045 Paulsen', 'R99', '3309' e pela vinífera 'Pinot Noir'.

As variedades '3309' e '101-14' são híbridos originados a partir do cruzamento entre *V. riparia* x *V. rupestris*. Já a 'R99' é um híbrido simples originado do cruzamento entre *V. berlandieri* e *V. rupestris*, e '1045 Paulsen' é um híbrido obtido pelo cruzamento envolvendo três espécies (*V. berlandieri*, *V. rupestris* e *V. vinifera*). Como pode ser observado, essas quatro variedades possuem em comum *V. rupestris* como um dos genitores, sendo que duas delas ('3309' e '101-14') também possuem como genitor *V. riparia* e outras duas ('R99' e '1045 Paulsen') possuem como genitor *V. berlandieri*, o que explica a similaridade genética entre elas. O segundo subgrupo é constituído pelos porta-enxertos 'Gravesac', 'IAC 572' e 'Rupestris Du Lot'. A similaridade genética entre esses três porta-enxertos pode ser explicada pelo fato da variedade 'Rupestris Du Lot' pertencer à

espécie *V. rupestris*, e 'Gravesac' e 'IAC 572' serem híbridos compostos, formados a partir de cruzamentos complexos envolvendo *V. rupestris* como um dos genitores.

O grupo 3 (caixa em amarelo) é formado por cinco variedades de porta-enxertos ('161-49', '1103 Paulsen', 'R110', 'IAC 766' e 'Kober 5 BB'). As variedades '161-49', '1103 Paulsen', 'R110' e 'Kober 5BB' são híbridos simples e todos possuem *V. berlandieri* como um dos genitores. O '161-49' e 'Kober 5BB' foram originados do cruzamento entre *V. ripária* e *V. berlandieri*, enquanto '1103 Paulsen' e 'R110' foram originados do cruzamento entre *V. rupestris* e *V. berlandieri*. Já o porta-enxerto brasileiro 'IAC 766' é um híbrido complexo que apesar de não possuir *V. berlandieri* como genitor, foi originado através de cruzamentos complexos envolvendo *V. ripária* e *V. rupestris*, o que explica sua similaridade com as demais variedades que constituem esse grupo.

O grupo 4 (sombreado em azul) é constituído por sete das oito variedades viníferas analisadas neste trabalho ('Cabernet Franc', 'Sauvignon Blanc', 'Cabernet Sauvignon', 'Syrah', 'Chardonnay', 'Merlot' e 'Moscatto'). Dentro desse grupo, a variedade 'Cabernet Franc' foi a que mais divergiu em relação às demais, enquanto que a maior similaridade foi observada entre as variedades 'Merlot' e 'Moscatto'.

Os resultados obtidos através da análise de agrupamento pelo método do vizinho mais próximo com base no índice de dissimilaridade genética CSchord, permitiram o agrupamento correto da maioria das variedades de acordo com a espécie, no caso das viníferas e das Niágaras Branca e Rosada, e de acordo com a similaridade entre os genitores, no caso das variedades copas americanas 'Violeta' e 'Bordô' e no caso das variedades de porta-enxertos, que são híbridos interespecíficos.

Para analisar a estruturação genética das variedades foi realizada uma análise de dispersão gráfica PCA ("Principal Coordinate Analysis"), apresentada na Figura 4. A coordenada 1 (eixo horizontal) apresentou uma

explicação de 26,26% enquanto a coordenada 2 (eixo vertical) apresentou 20,44%.

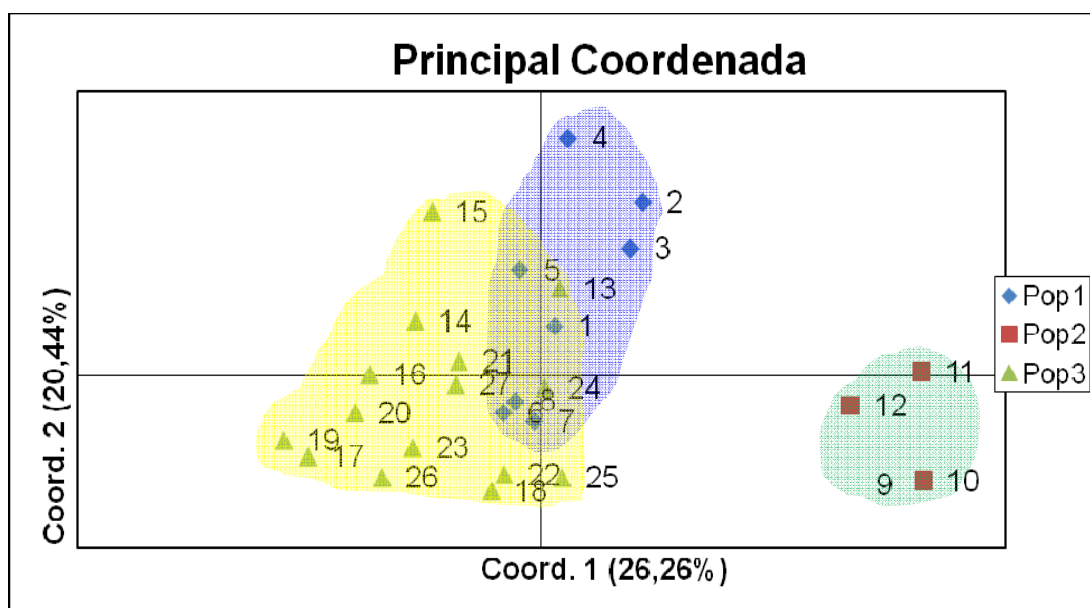


Figura 4 – Análise das coordenadas principais das 27 variedades de videira. A população 1 é formada por 8 viníferas (números 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8), a população 2 por 4 variedades de copas americanas (números 9, 10, 11, 12) e a população 3 por 15 porta-enxertos (números 13 a 27). Onde: (1) ‘Moscato’, (2) ‘Chardonnay’, (3) ‘Syrah’, (4) ‘Cabernet Sauvignon’, (5) ‘Merlot’, (6) ‘Cabernet Franc’, (7) ‘Pinot Noir’, (8) ‘Sauvignon Blanc’, (9) ‘Niágara Rosada’, (10) ‘Niágara Branca’, (11) ‘Bordô’, (12) ‘Violeta’, (13) ‘Gravesac’, (14) ‘Kober 5BB’, (15) ‘Rupestris du Lot’, (16) ‘101-14’, (17) ‘R99’, (18) ‘420 A’, (19) ‘1045 Paulsen’, (20) ‘161-49’, (21) ‘R110’, (22) ‘3309’, (23) ‘1103 Paulsen’, (24) ‘SO4’, (25) ‘Traviú’, (26) ‘IAC766’, (27) ‘IAC572’.

O grupo formado pelas quatro variedades copa de origem americana (população 2) foi o que apresentou o maior nível de estruturação. ‘Niágara Rosada’ e ‘Niágara Branca’ ficaram sobrepostas no gráfico, uma vez que apresentaram perfis de bandas idênticos para os sete *loci* analisados. Também foi possível notar que as variedades ‘Bordô’ e ‘Violeta’ (números 11 e 12) são mais similares entre si do que em relação às Niágaras (números 9 e 10).

Em relação a população 1 (viníferas), considerando apenas a coordenada 1, das 8 variedades viníferas, 4 ficaram posicionadas a direita (números 1, 2, 3 e 4) e 4 ficaram posicionadas a esquerda (números 5, 6, 7 e 8) do eixo vertical. No entanto, como pode ser verificado no gráfico, as variedades posicionadas à esquerda do eixo vertical estão muito próximas a ele, o que evidencia que apesar da análise de dispersão gráfica ter posicionado as variedades viníferas em lados opostos do eixo, não houve um grande distanciamento entre elas, indicando certa tendência, de acordo com a similaridade genética das mesmas, de se manterem agrupadas. Considerando apenas a coordenada 2, 5 variedades ficaram acima (números 1, 2, 3, 4 e 5) e três ficaram posicionadas abaixo (números 6, 7 e 8) do eixo horizontal. Assim como no caso da coordenada 1, as três variedades posicionadas abaixo do eixo horizontal estão situadas próximas a ele, evidenciando novamente a tendência das variedades se manterem agrupadas apesar de posicionadas em lados opostos da coordenada 2.

Em relação aos porta-enxertos (população 3), considerando apenas a coordenada 1, 12 das 15 variedades ficaram posicionados a esquerda do eixo vertical (números 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 26 e 27) e, das três restantes, duas estão posicionadas adjacentes ao eixo vertical (números 13 e 25) e uma está situada sobre ele (número 24). Considerando apenas a coordenada 2, 11 variedades ficaram posicionadas abaixo (números 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, e 27) e quatro variedades ficaram posicionadas acima do eixo horizontal (13, 14, 15 e 21). Portanto, na maioria dos casos, as variedades pertencentes a um mesmo grupo, mesmo que posicionadas em lados diferentes de um dos eixos, não se distanciam muito dos mesmos, o que indica certa tendência dos genótipos pertencentes a um mesmo grupo se manterem agrupados. Portanto, apesar de não ter ocorrido uma clara estruturação em relação aos grupos das viníferas e dos porta-enxertos, foi possível notar uma tendência de agrupamento das variedades pertencentes ao mesmo grupo.

O aplicativo computacional Structure foi também utilizado para analisar a estruturação genética das variedades estudadas. De acordo com o critério de Evano (2005), o ΔK ótimo foi obtido quando $K=4$, indicando que a estruturação máxima foi observada quando a amostra foi dividida em 4 grupos. Como pode ser constatado na Figura 6, foi observado alto grau de estruturação apenas em relação ao grupo formado pelas variedades de copas americanas (Azul). Em relação aos outros dois grupos (viníferas e porta-enxertos), não ocorreu uma clara estruturação, o que pode ser explicado pelos altos níveis de diversidade genética observada dentro desses grupos, o que pôde ser comprovado pelos resultados da análise molecular de variância molecular (AMOVA).

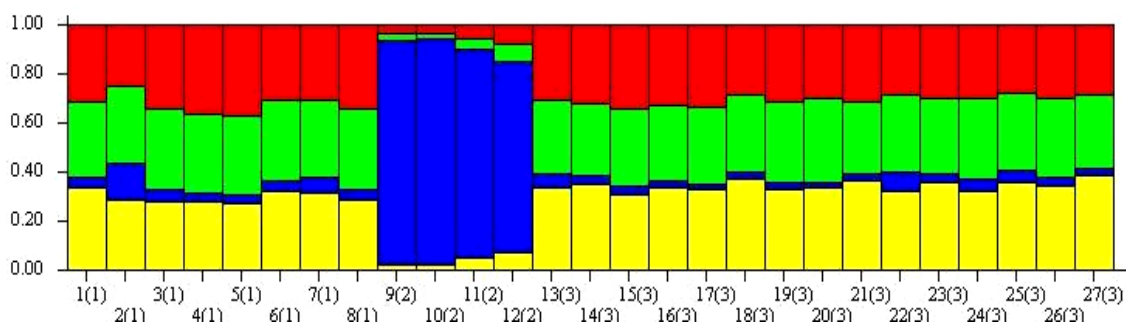


Figura 5 – Análise da estruturação genética de 27 variedades de videira. (No eixo x, os números fora dos parênteses representam as 27 variedades de videira analisadas, de acordo com a ordem da Tabela 1. Os números entre parênteses representam os 3 grupos de variedades, sendo que (1) corresponde ao grupo das viníferas, (2) ao grupo das copas americanas e (3) ao grupo dos porta-enxertos. O eixo y é uma escala de referência arbitrária.

Para analisar a distribuição da variabilidade entre e dentro dos grupos foi realizada a análise molecular de variância (AMOVA), cujo resultado está apresentado na Tabela 6. Como pode ser verificado, 85% da variação total foi observada dentro dos grupos e apenas 15% da variação total foi observada entre os grupos. Isso mostra que os grupos são constituídos por variedades que possuem níveis relativamente elevados de dissimilaridade. A elevada dissimilaridade média entre os porta-enxertos contribuiu consideravelmente para o alto valor da variância genética dentro dos grupos (85%) pois, além de ser o grupo geneticamente mais diverso, é também o

mais numeroso, sendo composto por 15 das 27 variedades analisadas neste trabalho.

Tabela 6 – AMOVA de 27 variedades de videira (8 viníferas, 4 copas americanas e 15 porta-enxertos).

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Variância Estimada	Porcentagem de Variância Molecular
Entre Grupos	2	28,053	14,026	1,045	15 %
Dentro dos Grupos	24	139,725	5,822	5,822	85 %
Total	26	167,778		6,867	100 %

4. CONCLUSÕES

Os dados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

- 1) Os marcadores microssatélites utilizados nesse trabalho são apropriados para realizar a caracterização da identidade genética de plantas matrizes e de mudas de videira;
- 2) O conjunto das 27 variedades de videira do germoplasma da EPAMIG apresentou uma variabilidade genética relativamente alta por incluir tanto variedades copa viníferas da espécie *Vitis vinifera* como copas americanas *Vitis labrusca* e porta-enxertos híbridos interespecíficos.
- 3) A análise de agrupamento pelo método do vizinho mais próximo agrupou corretamente a maioria das variedades de acordo com a espécie, no caso das variedades viníferas (*V. vinifera*) e das copas americanas 'Niágara Rosada' e 'Niágara Branca' (*V. labrusca*). No caso das variedades copas americanas 'Bordô' e 'Violeta' e das variedades de porta-enxertos, o agrupamento ocorreu de acordo com a similaridade genética entre as espécies genitoras das mesmas.
- 4) O grupo constituído pelas variedades copas americanas foi o que apresentou o maior grau de estruturação genética. Os outros dois grupos (viníferas e porta-enxertos) não se apresentaram claramente estruturados.
- 5) A maior parte da variância molecular total foi observada dentro dos grupos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL, 2009. **Anuário de Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria. 502 p., 2008.
- ARADHYA, M. K.; DANGL, G. S.; PRINS, B. H.; BOURSQUOT, J. M.; WALKER, M. A.; MEREDITH, C. P.; SIMON, C. J. Genetic structure and differentiation in cultivated grape, *Vitis vinifera* L. **Genetical Research**. 81: 179-192. 2003.
- ASENSIO, M. L.; VALDES, E.; CABELLO, F. Characterisation of some Spanish White grapevine cultivars by morphology and aminoacid analysis. **Scientia Horticulturae**. 93: 289-299. 2002.
- BOURSIQUOT, J. M.; THIS, P. Les nouvelles techniques utilisées en ampélographie: informatique et marquage. In: La viticulture à laube du IIIème Millénaire. **Journal international des sciences de la vigne et du vin**, pp. 13-23. 1996.
- BOWERS, J. E.; DANGL, G. S.; MEREDITH, C. P. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. **American Journal of Enology and Viticulture**. 50: 243-246. 1999.
- BOWERS, J. E.; DANGL, G. S.; VIGNANI, R.; MEREDITH, C. P. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). **Genome**. 39: 628-633. 1996.
- CAVALLI-SFORZA L. L.; EDWARDS W. F. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. **American Journal Human Genetic**, 19: 233-257. 1967.
- CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of simple sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biological Report**.4: 299-306. 2001.
- DETTWEILER, E.; JUNG, A.; ZYPRIAN, E.; TÖPFER, R. Grapevine cultivar Müller-Thurgau its true to type descent. **Vitis**. 39: 63-65. 2000.
- DOYLE, J. J.; DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**. 12: 13-15.1990.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**. 14: 2611-2620. 2005.

- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolution Bioinformatics** .Online. 1: 47-50. 2005.
- GALET, P. Dictionnaire encyclopédique des cépages. Paris: Hachette. 2000.
- GALET, P. Précis d'ampélographie pratique. In: Galet P (ed) Imprimerie Déhan, 6^{ème} edn. Montpellier, p 257. 1991.
- GENRES. European VitisDatabase.Web site at: (<http://www.genres.de/eccdb/vitis/>). Data da consulta: 05/08/2009.
- GLAUBITZ, J. C. CONVERT: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. **Molecular Ecology Notes**. 4: 309-310. 2004.
- IPGRI UPOV e OIV. Descriptores para la Vid (Vitis spp.) Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales, Gêneve, Switzerland; **Oficina Internacional de la Vinã y del Vino**, Paris, France; Internacional Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 1997.
- LAIADI, Z.; BENTCHIKOU, M. M.; BRAVO, G.; CABELLO, F.; MARÍNEZ-ZAPATER. Molecular identification and genetic relationships of Algerian grapevine cultivars maintained at the germoplasm collection of Skikda (Algeria). **Vitis**. 48: 25-32. 2009.
- LEÃO, P. C. S.; RIAZ, S.; GRAZIANI, R.; DANGL, G. S.; MOTOIKE, S. Y.; WALKER, M. Characterization of a Brazilian Grape Germplasm Collection Using Microsatellite Markers. **American Journal of Enology and Viticulture**. 60: 517-524 . 2009.
- LIU, K. J.; MUSE, S. V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. **Bioinformatics**. 21: 2128-2129. 2005.
- LIU, K. J.; MUSE, S. V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. **Bioinformatics**. 21: 2128–2129. 2005.
- MELLO, L. M. R. Vitivinicultura brasileira: Panorama 2007. **EMBRAPA Uva e Vinho: Artigos técnicos**. 2008.
- MENEGHETTI, S.; COSTACURTA, A.; CRESPIA, M.; MAUL, E.; HACK, R.; REGNER, F. Deepening inside the homonyms of 'Wildbacher' by means of SSR markers. **Vitis**. 48: 123-129. 2009.

- ORTIZ, J. M.; MARTIN, J. P.; BORREGO, J.; CHAVEZ, J.; RODRIGUES, I.; MUNOZ, G.; CABELLO, F. Molecular and morphological characterization of a *Vitis* gene bank for the establishment of a base collection. **Genetic Resources and Crop Evolution**. 51: 403-409. 2004.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**. 6: 288-295. 2006.
- PRITCHARD, J.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**. 155: 945-959. 2000.
- SAITOU, N.; NEI, M.. 'The Neighbor-Joining Method – a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology Evolution**. 4: 406-425. 1987.
- SANTANA, J. C.; HIDALGO, E.; DE LUCAS, A. I.; RECIO, P.; ORTIZ, J. M.; MARTIN, J. P. Identification and relationships of accessions grown in the grapevine (*Vitis vinifera* L.) Germplasm Bank of Castilla y León (Spain) and the varieties authorized in the VQPRD areas of the region by SSR-marker analysis. **Genetic Resource and. Crop Evolution**. 55: 573-583. 2007.
- SEFC, K. M.; LEFORT, F.; GRANDO, M. S.; SCOOT, K. D.; STEINKELLNER, H.; THOMAS, M.R. Microsatellites markers for grapevine: a state of the art. **Molecular Biology & Biotechnology of Grapevine**. Cap. 17. 1-30p. 2001.
- SEFC, K. M.; LOPES, M. S.; LEFORT, F.; BOTTA, R.; ROUBELAKISANGELAKIS, K. A.; IBAÑEZ, J.; PEJIC, I.; WAGNER, H. W.; GLOSSL, J.; STEINKELLNER, H. Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**. 100: 498-505. 2000.
- SEFC, K. M.; REGNER, F.; TURETSCEIK, E.; GLOSSL, J.; STEINKELLNER, H. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. **Genome**. 42: 367-373. 1999.
- TESSIER, C.; DAVID, J.; THIS, P.; BOURSQUOT, J. M.; CHARRIER, A. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. **Theoretical and Applied Genetics**. 89: 171-177. 1999.

- THIS, P.; JUNG, A.; BOCCACCI, P.; BORREGO, J.; BOTTA, J.; COSTANTINI, L.; CRESPIAN, M.; DANGL, G. S.; EISENHELD, C.; FERREIRA-MONTEIRO, F.; GRANDO, S.; IBÁÑEZ, J.; LACOMBE, T.; LAUCOU, V.; MAGALHÃES, R.; MEREDITH, C. P.; MILANI, N.; PETERLUNGER, E.; REGNER, F.; ZULINI, L.; MAUL, E. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, 109: 1448-1458. 2004.
- THOMAS, M. R.; SCOTT, N. S. Microsatellites repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysis as sequenced-targeted sites (STSs). **Theoretical and Applied Genetics**. 86: 985-990. 1993.
- WAITS L. P.; LUIKART, G.; TABERLET, P. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. **Molecular Ecology**. 10: 249-256. 2001.
- YEH, F.C.; BOYLE, T. J. B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. **Belgian Journal of Botany**. 129- 157. 1997.

CAPÍTULO II

Identificação e Avaliação da Incidência de Viroses em Variedades de Videira

RESUMO

A inexistência de um sistema oficial de controle e certificação da qualidade fitossanitária de mudas enxertadas de videira tem favorecido a transmissão de diversas viroses, através de materiais vegetativos contaminados. Assim, os objetivos deste trabalho foram: a) identificar e mapear a ocorrência de viroses na coleção de plantas matrizes de videira da Fazenda Experimental de Caldas no Núcleo Tecnológico EPAMIG Uva e Vinho, que são utilizadas para produção de mudas enxertadas; e b) analisar a evolução da carga viral ao longo do ciclo produtivo das plantas, utilizando o método sorológico DAS-ELISA. Para tanto, foram analisadas plantas matrizes de seis variedades copa, ('Syrah', 'Chardonnay', 'Cabernet Sauvignon', 'Merlot', 'Bordô' e 'Niágara Rosada'), quatro variedades de porta-enxertos ('Traviú', '1103 Paulsen', 'IAC 572' e 'IAC 766') e nove combinações de mudas enxertadas produzidas a partir das plantas matrizes. Foram também analisados 12 clones da variedade 'Bordô' pertencentes a um programa de seleção clonal desenvolvido na EPAMIG. As plantas foram testadas para os seguintes vírus: GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-6, GVA, GFkV e GFLV. Os clones 'Bordô' apresentaram uma alta taxa de infecção pelo GLRaV-2, que foi detectado em 91,66% das amostras avaliadas. O GLRaV-1 foi detectado nos clones 'Bordô' 3 e 17 e o GLRaV-3 nos clones 'Bordô' 3 e 7. Analisando plantas matrizes e as mudas produzidas a partir delas, apenas o GLRaV-3 foi detectado, estando presente nas matrizes de 'Niágara Rosada', nos porta-enxertos 'IAC 572' e 'IAC 766', e nas combinações de mudas 'Niágara Rosada/IAC 766' e 'Niágara Rosada/IAC 572'. A análise da variação da carga viral ao longo do ciclo vegetativo evidenciou um aumento da concentração de partículas virais ao longo do ciclo vegetativo da videira para os três vírus analisados (GLRaV-1, GLRaV-2 e GLRaV-3). Os vírus GLRaV-6, GVA, GFkV e GFLV não foram detectados.

Palavras-chave: *Vitis* spp., vírus, indexação sorológica, DAS-ELISA

ABSTRACT

Identification and Evaluation of Viroses in Varieties of Grapevine

The lack of an official control system for phytosanitary certification of grafted grapevines in Brazil has favored the transmission of several viruses due to use of infected plant materials. Thus, the aim of this work was the identification and mapping of viruses occurring in the grapevine collection of Experimental Farm of Caldas - EPAMIG Grape and Wine, used for commercial production of grafted grapevines. The viral titer progress was also evaluated during the phenological cycle of infected plants previously identified, using the serological method DAS-ELISA. Stock plants of six varieties ('Syrah', 'Chardonnay', 'Cabernet Sauvignon', 'Merlot', 'Bordo' and 'Niagara Rosada'), four rootstock varieties ('Traviú', '1103 Paulsen', 'IAC 572' and 'IAC 766') and nine combinations of grafted plantlets were evaluated. Twelve 'Bordo' clones obtained from the clonal selection breeding program of EPAMIG were also evaluated. The plants were tested for the following viruses: GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-6, GVA, GFkV and GFLV. 'Bordo' clones showed a very high rate of GLRaV-2 infection detected in 91.66% of samples analysed. The GLRaV-1 was also detected in 'Bordo' clones 3 and 17 while the GLRaV-3 was detected in 'Bordo' clones 3 and 7. Analyzing stock plants and grafted plantlets produced from them for a set of 7 seven virus, only GLRaV-3 was detected. The GLRaV-3 was detected in 'Niagara Rosada' stock plants and in two rootstocks ('IAC 572' and 'IAC 766') as well as in the grafted plants using these materials. The variation in viral titer along the phenological cycle showed an increase in the concentration of viral particles of the three viruses (GLRaV-1, GLRaV-2, and GLRaV-3) previously detected in analyzed plants. The virus GLRaV-6, GVA, GFkV and GFLV were not detected.

Key words: *Vitis* spp., virus, serological indexing, DAS-ELISA.

1. INTRODUÇÃO

As viroses constituem um dos principais problemas que afetam a viticultura mundial. Em geral estas doenças se caracterizam por induzir a lenta e gradual degenerescência da planta, causando constantes reduções na produção de uvas, podendo levar a perdas totais em variedades sensíveis (Amorim e Kuniyuki, 1997; Moreira et al., 2004). Por não produzirem sintomas perceptíveis em muitas variedades de videira, essas doenças podem ser transmitidas indefinidamente, levando a altas taxas de infecção dos materiais vegetais utilizados (Fajardo et al., 2003; Martelli e Boudon-Padieu, 2006).

Uma questão essencial para a produção de mudas de videira com qualidade é a necessidade de se utilizar plantas comprovadamente livres de viroses. A inexistência de um sistema oficial de controle e certificação da qualidade de mudas tem favorecido a transmissão de diversas doenças, principalmente viroses, através de materiais vegetativos contaminados (Kuhn, 1989; Silva et al., 2002). Sendo assim, a utilização de técnicas apropriadas para diagnóstico de viroses em videira é de extrema importância para garantir a segurança fitossanitária de materiais propagativos.

No Brasil, foram relatados 10 vírus da videira: GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-5, GLRaV-6, GVA, GVB, RSPaV, GFkV e GFLV. Nas principais regiões vitícolas do Brasil, onde os vinhedos foram formados utilizando-se materiais propagativos introduzidos a muitos anos, principalmente do continente europeu, a ocorrência de viroses é comum. Na época em que estes materiais foram introduzidos no país, pouca ou nenhuma seleção sanitária era realizada, o que facilitava a distribuição de material infectado entre regiões e países, especialmente os porta-enxertos, nos quais a infecção viral geralmente é latente (Fajardo et al., 2003).

Os métodos mais utilizados para a identificação de viroses em videira são os testes biológicos, sorológicos e os moleculares (Osman et al., 2008; Engel et al., 2010). No teste biológico, as plantas a serem avaliadas são enxertadas em plantas indicadoras, e observa-se a manifestação dos

sintomas característicos da virose na planta indicadora. Apesar de ser bastante sensível para a detecção das doenças, o teste biológico não permite a identificação precisa e específica do vírus causador dos sintomas, principalmente quando a planta a ser analisada está infectada com mais de um vírus denominado de complexo viral (Osman et al., 2008). Além disso, a reação das plantas indicadoras pode variar de acordo com as condições ambientais e a manifestação dos sintomas pode levar até mais de dois anos para ocorrer, o que torna o teste demorado e oneroso (Kuhn e Fajardo, 2004). Além disso, para evitar possíveis contaminações, é necessário manter o material enxertado em ambiente protegido.

O método sorológico mais utilizado para identificação de viroses em videira é conhecido como ELISA (Clark e Adams, 1977), especialmente o tipo direto de duplo sanduíche (DAS-ELISA). A presença do antígeno, no caso uma proteína viral, presente na seiva infectada, é detectada indiretamente através de uma reação colorimétrica que ocorre devido a ação de uma enzima, em geral uma fosfatase alcalina ou uma peroxidase conjugada a um anticorpo, na presença de um substrato apropriado (Boscia et al., 1997).

Outra forma de detecção de viroses que tem sido empregada de forma crescente e de maneira auxiliar aos testes biológicos e sorológicos é o RT-PCR (Osman et al., 2008; Engel et al., 2010). Nessa técnica de base molecular, o RNA do vírus que infecta a planta é detectado utilizando iniciadores específicos desenhados com complementaridade apenas para o genoma viral, sendo esse amplificado por PCR e visualizado em gel de agarose. Apesar da alta sensibilidade, a RT-PCR apresenta alguns fatores limitantes que dificultam a sua utilização em testes de rotina para um grande número de amostras. A necessidade de transcrição do RNA viral em cDNA e sua posterior amplificação por PCR exige que o RNA extraído da planta a ser analisada esteja livre de polissacarídeos e compostos fenólicos, que estão presentes em grandes quantidades em tecidos foliares da videira, uma vez que tais compostos podem inibir a ação tanto da transcriptase reversa quanto da Taq polimerase (Marinho, 2001). Outro fator que limita a utilização

da RT-PCR em larga escala é o alto custo, devido aos preços elevados dos equipamentos e reagentes necessários para a realização da técnica.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi identificar e mapear a ocorrência de viroses na coleção de plantas matrizes de videira utilizadas para produção de mudas enxertadas localizado na Fazenda Experimental de Caldas do Núcleo Tecnológico EPAMIG Uva e Vinho, e analisar a evolução da carga viral de plantas infectadas ao longo do ciclo produtivo da videira.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal

Neste trabalho foram analisadas plantas matrizes de seis variedades copa, sendo quatro viníferas de origem européia ('Syrah', 'Chardonnay', 'Cabernet Sauvignon' e 'Merlot'), duas variedades americanas ('Bordô' e 'Niágara Rosada'), quatro variedades de porta-enxertos ('Traviú', '1103 Paulsen', 'IAC 572' e 'IAC 766') e oito combinações de mudas enxertadas produzidas a partir das plantas matrizes descritas acima. Foram também analisados 12 clones da variedade 'Bordô' pertencentes a um programa de seleção clonal desenvolvido na EPAMIG (Tabela 1). Todas as plantas utilizadas no trabalho pertencem à coleção de germoplasma de videira da Fazenda Experimental de Caldas no Núcleo Tecnológico EPAMIG Uva e Vinho e foram testadas para os seguintes vírus: GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-6, GVA, GFkV e GFLV.

Tabela 1 - Plantas matrizes, clones e mudas de videira testadas para a presença de 7 vírus.

Variedade	Grupo	Tipo
'Niágara Rosada'	Americana	Matriz
'Bordô'	Vinífera	Matriz
'Syrah'	Vinífera	Matriz
'Merlot'	Vinífera	Matriz
'Cabernet Sauvignon'	Vinífera	Matriz
'Chardonnay'	Vinífera	Matriz
'Traviú'	Porta-enxerto	Matriz
'1103 Paulsen'	Porta-enxerto	Matriz
'IAC 766'	Porta-enxerto	Matriz
'IAC 572'	Porta-enxerto	Matriz
Niágara Rosada/IAC 766	Americana/ Porta-enxerto	Mudas

Niágara Rosada/IAC 572	Americana/ Porta-enxerto	Mudas
Bordô/IAC 766	Americana/ Porta-enxerto	Mudas
Bordô/1103 Paulsen	Americana/ Porta-enxerto	Mudas
Chardonnay/1103 Paulsen	Vinífera/ Porta-enxerto	Mudas
Syrah/1103 Paulsen	Vinífera/ Porta-enxerto	Mudas
Merlot/1103 Paulsen	Vinífera/ Porta-enxerto	Mudas
Merlot/IAC 766	Vinífera/ Porta-enxerto	Mudas
Clone Bordô 3	Seleção Clonal	Acesso
Clone Bordô 6	Seleção Clonal	Acesso
Clone Bordô 7	Seleção Clonal	Acesso
Clone Bordô 8	Seleção Clonal	Acesso
Clone Bordô 10	Seleção Clonal	Acesso
Clone Bordô 12	Seleção Clonal	Acesso
Clone Bordô 13	Seleção Clonal	Acesso
Clone Bordô 15	Seleção Clonal	Acesso
Clone Bordô 16	Seleção Clonal	Acesso
Clone Bordô 17	Seleção Clonal	Acesso
Clone Bordô 18	Seleção Clonal	Acesso
Clone Bordô 19	Seleção Clonal	Acesso

Para análise das matrizes, clones e mudas da EPAMIG foram coletadas seis amostras compostas de cada variedade, e cada uma delas foi considerada como uma repetição. Três amostras eram constituídas por folhas jovens e três amostras constituídas por folhas completamente expandidas, seguindo as recomendações do fabricante dos kits de detecção sorológica (Bioreba, Suíça) para a detecção ótima dos diferentes vírus testados. Cada amostra composta foi constituída por 10 folhas coletadas aleatoriamente de plantas individuais na população de plantas ou mudas no

campo. Já para analisar os 12 clones Bordô foi amostrada uma única planta de cada clone de um conjunto de seis plantas/clone mantidas no campo.

2.2. Preparação das amostras

Para a análise dos vírus GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-6 e GVA foram utilizadas folhas completamente expandidas coletadas na base dos ramos e para a análise dos vírus GFkV e GFLV foram utilizadas folhas jovens coletadas no ápice dos ramos, conforme indicação do fabricante dos kits de diagnose (Bioreba, Suíça). Para a preparação dos extratos protéicos foram utilizados tecidos de pecíolos e nervuras. Foram maceradas 0,2 g de tecido na presença nitrogênio líquido e em seguida, adicionado 1 mL de tampão de extração [Tris-HCl 200 mM (pH 8,2); NaCl 137 mM; PVP 2%, PEG 1%; Tween-20, 0,05% e NaN_3 0,02 %]. A mistura, após ser homogeneizada, foi transferida para tubos de polipropileno de 2 mL e submetida à centrifugação a 13.000 rpm durante 1 minuto para purificação do extrato com a remoção dos fragmentos de tecido. A fase sobrenadante foi transferida para novos tubos devidamente identificados e o material foi armazenado a -20 °C até o momento da análise.

2.3. Análises de DAS-ELISA

Todas as análises de DAS-ELISA foram realizadas utilizando kits comerciais, elaborados especificamente para cada um dos vírus testados (Bioreba, Suíça). Cada poço com volume individual de 300 μL das placas de poliestireno de 96 poços foi revestido com 200 μL de tampão de cobertura [Carbonato-Bicarbonato 50 mM (pH 9,6); NaN_3 0,02%] contendo anticorpo de captura na diluição de 1:1000 (v/v) e as placas foram incubadas a 30 °C durante 4 horas. Em seguida as placas foram 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%] e secas com auxílio de papel toalha. Logo em seguida foram aplicadas 200 μL do extrato protéico 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 μL do tampão do

conjugado [Tris-HCl 20 mM (pH 7,4); NaCl 137 mM; KCl 3 mM; MgCl₂ 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 µL do substrato (p-nitro-fenil-fosfato, 1 mg/mL) diluídos em tampão apropriado [Dietanolamina 1M (pH 9.8); NaN₃ 0,02%].

Após a adição do substrato foram realizadas leituras de absorvância a 30, 60, 90 e 120 minutos no comprimento de onda de 405 nm. As leituras de absorvância foram realizadas numa leitora automática de placas (Anthos, Zenyth 340 RT, USA). De acordo com o fabricante dos kits para a detecção viral, devem ser consideradas positivas as amostras cujos valores de absorvância forem superiores ao dobro da média dos controles negativos.

2.3. Teste de Diluições do Extrato Protéico

Com o intuito de avaliar a sensibilidade do teste de DAS-ELISA, foram realizados testes utilizando 5 diluições dos extratos protéicos obtidos a partir de materiais vegetais comprovadamente infectados pelos vírus GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, GFkV e GFLV, cedidos pela Embrapa Uva e Vinho (Bento Gonçalves, RS). As diluições foram: 1:1 (extrato original), 1:5, 1:10, 1:20 e 1:100. As reações e leituras foram realizadas de forma semelhante ao descrito no item anterior.

2.4. Avaliação da Carga Viral ao Longo do Ciclo Vegetativo

Para analisar a evolução da carga viral em função do tempo, foram utilizadas plantas previamente identificadas como infectadas, provenientes do germoplasma da Epamig. Essas plantas foram testadas no ano anterior, no final do ciclo vegetativo, para 7 viroses (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-6, GVA, GFkV e GFLV), mas apenas os vírus GLRaV-1, GLRaV-2 e GLRaV-3 foram detectados.

Foram selecionadas as duas plantas que apresentaram maior carga viral para cada um dos vírus detectados e em seguida foram realizadas

cinco coletas periódicas de folhas completamente expandidas da base dos ramos de cada planta, a partir do início do ciclo vegetativo (outubro de 2009) até a colheita dos frutos (janeiro de 2010). A Tabela 2 apresenta o cronograma das coletas periódicas.

Tabela 2 – Cronograma das coletas periódicas para avaliação da variação da carga viral ao longo do ciclo vegetativo.

Coletas	Data
1	30/10/2009
2	30/11/2009
3	15/12/2009
4	30/12/2009
5	15/01/2010

A Tabela 3 apresenta as plantas selecionadas para o acompanhamento periódico do desenvolvimento de cada uma das três viroses durante o ciclo.

Tabela 3 – Plantas infectadas com GLRaV-1, GLRaV-2 e GLRaV-3 selecionadas para acompanhamento da variação da carga viral ao longo do ciclo vegetativo.

Vírus	Planta infectada 1	Planta infectada 2
GLRaV-1	Clone 3	Clone 17
GLRaV-2	Clone 6	Clone 19
GLRaV-3	Cabernet Sauvignon/IAC 572	Cabernet Sauvignon/IAC 313

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Diluições dos Extratos Protéicos

Com o intuito de avaliar a sensibilidade do teste DAS-ELISA para a detecção dos diferentes vírus, foi realizado um teste com amostras constituídas por 5 diferentes diluições dos extratos protéicos obtidos a partir de plantas infectadas com cada um dos vírus GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GfkV e GFLV.

Como observado no gráfico da Figura 1, para a amostra infectada com o GLRaV-1, o teste foi positivo somente para o extrato protéico na concentração original (1:1), que apresentou valor de absorbância igual a 0,279. Para o extrato protéico diluído 1:5 a absorbância caiu para 0,058, permanecendo próxima deste valor para as diluições 1:10, 1:20 e 1:100. Isso indica que a amostra infectada utilizada para realização do experimento apresenta uma carga viral relativamente baixa, próxima ao limite mínimo da sensibilidade do teste DAS-ELISA.

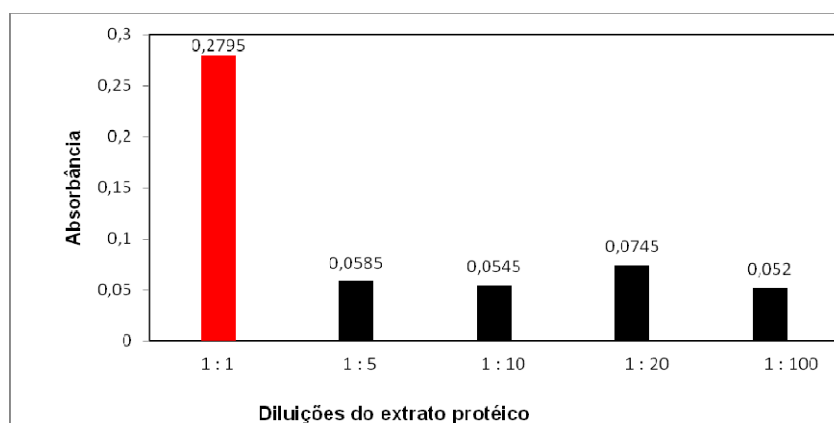


Figura 1 – Gráfico mostrando a variação dos valores de absorbância para 5 diferentes diluições do extrato protéico obtido de plantas infectadas com GLRaV-1. A barra em vermelho indica resultado positivo.

Para o GLRaV-2 o teste foi positivo para as diluições 1:1 e 1:5, que apresentaram valores de absorbância iguais a 0,230 e 0,107, respectivamente (Figura 2). Como pode ser observado neste caso, a diluição

de 1:5 não foi suficiente para reduzir a concentração de partículas virais para níveis abaixo da sensibilidade do teste DAS-ELISA para detecção deste vírus. No entanto, o valor da absorbância, apesar de ter sido claramente superior aos das diluições de 1:10, 1:20 e 1:100, não foi superior ao dobro da média dos controles negativos fornecidos pelo fabricante do kit para detecção ($2 \times 0,074 = 1,48$).

Já para o GLRaV-3, o teste foi positivo para as diluições 1:1, 1:5, 1:10 e 1:20, com valores de absorbância iguais a 3,903; 1,416; 0,730 e 0,306, respectivamente (Figura 3). Nesse caso, a amostra foi constituída por pecíolo e nervuras de folhas obtidas de plantas com sintomas severos da virose do enrolamento das folhas, que só são observados no caso de altas concentrações de partículas virais no tecido do floema.

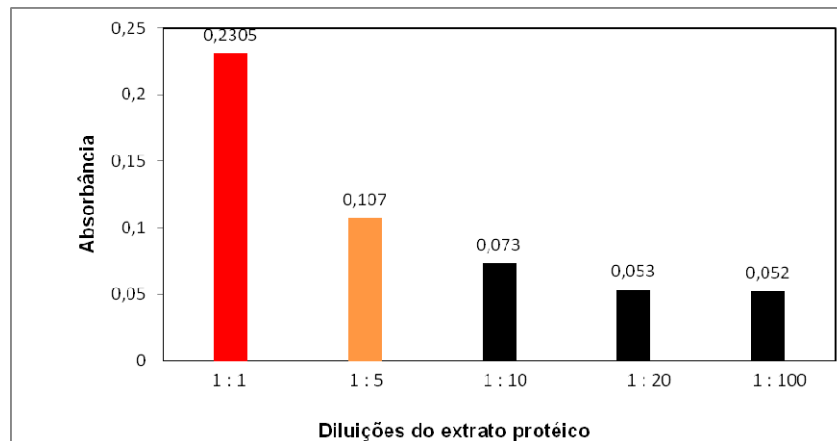


Figura 2 - Gráfico mostrando a variação dos valores de absorvância para 5 diferentes diluições do extrato protéico obtido de plantas infectadas com GLRaV-2. A barra em vermelho indica resultado positivo e a barra laranja indica que o resultado foi positivo mas o valor de absorvância não foi superior ao dobro da média dos controles negativos.

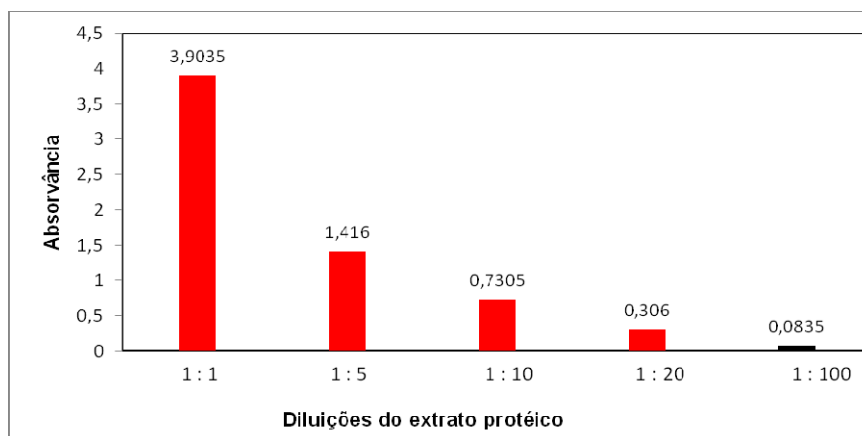


Figura 3 - Gráfico mostrando a variação dos valores de absorvância para 5 diferentes diluições do extrato protéico obtido de plantas infectadas com GLRaV-3. A barra em vermelho indica resultado positivo.

Como observado nos gráficos das Figuras 4 e 5, as amostras infectadas com o GFkV e com o GFLV reagiram positivamente apenas nas concentrações originais (1:1), com valores de absorvância iguais a 0,1295 e 0,1005 respectivamente, indicando uma baixa concentração de partículas virais nas amostras testadas para estes dois vírus.

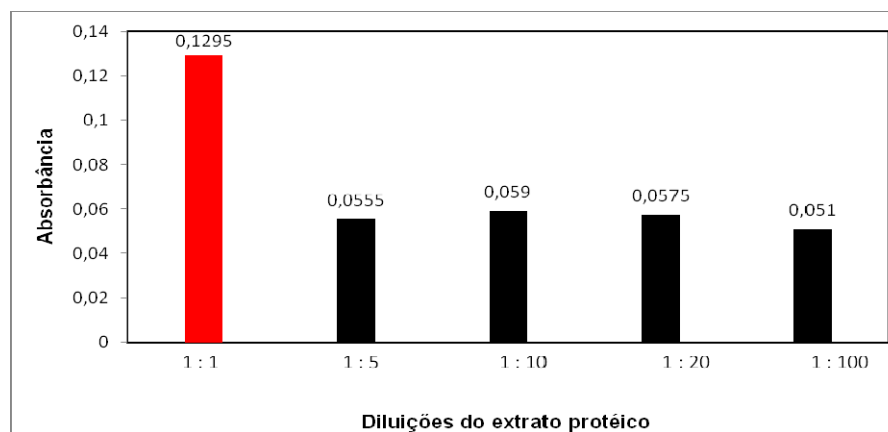


Figura 4 - Gráfico mostrando a variação dos valores de absorvância para 5 diferentes diluições do extrato protéico obtido de plantas infectadas com GFkV. A barra em vermelho indica resultado positivo.

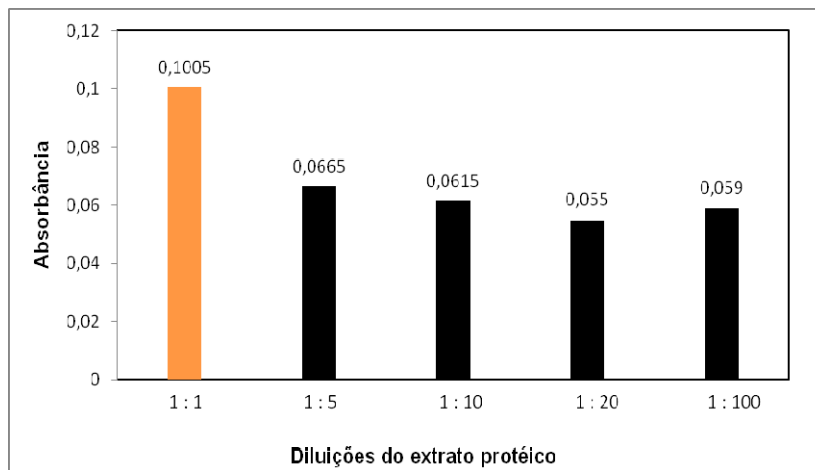


Figura 5 - Gráfico mostrando a variação dos valores de absorbância para 5 diferentes diluições do extrato protéico obtido de plantas infectadas com GFLV. A barra laranja indica que o resultado foi positivo, mas o valor de absorbância não foi superior ao dobro da média dos controles negativos.

Portanto, foi possível verificar que a carga viral, que é diretamente proporcional a absorvância, foi bastante variável entre as plantas infectadas com os diferentes vírus. O extrato protéico que apresentou a maior carga viral foi o obtido a partir da planta infectada com o GLRaV-3, com valor de absorvância igual a 3,903. O que apresentou menor carga viral foi o da planta infectada com o GFLV, com absorvância igual 0,1005.

De acordo com a recomendação do fabricante do kit para detecção, devem ser consideradas como positivas as amostras cujos valores de absorvância forem superiores ao dobro da média dos controles negativos. No entanto, de acordo com os resultados obtidos, ficou evidente que amostras infectadas, como foi o caso da diluição 1:5 do extrato protéico obtido de amostra infectada com o GLRaV-2 e das diluições 1:1 das plantas infectadas com o GFkV e com o GFLV, que apresentam baixas concentrações de partículas virais, podem apresentar valores de absorvância menores do que o dobro da média dos controles negativos. Isso demonstra que esse critério indicado pelo fabricante do kit é um tanto arbitrário, e pode levar a erros de classificação de amostras testadas como negativas. Para superar esta limitação, sugerimos o critério de considerar como positivas as amostras cujos valores de absorvância forem superiores ao valor da média dos controles negativos somado com desvio padrão multiplicado por 5. A Tabela 4 mostra os valores de absorvância para 20 controles negativos fornecido pelo fabricante dos kits para detecção viral. Como pode ser observado, o maior valor de absorvância verificado foi 0,080. A média dos valores de absorvância foi de 0,0752 e o desvio padrão foi de 0,002931, mostrando que os controles negativos, constituídos por extratos protéicos obtidos de amostras de folhas de plantas comprovadamente livre de qualquer virose, apresentam uma pequena variação em torno da média. Portanto, uma amostra que apresente valores de absorvância menores que o dobro da média dos controles negativos, pode estar infectada, porém com uma baixa concentração de partículas virais, o que é comum no caso da maioria dos vírus da videira, cuja localização se limita ao floema das plantas infectadas.

Tabela 4 – Valores das medidas de absorvância em comprimento de onda de 405 nm para 20 controles negativos fornecidos pelo fabricante dos kits de testes DAS-ELISA para detecção viral em videira.

Controles Negativos	Absorbância (405 nm)
1	0,076
2	0,076
3	0,08
4	0,076
5	0,075
6	0,076
7	0,077
8	0,076
9	0,076
10	0,074
11	0,078
12	0,077
13	0,077
14	0,075
15	0,075
16	0,077
17	0,074
18	0,071
19	0,066
20	0,072
Média	0,0752
Desvio Padrão	0,002931

No caso dos vírus da videira, é muito importante se ter muito rigor em relação à seleção fitossanitária, uma vez que não existem medidas curativas efetivas. Além disso, a transmissão dos vírus GLRaV-1 e GLRaV-3 pode ocorrer através de cochonilhas cotonosas (*Planococcus ficu*, *P. citri*, *Pseudococcus longispinos*, *P. calceolariae*, *P. affinis*, *Heliococcus bohemicus* e *Phenacoccus aceris*) e pelas cochonilhas de carapaça (*Pulvinaria vitis* e *Parthenolecanium corni*) (Kuniyuki, 2005). Já o GLRaV-5 e o GLRaV-9 são transmitidos por *Pseudococcus longispinus*. As cochonilhas têm sido relatadas como os principais vetores dos vírus da videira (Charles et al., 2006). Os demais vírus associados ao enrolamento da folha não possuem vetores conhecidos (Martelli e Boudon-Padieu, 2006).

3.2. Análise do Desenvolvimento da Reação em Função do Tempo

Com o intuito de analisar a cinética de reação para os diferentes vírus, foram realizadas leituras de absorbância em diferentes tempos após a adição do substrato nas placas de ELISA (30, 60, 90 e 120 minutos). Para essas análises foram utilizadas as mesmas amostras do experimento das diluições dos extratos protéicos.

Como observado nos gráficos das Figuras 6, 7 e 8, as amostras infectadas com o GLRaV-1, GLRaV-2 e GLRaV-3 apresentaram resultados positivos 30 minutos após a adição do substrato, com valores de absorbância iguais a 0,115; 0,101 e 1,658, respectivamente.

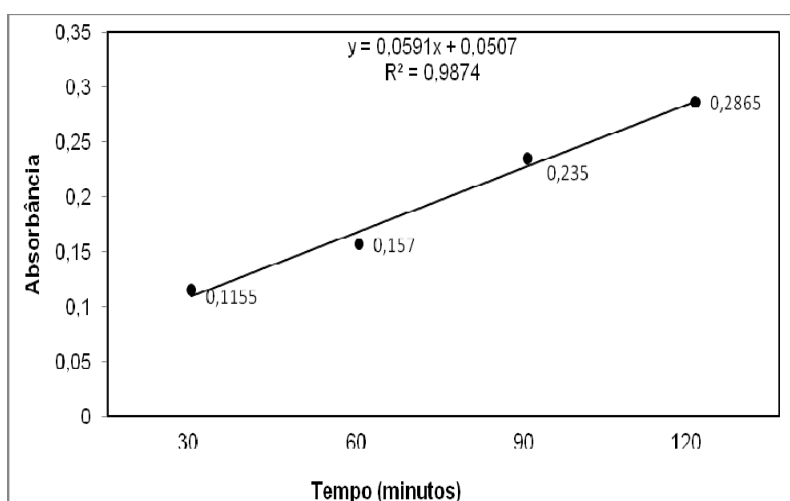


Figura 6 – Gráfico mostrando o desenvolvimento da reação colorimétrica através do aumento da absorbância em função do tempo (após adição do substrato às placas de microtitulação) em teste DAS-ELISA de amostra infectada com o GLRaV-1.

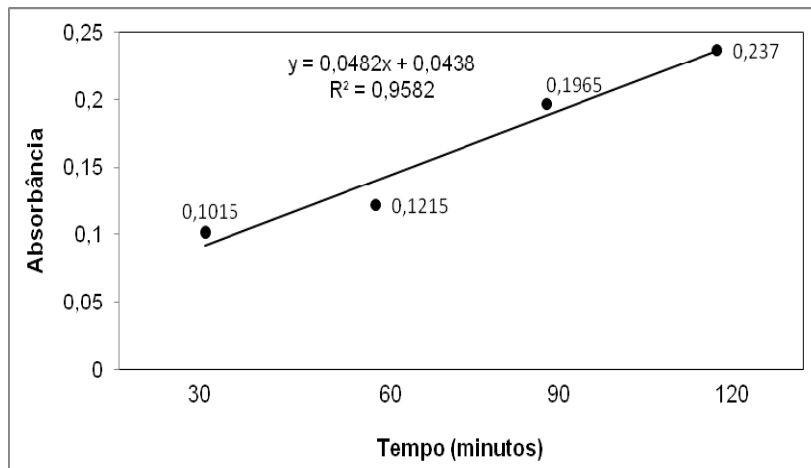


Figura 7 – Gráfico mostrando o desenvolvimento da reação colorimétrica através do aumento da absorvância em função do tempo (após adição do substrato às placas de microtitulação) em teste DAS-ELISA de amostra infectada com o GLRaV-2.

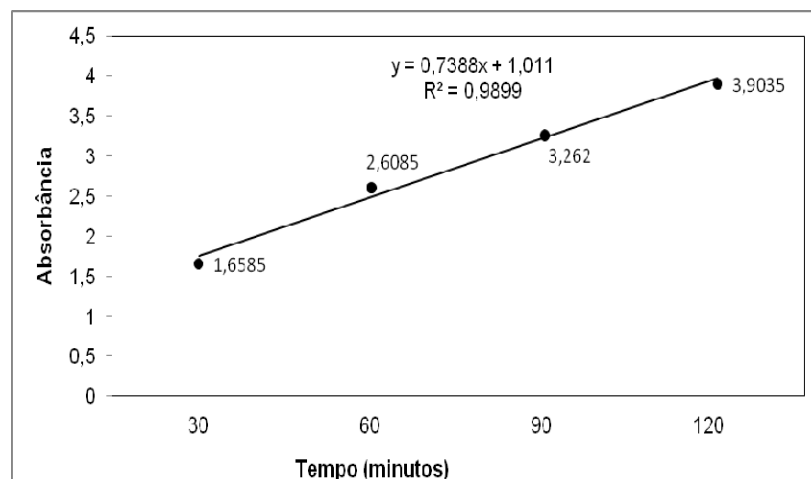


Figura 8 – Gráfico mostrando o desenvolvimento da reação colorimétrica através do aumento da absorvância em função do tempo (após adição do substrato às placas de microtitulação) em teste DAS-ELISA de amostra infectada com o GLRaV-3.

Já as amostras infectadas com GFkV e GFLV apresentaram resultados positivos somente a partir de 90 minutos após adição do substrato, com valores de absorvância iguais a 0,112 e 0,097 respectivamente(Figuras 9 e 10).

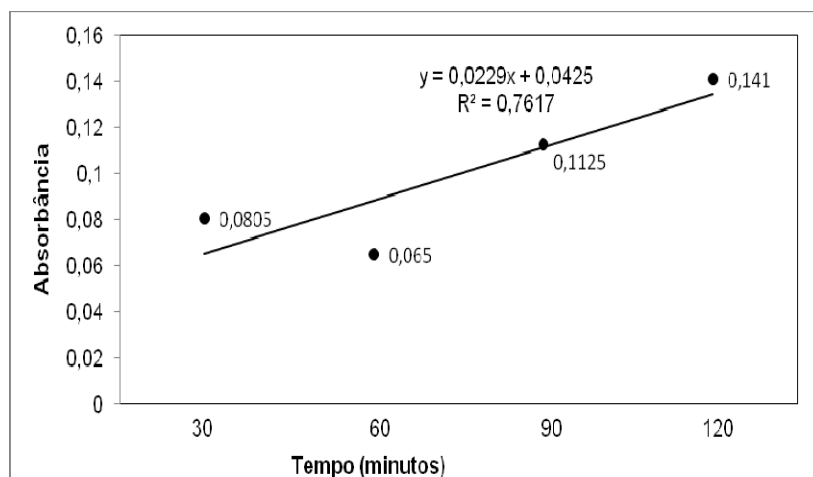


Figura 9 - Gráfico mostrando o desenvolvimento da reação colorimétrica através do aumento da absorvância em função do tempo (após adição do substrato às placas de microtitulação) em teste DAS-ELISA de amostra infectada com o GFKV.

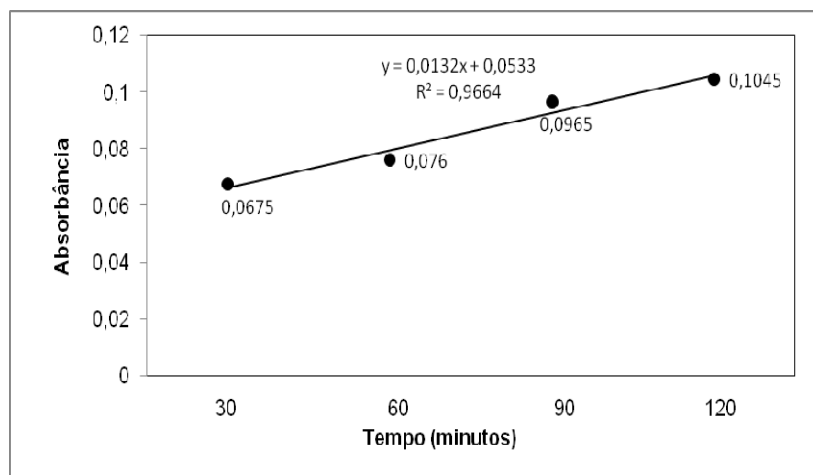


Figura 10 – Gráfico mostrando o desenvolvimento da reação colorimétrica através do aumento da absorvância em função do tempo (após adição do substrato às placas de microtitulação) em teste DAS-ELISA de amostra infectada com o GFLV.

No caso de todas as amostras infectadas com os 5 diferentes vírus o aumento da absorvância ao longo do tempo foi linear, sendo que as equações de regressão linear apresentaram altos valores de R^2 . Aos 120 minutos após a adição do substrato às placas de microtitulação, todas as amostras infectadas apresentaram valores positivos, o que indica que este tempo é adequado para a realização das leituras de absorvância para a detecção dos cinco vírus estudados.

3.3. Avaliação dos Clones 'Bordô'

Entre os clones 'Bordô' (3, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18 e 19), também denominados na região do sul de Minas Gerais pelo nome de Folha de Figo, foram detectados os vírus GLRaV-1 (clones 'Bordô' 13 e 17); GLRaV-2 (clones 'Bordô' 3, 6, 7, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18 e 19); e GLRaV-3 (clones 'Bordô' 3 e 7). A Tabela 5 mostra os valores das absorvâncias das amostras positivas para estes vírus. A elevada incidência de viroses nesses clones provavelmente se deve ao elevado período de tempo em que esse genótipo foi introduzido na região (pouco mais de um século), agravado pela multiplicação contínua de material propagativo contaminado, o que favoreceu o acúmulo das diferentes viroses ao longo das décadas.

A ocorrência de plantas infectadas por complexos virais pôde ser verificada no caso do clone 'Bordô' 17, infectado por GLRaV-1 e GLRaV-2, do clone 'Bordô' 7, infectados por GLRaV-2 e GLRaV-3, e do clone 'Bordô' 3 infectado por GLRaV-1, GLRaV-2 e GLRaV-3.

Os clones 'Bordô' apresentaram uma alta taxa de infecção pelo GLRaV-2, que foi detectado em 11 dos 12 clones (91,66 % das amostras avaliadas). O GLRaV-2 é a única espécie do complexo GLRaV classificada na família *Closteroviridae*, gênero *Closterovirus* (Fajardo et al., 2003; Fauquet et al., 2005). O GLRaV-2 também se destaca pelos sintomas específicos que pode induzir, pois está associado a incompatibilidade da enxertia e ao declínio em vinhedos jovens (Abou Ghanem-Sabanadzovic et al., 2000; Martelli et al., 2002; Bertazzon e Angelini, 2004; Meng et al., 2005). Apenas no clone 'Bordô' 8 não foi detectado nenhum dos sete vírus testados por DAS-ELISA. Em todas as análises foram incluídas na mesma leitura, amostras de controles positivos e controles negativos para cada uma das viroses testadas, fornecido pelo fabricante dos kits (Bioreba, Suíça).

Tabela 5 – Clones ‘Bôrdô’ (Folha de Figo) com resultados positivos para presença de viroses e respectivos valores de absorbância.

Vírus	Clones ‘Bordô’	Absorbância (405 nm)
GLRaV-1	C3	0,1550
GLRaV-1	C17	0,1330
GLRaV-2	C3	0,3060
GLRaV-2	C6	0,2500
GLRaV-2	C7	0,1305
GLRaV-2	C10	0,1825
GLRaV-2	C12	0,2405
GLRaV-2	C13	0,2435
GLRaV-2	C15	0,1875
GLRaV-2	C16	0,2155
GLRaV-2	C17	0,1645
GLRaV-2	C18	0,1290
GLRaV-2	C19	0,1685
GLRaV-3	C3	2,7335
GLRaV-3	C7	1,2825

Até o momento não existe nenhum tratamento eficaz e confiável para eliminação de viroses em videiras infectadas. Nos casos em que o material propagativo já se encontra infectado, recomenda-se a erradicação das plantas contaminadas para evitar a infecção de plantas sadias e impedir a disseminação do agente etiológico. Uma possibilidade para recuperação de genótipos de interesse infectados por viroses é a utilização da combinação de técnica de termoterapia (exposição contínua de plantas a temperaturas elevadas por um longo período de tempo) com posterior isolamento e cultivo *in vitro* de meristemas. No entanto, a combinação dessas abordagens pode ocasionar o efeito indesejável de variação somaclonal, promovendo mudanças genéticas ou epigenéticas que alteram o fenótipo original do material vegetal (Gribaudo et al., 2006; Baránek et al., 2009).

3.4. Avaliação de Matrizes e de Mudanças

Os vírus GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-6, GVA, GFkV e GFLV não foram detectados em nenhuma das amostras analisadas. Já o GLRaV-3, como pode ser observado na Tabela 6, foi detectado em plantas matrizes de 'Niágara Rosada' e dos porta-enxertos 'IAC 572' e 'IAC 766.' Foi também detectado nas mudas de 'Niágara Rosada' enxertadas sobre 'IAC 572' e 'Niágara Rosada' enxertadas sobre 'IAC 766', as quais foram formadas pela união de porta-enxertos (hipobioto) e copas (epibioto) ambos infectados (plantas matrizes). As mudas das outras variedades ('Bordô', 'Syrah', 'Merlot', 'Cabernet Sauvignon' e 'Chardonnay') não apresentaram resultado positivo para GLRaV-3 mesmo estando enxertadas em porta-enxertos originados de plantas matrizes infectadas. Isto pode ser explicado pelo fato de que pelo estágio de desenvolvimento da muda, não houve tempo suficiente para a completa conexão entre os sistemas vasculares (formação de xilema e floema) entre o hipobioto e epibioto, impossibilitando assim a transmissão das partículas virais através do sistema vascular, dificultando ou mesmo impossibilitando a movimentação das partículas virais entre os dois tecidos distintos. Em todas as análises foram incluídas na mesma leitura, amostras de controles positivos e controles negativos para cada uma das viroses testadas, fornecido pelo fabricante dos kits (Bioreba, Suécia).

Após a identificação das mudas, matrizes e porta-enxertos contaminados foi recomendado à EPAMIG a erradicação das plantas e mudas infectadas e sua substituição por material previamente testado e comprovadamente isento de viroses.

Tabela 6 – Matrizes e mudas de videira infectadas com o GLRaV-3 e respectivos valores de absorvância no comprimento de onda de 405 nm.

Variedades	Amostras Compostas		
	1	2	3
Niágara Rosada (matriz)	0,099	0,320	0,200
Niágara Rosada/IAC 766 (muda)	0,064	0,102	0,070
Niágara Rosada/IAC 572 (muda)	0,106	0,651	0,169
IAC 766 (matriz)	0,073	0,132	0,154
IAC 572 (matriz)	0,065	0,090	0,233

No Brasil o GLRaV-3 já foi detectado em vinhedos de variedades americanas em São Paulo (Kuniyuki e Costa, 1987) e no Rio Grande do Sul (Kuhn, 1992). A virose do enrolamento das folhas chegou a ocorrer em 78% a 98% das produtoras viníferas e 15,6% a 33% dos porta-enxertos amostrados por Fajardo et al (2003). Em um levantamento realizado em 30 municípios do estado de São Paulo (Kuniyuki e Costa, 1987), foram avaliadas 20 variedades de copa e 15 variedades de porta-enxertos em relação a presença das principais viroses. A virose do enrolamento das folhas apresentou uma incidência de 100% entre as plantas de 'Niágara Rosada' e de 'Niágara Branca'. Entre os porta-enxertos, 'Traviú', 'IAC 571-6' e 'Rupestris du Lot' apresentaram 100%, 36% e 33%, respectivamente, de incidência do enrolamento das folhas.

Os vírus GLRaV-1, GLRaV-2 e GLRaV-3 já foram detectados no Rio Grande do Sul (Kuhn et al., 1998), em São Paulo (Kuniyuki et al., 2002) e agora em Minas Gerais por meio dos resultados obtidos nesse trabalho. Existem indícios de que o GLRaV-3 seja o vírus de ocorrência mais frequente nos vinhedos brasileiros (Kuniyuki et al., 2005), o que foi confirmado nas análises realizadas no germoplasma da EPAMIG, já que esse foi o vírus detectado com maior frequência durante os testes de DAS-ELISA. Em São Paulo, foi também detectado o GLRaV-5 (Kuniyuki et al., 2008). O GLRaV-6 também foi detectado por Kuniyuki et al (2003) em amostras de plantas cultivadas em 4 estados brasileiros (SP, PE, MG e RS), apresentando baixa incidência, com exceção das cultivares 'Cardinal' (100%) e 'Red Glob' (42,8%). Neste estudo os autores constataram que este vírus se apresenta geograficamente bem distribuído, ocorrendo em todas as regiões onde estas duas cultivares estão presentes.

Devido à insuficiência de instituições ou empresas capacitadas para realizar a detecção de viroses de videira no Brasil, assim como de outras espécies agronômicas, acredita-se que o quadro atual de disseminação dessas viroses seja subestimado para todas as regiões que cultivam a videira.

3.5. Análise da variação da carga viral ao longo do ciclo vegetativo

Como pode ser verificado nos gráficos da Figura 11, nas plantas infectadas com o GLRaV-1, foi observado um acentuado aumento dos valores de absorvância entre as coletas realizadas após 60 e 75 dias. Após 75 dias as duas plantas avaliadas apresentaram os maiores valores, indicando a presença de uma maior carga viral durante este período do ciclo. Esse resultado confirma o fato de que a carga viral do GLRaV-1 evolui de forma crescente ao longo do desenvolvimento vegetativo, o que é explicado pela maior disponibilidade de tecido vegetal metabolicamente ativo e de tempo ao longo do ciclo para a multiplicação do vírus.

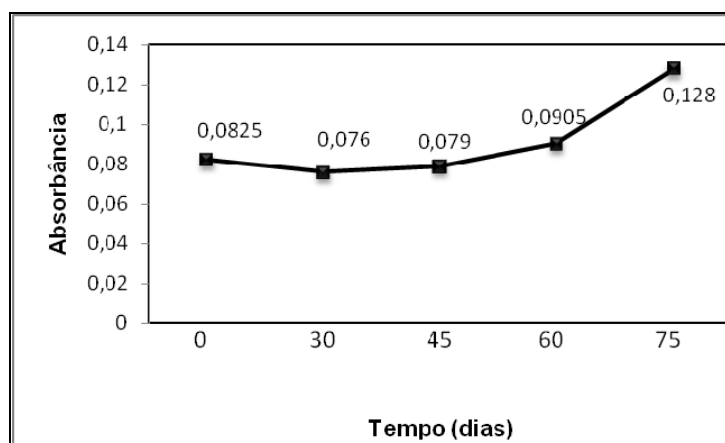
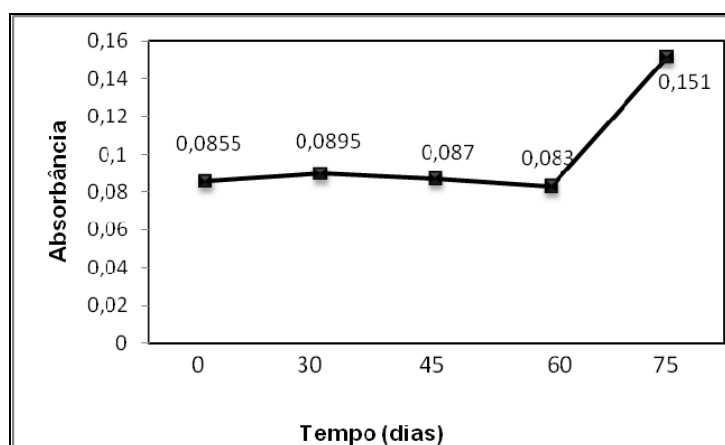


Figura 11 – Gráficos mostrando a variação da absorvância (proporcional a carga viral) ao longo do ciclo vegetativo do clone 'Bordô' 3 (A) e do clone 'Bordô' 17 (B), ambos infectados com o GLRaV-1.

No caso do GLRaV-2 (Figura 12), as duas plantas analisadas (Clones 'Bordô' 6 e 19) apresentaram os maiores valores de absorvância na amostra coletada aos 60 dias. Foi observado um aumento gradual dos valores de absorvância entre as amostras coletadas nos tempos 0, 30 e 45 dias, e um aumento bem mais acentuado entre as amostras coletadas em 45 e de 60 dias. Apesar de que as duas plantas estarem infectadas, no caso do clone 'Bordô' 6, o valor máximo de absorvância (2,0755) foi muito superior ao observado no clone 'Bordô' 19 (0,313). Esse resultado indica que as plantas podem apresentar diferentes níveis de infecção mesmo estando no mesmo estágio do ciclo vegetativo, refletindo a diferença entre cargas virais entre as diferentes plantas avaliadas. Entre as amostras coletadas aos 60 e 75 dias, ocorreu uma queda no valor da absorvância. Portanto, os resultados obtidos demonstram um aumento na concentração de partículas virais ao longo do ciclo vegetativo, indicando que o período ideal para a coleta de material vegetal a ser testado em relação a presença do GLRaV-2 seria no final do mês de janeiro (manejo cultural realizado no sul de Minas Gerais), quando as plantas estão repletas de folhas completamente expandidas e com altas taxas metabólicas. Após esse período, aos 75 dias, se observou uma queda na carga viral do GLRaV-2, o que deve ser um reflexo da mudança do metabolismo da planta que evolui do anabolismo para catabolismo, antecedendo o período de dormência característico do gênero *Vitis*.

Das plantas infectadas com o GLRaV-3 (Figura 13), ambas apresentaram resultados positivos na amostra da primeira coleta, porém com valores de absorvância relativamente baixos, indicando a ocorrência de uma baixa carga viral no início do ciclo vegetativo. Já na amostra de 30 dias, as absorvâncias das duas amostras atingiram o valor máximo, saturando a leitura da absorvância (4,0) e permanecendo desta forma até a coleta da última amostra, indicando uma elevada carga viral de GLRaV-3 durante a evolução do ciclo das plantas.

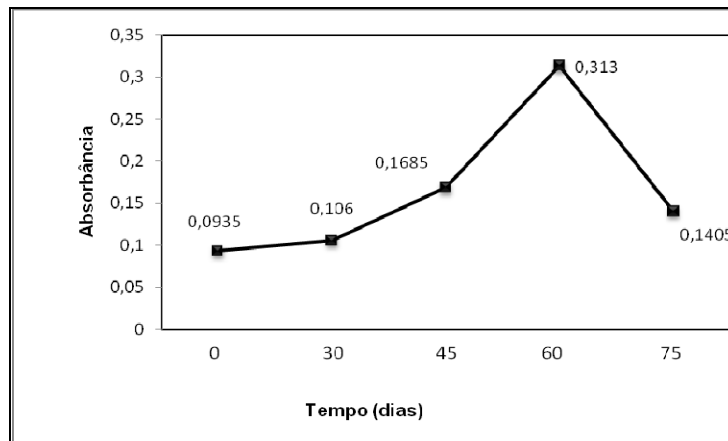
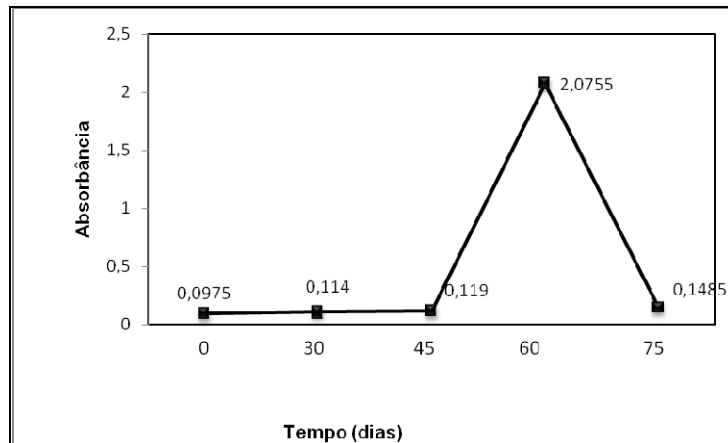


Figura 12 – Gráficos mostrando a variação da absorbância, que representa indiretamente a evolução da carga viral no tecido analisado, ao longo do ciclo vegetativo do clone ‘Bordô’ 6 (A) e do clone ‘Bordô’ 19 (B), ambos infectados com o GLRaV-2.

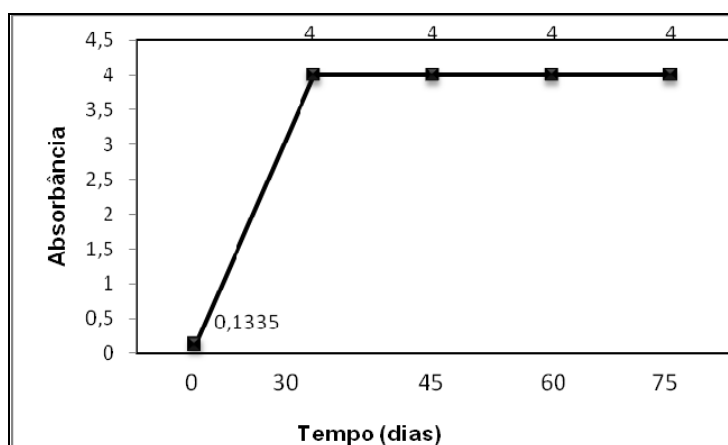
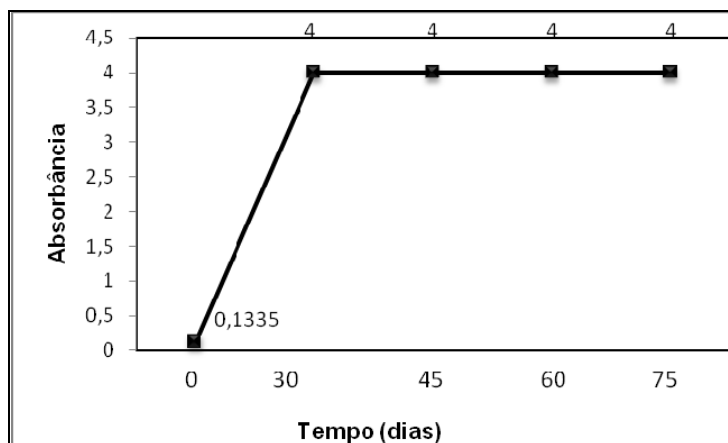


Figura 13 – Gráficos mostrando a variação da absorbância, que representa indiretamente a evolução da carga viral no tecido analisado, ao longo do ciclo vegetativo das plantas de Cabernet Sauvignon/IAC 572 (A) e Cabernet Sauvignon/IAC 313 (B), ambos infectadas com o GLRaV-3.

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que ocorreu um aumento da carga viral ao longo do ciclo vegetativo da videira. Resultados semelhantes foram obtidos por Monis e Bestwick (1996) que, avaliaram a detecção e a localização dos vírus GLRaV-1, GLRaV-2 e GLRaV-3 em plantas mantidas em casa de vegetação e em plantas cultivadas *in vitro*. Esses autores encontraram uma maior concentração de partículas virais em tecidos coletados nas bases dos ramos no final do ciclo vegetativo das plantas. Ainda de acordo com os mesmos autores, as maiores concentrações de partículas virais foram observadas nas amostras localizadas próximas da base dos ramos. Foi observado que o vírus apresenta uma distribuição irregular nas folhas e nos caules, sugerindo que o movimento e a replicação dos vírus ocorrem de maneira ineficiente no floema da planta infectada. A detecção de altas concentrações de partículas virais nas bases dos ramos das plantas infectadas no final do ciclo vegetativo sugere que o movimento do vírus através do floema é relativamente lento. Isso está de acordo com os resultados descritos por Teliz et al. (1987), que constataram que a concentração de partículas virais do GLRaV-3 em amostras de folhas localizadas na base dos ramos coletadas no final do ciclo vegetativo é maior do que a carga viral detectada em folhas localizadas na região apical dos ramos. Embora doenças causadas por viroses em videira sejam um grande problema para a plena exploração comercial da cultura em todo mundo, o número de relatos científicos sobre o assunto pode ser considerado modesto. A maioria das recomendações para coleta de tecidos e amostras de plantas de videira ainda é baseado em observações empíricas que necessitam de comprovação e teste científicos rigorosos.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões

1) Considerando apenas as plantas matrizes e as mudas analisadas, só foi detectado a presença do vírus GLRaV-3, detectado em plantas matrizes de 'Niágara Rosada' e dos dos porta-enxertos 'IAC 572' e 'IAC 766.' Foi também detectado nas mudas de 'Niágara Rosada' enxertadas em 'IAC 572' e 'Niágara Rosada' enxertadas em 'IAC 766'. Já os vírus GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-6, GVA, GFkV e GFLV não foram detectados em nenhuma das plantas matrizes e mudas analisadas.

2) Entre os clones 'Bordô', foram detectados os vírus GLRaV-1 (clones 13 e 17); GLRaV-2 (clones 3, 6, 7, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18 e 19); e GLRaV-3 (clones 3 e 7). A ocorrência de plantas infectadas por complexos virais pôde ser verificada no caso dos clones 13 e 17, infectados simultaneamente por GLRaV-1 e GLRaV-2; nos clones 3 e 7, infectados simultaneamente por GLRaV-2 e GLRaV-3.

3) Para as plantas infectadas com os vírus GLRaV-1, GLRaV-2 e GLRaV-3 foram observadas variações da carga viral ao longo do ciclo vegetativo/produtivo da videira.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU GHANEM-SABANADZOVIC, N.; SABANADZOVIC, S.; CASTELLANO, M. A.; BOSCIA, D.; MARTELLI, G. P. Properties of a new isolate of *Grapevine leafroll-associated virus 2*. **Vitis**. 39:119-121. 2000.
- AMORIM, L.; KUNIYUKI, H. Doenças da videira. In: Kimati, H., Amorim, L., Bergamin, A., Camargo, L. E. A., Rezende, J. A. M. (Eds) **Manual de Fitopatologia**, vol.2: Doenças de plantas cultivadas. São Paulo. Agronômica Ceres. p.736-757. 1997.
- BARÁNEK, M.; RADDOVÁ, J.; KRIZAN, B.; PIDRA, M. Genetic changes in grapevine genomes after stress induced by in vitro cultivation, thermotherapy and virus infection, as revealed by AFLP. **Genetics and Molecular Biology**. 2009.
- BERTAZZON, N.; ANGELINI, E. Advances in the detection of *Grapevine leafroll-associated virus 2* variants. **Journal of Plant Pathology**. 86: 283-290. 2004.
- BOSCIA, D.; MINAFRA, A.; MARTELLI, G. P. Filamentous viruses of the grapevine: Putative trichovirus and capilloviruses. In: Monette, P.L. (Ed.) *Filamentous Viruses of Woody Plants*. Research Signpost. Trivandrum. pp.19-28. 1997.
- CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**. 34 :475-83. 1977.
- ENGEL, E. A.; ESCOBAR, P. F.; ROJAS, L. A.; RIVERA, P. A.; FIORE, N.; VALENZUELA, P. D. T. A diagnostic oligonucleotide microarray for simultaneous detection of grapevine viruses. **Journal of Virological Methods**. 163 :445–451. 2010.
- FAJARDO, T. V. M., KUHN, G. B.; NICKEL, O. **Doenças virais**. In: Fajardo, T. V. M. (Ed.). *Uva para Processamento Fitossanidade*. Série Frutas do Brasil, 35. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília. p.45-62. 2003.
- FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, A. L. (Eds.) *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London.Elsevier Academic Press. 2005.
- GRIBAUDO, I.; GAMBINO, G.; CUOZZO, D.; MANNINI, F. Attempts to eliminate *Grapevine Rupestris Stem Pitting-Associated Virus* from grapevine clones. **Journal of Plant Pathology**. 88: 293-298. 2006.
- KUHN, G. B. Efeitos causados pelo vírus do enrolamento da folha da videira no cultivar Cabernet Franc. **Fitopatologia Brasileira**. 14: 280-283. 1989.

- KUHN, G. B. Intumescimento dos ramos da videira ("Corky Barky"), doença constatada no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**. 17: 399-406. 1992.
- KUHN, G. B.; FAJARDO, T. V. M. **Viroses da Videira no Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. Capacitação técnica em viticultura. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/viticultura/viroses.html>>. Acessado em: 05/02/2010.
- KUNIYUKI, H.; COSTA, A. S. Incidência de vírus da videira em São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**. 12: 240-245. 1987.
- KUNIYUKI, H.; GASPAR, J. O.; REZENDE, J. A. M. Ocorrência do Grapevine leafroll-associated virus 6 em vinhedos do Brasil. **Summa Phytopathologica**. 29: 288-289. 2003.
- KUNIYUKI, H.; REZENDE, J. A. M.; GASPAR, J. O.; YUKI, V. A. Detecção do Grapevine leafroll-associated virus 5 no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**. 34: 366-367. 2008.
- KUNIYUKI, H.; REZENDE, J. A. M.; SCAGLIUSI, S. M. M.; VEGA, J.; YUKI, V. A. Incidência de Grapevine leafroll-associated virus 1, 2 e 3 em vinhedos do estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**. 28: 311-314. 2002.
- KUNIYUKI, H.; REZENDE, J. A. M.; WILLINK, C. G.; NOVO, J. P. S.; YUKI, V. A. Transmissão do Grapevine leafroll-associated virus 3 pela cochonilha *Pseudococcus longispinus* Targioni-Tozzetti (Hemiptera:Pseudococcidae). **Summa Phytopathologica**. 31: 65-68. 2005.
- MARINHO, V. L. A. Técnicas imunológicas e moleculares no diagnóstico de vírus de plantas. In: LUZ, W. C. (Ed). **Revisão anual de patologia de plantas**. 9: 383-401. 2001.
- MARTELLI G.P., BOUDON-PADIEU E. Directory of infectious diseases of grapevines and viroses and virus-like diseases of the grapevine, Bibliographic report 1998-2004. Options méditerranéennes, Serie B: Studies and Research 55, 279 p. 2006.
- MARTELLI, G. P.; AGRANOVSKY, A. A.; BAR-JOSEPH, M.; BOSCIA, D.; CANDRESSE, T.; COUTTS, R. H. A.; DOLJA, V. V.; FALK, B. W.; GONSALVES, D.; JELKMANN, W.; KARASEV, A. V.; MINAFRA, A.; NAMBA, S.; VETTEN, H. J.; WISLER, G. C.; YOSHIKAWA, N. The family *Closteroviridae* revised. **Archives of Virology**. 147: 2039-2044. 2002.
- MENG, B.; LIN, C.; GOSZCZYNSKI, D. E.; GONSALVES, D. Genome sequences and structures of two biologically distinct strains of *Grapevine leafroll-associated virus 2* and sequence analysis. **Virus Genes**. 31: 31-41. 2005.

- MONIS, J.; BESTWICK, R. K. Detection and localization of grapevine leafroll associated closteroviruses in greenhouse and tissue culture grown plants. **American Journal of Enology and Viticulture**. 47: 199-205. 1996.
- MOREIRA, A. E.; GASPAR, J. O.; CAMARGO, L. E. A.; KUNIYUKI, H. Caracterização do gene da proteína capsidial do *Grapevine virus A* em videiras afetadas pela acanaladura do lenho de Kobber no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**. 29: 205-208. 2004.
- OSMAN, F., LEUTENEGGER, C., GOLINO, D., ROWHANI, A. Comparison of low-density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan RT-PCR in detection of grapevine viruses. **Journal of Virological Methods**. 149: 292–299. 2008.
- SILVA, A. L. Programa de certificação de mudas de videira em Santa Catarina. IN: **SIMPÓSIO MINEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA**, 1, 2002, Andradas. Anais. Caldas: EPAMIG-FECD, 2002. 340 p.: 215-231.
- TELIZ, D.; TANNE, E.; GONSALVES, D.; ZEE, F. Field serological detection of viral antigens associated with grapevine leafroll disease. **Plant Disease**. 71: 704-709. 1987.

CONCLUSÕES GERAIS

- Os marcadores microssatélites utilizados nesse trabalho foram muito eficientes para realizar a caracterização da identidade genética de plantas matrizes e de mudas de videira.
- Foi possível observar que os *loci* que apresentam distribuições mais equitativas das frequências alélicas foram mais eficientes para a identificação varietal.
- O conjunto de variedades de videira analisadas no presente trabalho, apesar de não ser muito numeroso, apresenta uma diversidade genética relativamente alta.
- Foi verificada a presença de um excesso de indivíduos heterozigotos devido à seleção para qualidade e produtividade feita em gerações anteriores e que foi preservado ao longo da multiplicação vegetativa que é comumente utilizada para a propagação dessa espécie.
- Na análise das coordenadas principais, apesar de não ter ocorrido uma clara estruturação em relação aos grupos das viníferas e dos porta-enxertos, foi possível notar uma tendência de agrupamento das variedades pertencentes ao mesmo grupo.
- De acordo com as análises utilizando o aplicativo computacional Structure, foi observado alto grau de estruturação apenas em relação ao grupo formado pelas variedades de copas americanas.
- Através da AMOVA verificou-se que a maior parte da variabilidade genética ocorreu dentro dos grupos.
- Os clones 'Bordô' apresentaram uma alta taxa de infecção pelo GLRaV-2, que foi detectado em 91,66% das amostras avaliadas.
- O GLRaV-1 foi detectado nos clones 'Bordô' 3 e 17 e o GLRaV-3 nos clones 'Bordô' 3 e 7.

- Nas plantas matrizes e nas mudas produzidas a partir delas, apenas o GLRaV-3 foi detectado, estando presente nas matrizes de 'Niágara Rosada', nos porta-enxertos 'IAC 572' e 'IAC 766', e nas combinações de mudas 'Niágara Rosada/IAC 766' e 'Niágara Rosada/IAC 572'.
- Foi observado uma variação da concentração de partículas virais ao longo do ciclo vegetativo da videira para os 3 vírus do enrolamento da folha (GLRaV-1, GLRaV-2 e GLRaV-3).