

Petrolina, PE
Dezembro, 2009

Autor

Mirtes Freitas Lima

Eng. agrôn., Ph.D., Pesquisadora Embrapa Semiárido.

E-mail:

mflima@cnpq.embrapa.br

Detecção e Controle de Viroses em Videira

Introdução

O polo Petrolina, PE/Juazeiro, BA é a principal região produtora de uvas finas de mesa do País, contribuindo com mais de 90% das exportações brasileiras. O cultivo de videira (*Vitis vinifera* L.) nesta região foi iniciado nos anos 1970 com a criação dos projetos de irrigação e, atualmente, a área total cultivada está em torno de 10.000 ha, dos quais 90% encontram-se em fase produtiva (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2006). Metade desta área é ocupada com uvas apirênicas. Os ciclos produtivos da videira nesta região são condicionados, principalmente, às condições edafoclimáticas da região e às práticas de manejo da cultura que, associadas à irrigação, propiciam duas safras anuais.

As doenças causadas por vírus são difíceis de serem controladas, além de bastante destrutivas. O ataque desses patógenos, geralmente, resulta no declínio de plantas e, conseqüentemente, na redução da longevidade do parreiral, diminuição da produção e da qualidade dos frutos. Entretanto, devido à natureza dessas doenças, o estado fitossanitário do material propagativo a ser utilizado na produção de mudas e em enxertias é o fator mais importante. A disseminação desses patógenos pode ser potencializada quando se considera que a videira é, comercialmente, multiplicada por propagação vegetativa, o que propicia a possibilidade da ocorrência de infecção latente, na qual plantas infectadas não apresentam sintomas aparentes. Outros fatores que contribuem para o agravamento do problema são: presença de infecção mista - presença de diferentes espécies de vírus infectando uma mesma planta - suscetibilidade da cultivar a estes agentes, combinação copa/porta-enxerto e presença de vetores desses vírus na área do parreiral, entre outros.

A seguir, serão discutidos métodos utilizados na diagnose de doenças virais em videiras e as estratégias de controle.

Principais Viroses da Videira Relatadas no Brasil

Cerca de 50 vírus já foram identificados em infecções de videira em todo o mundo (MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006; REGENMORTEL et al., 2000). No Brasil, as doenças mais importantes causadas por vírus e relatadas até o momento são: a) enrolamento da folha ("Leafroll"); b) malformação infecciosa ou doença dos entrenós curtos ("Fanleaf disease"); c) mancha das nervuras ("Fleck disease"); d) lenho rugoso ("Rugose wood complex") e, e) necrose das nervuras ("Vein necrosis disease").

O lenho rugoso 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"). Para a maioria dessas doenças, os respectivos agentes etiológicos já foram identificados e associados à ocorrência de sintomas característicos em videiras, especialmente em plantas indicadoras (Tabela 1). Estas doenças são frequentes em áreas vitícolas de todo o mundo, podendo infectar cultivares de copa e de porta-enxerto.

Tabela 1. Doenças de origem viral mais frequentes em videira no Brasil, seus agentes etiológicos e plantas indicadoras utilizadas na indexação biológica.

Doenças	Vírus	Planta indicadora	
		Lenhosas	Herbáceas ¹
Enrolamento da folha ("Leafroll")	<i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i> (GLRaV-2) Gênero: <i>Closterovirus</i> Família: <i>Closteroviridae</i>		
	<i>Grapevine leafroll-associated virus 1;3-6;</i> 8-9 (GLRaV-1;3-6;8-9) Gênero: <i>Ampelovirus</i> Família: <i>Closteroviridae</i>	<i>Vitis vinifera</i> cvs. Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Pinot Noir, Merlot, Mission	<i>Chenopodium quinoa</i> ; <i>C. amaranticolor</i> ; <i>Nicotiana clevelandii</i> e <i>Cucumis</i> <i>sativus</i>
	<i>Grapevine leafroll-associated virus 7</i> (GLRaV-7) Gênero: ----- ² Família: <i>Closteroviridae</i>		
Malformação infecciosa ("Fanleaf disease")	<i>Grapevine fanleaf virus</i> (GFLV) Gênero: <i>Nepovirus</i> Família: <i>Comoviridae</i>	<i>V. rupestris</i> cv. St. George	<i>C. quinoa</i> ; <i>C.</i> <i>amaranticolor</i> ; <i>N.</i> <i>clevelandii</i> e <i>C. sativus</i>
Mancha das nervuras ("Fleck disease")	<i>Grapevine flexk virus</i> (GFkV) Gênero: <i>Maculavirus</i> Família: <i>Tymoviridae</i>	<i>V. rupestris</i> cv. St. George; Kober 5BB (<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i>)	<i>C. quinoa</i> ; <i>C.</i> <i>amaranticolor</i> ; <i>N. clevelandii</i> e <i>C. sativus</i>
Intumescimento dos ramos ("Corky bark")	<i>Grapevine virus B</i> (GVB) Gênero: <i>Vitivirus</i> Família: <i>Flexiviridae</i>	Híbrido LN33 (Couderc 1613 x <i>V. vinifera</i> cv. Thompson Seedless)	_____
Caneluras do tronco do Rupestris ("Rupestris stem pitting disease")	<i>Rupestris stem pitting-associated virus</i> (RSPaV) Gênero: <i>Foveavirus</i> Família: <i>Flexiviridae</i>	<i>V. rupestris</i> cv. St. George	_____
Acanaladura do lenho de Kober ("Kober stem grooving")	<i>Grapevine virus A</i> (GVA) Gênero: <i>Vitivirus</i> Família: <i>Flexiviridae</i>	Híbrido LN33 (Couderc 1613 x <i>V. vinifera</i> cv. Thompson Seedless)	<i>C. quinoa</i> ; <i>C.</i> <i>amaranticolor</i> ; <i>N.</i> <i>clevelandii</i> e <i>C. sativus</i>
Acanaladura do lenho do LN33 ("Ln33 stem grooving") ³ Gênero:----- Família:-----	Híbrido LN33 (Couderc 1613 x <i>V. vinifera</i> cv. Thompson Seedless)	_____
Necrose das nervuras ("Vein necrosis") ⁴ Gênero:----- Família:-----	R110 (<i>V. berlandieri</i> x <i>V. rupestris</i>)	_____

¹Plantas herbáceas utilizadas na indexação desses vírus.²GLRaV-7: não foi designado a nenhum gênero dentro da Família *Closteroviridae*.³Doença considerada de origem viral, entretanto, o agente causal dos sintomas em videira ainda não foi identificado.⁴Doença cujo agente é possivelmente um vírus.

Fonte: Rowhani et al. (2005).

a) O enrolamento da folha é a doença de origem viral mais disseminada e mais importante da videira, podendo infectar cultivares de copa e de porta-enxerto. Até o momento, nove espécies de vírus (*Grapevine leafroll-associated virus* 1-9 - GLRaV 1-9), já foram associadas à doença (ROWHANI et al., 2005). Em videiras tintas infectadas, as folhas tornam-se avermelhadas e apenas o tecido ao longo das nervuras permanece verde (Figura 1), enquanto que, em cultivares brancas, as folhas tornam-se cloróticas. Nos dois casos, ocorre o enrolamento dos bordos das folhas para baixo, sintoma do qual originou o nome da doença. As folhas tornam-se espessas e quebradiças devido ao acúmulo de carboidratos, como consequência da degeneração do floema, resultando em menores teores de sólidos solúveis totais nos frutos.



Foto: Gilmar Bacelar Kuhn.

Figura 1. Enrolamento e avermelhamento de folhas em videira (cultivar tinta).

Além da disseminação por meio do material propagativo, espécies do gênero *Ampelovirus*, como o GLRaV-1 e GLRaV-3 são também disseminados de maneira semipersistente por cochonilhas algodonosas (Família Pseudococcidae) e de carapaça (Família Coccidae). De maneira geral, neste tipo de transmissão, o vírus é adquirido quando estes insetos se alimentam em planta infectada por cerca de 15 min. Este tempo é denominado período de aquisição, durante o qual as cochonilhas adquirem e acumulam as partículas virais.

A transmissão para plantas saudáveis ocorre durante o processo de alimentação desses insetos virulíferos em videiras por períodos de tempo bastante variáveis. 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 insetos descendentes. No caso das espécies virais pertencentes ao gênero *Closterovirus*, como o GLRaV-2, são transmitidos por afídeos, além do material propagativo (Tabela 1). No Brasil, o GLRaV-1 e o GLRaV-3 têm sido

frequentemente detectados.

b) A malformação infecciosa ou doença dos entrenós curtos, causada pelo *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), foi uma das primeiras viroses descritas em videira, podendo afetar os porta-enxertos americanos e outras espécies de *Vitis* e/ou híbridos. Os sintomas podem ser diferenciados em mosaico amarelo (Figura 2), folha em leque e faixa das nervuras, dependendo da estirpe do vírus. O GFLV é disseminado por nematóides do gênero *Xiphinema*, destacando-se as espécies *X. index* e *X. italiae*, as quais podem reter o vírus por até 8 meses na ausência de plantas hospedeiras (MARTELLI, 1986; MARTELLI; SAVINO, 1994).

Quando videiras velhas e infectadas pelo GFLV são eliminadas, parte de suas raízes que ainda permanecem no solo por muitos anos, constituem os reservatórios do vírus que pode ser transmitido pelos nematóides vetores. No Brasil, as espécies *X. americanum* (= *X. brevicolle*), *X. index*, *X. brasiliensis* e *X. krugi* já foram identificadas em videiras (KUHN; FAJARDO, 2003). Entretanto, não há informações sobre a incidência desses nematóides, assim como não há informações sobre o seu papel como agentes disseminadores de vírus, em parreirais do País. Nas raízes de videira, os nematóides podem ser disseminados pelo solo, água e por meio de práticas culturais realizadas dentro do parreiral. Naturalmente, o GFLV infecta apenas a videira (*Vitis* spp.), entretanto, experimentalmente, pode ser transmitido pela fricção do extrato de plantas infectadas em folhas de plantas herbáceas dos gêneros *Chenopodium*, *Gomphrena* e *Cucumis*, utilizadas na diagnose da malformação infecciosa.



Foto: Gilmar Bacelar Kuhn.

Figura 2. Sintomas de mosaico amarelo causados pelo vírus da malformação infecciosa.

c) A mancha das nervuras causada pelo *Grapevine fleck virus* (GFkV) foi detectada em diversas áreas vitícolas de todo o mundo. Nas folhas, surgem manchas

cloróticas e translúcidas, irregulares, acompanhando a posição das nervuras. Este vírus é disseminado apenas por meio de material propagativo infectado.

d) O lenho rugoso é um termo que compreende quatro doenças (Tabela 1), caracterizadas por anomalias no lenho, sendo transmitidas por enxertia e diferenciadas, segundo a expressão de sintomas, em diferentes cultivares diferenciadoras de porta-enxerto: intumescimento dos ramos (“Corky bark”), associada ao *Grapevine virus B* (GVB); caneluras do tronco de *Rupestris* (“*Rupestris* stem pitting”), associada ao *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV) (Figura 3); acanaladura do lenho de Kober (“Kober stem grooving”), associada ao *Grapevine virus A* (GVA) (Figura 4) e, acanaladura do lenho de LN33 (“LN33 stem grooving”), cujo agente causal ainda é desconhecido.



Figura 3. Sintomas típicos da doença caneluras do tronco, em *V. rupestris*, cv. St. George.



Figura 4. Sintomas de caneluras no cilindro lenhoso de videira.

Essas doenças encontram-se disseminadas em áreas vitícolas de todo o mundo e, muito frequentemente, podem ocorrer em infecção mista numa mesma videira, acarretando severos prejuízos. No Brasil, apenas a acanaladura do lenho de LN33 ainda não foi

detectada. Dentre estes agentes, o GVA e o GVB do gênero *Vitivirus* são disseminados de maneira semipersistente por cochonilhas algodonosas da Família Pseudococcidae e de carapaça da Família Coccidae.

e) A **necrose das nervuras** ocorre em parreirais de todo o mundo, em cultivares de uva europeias e americanas e em alguns porta-enxertos. O sintoma mais característico da doença é a necrose das nervuras, principalmente naquelas secundárias e terciárias, visíveis na face dorsal da folha (MARTELLI, 1986). A doença é transmitida por meio de material propagativo infectado e o seu agente etiológico é, possivelmente, um vírus.

Detecção de Vírus em Videira

Diversos métodos têm sido desenvolvidos para a detecção e identificação de vírus de plantas. A diagnose de doenças virais 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, envolver diversos agentes virais e não ser característica de uma doença em particular. A ocorrência de infecção latente é um outro fator a ser considerado.

Dessa maneira, plantas infectadas e sem sintomas aparentes, podem propiciar a disseminação desses patógenos quando utilizadas como matrizes. Além disso, um outro fator a ser levado em conta é que sintomas semelhantes aos de virose apresentados pela planta podem não ter sido incitados por vírus, mas por outros patógenos ou mesmo por fatores abióticos. A diagnose acurada, com a correta identificação do agente causal da doença, assim como a sua distribuição no campo, são essenciais para o estabelecimento de medidas eficientes ao seu controle. Por isso, métodos biológicos, sorológicos e moleculares têm sido utilizados na detecção e identificação de vírus em videiras.

Métodos Biológicos

A diagnose de virose em videiras 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 a movimentação do material propagativo de forma mais segura. Ainda hoje, os métodos biológicos e os sorológicos são considerados os mais tradicionais, constituindo-se em ferramentas

fundamentais em programas voltados para a produção de material livre de vírus. Embora os métodos sorológicos e os moleculares permitam a identificação de vírus de forma precisa, além de serem extremamente sensíveis e rápidos, para que se obtenha uma diagnose plenamente confiável, a utilização dos três métodos é, geralmente, necessária.

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

A indexação em plantas lenhosas é realizada para a detecção dos vírus que infectam a videira e são limitados ao floema, não sendo transmitidos mecanicamente. Estes pertencem às famílias *Closteroviridae* (GLRaVs), *Flexiviridae* (RSPaV) e *Tymoviridae* (GFkV). A indexação é feita por meio de enxertia de gemas de videiras candidatas em mudas de porta-enxertos e, também, em mudas de material de copa (Figura 5). As plantas enxertadas são mantidas em casa de vegetação por cerca de dois meses e, posteriormente, transferidas para o campo, onde permanecem por até 3 anos, quando ocorre a avaliação dos sintomas. Alternativamente, as plantas enxertadas podem ser mantidas em casa de vegetação, pelo mesmo período de 3 anos até a avaliação.

Para o complexo rugoso da videira, após o arranquio das plantas, a casca do porta-enxerto é removida para verificação da presença de caneluras no lenho.

No caso das plantas herbáceas, a inoculação é feita mecanicamente. As folhas de videira infectadas com vírus são maceradas em tampão e o extrato é friccionado na superfície das folhas dessas indicadoras, previamente pulverizadas com agentes abrasivos, como carborundo (500 mesh a 600 mesh) ou celite. Estes abrasivos provocam pequenos ferimentos no limbo foliar das plantas propiciando a penetração das partículas virais no tecido vegetal. As plantas inoculadas são mantidas em casa de vegetação. Quando o vírus é transmitido às plantas indicadoras, estas apresentam sintomas de 5 a 20 dias após a inoculação. Os vírus de maior importância transmitidos por este método pertencem aos gêneros *Nepovirus* (GFLV), *Vitivirus* (GVA e GVB) e *Closterovirus* (GLRaV-2) (ROWHANI et al., 2005). As indicadoras mais utilizadas pertencem aos gêneros *Nicotiana*, *Chenopodium* e *Cucumis* (Tabela 1).

Métodos Sorológicos

A sorologia apresenta diversos métodos para detecção viral que se caracterizam pelo emprego de anticorpos específicos capazes de reconhecer proteínas capsidiais. Um dos métodos sorológicos mais comuns para detecção de vírus em material vegetal e insetos vetores é o ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizado na detecção de vírus em plantas pela primeira vez por Clark e Adams (1977). Neste, os anticorpos produzidos contra a proteína capsidial de um determinado vírus são empregados na sua detecção (Figura 6). Nesta reação, extratos preparados pela maceração de tecido vegetal infectado em tampão são utilizados como antígeno.

No teste dot-blot ou dot-ELISA, o extrato das amostras é fixado em membrana de nitrocelulose, ao contrário do ELISA tradicional, no qual as amostras são depositadas em poços de placas de microtitulação. Além desta diferença, sistemas distintos de substrato/enzima são usados nas reações.

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, o estágio fenológico considerado e o tipo de tecido a ser coletado devem estar associados a maior concentração destes patógenos na planta, visando favorecer a sua detecção.

Fotos: Beverly Ferguson.

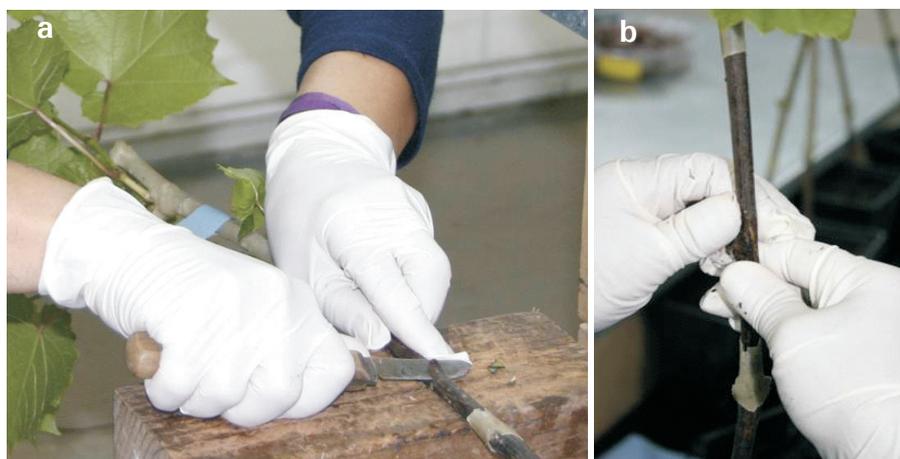


Figura 5. Indexação em plantas lenhosas por enxertia. Corte realizado na muda do porta-enxerto (a) para encaixe da gema do material a ser testado (b).



Figura 6. Detecção do GLRaV-3 por meio do teste ELISA. Poços com coloração amarela escura indicam amostras positivas para o GLRaV-3 e poços sem coloração ou quase incolor indicam amostras negativas para esse vírus.

No preparo do extrato, tecido cambial ou pecíolos e nervuras de folhas maduras coletadas no final do ciclo vegetativo constituem fontes de antígeno ideais para a detecção de GLRaVs, GVA e GVB, enquanto que para GFLV e GFkV, a detecção é mais acurada em preparações obtidas a partir de folhas novas, coletadas no início do ciclo vegetativo da cultura.

O resultado do ELISA é determinado por uma reação enzimática (enzima fosfatase alcalina conjugada ao anticorpo) com um substrato específico e a avaliação é realizada pela leitura da absorbância em uma leitora de placas, utilizando-se filtro de 405 nm. As amostras são consideradas positivas quando o valor da sua leitura for pelo menos duas vezes superior àquele do extrato da planta sadia, utilizado como controle negativo. Este método apresenta como vantagens: ser rápido, podendo-se obter os resultados em um período relativamente curto, 24 a 48 horas, 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. Neste caso, outros tipos de testes devem ser utilizados nessa identificação. Dentre os vírus descritos anteriormente, anticorpos produzidos comercialmente podem ser encontrados para GFLV, GFkV, GVA, GVB e alguns GLRaVs.

O Western blot é uma técnica imunoeletróforética utilizada na caracterização de proteínas virais (HAMMOND, 1993). Neste método, proteínas totais extraídas de plantas infectadas são desnaturadas e,

posteriormente, separadas em gel de SDS-poliacrilamida. As frações da proteína são transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose. Esta transferência pode ser ativa, pela aplicação de uma voltagem para propiciar a migração das proteínas do gel para a membrana, ou passiva, na qual esta 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 e a revelação da membrana utilizando-se reagentes específicos.

Métodos Moleculares

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) (MULLIS et al., 1986) é o mais utilizado. Os vírus anteriormente citados podem ser identificados por meio desta técnica. A RT-PCR baseia-se na amplificação e detecção do material genético do vírus de RNA ou apenas PCR, no caso de DNA, em amostras vegetais infectadas. Neste 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 um termociclador programado para executar a transcrição reversa do RNA em DNA complementar e os múltiplos ciclos da PCR, que visam à produção de um grande número de cópias do fragmento alvo deste DNA. Dessa forma, a amplificação seletiva de um fragmento do genoma do vírus, compreendido entre dois oligonucleotídeos, é realizada a partir do RNA do vírus utilizado como molde. Vale ressaltar que mais de 90% dos vírus de plantas e todos os que infectam a videira possuem RNA como material genético.

O preparo do extrato da planta infectada a ser utilizado na RT-PCR é muito importante, tendo em vista 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 deste método é a sua alta sensibilidade, isto é, mesmo que o patógeno esteja presente na amostra vegetal em pequenas quantidades, a amplificação pela PCR propicia a sua detecção. Os produtos da reação são visualizados por meio de eletroforese em um gel de agarose. O emprego de brometo de etídeo, corante mais recomendado e utilizado, forma um "complexo" com o

DNA e permite que este possa ser visualizado sob luz ultravioleta, na forma de uma banda (Figura 7). Quando nenhum DNA de tamanho esperado for visualizado em gel de agarose, significa que a amostra vegetal não está infectada com o patógeno ou, ainda, que a sua concentração encontra-se abaixo do limiar de detecção da técnica utilizada.

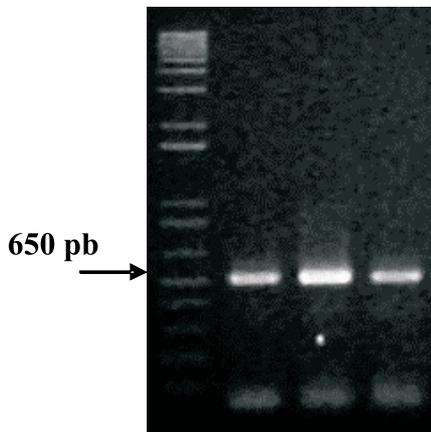


Figura 7. Análise em gel de agarose 1,5%, dos produtos da RT-PCR realizada utilizando-se RNA total extraído de videira infectada com RSPaV. A seta indica o fragmento específico de DNA amplificado com 650 nucleotídeos (pb=pares de base).

Outros métodos moleculares incluem a hibridização, Northern blot, utilizado na detecção de RNA (SAMBROOK et al., 1989). Neste, o ácido nucleico viral imobilizado em membranas de *nylon* é detectado por meio da utilização de sondas moleculares. Estas são constituídas por fragmentos da sequência do genoma do vírus a ser detectado e podem ser sintetizadas *in vitro*. As sondas podem ser radioativas, ou seja, marcadas com ³²P ou, ainda, as chamadas “sondas frias” e, neste caso, 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, formando “duplexes” (DNA:RNA ou RNA:RNA). Os resultados positivos são detectados pela presença de manchas na membrana, que servem de suporte para a fixação do ácido nucleico extraído das amostras. Esta técnica é altamente específica e requer mão-de-obra especializada, sendo mais utilizada na caracterização de isolados virais e, esporadicamente, como método diagnóstico.

Controle das Viroses da Videira

Dos problemas fitossanitários que afetam a videira, os vírus constituem o principal grupo de patógenos

disseminados por meio da multiplicação vegetativa. Estes infectam as plantas de forma sistêmica, podendo ser detectados em todas as suas partes e, neste caso, quando as plantas-matrizes estão infectadas, as mudas produzidas a partir de material propagativo - estacas ou gemas - oriundo dessas matrizes resultam em plantas infectadas.

Além da disseminação, a propagação vegetativa propicia, ainda, o acúmulo desses patógenos na planta ao longo dos anos, dando origem a doenças complexas, podendo envolver diferentes espécies de vírus. Considerando que não há medidas curativas que possam ser utilizadas no campo para as doenças causadas por vírus, as estratégias para o seu manejo devem estar direcionadas à prevenção da ocorrência da infecção. Estas incluem a erradicação de fontes de inóculo no campo, redução da disseminação da doença por meio do controle do vetor, utilização de mudas e material vegetativo livres de vírus e incorporação de resistência ao vírus (NAYDU; HUGHES, 2008). Entre estas medidas, a utilização de material propagativo livre de doenças é extremamente importante para culturas perenes como a videira, multiplicada, essencialmente, por via propagativa. Dessa maneira, na obtenção das mudas, é essencial a utilização de material propagativo com certificado fitossanitário de origem, pois somente pelo plantio de mudas livres de vírus, é possível realizar o controle de viroses em campo.

Videiras afetadas apresentam uma série de sintomas, entre os quais redução de vigor, declínio e queda da produtividade. Plantas doentes são, também, fonte de inóculo viral para a disseminação secundária por vetores como insetos e nematóides para plantas saudáveis. Considerando estes fatores, os métodos mais importantes e eficientes para o controle de viroses em culturas perenes inclui a aplicação de estratégias como a seleção sanitária, a obtenção de clones saudáveis e o controle de vetores.

Seleção Sanitária

A aquisição e o plantio de mudas certificadas, livres de vírus, é de fundamental importância no estabelecimento de novas áreas, pois, esta medida diminui o risco da introdução desses patógenos no parreiral e, assim, reduz a sua disseminação via material propagativo infectado. A qualidade sanitária do material propagativo a ser utilizado na produção de mudas é primordial, e a seleção sanitária constitui a primeira etapa desse processo.

As estacas enraizadas e as gemas devem ser originadas de

plantas-matrizes livres dos vírus para os quais essas videiras tenham sido indexadas. Estas matrizes devem ter sido submetidas a testes biológicos, sorológicos e/ou moleculares, para certificação da ausência de vírus. Dessa maneira, na obtenção dessas plantas, que são as fontes primárias de propagação, diversas etapas devem ser realizadas, incluindo-se a seleção sanitária e a seleção clonal. O primeiro passo envolve a escolha de plantas dentro do parreiral, segundo determinados critérios tais como conformidade varietal, vigor vegetativo, produtividade e qualidade sanitária, observadas ao longo de diversos ciclos vegetativos consecutivos.

As videiras livres de problemas fitossanitários e que apresentem boas características produtivas são as candidatas ideais para serem selecionadas como plantas-matrizes. Os clones oriundos dessas videiras são mantidos em campo e avaliados por alguns ciclos vegetativos. No processo de seleção clonal, os clones candidatos permanecem no campo e são avaliados por um período de 2 a 3 anos. A avaliação sanitária das plantas selecionadas é realizada com a utilização de ferramentas diagnósticas tais como indexação em plantas lenhosas ou herbáceas, testes sorológicos e moleculares. Os clones selecionados segundo os resultados desses testes serão as fontes primárias que devem ser cultivadas sob condições controladas, em casa de vegetação telada.

Obtenção de Clones Sadios

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 a determinadas temperaturas.

Outro fator importante é que os vírus não seriam capazes de atingir o ápice caulinar ou os meristemas das brotações novas, emitidas durante o processo de termoterapia, considerando que esta condição desfavoreceria a multiplicação viral. Embora a termoterapia e o cultivo *in vitro* sejam métodos trabalhosos, onerosos, e que demandam um longo período de tempo para que novas plantas sejam obtidas, e para que o processo de indexagem seja concluído, apresentam grande eficiência na 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 até mais, de acordo com o vírus a ser eliminado. Para o GFLV, este período varia de 30 a 42 dias; 90 dias para o GVB; 60 a 120 dias para os vírus do enrolamento da folha (GLRaV) (GOHEEN, 1977); 150 dias para o GVA

(MARTELLI, 1993) e mais de 150 dias para o RSPaV (LEGIN et al., 1979).

As técnicas de cultura de tecidos são empregadas após o tratamento termoterápico das plantas, quando os ápices das brotações são extraídos - micropagação de segmentos caulinares de uma gema - ou os meristemas são excisados e, posteriormente, cultivados em condições *in vitro*. As videiras regeneradas passam por um processo de indexação para certificação do seu estado sanitário.

Controle de Vetores

No Brasil, são escassas as informações disponíveis sobre as espécies de cochonilhas presentes nas principais regiões vitícolas e a magnitude de atuação destas como vetores de vírus. Apesar disso, recomenda-se que o seu controle seja feito no parreiral considerando, principalmente, se são vetores, estão virulíferos e podem transmitir vírus para plantas sadias. Segundo Botton e Fajardo (2003), algumas das espécies já identificadas em parreirais brasileiros são *Pseudococcus viburni*, *P. vitis*, *P. longispinus* e *Planococcus citri*. Ainda de acordo com Botton e Fajardo (2003), o controle desses insetos é ainda uma prática pouco frequente, pois as cochonilhas são difíceis de serem observadas e permanecem no solo ou sob a casca das videiras grande parte do tempo. Dessa maneira, o estabelecimento de medidas racionais é essencial, a exemplo do monitoramento do vetor em campo para detecção dos focos de infestação, como também, do período de migração das ninfas do solo para a parte aérea das plantas (BOTTON; FAJARDO, 2003).

A realização de inspeções rotineiras - monitoramento - dos parreirais para detecção de pragas constitui a base do Manejo Integrado de Pragas (MIP), que é um dos componentes mais importantes da Produção Integrada da Uva (PI-Uva) (LOPES et al., 2009). Estas visam dar suporte à definição do melhor momento para a utilização do controle químico, na tentativa de reduzir a disseminação da doença quando esta encontra-se estabelecida no parreiral.

No caso do GFLV que é transmitido por nematóides, videiras infectadas devem ser eliminadas e as raízes remanescentes no solo devem ser arrancadas e destruídas, sendo que o replantio de mudas de videira em solo infestado com nematóides, não deve ser efetuado imediatamente; somente após um período de 10 anos (MARTELLI; SAVINO, 1994). Nestas áreas e naquelas ainda não implantadas, métodos como o pousio prolongado, a eliminação de plantas daninhas e a

fumigação do solo podem ser adotadas visando quebrar o ciclo do nematóide vetor. Entretanto, devido ao alto custo do tratamento com nematicidas, este é recomendado apenas em áreas muito limitadas, como em viveiros.

Agradecimentos

Ao Dr. Gilmar B. Kuhn, ex-pesquisador da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, pela concessão das fotos (Figuras 1 e 2) que ilustram esta publicação.

Referências

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA: brazilian fruit yearbook. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2006. 136 p.

BOTTON, M.; FAJARDO, T. V. M.; MORANDI FILHO, W. J.; GRUTZMACHER, A. D.; PRADO, E. Vetor encoberto, cochonilhas algodonosas em uva. **Revista Cultivar Hortaliças e Frutas**, Pelotas, v. 7, p. 28-29, 2003.

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**, [Spencers Wood], v. 34, p. 475-483, 1977.

GOHEEN, A. C. Virus and virus-like diseases of grapes. **HortScience**, Alexandria, v. 12, n. 5, p. 465-469, 1977.

HAMMOND, J. Western blotting and the use of membranes to adsorb antisera and to affinity purify antibodies. In: HAMPTON, R.; BALL, E.; BOER, S. de (Ed.). **Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens: a laboratory manual**. St. Paul: APS Press, 1993. p. 269-279.

KUHN, G. B.; FAJARDO, T. V. M. Doenças causadas por vírus, bactérias e nematóides e medidas de controle. In: KUHN, G. B.(Ed.). **Uvas americanas e híbridas para processamento em clima temperado**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. (Sistema de Produção). Disponível em: <<http://sistemas.deproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvaAmericanaHibridaClimaTemperado/virus.htm>>. Acesso em: 30 jul. 2009.

LEGIN, R.; BASS, P.; VUITTENEZ, A. Premiers résultats de guérison par thérapie et culture in vitro d'une maladie de type cannelure (legno riccio) produite par le greffage du cultivar Servant de Vitis vinifera sur le porte-greffe Vitis riparia x V. berlandieri Kober 5BB. Comparaison avec diverses viroses de la vigne. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 18, p. 207-210, 1979.

LOPES, P. R. C.; HAJI, F. N. P.; BORGES, R. M. E.; ASSIS, J. S. Sistema de produção integrada. In: SOARES, J. M.; LEÃO, P. C. de S. (Ed.). **A viticultura no Semiárido brasileiro**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Petrolina: Embrapa Semiárido, 2009. p. 659-657.

MARTELLI, G. P. Rugose wood complex. In: MARTELLI, G. P. (Ed.). **Graft-transmissible diseases of grapevines: handbook for detection and diagnosis**. Rome: FAO, 1993. p. 45-54.

_____. Virus and virus-like diseases of the grapevine in mediterranean areas. **FAO Plant Protection Bulletin**, Rome, v. 34, n. 1, p. 25-42, 1986.

MARTELLI, G. P.; BOUDON-PADIEU, E. (Ed). **Directory of infectious diseases of grapevines and viruses and virus-like disease of the grapevine: bibliographic report 1998-2004**. [Rome]: CIHEAM-IAMB, 2006. 195 p. (Options Méditerranéennes. Série B. Studies and Research, 55).

MARTELLI, G. P.; SAVINO, V. Fanleaf degeneration. In: PEARSON, R. G.; GOHEEN, A. C. (Ed.). **Compendium of grape diseases**. St. Paul: APS Press, 1994. p. 48-49.

MULLIS, K. F.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Quantitative Biology**, Cold Spring Harbor, v. 51, p. 263-273, 1986.

NAYDU, R. A.; HUGHES, J. d'A. Methods for the detection of plant virus diseases. **Plant Virology in Sub-Saharan Africa**. Disponível em: <www.iita.org/cms/details/virology>. Acesso em: 7 jul. 2008.

REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANIHOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. (Ed.). **Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses**. San Diego: Academic Press, 2000. 1162 p.

ROWHANI, A.; UYEMOTO, J. K.; GOLINO, D.; MARTELLI, G. P. Pathogen testing and certification of *Vitis* and *Prunus* species. **Annual Review of Phytopathology**, [Palo Alto], v. 43, p. 261-278, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Circular Técnica, 90

Esta publicação está disponibilizada no endereço: www.cpatsa.embrapa.br
Exemplares da mesma podem ser adquiridos na:
Embrapa Semiárido
BR 428, Km 152, Zona Rural
Caixa Postal 23 56302-970 Petrolina, PE
Fone: (87) 3862-1711 **Fax:** (87) 3862-1744
sac@cpatsa.embrapa.br

1ª edição (2009): Formato digital

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO



Comitê de publicações

Presidente: Maria Auxiliadora Coêlho de Lima.
Secretário-Executivo: Josir Laine Aparecida Veschi.
Membros: Daniel Terao,

Tony Jarbas Ferreira Cunha,
Magna Soelma Beserra de Moura,
Lúcia Helena Piedade Kiill,
Marcos Brandão Braga,
Gislene Feitosa Brito Gama,
Mizael Félix da Silva Neto.

Expediente

Supervisor editorial: Sidinei Anunciação Silva.
Revisão de texto: Sidinei Anunciação Silva.
Tratamento das ilustrações: Nivaldo Torres dos Santos.
Editoração eletrônica: Nivaldo Torres dos Santos.