

Indexação de variedades de videira provenientes do cultivo in vitro visando a micropropagação de material livre do cancro-bacteriano

Indexing grapevine varieties from in vitro cultivation aiming to micropropagation of material free of bacterial canker

Carlos Luciano da Fonseca¹; Carine Rosa Naue²; Visêdo Ribeiro de Oliveira³; Nataniel Franklin de Melo⁴; Diógenes da Cruz Batista⁵; Maria Angélica Guimarães Barbosa⁶

Resumo

O cancro-bacteriano causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv) é uma das mais importantes doenças da videira no Vale do São Francisco. Recomenda-se uma combinação de várias medidas para diminuir a severidade da doença, pois ainda não existem métodos eficientes de controle. Uma das principais medidas é a utilização de material propagativo livre do patógeno. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi promover a limpeza clonal de mudas de videira por meio da cultura de tecidos, para eliminação de Xcv. Foram utilizadas plantas de videira de variedades copa e porta-enxerto para indexação a partir de fragmentos retirados da região mediana do caule. Esses fragmentos foram colocados em microtubos contendo água esterilizada e macerados. Após a maceração, o material foi

¹Bolsista CNPq/Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

²Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE.

³Engenheiro-florestal, D.Sc. em Recursos Genéticos Florestais, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina/ PE.

⁴Biólogo, D.Sc. em Genética Vegetal, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

⁵Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

⁶Engenheira-agrônoma, D.Sc. em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, angelica.guimaraes@cpatsa.embrapa.br

dispensado em placas de Petri contendo meio de cultura NYDAM e acondicionado em B.O.D à temperatura de 28 °C durante 48 e 72 horas. A avaliação foi realizada quanto à presença ou ausência de colônias bacterianas típicas de Xcv. Após a indexação, todo material livre da bactéria foi multiplicado por meio de segmentos nodais. Todas as plantas, de todas as variedades avaliadas, apresentaram indexação negativa. Assim, a cultura de tecidos com posterior indexação pode ser utilizada para a produção de material propagativo sadio.

Palavras-chave: *Vitis vinifera*, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

Introdução

As condições edafoclimáticas do Semiárido brasileiro, juntamente com as técnicas modernas de irrigação, permitiram que o Vale do São Francisco se destacasse na viticultura, como grande produtora e exportadora de uvas finas de mesa de alta qualidade. Entretanto, problemas fitossanitários podem trazer sérios prejuízos econômicos a essa cadeia produtiva.

Dentre as doenças, o cancro-bacteriano causado por Xcv apresenta grande importância econômica pelos danos que causa à cultura da videira no Vale do São Francisco (ARAÚJO et al., 2004). Quando presente, coloca em risco a competitividade da região em termos de produtividade, impede o trânsito de material vegetal de videira a partir dos estados onde a bactéria foi detectada e pode limitar o acesso da uva da região nos mercados interno e externo.

Na formação de novos parreirais, o emprego de mudas com sanidade comprovada é a primeira e mais importante recomendação para que a estabilidade fitossanitária da cultura seja viável a médio e longo prazo, além de ser norma obrigatória para que o produtor, futuramente, possa ser certificado no Programa de Produção Integrada (BRASIL, 2001). À medida que a doença vai se espalhando nos parreirais do Vale do São Francisco, o que vem acontecendo nos últimos anos, a garantia de que os viveiros da região permanecem isentos da doença vai diminuindo e não se tem nenhum meio eficiente e rápido, até o momento, de comprovar a sanidade das mudas produzidas na região.

Da mesma forma, a disseminação de Xcv, para novas áreas no País por meio do trânsito de mudas é uma preocupação crescente e alvo de medidas de vigilância sanitária, sendo necessária a disponibilização de material propagativo sadio de videira.

Técnicas de cultura de tecidos vêm sendo utilizadas para a eliminação de patógenos visando à obtenção de material de multiplicação com alta qualidade fitossanitária. Esta técnica tem grande aplicação na agricultura e alto potencial para a aplicação no melhoramento genético de plantas. Pode ser utilizada tanto para a multiplicação de material genético como para a produção de mudas livres de fitopatógenos (ANDRADE, 2002). Dentre as contribuições desta técnica para a fitopatologia, a recuperação de plantas livres de vírus e de outros agentes causadores de doenças está sendo obtida por meio de culturas de ápices caulinares (PIERIK, 1990). No entanto, a cultura de tecidos isoladamente não permite assegurar a ausência de fitopatógenos nas plantas obtidas, havendo a necessidade de serem avaliadas por meio da utilização de testes de indexação (CASTRO; OLIVEIRA, 2007).

Thomas (2004) apresentou um procedimento de indexação para a detecção de bactérias, em três etapas sequenciais, sendo estas o exame visual das culturas para qualquer crescimento microbiano, a indexação do meio aparentemente não contaminado, utilizando meio bacteriológico e por fim a indexação do tecido usando segmentos de diferentes partes da planta, provenientes de meios com indexação negativa. Este mesmo autor ainda afirma que a terceira etapa é fundamental, pois uma proporção variável de culturas que não revelaram bactérias na segunda etapa mostrou indexação positiva na terceira avaliação.

A utilização da cultura de tecidos e da indexação são alternativas importantes para a comercialização de mudas com alta qualidade fitossanitária, uma vez que ainda não existe um método de controle capaz de erradicar Xcv de bacelos de videira. Diante da necessidade de disponibilizar material propagativo sadio para o setor produtivo, inclusive para a formação de matrizeiros e/ou jardins clonais isentos da bactéria na região, o objetivo deste trabalho foi promover a limpeza clonal de diferentes variedades de videira por meio da cultura de tecidos, visando eliminar a bactéria Xcv.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido nos Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Fitopatologia, ambos da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

Foram utilizadas plantas de videira de variedades copa ('Thompson seedless' e 'Sugraone') e porta-enxerto ('IAC-313', 'IAC-572', 'IAC-766'; 'Paulsen-1103' e 'SO4'), pertencentes ao banco de germoplasma in vitro do Laboratório de Biotecnologia Vegetal.

Cinquenta e seis plantas da variedade IAC-313, 100 plantas da variedade IAC 572, 82 plantas da variedade IAC-766; 99 plantas da variedade Paulsen-1103, 79 plantas da variedade SO4, 91 plantas da variedade Thompson Seedless e 59 plantas da variedade Sugraone foram indexadas mediante a utilização do meio semisseletivo para Xcv seguido de teste de patogenicidade para amostras positivas.

A indexação do material foi realizada com a retirada de fragmento de 1 cm de comprimento da região mediana do caule de todos os clones destinados à multiplicação (Figura 1a). Esses fragmentos foram colocados em microtubos contendo 200 μ L de água esterilizada (Figura 1b) e em seguida macerados (Figura 1c). Após a maceração, 100 μ L do material foram coletados com auxílio de um micropipetador, dispensados em placa de Petri contendo meio de cultura NYDAM (PEIXOTO et al., 2006) e espalhados com a ajuda de uma alça de Drigalsky (Figura 1d) em placa de Petri contendo meio de cultura NYDAM (PEIXOTO et al., 2006), seguido de acondicionamento em B.O.D à temperatura de 28 °C durante 48 e 72 horas. Cada material macerado foi amostrado em duplicata.

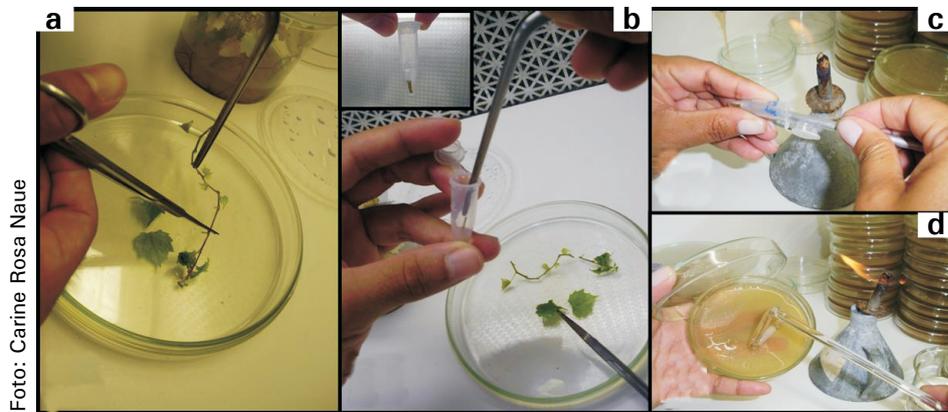


Foto: Carine Rosa Naue

Figura 1. Limpeza clonal de variedades de videira: (a) retirada de fragmento de 1 cm de comprimento da região mediana do caule; (b) fragmentos transferidos para tubos “eppendorfs” contendo água esterilizada; (c) maceração dos fragmentos; (d) fragmentos macerados espalhados com alça de Drigalsky.

A avaliação foi realizada quanto à presença ou ausência de colônias bacterianas típicas de Xcv.

Após a indexação, todo o material livre da bactéria foi multiplicado por meio de segmentos nodais (Figura 2a). Foram utilizados o meio de Galzy (1964) para as variedades Paulsen-1103, Thompson Seedless e Sugraone e o meio WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), para as variedades SO4 e IAC-766, ambos suplementados com 0,1mg/L de ácido indol acético, 100 mg/L de mio inositol, 2 mg/L de glicina, 5 g/L de agargel e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Os explantes foram transferidos para potes de plásticos termorresistentes, contendo 50 mL de meio de cultura (Figura 2b), e incubados em condição de fotoperíodo com 16 horas de luz, temperatura de 25 °C e intensidade luminosa de 40 $\mu\text{mol s}^{-2}$, por um período de 60 dias (Figura 2c). Após essa fase, as mudas foram levadas para aclimação em casa de vegetação contendo um sistema de nebulização intermitente e controle de temperatura e umidade.



Foto: Carine Rosa Naue

Figura 2. a) Material multiplicado por segmentos nodais; b) inoculação de explantes em meio de cultura; c) explantes incubados na sala de crescimento.

Resultados e Discussão

Todas as plantas, de todas as variedades avaliadas, apresentaram indexação negativa, ou seja, 100% das plantas estavam livres de Xcv (Tabela 1).

Tabela 1. Percentual de fragmentos livres de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*.

Variedades	% fragmentos livres de Xcv
IAC- 313	100
IAC 572	100
IAC 766	100
Paulsen-1103	100
SO4	100
Thompson seedless	100
Sugraone	100

A utilização da técnica de cultura de tecidos, juntamente com o procedimento de indexação, proporcionou a eliminação de fungos fitopatogênicos das culturas do cravo e do gladiolo (PIERIK, 1990). Utilizando essa mesma técnica, Silva (2009) obteve mudas de videira da variedade Red Globe, livres de Xcv. O procedimento de indexação utilizado por Silva (2009) pode ser aplicado para as diferentes variedades de videira, proporcionando, assim, material propagativo sadio para atender às demandas dos produtores não só do Vale do São Francisco, como das demais regiões produtoras de uva do País, visto que mudas produzidas por cultura de tecidos e indexadas é a única forma permitida para o trânsito e a comercialização de material propagativo a partir das áreas nas quais o cancro-bacteriano ocorre.

Conclusão

A cultura de tecidos, juntamente com o procedimento de indexação, permite constatar com segurança a sanidade das plantas e poderá ser utilizada como estratégia para a comercialização de mudas livres de Xcv.

Referências

- ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002. 16 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 58).
- ARAÚJO, J. S. P.; ROBBS, C. F.; RIBEIRO, R. Manejo integrado de fitobacterioses de importância econômica no Brasil. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 12, p. 145-199, 2004.
- BRASIL. Instrução Normativa n. 20, de 27 de setembro de 2001. Aprova as diretrizes para a produção integrada de frutas (DGPIF) e as normas técnicas gerais para a produção integrada de frutas. Diário Oficial [da República] Federativa do Brasil, Brasília, DF, 15 out. 2001. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=3915>>. Acesso em: 20 jun. 2011.
- CASTRO, L. A. S.; OLIVEIRA, R. P. **Sistema de produção da batata-doce**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. (Embrapa Clima Temperado. Sistema de Produção, 10). Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Batata-doce/SistemaProducaoBatata-doce/index.htm>>. Acesso em: 20 nov. 2010.
- GALZY, R. Technique de thermothérapie des viroses de la vigne. **Annales des Épiphyties**, Paris, v. 15, n. 3, p. 245-256, 1964.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagator's Society**, [Carlisle], v. 30, p. 421-427, 1980.
- PEIXOTO, A. R.; MARIANO, R. L. R.; VIANA, I. O. Meio semi-seletivo para o isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 36, n. 4, p. 1317-1320, 2006.
- PIERIK, R. L. M. Produccion de plantas libres de enfermedades In: PIERIK, R. L. M. (Ed.). **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. Madrid: Mundi-Pronsa, 1990. p.169-180.
- SILVA, A. M. F. **Limpeza clonal de videira com cancro-bacteriano e sobrevivência de Xanthomonas campestris pv. viticola em tecidos infectados**. 2009. 89 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- THOMAS, P. A three-step screening procedure for detection of covert and endophytic bacteria in plant tissue cultures. **Current Science**, Bangalore, v. 87, n. 1, p. 67-72, 2004.

