4 DOENÇAS CAUSADAS POR VÍRUS[1]

Mirtes Freitas Lima
Thor Vinícius Martins Fajardo

INTRODUÇÃO

Entre as doenças que afetam a cultura da uva, as causadas por vírus são difíceis de serem controladas, além de bastante destrutivas. Sintomas causados por esses patógenos geralmente resultam no declínio de plantas e, consequentemente, na redução da produtividade. Diversos são os fatores que influenciam a ocorrência e a severidade dessas viroses no parreiral, entretanto, o estado fitossanitário do material propagativo a ser utilizado na produção de mudas e em enxertias se destaca como o componente mais importante.

A disseminação desses patógenos pode ser potencializada quando se considera que a videira é, comercialmente, multiplicada por propagação vegetativa, o que aumenta a possibilidade de ocorrência de infecção latente (na qual videiras infectadas não apresentam sintomas aparentes) em plantas matrizes – doadoras de material propagativo. Outros fatores, também importantes, são presença de diferentes espécies de vírus infectando a planta, suscetibilidade da cultivar a esses patógenos, combinação copa/porta-enxerto, presença de vetores na área do parreiral, entre outros.

Cerca de 50 vírus já foram identificados infectando videiras em todo o mundo. No Brasil, as doenças mais importantes causadas por vírus e relatadas até o momento, são: a) enrolamento-da-folha (*Grapevine leafroll*); b) malformação-infecciosa ou doença-dos-entrenós-curtos (*Fanleaf disease*); c) lenho-rugoso (*Rugose wood*); d) manchas-das-nervuras (*Fleck disease*); e e) necrose-das-nervuras (*Vein necrosis disease*). O lenho-rugoso é um complexo que compreende quatro doenças: intumescimento-dos-ramos (*Corky bark*); doença das caneluras-do-tronco do Rupestris (*Rupestris stem pitting disease*); acanaladura-do-lenho de Kober (*Kober stem grooving*) e acanaladura-do-lenho do LN33 (*LN33 stem grooving*). A seguir, serão discutidas as principais doenças de origem viral que afetam a videira.

ENROLAMENTO-DA-FOLHA *Grapevine leafroll-associated virus – GLRaV*

O enrolamento-da-folha (*Grapevine leafroll*) é a virose mais disseminada e importante da videira. A sua transmissão por enxertia foi demonstrada nos anos 1930, na Alemanha. Atualmente, essa doença ocorre em parreirais de todo o mundo, podendo afetar cultivares de copa e de porta-enxerto, provocando o definhamento de videiras, redução da produtividade e aumento dos custos de manutenção do parreiral.

[1] Os autores agradecem ao pesquisador Gilmar B. Kuhn, da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, pela concessão de fotos com sintomas de viroses para ilustração deste capítulo.

Agente causal

Nove espécies de vírus, referidas como *Grapevine leafroll-associated virus* 1-9 (GLRaV 1 a 9), serologicamente distintas, já foram relatadas associadas à doença do enrolamento-da-folha (MARTELLI et al., 2007). Entre essas, o GLRaV-3 é a espécie mais estudada e melhor caracterizada, até o momento. Esses vírus pertencem à família Closteroviridae e aos gêneros *Closterovirus* e *Ampelovirus,* sendo transmitidos por afídeos e cochonilhas, respectivamente. As partículas virais são flexuosas, medindo de 1.250 nm a 2.200 nm de comprimento e 12 nm de diâmetro. O seu genoma é RNA de fita simples, senso positivo, variando de 15,5 kb a 19,3 kb. O peso molecular da proteína capsidial da maioria dos GLRaVs está situado em uma faixa entre 35 kDa (GLRaV-5) e 43 kDa (GLRaV-3). Entretanto, para o GLRaV-2, esse valor é significativamente menor, 26 kDa. O GLRaV-2 pertence ao gênero *Closterovirus*, o GLRaV-7 não foi designado a nenhum desses gêneros e as demais espécies de GLRaVs estão classificadas dentro de *Ampelovirus.*

No Brasil, o GLRaV-1 e o GLRaV-3 já foram identificados infectando videiras em parreirais dos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Goiás, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e, também, na região do Submédio do Vale do São Francisco. Entre essas espécies, o GLRaV-3 é a mais frequentemente detectada no País. Nos últimos sete anos, o GLRaV-2 (KUNIYUKI et al., 2002), o GLRaV-5 (KUNIYUKI et al., 2008) e o GLRaV-6 (KUNIYUKI et al., 2003) foram detectados no Brasil, em parreirais de São Paulo. O vermelhão, ou amarelo, como a doença é conhecida em São Paulo, já chegou a apresentar incidência média de 78,1% e 32,9%, em cultivares de copa e porta-enxerto, respectivamente (KUNIYUKI; COSTA, 1987). No Rio Grande do Sul, cultivares americanas (*Vitis labrusca*) e híbridas não apresentam sintomas típicos da doença e os porta-enxertos apresentam infecção latente.

Sintomatologia e epidemiologia

Em cultivares tintas de *V. vinifera*, os sintomas se caracterizam por apresentar manchas de coloração vermelha nas folhas que, posteriormente, coalescem tornando todo o limbo foliar avermelhado (Figura 1). Apenas o tecido ao longo e próximo às nervuras primárias e secundárias permanece verde. Em cultivares brancas, folhas de plantas infectadas tornam-se cloróticas ou amareladas. Em ambos os casos, os bordos das folhas ficam enrolados para baixo, que é o sintoma característico que originou o nome da doença. Videiras afetadas apresentam folhas espessas e quebradiças devido ao acúmulo de carboidratos, em decorrência da degeneração do floema que afeta a translocação de fotoassimilados, resultando em menores teores de sólidos solúveis totais nos frutos.

Os sintomas causados por esses vírus são mais perceptíveis no final do ciclo vegetativo em cultivares suscetíveis. Essa doença resulta em plantas menos vigorosas e com crescimento reduzido e, consequentemente, no definhamento e na redução da vida útil do parreiral.

Foto: Gilmar B. Kuhn

Figura 1. Sintomas causados pelo vírus do enrolamento-da-folha em videira. Enrolamento e avermelhamento de folhas em cultivar tinta de videira.

Entre os prejuízos causados pelo enrolamento-da-folha em plantas afetadas pela doença, destacam-se: diminuição na produção, na capacidade de enraizamento de estacas e no pegamento de enxertias, sendo que reduções de 10% a 70% na produtividade já foram detectadas (MARTELLI, 1986). No Brasil, perdas de até 60% ocorreram em plantas da cultivar Cabernet Franc, no Rio Grande do Sul (KUHN, 1989). Em plantas em fase produtiva, os cachos são menores e apresentam maturação tardia e irregular, com redução da pigmentação da película das bagas.

O vírus é disseminado a longas e a curtas distâncias por meio de material propagativo de copa e de porta-enxerto infectados, utilizados na formação de mudas e em enxertias. A ocorrência de infecção latente em cultivares de porta-enxerto, com a consequente ausência de sintomas nessas plantas, ocasiona a disseminação desses patógenos, via material propagativo, como resultado da dificuldade de identificação da doença apenas por meio da sintomatologia. A disseminação natural dos vírus associados ao enrolamento-da-folha, em campo, levou à comprovação de que a sua disseminação pode ocorrer, também, por meio de insetos vetores.

Cochonilhas das famílias *Pseudococcidae* e Coccidae, conhecidas como algodonosas (brancas) e de carapaça, respectivamente, transmitiram, experimentalmente, o GLRaV-1 e o GLRaV-3 de videira para videira. Como vetores do GLRaV-1, já foram relatadas as espécies *Parthenolecanium corni*, *Heliococcus bohemicus* e *Phenacoccus aceris*. Enquanto as espécies de cochonilhas *Pseudococcus longispinus*, *P. calceolariae*, *P. viburni* (= *P. affinis*), *P. maritimus*, *Planococcus ficus*, *P. citri*, *Heliococcus bohemicus*, *Phenacoccus aceris*, *Pseudococcus comstocki* e *Pulvinaria vitis* têm sido associadas à transmissão do GLRaV-3 (SACCAGGI, 2006).

Muitos desses pseudococcídeos são espécies polífagas e cosmopolitas, que atacam diversas culturas economicamente importantes, como cítrus e pessegueiro, e utilizam plantas invasoras como hospedeiras alternativas (KUNIYUKI et al., 2005a). Entretanto, a disponibilidade de informações sobre a ocorrência e a atuação dessas cochonilhas como vetoras de vírus no Brasil ainda é limitada. Em levantamento realizado em 131 vinhedos (*V. vinifera*) de Bento Gonçalves, no Rio Grande do Sul, verificou-se que as cochonilhas prevalentes em cachos (50 cachos por área) foram *P. citri* (10% de incidência), *Dysmicoccus* sp. (5%), *Planococcus minor* (4%), *Dysmicoccus brevipes* (3%), *Pseudococcus* sp. (3%), *P. viburni* (2%) e *P. maritimus* (1%), indicando nível de infestação das áreas amostradas de cerca de 30% (MORANDI FILHO et al., 2007). Entre essas, *P. citri* e *P. viburni* são, comprovadamente, transmissoras do GLRaV-3, GVA e GVB, e *P. maritimus*, vetora de GLRaV-3, em videira.

Recentemente, Kuniyuki et al. (2005a, 2005b) realizaram a transmissão do GLRaV-3, entre videiras, pelas cochonilhas *P. longispinus* e *P. citri*, obtendo porcentagens de transmissão de 60% a 64% e de 41,8% a 83,3%, respectivamente. Douglas e Krüger (2006) observaram taxas de transmissão variando de 38% a 78% para GLRaV-3, por *P. ficus*, e de 20% a 71% para *P. longispinus*. Estudos sobre ocorrência, dispersão e bioecologia dessas espécies de cochonilhas em videiras no Brasil ainda são escassos. Não há relatos da transmissão dos GLRaVs por sementes, tesouras utilizadas na poda e nem pelo contato entre raízes. Mecanicamente, pela fricção de extrato de plantas infectadas em folhas de plantas herbáceas (*Nicotiana* spp.), ocorre a transmissão, apenas, do GRLaV-2.

A identificação do enrolamento-da-folha é realizada pela enxertia de gemas da planta candidata em plantas de cultivares indicadoras sadias. Segundo Kuhn (1989), no Rio Grande do Sul, utilizam-se as cultivares Cabernet Franc, Pinot Noir, Merlot e Mission.

MALFORMAÇÃO-INFECCIOSA *Grapevine fanleaf virus* – GFLV

A malformação-infecciosa, folha-em-leque, degeneração-da-folha-em-leque, ou ainda, doença-dos-entrenós-curtos (*Grapevine fanleaf disease*), é uma das viroses mais antigas da videira. A doença tem ocorrência generalizada em parreirais de todo o mundo, afetando a produtividade e a longevidade das plantas. A malformação-infecciosa pode afetar todas as cultivares, incluindo porta-enxertos americanos e espécies de *Vitis* e/ou híbridos. A infecção, por esse vírus, pode causar a rápida destruição ou o declínio das plantas com o passar dos anos.

No Brasil, a doença foi relatada nos anos 1970, no Estado de São Paulo e na região Sul, onde é conhecida como "mosaico do Traviú" e "doença-dos-entrenós-curtos", respectivamente. Entretanto, não ocorre com incidência significativa em parreirais dessas regiões. Em São Paulo, a incidência média da malformação-infecciosa foi de 4,5% na cultivar Niágara Rosada e no porta-enxerto Traviú (KUNIYUKI et al., 1994).

Agente causal

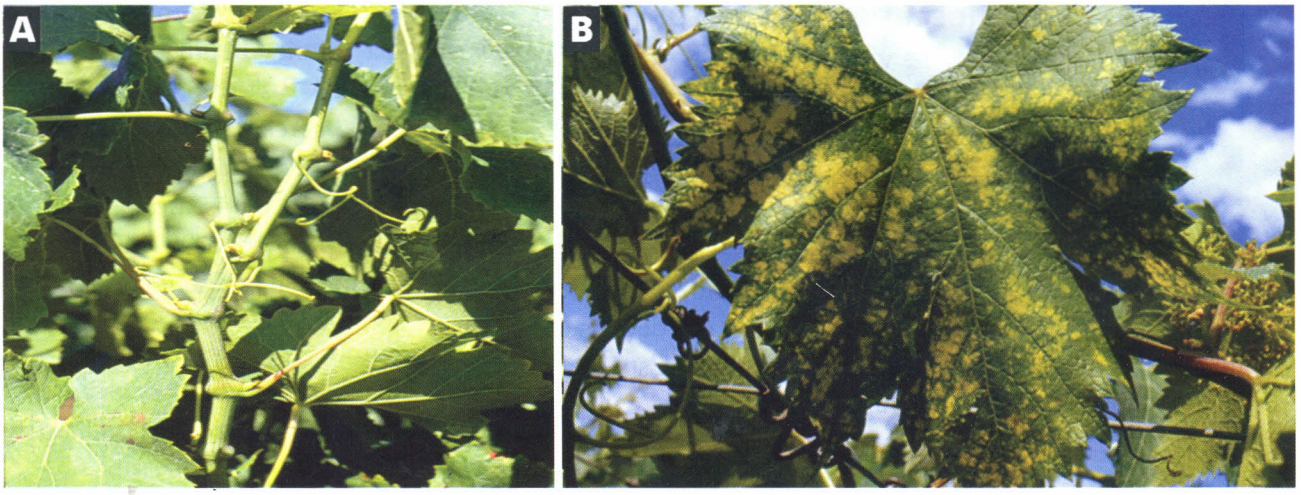
O vírus da malformação-infecciosa (*Grapevine fanleaf virus* – GFLV) pertence à família Comoviridae, gênero *Nepovirus*. Esse vírus possui partículas isométricas de 30 nm de diâmetro. O seu genoma é bipartido, RNA1 (7,3 kb) e RNA2 (3,7 kb), sendo composto por RNA de fita simples e polaridade positiva. Ambos RNAs são necessários para que a infecção ocorra.

Sintomatologia e epidemiologia

O nome da doença é derivado de um dos sintomas causados pelo GFLV em folhas de videira, os quais são caracterizados pela malformação foliar, pecíolo em ângulo aberto e distribuição irregular das nervuras no limbo da folha, propiciando aspecto de leque aberto. De acordo com a estirpe do vírus presente na planta infectada, os sintomas podem ser diferenciados em três tipos:

- Folha em leque – É causado pela estirpe *fanleaf* e os sintomas caracterizam-se por apresentar malformação foliar e denticulações pontiagudas nos bordos das folhas. Nos ramos observam-se achatamento e ramificações anormais, crescimento em zigue-zague e presença de nós duplos e entrenós curtos (Figura 2a). Plantas infectadas com essa estirpe são menos vigorosas, a produção é reduzida e os frutos apresentam amadurecimento irregular, com bagas que permanecem pequenas e verdes.
- Mosaico amarelo – É causado pela estirpe *yellow mosaic* (Figura 2b). As folhas exibem manchas de coloração amarela e de tamanho irregular, que se estendem por todo o limbo foliar. Sintomas similares podem também surgir em ramos, gavinhas e inflorescências.
- Faixa das nervuras – Esse sintoma é incitado pela estirpe *vein banding* e caracteriza-se pelo surgimento de manchas de coloração amarela ao longo das nervuras principais das folhas, que podem apresentar assimetria. Os prejuízos no parreiral incluem redução da produção e da produtividade, devido ao baixo pegamento de frutos e à formação de cachos com bagas de tamanhos irregulares.

A disseminação da doença, dentro do parreiral, é feita pelas espécies de nematoides *Xiphinema index* e *X. italiae*, que podem reter o vírus por até oito meses na ausência de plantas hospedeiras (BOVEY et al., 1980; MARTELLI, 1986). A longas distâncias, a disseminação ocorre por meio de material vegetativo infectado.



Fotos: Gilmar B. Kuhn

Figura 2. Sintomas do vírus da malformação-infecciosa. Bifurcação e achatamento em ramo causado por estirpe do GFLV (A); mosaico amarelo (B).

No Brasil, as espécies *X. americanum* (sin. *X. brevicolle*), *X. index*, *X. brasiliensis* e *X. krugi* já foram identificadas em videiras (KUHN; FAJARDO, 2003). Entretanto, não existem informações sobre a incidência dessas espécies, nem do seu papel como agentes disseminadores de vírus, em parreirais do País. Não há relatos da transmissão desse vírus pela semente, tesouras de poda ou ferramentas.

Naturalmente, esse vírus infecta apenas a videira (*Vitis* spp.). Entretanto, experimentalmente, pode ser transmitido por meio de inoculação mecânica, que consiste na fricção do extrato de videiras infectadas em folhas das espécies *Chenopodium amaranthicolor*, *C. quinoa*, *Gomphrena globosa* e *Cucumis sativus*, que são plantas herbáceas utilizadas na diagnose da malformação-infecciosa.

A identificação do GFLV pode ser feita por meio de enxertia de material infectado em plantas de *V. rupestris* cv. St. George. A importância econômica dessa doença no parreiral varia com o nível de tolerância da cultivar ao vírus. Perdas de até 80% na produtividade já foram relatadas em cultivares suscetíveis (MARTELLI; SAVINO, 1994). Videiras infectadas apresentam redução no vigor e declínio progressivo, além de menor produtividade devido ao baixo pegamento de frutos, à formação de cachos com bagas de tamanhos irregulares e ao amadurecimento desuniforme. Os prejuízos causados pela malformação-infecciosa em uvas de mesa podem ser mais significativos devido ao abortamento de flores e à má formação de bagas, o que inviabiliza os frutos para a comercialização.

LENHO-RUGOSO

O lenho-rugoso da videira (*Rugose Wood*) é uma denominação que compreende quatro doenças caracterizadas pela presença de anomalias no lenho, sendo transmitidas por enxertia e diferenciadas, segundo a expressão de sintomas, em três cultivares de porta-enxerto: a) intumescimento-dos-ramos (*Corky bark*), cuja indicadora é LN33; b) acanaladura-do-lenho de Kober (*Kober stem grooving*), identificada pela enxertia no porta-enxerto Kober 5BB; c) caneluras-do-tronco de *Rupestris* (*Rupestris stem pitting*), sintomas induzidos em *V. rupestris* cv. St. George; e d) acanaladura-do-lenho de LN33 (*LN33 stem grooving*), diferenciada em plantas LN33. Essas doenças encontram-se disseminadas em áreas vitícolas de todo o mundo. No Brasil, apenas a acanaladura-do-lenho de LN33, ainda não foi detectada, por isso não será apresentada.

Intumescimento-dos-ramos *Grapevine virus B* – GVB

A doença intumescimento-dos-ramos da videira (*Corky bark*) foi relatada pela primeira vez no Estado da Califórnia, nos Estados Unidos. Atualmente, apresenta ampla distribuição, já tendo sido relatada em áreas vitícolas de países como o México, Brasil, França, Espanha, Suíça, Itália, Iugoslávia, Bulgária, África do Sul e Japão.

No Brasil, essa doença ocorre em parreirais dos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e, também, na região do Submédio do Vale do São Francisco. Em São Paulo, a incidência média foi determinada em 9,6% (cultivares de copa) e 2,3% (cultivares de porta-enxerto), e no Rio Grande do Sul, a incidência ficou na faixa de 2% a 11%, em cultivares americanas (KUHN, 1992).

Agente causal

O *Grapevine virus B* (GVB) tem sido associado à doença do intumescimento-dos-ramos. Esse vírus pertence ao gênero *Vitivirus*, da família Betaflexiviridae. As partículas do GVB são alongadas e flexuosas, medindo cerca de 800 nm de comprimento e 12 nm de largura. O seu genoma é monopartido e possui RNA de fita simples, senso positivo, de cerca de 7,6 kb. A proteína capsidial apresenta peso molecular de 23 kDa.

Sintomatologia e epidemiologia

Em folhas das cultivares tintas, a doença ocasiona o avermelhamento do limbo foliar e, em cultivares brancas, as folhas passam a ter coloração amarela. Em ambos os casos, os bordos das folhas ficam voltados para baixo.

Em videiras afetadas pela doença, observam-se, também, retardamento na brotação das gemas, maturação irregular dos ramos que se tornam flexíveis e a presença de rachaduras localizadas na base dos ramos (Figuras 3a e 3b). Em diversas espécies de *Vitis* e em cultivares de *V. vinifera,* o vírus parece não induzir o aparecimento de todos os sintomas carac-

Fotos: Gilmar B. Kuhn

Figura 3. Sintomas de intumescimento em ramo de videira cv. Isabel (A, B).

terísticos da doença (GOHEEN, 1994). Nesse caso, a manifestação de sintomas ocorre apenas quando gemas dessas videiras são enxertadas em cultivares indicadoras, como a LN33. Entretanto, sintomas da doença podem ser observados naturalmente em videiras de cultivares americanas (*V. labrusca*), como Isabel (Figuras 3a e 3b), Niágara Branca e Niágara Rosada, que podem apresentar intumescimento dos entrenós do ramo do ano, com fendilhamento longitudinal do tecido afetado.

A disseminação da doença ocorre, principalmente, por meio de material propagativo infectado e utilizado na formação de mudas e em enxertias. A disseminação natural do vírus também foi relatada no México (TELIZ et al., 1980) e na África do Sul (ENGELBRECHT; KARSDORF, 1990). Experimentalmente, o agente associado ao intumescimento dos ramos foi transmitido pelas espécies de cochonilhas *Planococcus ficus*, *Pseudococcus viburni* (=*P. affinis*), *P. longispinus* e *Planococcus citri*.

A sua identificação é feita pela indexagem em plantas da indicadora, híbrido LN33 (Courdec 1613 x Thompson Seedless), sensível à doença e, na qual, os sintomas se manifestam na forma de intumescimento dos entrenós dos ramos, em plantas do porta-enxerto.

Videiras afetadas apresentam enfraquecimento e a consequente redução da longevidade. Maturação irregular dos frutos também pode ser observada. Perdas, de até 76% na produção total, foram registradas no México (MARTELLI, 1986).

Caneluras-do-tronco de Rupestris
Rupestris stem pitting-associated virus – RSPaV

Em 1959, acreditava-se que a doença das caneluras da videira (*Rupestris stem pitting*), tivesse origem viral (GRANITI; CICCARONE, 1961), entretanto, a sua natureza infecciosa foi relatada apenas posteriormente. Atualmente, apresenta ampla distribuição em videiras de vários países. No Brasil, a doença das caneluras-do-tronco de *Rupestris* já foi detectada nos estados de São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e na região do Submédio do Vale do São Francisco. Em São Paulo, é conhecida como Cascudo.

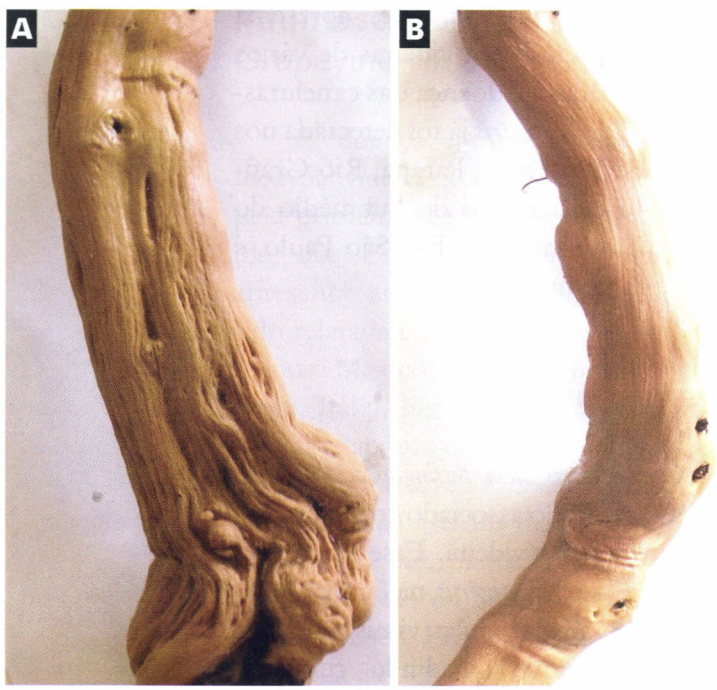
Agente causal

O *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV) tem sido associado com a doença das caneluras da videira. Esse vírus pertence ao gênero *Foveavirus*, na família Betaflexiviridae. As partículas virais são alongadas e flexuosas, medindo cerca de 800 nm de comprimento. O seu genoma é composto por RNA de fita simples, senso positivo e 8,7 kb. O peso molecular da proteína capsidial é de 28 kDa.

Sintomatologia e epidemiologia

Em plantas da espécie *V. rupestris* cv. St. George, sintomas típicos da doença surgem abaixo do ponto de enxertia e são caracterizados pela presença de caneluras no cilindro lenhoso, observados quando a casca do tronco da planta é removida (Figuras 4a e 4b). Nenhum sintoma específico é observado na folhagem. A severidade dos sintomas pode variar segundo a população de sequências variantes do vírus, presentes na gema utilizada como enxerto. A presença de partículas do vírus pode ser observada no parênquima do floema de brotações jovens (TZENG et al., 1984).

A doença das caneluras é caracterizada pela manifestação de declínio gradual em plantas das cultivares de *V. vinifera*, além de redução da produtividade. Porta-enxertos originados de espécies americanas, diferentes de *V. rupestris*, podem não exibir sintomas de caneluras no lenho, apenas declínio de plantas. A doença é



Fotos: Mirtes F. Lima

Figura 4. Sintomas de caneluras no cilindro lenhoso de videira (A). Videira sadia (B).

disseminada, principalmente, em material propagativo infectado, utilizado em enxertias. Não ocorre a transmissão mecânica do RSPaV para plantas herbáceas.

A identificação da doença é feita por meio de testes biológicos com a indexagem em plantas da indicadora *V. rupestris* cv. St. George, na qual sintomas típicos são reproduzidos no cilindro lenhoso do porta-enxerto. Em plantas afetadas, observam-se redução na produtividade. Outras plantas indicadoras, tais como *V. berlandieri,* Kober 5BB, 157/11 e o híbrido LN33, também, podem ser utilizadas na sua identificação (MARTELLI, 1986).

Acanaladura-do-lenho de Kober Grapevine virus A – GVA

O *Grapevine virus A* (GVA) tem sido associado aos sintomas da acanaladura-do-lenho de Kober (*Kober stem grooving*). Apesar da frequência dessa associação ser significativa, nem sempre o GVA é detectado em plantas com sintomas da doença.

O GVA está classificado no gênero *Vitivirus,* dentro da família Betaflexiviridae. Os vírus pertencentes a esse gênero possuem partículas alongadas e flexuosas, medindo cerca de 800 nm de comprimento e 12 nm de largura. O genoma do vírus é monopartido, possui RNA de fita simples, polaridade positiva e cerca de 7,6 kb. A proteína capsidial apresenta peso molecular de 21,5 kDa.

Sintomatologia e epidemiologia

Sintomas de acanaladura são produzidos no cilindro lenhoso de plantas afetadas. A identificação da doença é feita pela indexagem em plantas do porta-enxerto Kober 5BB (*V. berlandieri* x *V. riparia*), hospedeiro indicador da doença. Em plantas desse porta-enxerto, sintomas típicos são observados no lenho, após remoção da casca do tronco de plantas mantidas no campo (Figura 4a).

A transmissão do GVA ocorre por meio de material propagativo infectado, utilizado em mudas e em enxertias e, também, pelas cochonilhas *Pseudococcus longispinus*, *Planococcus citri*, *Planococcus ficus*, *P. viburni* (= *P. affinis*), *Neopulvinaria innumerabilis*, *Heliococcus bohemicus* e *Pseudococcus comstocki*, de maneira semipersistente. Experimentalmente, esse vírus pode ser inoculado em plantas indicadoras herbáceas (*Nicotiana* spp.), por meio de inoculação mecânica. Entretanto, essa transmissão ocorre com alguma dificuldade, considerando-se que o GVA é limitado ao floema.

MANCHA-DAS-NERVURAS *Grapevine fleck virus – GFkV*

A mancha-das-nervuras (*Grapevine fleck disease*) passou a ser considerada uma doença, em 1972 (HEWITT et al., 1972). Atualmente, ocorre em todas as áreas vitícolas do mundo, já tendo sido diagnosticada no Brasil, Algéria, Tunísia, Israel, Jordânia, Turquia e Chipre.

No Brasil, a doença foi detectada em videiras nos estados de Goiás, Minas Ge-

rais, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio Grande do Sul e na região do Submédio do Vale do São Francisco. Em São Paulo, a sua incidência média em cultivares de copa e porta-enxerto foi de 58% e de 18,1%, respectivamente (KUNIYUKI; COSTA, 1994). No Rio Grande do Sul, a mancha-das-nervuras foi detectada, ocorrendo em 19,8% das cultivares produtoras e em 6,9% dos porta-enxertos. A infecção latente também pode ocorrer em cultivares de copa e de porta-enxerto.

Agente causal

A doença é causada por *Grapevine fleck virus* (GFkV), pertencente ao gênero *Maculavirus*, família Tymoviridae. As partículas virais são isométricas de 30 nm de diâmetro. O genoma desse vírus é monopartido, RNA de fita simples e polaridade positiva de cerca 7,5 kb. O peso molecular da proteína capsidial é de 24 kDa.

Sintomatologia e epidemiologia

Nas folhas surgem manchas levemente cloróticas e translúcidas, de formato irregular, acompanhando a posição das nervuras terciárias e quaternárias (PEARSON; GOHEEN, 1994). As manchas podem variar em número, tamanho e distribuição no limbo foliar. Os sintomas observados em plantas infectadas compreendem deformação foliar, bordos das folhas voltados para cima e redução no crescimento da planta. Em cultivares de *V. vinifera* e em muitos híbridos de copa, assim como em alguns porta-enxertos, o vírus é latente.

A identificação do GFkV é feita pela enxertia na indicadora *V. rupestris* cv. St. George. Entretanto, os porta-enxertos 99R (VUITTENEZ, 1970) e 5C (BOVEY, 1972) podem, também, exibir sintomas da doença, quando enxertados. Esse vírus não é transmitido, mecanicamente, para plantas indicadoras herbáceas, por ser limitado aos tecidos do floema.

O GFkV é disseminado por meio de material propagativo infectado, utilizado na produção de mudas e em enxertia. No Brasil, além da cv. St. George, os porta-enxertos Kober 5BB e Golia também são utilizados na identificação do mosaico das nervuras, em São Paulo (KUNYIUKI; COSTA, 1994).

NECROSE-DAS-NERVURAS *Vein necrosis disease*

A necrose-das-nervuras (*Vein necrosis disease*) foi descrita pela primeira vez na França. Atualmente, ocorre em parreirais de todo o mundo. Entretanto, não há informações com relação a sua importância econômica. A doença é latente em cultivares de uva europeias e americanas e em alguns porta-enxertos.

No Brasil, a necrose-das-nervuras ocorre em regiões produtoras de São Paulo, Rio Grande do Sul e do Submédio do Vale do São Francisco. Nesses estados, a incidência da doença foi de 70,8%, em cultivares de copa, e de 38,2% em porta-enxertos. Entretanto, no Submédio do Vale do São Francisco, ainda não existem informações sobre a incidência dessa doença em parreirais da região.

Agente causal

Até o momento, nenhum agente viral foi isolado, identificado e, consequentemente, comprovadamente associado aos sintomas da doença necrose-das-nervuras.

Sintomatologia e epidemiologia

Sintomas de necrose, principalmente nas nervuras secundárias e terciárias,

podem ser observados em folhas de videiras afetadas pela doença, sendo mais distintos na face dorsal da folha.

Os sintomas surgem, no início, nas folhas da base das brotações e evoluem ao longo do ramo, acompanhando o seu desenvolvimento e, eventualmente, tomando a maioria das folhas. Estrias escurecidas nas gavinhas e nas brotações, e seca das extremidades das brotações podem também ser observadas (BOVEY et al., 1980). Plantas doentes geralmente apresentam redução no crescimento.

A identificação da necrose-das-nervuras é feita por meio da indexagem em plantas sadias do porta-enxerto americano 110 Richter (*V. rupestris* x *V. berlandieri*), que exibem sintomas característicos da doença. No Rio Grande do Sul, o porta-enxerto "Solferino" (*V. berlandieri* x *V. riparia*) também é utilizado como planta indicadora na detecção da doença. No Brasil, pela sua grande disseminação no Estado do Rio Grande do Sul, Kuhn (1994) sugeriu a inclusão da doença em programas de seleção sanitária.

DETECÇÃO DE VÍRUS

A diagnose de doenças de origem viral em videira é baseada, principalmente, em resultados obtidos nos testes de campo e nos testes laboratoriais. Isso ocorre porque a sintomatologia apresentada por plantas doentes no campo pode ser complexa, com o envolvimento de diversos agentes virais, e não ser característica de uma determinada doença. Outro fator a ser considerado é a ocorrência de infecção latente. Plantas infectadas e sem apresentar sintomas aparentes podem propiciar a disseminação desses patógenos, quando utilizadas como matrizes. Além disso, a sintomatologia pode não ter sido incitada por vírus, mas por outros patógenos, ou mesmo, por fatores abióticos.

Inicialmente, a diagnose de viroses em videira era realizada apenas por meio dos testes biológicos, que são trabalhosos e demandam muito tempo para a obtenção dos resultados. Entretanto, o desenvolvimento dos métodos sorológicos e, posteriormente, dos métodos moleculares, viabilizaram a identificação desses patógenos em material propagativo infectado de forma rápida e acurada, prevenindo a sua disseminação por meio de mudas e gemas, garantindo, assim, a movimentação do material propagativo de forma mais segura. Entre esses, os métodos biológicos e os sorológicos são os mais tradicionais, constituindo-se em ferramentas fundamentais em programas voltados para a produção de materiais livres de vírus. Os métodos sorológicos e os métodos moleculares permitem a identificação de vírus de forma precisa, além de serem extremamente sensíveis. Mas para atingir uma diagnose plenamente confiável, recomenda-se o emprego dos três métodos, por serem complementares.

No método biológico, a transmissão do vírus ocorre por meio da união de tecidos (enxertia) ou por inoculação mecânica, podendo ser realizado em dois grupos distintos de plantas hospedeiras, empregadas de acordo com a doença a ser identificada. O primeiro grupo é compreendido por plantas lenhosas – que são diferentes cultivares de porta-enxerto ou de copa de videira – sensíveis às viroses. O segundo grupo é constituído por plantas herbáceas.

A indexagem em plantas lenhosas, de forma geral, é realizada para a detecção dos vírus que infectam a videira, limitados ao floema e não transmitidos mecanicamente. Esses pertencem às famílias Closteroviridae, Betaflexiviridae e Tymoviridae. A indexação é feita por meio de enxertia de gemas de videiras candidatas em mudas de porta-enxertos e de copas. As plantas enxertadas podem ser mantidas em casa de vegetação por cerca de dois anos ou transferidas para o

campo, onde permanecem por até três anos, quando ocorre a avaliação dos sintomas. No caso do complexo-rugoso da videira, após o arranquio das plantas, a casca do tronco do porta-enxerto é removida, para verificação da presença ou ausência de caneluras no lenho.

No caso das plantas herbáceas, a inoculação é feita mecanicamente. Folhas de videira doentes são maceradas em solução tampão e o extrato obtido é friccionado na superfície de folhas das plantas indicadoras, previamente pulverizadas com agentes abrasivos, como carborundo (500 mesh a 600 mesh) ou celite. Esses abrasivos provocam pequenos ferimentos no limbo foliar das plantas, propiciando a penetração das partículas virais no tecido vegetal. As plantas são mantidas em casa de vegetação. Quando o vírus é transmitido às plantas indicadoras, essas exibem sintomas de 5 a 20 dias após a inoculação. Os vírus de maior importância, transmitidos por esse método, pertencem aos gêneros *Nepovirus* (GFLV), *Vitivirus* (GVA e GVB) e *Closterovirus* (GLRaV-2). As indicadoras mais utilizadas pertencem aos gêneros *Nicotiana, Chenopodium* e *Cucumis*.

A sorologia é um método imunológico de detecção que se caracteriza pelo emprego de anticorpos específicos, capazes de reconhecer determinadas proteínas. O método mais comum é o *Enzyme-linked immunosorbent assay* (Elisa), no qual anticorpos produzidos contra a proteína capsidial de um determinado vírus são empregados na sua detecção (Figura 5). Nessa reação, extratos preparados pela maceração de tecido vegetal infectado em solução tampão são utilizados como antígeno. A coleta do material vegetal a ser utilizado no preparo dos extratos é muito importante, considerando-se que os vírus apresentam distribuição irregular dentro da planta e que, também o estádio fenológico, assim como o tipo de tecido a ser coletado, devem estar associados à maior concentração desses patógenos na planta, visando facilitar a sua detecção.

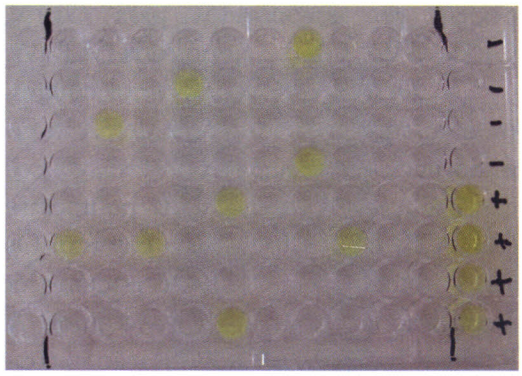


Foto: Mirtes Freitas Lima

Figura 5. Detecção do GLRaV-1 por meio do teste Elisa. Orifícios com coloração amarelo-escuro indicam amostras positivas para o GLRaV-1, e orifícios sem coloração indicam amostras negativas para esse vírus.

No preparo do extrato, tecido cambial ou pecíolos e nervuras de folhas maduras, coletados no final do ciclo vegetativo, constituem boa fonte de antígeno para a detecção de GLRaVs, GVA e GVB. Entretanto, para GFLV e GFkV, a detecção é mais acurada em preparações feitas a partir de folhas novas coletadas no início do ciclo vegetativo.

O resultado do Elisa é determinado por uma reação enzimática (enzima fosfatase alcalina conjugada ao anticorpo) com um substrato específico. A avaliação do teste é realizada pela leitura da absorbância em leitora de placas, utilizando-se filtro de 405 nm. A amostra é considerada positiva quando o valor da leitura da absorbância for, pelo menos, duas vezes maior que o valor para o extrato de planta sadia, utilizado como controle negativo. Esse método apresenta como vantagens: ser rápido, podendo-se obter os resultados no período de 24h a 48h; ser sensível; e poder ser utilizado para a avaliação de um grande número de amostras. A limitação do teste Elisa reside no fato de não haver anticorpos produzidos para a identificação de todos os vírus que infectam videira. Nesse caso, outros tipos de testes devem ser utilizados na sua identificação. Dentre os vírus descritos, anteriormente, anticorpos produzidos comercialmente

podem ser encontrados para GFLV, GFkV, GVA, GVB e alguns dos GLRaVs.

Dentre os métodos moleculares, ou seja, aqueles baseados na detecção do ácido nucleico, a transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) é o método mais comum. Os vírus anteriormente citados podem ser identificados por meio dessa técnica. A RT-PCR baseia-se na amplificação e, consequentemente, na detecção do material genético do vírus (RNA no caso daqueles que infectam videira) em amostras vegetais infectadas. Nesse método, pelo menos parte da sequência do genoma do vírus a ser detectado precisa ser conhecida para dar origem aos oligonucleotídeos que serão utilizados na reação. O processo envolve as enzimas Transcriptase reversa e Taq DNA Polimerase, e a reação é automatizada, pela incubação em termociclador programado para executar a transcrição de fragmentos do RNA em DNA e, posteriormente, executar os múltiplos ciclos da PCR, com o objetivo de produzir inúmeras cópias do fragmento de DNA. A amplificação seletiva de um fragmento do genoma do vírus, compreendido entre dois oligonucleotídeos, ocorre pela utilização do RNA do vírus como molde. Mais de 90% dos vírus que infectam plantas possuem RNA como material genético.

O preparo do extrato da planta infectada a ser utilizado na RT-PCR é muito importante, considerando-se que os tecidos da videira contêm altas concentrações de polissacarídeos e de compostos fenólicos, que podem inibir a ação das enzimas utilizadas na PCR. A vantagem desse método é que, mesmo que o patógeno esteja presente em pequenas quantidades, a amplificação por PCR propicia a sua detecção. Os produtos da reação são visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose (Figura 6). O emprego de brometo de etídeo, corante que forma um "complexo" com o DNA, permite que esse possa ser visualizado sob luz ultravioleta, na forma de uma banda. Quando nenhum DNA, de tamanho esperado, for visualizado em gel de agarose, significa que a amostra vegetal não está infectada com o patógeno ou que a sua concentração encontra-se abaixo do limiar de detecção da técnica.

O *Western blot* é uma técnica imunoeletroforética utilizada na caracterização de proteínas virais (Figura 7). Nesse método, proteínas totais extraídas de plantas infectadas são desnaturadas e, posteriormente, separadas em gel de SDS-poliacrilamida. As frações da proteína são, então, transferidas do gel para membrana de nitrocelulose. Essa transferência pode ser ativa, pela aplicação de uma voltagem para propiciar a migração das proteínas do gel para a membrana, ou passiva, quando ocorre por capilaridade. O processo de detecção das proteínas virais, imobilizadas nas membranas, envolve a sua exposição aos anticorpos produzidos contra a proteína do vírus a ser detectado,

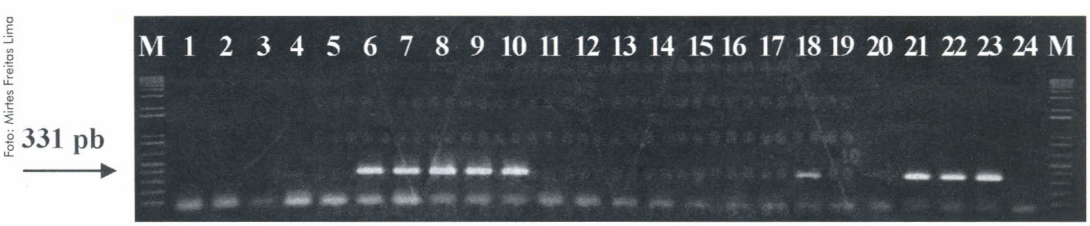


Foto: Mirtes Freitas Lima

Figura 6. Análise em gel de agarose 1,5% dos produtos da RT-PCR, realizada utilizando-se RNA total, extraído de videiras e testadas para *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV). A seta indica o fragmento específico de DNA amplificado com 331 nucleotídeos (pb = pares de base). M = marcador DNA *ladder plus*. 1 – 20 = amostras de videira testadas; 21 – 23 = controle positivo; 24 = controle negativo.

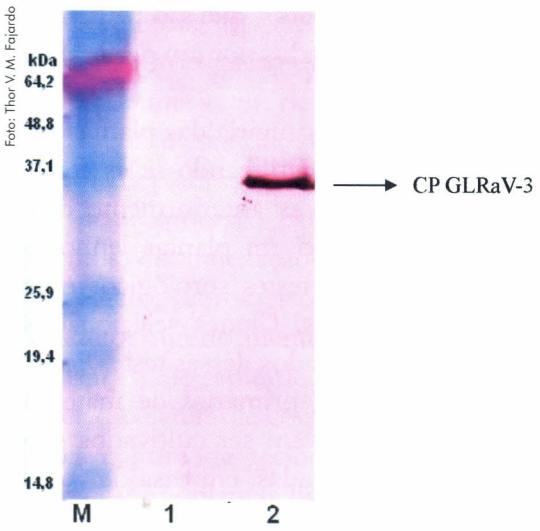


Figura 7. *Western blot* utilizando antissoro contra *Grapevine leafroll-associated virus 3*. A seta à direita indica a banda correspondente à proteína capsidial do GLRaV-3. 1 = extrato de videira sadia. 2 = extrato de videira infectada com GLRaV-3. M = posição dos padrões de massa molecular, em kDa.

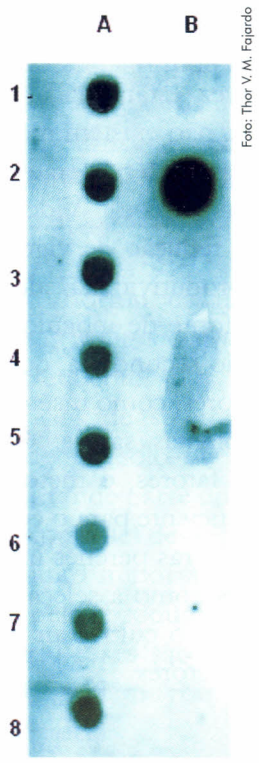


Figura 8. Hibridização *dot-blot* com sonda não radioativa para a detecção do *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV). A (1-8) = diferentes videiras infectadas. 1B = controle negativo (videira sadia). 2B = controle positivo.

e a revelação da membrana é feita utilizando-se reagentes específicos.

Outros métodos moleculares incluem as hibridizações, *Northern blot* (utilizada na detecção de RNA) e *Southern blot* (empregada na detecção de DNA). Em ambos os casos, o ácido nucleico viral, imobilizado em membranas de náilon, é detectado por meio da utilização de sondas moleculares (Figura 8), constituídas por fragmentos da sequência do genoma do vírus a ser detectado, e que podem ser sintetizadas in vitro. As sondas podem ser radioativas, ou seja, marcadas com ^{32}P ou, ainda, as chamadas sondas frias, marcadas com digoxigenina. Para as amostras serem consideradas positivas, deve haver complementaridade entre a sequência utilizada como sonda e aquela do vírus presente na amostra testada e imobilizada na membrana, formando "duplexes". Esses resultados positivos são detectados pela presença de manchas na membrana que serve de suporte para os ácidos nucleicos das amostras. Essa técnica é altamente específica e requer mão de obra especializada, sendo mais utilizada na caracterização de isolados virais e, esporadicamente, como método diagnóstico.

Controle

A utilização de material propagativo livre de doenças é extremamente importante para culturas perenes, como a videira, multiplicada, essencialmente, por via propagativa. Entre os problemas fitossanitários da cultura, os vírus constituem o principal grupo de patógenos disseminados por meio da multiplicação vegetativa. Esses infectam a videira, de forma sistêmica, podendo ser detectados em todas as suas partes e, nesse caso, quando as plantas-matrizes estão infectadas, os vírus permanecem nas mudas. Além da disseminação, a propagação vegetativa propicia acúmulo desses patógenos, ao longo

de vários anos, originando doenças complexas.

Uma vez estabelecidas nas plantas do parreiral, não existem medidas curativas que possam ser adotadas visando o controle das viroses. Videiras afetadas apresentam redução de vigor, declínio e queda da produtividade, além de servirem como fonte de inóculo viral para a disseminação secundária, que ocorre por meio de vetores, como insetos e nematoides, para plantas sadias. Considerando todos esses fatores, o método mais importante e eficiente para o controle de viroses em culturas perenes inclui a aplicação de ações como a seleção sanitária, a termoterapia e o cultivo in vitro, e a eliminação de vetores.

Seleção sanitária

O plantio de mudas certificadas, livres de vírus, é de fundamental importância ao estabelecimento de novas áreas, pois reduz o risco de introdução desses patógenos no parreiral. A qualidade sanitária do material propagativo a ser utilizado na produção de mudas é de grande relevância, e a seleção sanitária se constitui na primeira etapa desse processo. As estacas enraizadas e as gemas devem ser oriundas de plantas matrizes, livres de vírus para os quais tenham sido indexadas.

Para a obtenção dessas plantas, que constituem as fontes primárias de propagação, é necessário realizar várias etapas, as quais incluem a seleção sanitária e a seleção clonal. A primeira envolve a escolha de plantas dentro do parreiral segundo a conformidade varietal, vigor vegetativo, produtividade e qualidade sanitária, observada ao longo de sucessivos ciclos vegetativos. Videiras livres de doenças e com boas características produtivas são selecionadas. Os clones oriundos dessas plantas são mantidos em campo e analisados por alguns ciclos vegetativos. A seleção clonal é realizada pela escolha dos clones candidatos, que são plantados em campo e avaliados por um período de 2 a 3 anos.

A avaliação sanitária das plantas selecionadas é feita utilizando-se as ferramentas diagnósticas anteriormente descritas: a indexação em plantas lenhosas ou herbáceas, os testes sorológicos e os testes moleculares. Clones selecionados segundo os resultados desses testes constituirão as fontes primárias de material propagativo e devem ser cultivados sob condições controladas, em casa de vegetação telada.

Termoterapia e cultivo in vitro

A termoterapia associada à cultura de tecidos pode ser utilizada na obtenção de plantas sadias a partir de videiras infectadas com vírus. O método baseia-se no princípio de que a inativação desses patógenos em material vegetal infectado é possível, por meio de sua exposição prolongada ao calor. Ainda, o vírus não seria capaz de atingir o ápice caulinar ou o meristema das brotações novas, surgidas nas plantas durante o tratamento termoterápico, pois essa condição seria desfavorável à multiplicação viral.

O processo é trabalhoso, oneroso e demanda um longo período de tempo para que novas videiras sejam obtidas a partir das plantas tratadas e para que o processo de indexagem seja concluído. Entretanto, é um método eficiente para a obtenção de videiras livres de vírus. As plantas infectadas são mantidas à temperatura de 37 °C a 38 °C, por um período que varia de 30 a 150 dias ou mais, de acordo com o vírus a ser eliminado. Para o GFLV, esse período situa-se em torno de 30 a 42 dias; 90 dias para o GVB; 60 a 120 dias para os GLRaVs; 150 dias para o GVA; e mais de 150 dias para o RSPaV.

As técnicas de cultura de tecidos são empregadas após as plantas terem passado pela termoterapia, quando os ápices

das brotações são retirados e utilizados na micropropagação de segmentos caulinares de uma gema, ou os meristemas são excisados e mantidos sob condições in vitro. As plantas regeneradas e resultantes desse processo passam por procedimentos de indexação utilizando testes biológicos, sorológicos e moleculares, descritos anteriormente, para certificação do seu estado sanitário. Em muitos casos, a seleção sanitária, combinada à termoterapia/cultura de tecidos, é utilizada na obtenção de plantas livres de vírus e, no caso de cultivares selecionadas, esse procedimento é muito importante.

Controle de vetores

Apesar de o material propagativo ser a principal via de disseminação de vírus em videira, alguns desses patógenos também são disseminados por insetos e nematoides, como descrito anteriormente. Por exemplo, GLRaV-1 e GLRaV-3 (gênero *Ampelovirus*) e GVA e GVB (gênero *Vitivirus*) são disseminados por cochonilhas de maneira semipersistente.

De modo geral, nesse tipo de transmissão, o vírus é adquirido quando esses insetos se alimentam em planta infectada, por cerca de 15 minutos. Esse tempo é denominado período de acesso de aquisição, durante o qual as cochonilhas adquirem e acumulam as partículas virais. A transmissão para videiras sadias ocorre durante o processo de alimentação desses insetos virulíferos nessas plantas, por cerca de 30 minutos, entretanto, esse período pode ser bastante variável. A alimentação em plantas doentes, por períodos mais longos, aumenta a eficiência de transmissão desses patógenos. A multiplicação do vírus no vetor não ocorre, assim como também não há transmissão viral para os descendentes.

No Brasil, são escassas as informações disponíveis sobre as espécies de cochonilhas presentes nas principais regiões vitícolas e a magnitude de sua atuação, como vetoras de vírus. Algumas das espécies já identificadas em parreirais brasileiros são *Pseudococcus viburni*, *P. vitis*, *P. longispinus* e *Planococcus citri* (BOTTON et al., 2007).

Segundo Botton et al. (2007), o controle desses insetos é ainda uma prática pouco frequente, pois as cochonilhas são difíceis de serem detectadas, permanecendo no solo ou sob a casca das videiras, grande parte do tempo. Entretanto, o controle desses insetos no parreiral é muito importante e deve ser considerado pelos produtores, principalmente, quando esses são vetores, estão virulíferos e podem transmitir vírus para plantas sadias.

Dessa maneira, o estabelecimento de medidas racionais é imprescindível, a exemplo do monitoramento do vetor em campo, visando a detecção dos focos de infestação e do período que as ninfas migram do solo para a parte aérea das plantas (BOTTON et al., 2007) para, assim, dar suporte à definição do melhor momento para a utilização do controle químico. Essa estratégia busca reduzir a disseminação da doença quando essa encontra-se estabelecida no parreiral.

O GFLV é disseminado no solo por nematoides do gênero *Xiphinema,* que são capazes de reter o vírus por muito tempo. Quando videiras infectadas por GFLV são eliminadas, parte de suas raízes ainda permanecem no solo, por longos anos, constituindo reservatório do vírus, que podem ser transmitidos pelos vetores para plantas sadias no parreiral. Dentro da área, os nematoides podem ser disseminados pelo solo, água e por meio de práticas culturais.

As raízes de videira, remanescentes no solo, devem ser arrancadas e destruídas, e o replantio de mudas no mesmo local infestado com nematoides não deve ser efetuado imediatamente, mas somen-

te após um período de 10 anos, em média. Nessas e em áreas ainda não implantadas, o pousio prolongado, a eliminação de plantas daninhas e a fumigação do solo podem ser adotadas, visando quebrar o ciclo do nematoide vetor. Com relação ao controle químico, devido ao alto custo do tratamento com nematicidas, é recomendado apenas em áreas muito limitadas, como viveiros.