

PAULO ESTEVÃO SILVEIRA SILVANO

**DIAGNOSE DAS VIROSES DO ENROLAMENTO DAS
FOLHAS ASSOCIADO-3 E DO INTUMESCIMENTO DOS
RAMOS DA VIDEIRA (*Vitis* spp) EM SANTA CATARINA**

**FLORIANÓPOLIS
2003**

PAULO ESTEVÃO SILVEIRA SILVANO

**DIAGNOSE DAS VIROSES DO ENROLAMENTO DAS
FOLHAS ASSOCIADO-3 E DO INTUMESCIMENTO DOS
RAMOS DA VIDEIRA (*Vitis* spp) EM SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva

**FLORIANÓPOLIS
2003**

Silvano, Paulo Estevão Silveira

Diagnose das viroses do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos da videira (*Vitis* spp) em Santa Catarina / Paulo Estevão Silveira Silvano - Florianópolis, 2003.

82f.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva

Dissertação de Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias.

Bibliografia: f. 73-82

1. *Vitis*. 2. ELISA. 3. RT-PCR. 4. enrolamento das folhas associado-3.
4. intumescimento dos ramos da videira. I. Título

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus.

Aos meus pais, Luiz e Maria, e aos meus demais familiares, por todo o auxílio e esforço durante esses anos.

À minha noiva, Luciléia, por todo o incentivo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva, pelo apoio e ensinamentos durante essa caminhada.

Aos membros da banca, pela avaliação e sugestões.

A todos os amigos do CCA, pela força e ajuda indispensáveis e pela sua amizade incondicional.

RESUMO

A vitivinicultura é uma atividade de grande importância sócio-econômica para o Brasil. A área de produção tem aumentado significativamente, mas com a falta de mudas certificadas, tem ocorrido uma crescente importação de mudas. A inexistência de um sistema de controle e certificação de qualidade das mudas possibilita a transmissão de doenças, principalmente viroses, via material vegetativo. Assim, o Governo do Estado de SC estabeleceu as “Normas e padrões para produção e comercialização de plantas-matrizes e mudas de videira (*Vitis* spp) no Estado de Santa Catarina”, que prevêem a diagnose periódica de viroses. Entre as viroses a serem diagnosticadas, o enrolamento das folhas associado-3 e o intumescimento dos ramos apresentam alta incidência nas diferentes regiões vitícolas do mundo. Para a diagnose dessas e de outras viroses o programa de certificação indica o teste de ELISA, com possibilidade de recomendação da diagnose por RT-PCR. Este trabalho objetivou realizar um estudo preliminar sobre a incidência das viroses do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos da videira em plantas doadoras de propágulos existentes em Santa Catarina, bem como comparar tipos de amostras utilizadas nas técnicas de ELISA e de RT-PCR. Foram utilizadas amostras foliares, coletadas durante o período vegetativo, e sarmentos, coletados durante o período de dormência dos porta-enxertos Paulsen 1103 (*V. berlandieri* x *V. rupestris*) e VR-043-43 (*V. rotundifolia* x *V. vinifera*) e das variedades Cabernet Sauvignon (*V. vinifera*), Chardonnay (*V. vinifera*), Bordô (*V. labrusca*) e Niágara Branca (*V. labrusca*) nas regiões Serrana, do Vale do Itajaí e do Vale do Rio do Peixe e Florianópolis (UFSC). As taxas de incidência do enrolamento das folhas associado-3 variaram entre 0,0% na UFSC e 47,1% na região Serrana, e as do intumescimento dos ramos da videira variaram entre 0,0% na UFSC e no Vale do Rio Itajaí e 17,6% na região Serrana. Em amostras foliares detectou-se o vírus do enrolamento das folhas associado-3 em 20,5% das amostras e o vírus do intumescimento dos ramos da videira em 10,2% das amostras. A utilização de amostras foliares proporcionou resultados mais consistentes que a utilização de sarmentos na detecção dos dois vírus, apesar da necessidade de ajustes nas metodologias utilizadas, nas técnicas de ELISA e de RT-PCR, para que se alcance, ao mesmo tempo, maior economia, praticidade, efetividade e confiabilidade na sua execução.

PALAVRAS-CHAVE: *Vitis*; ELISA; RT-PCR; enrolamento das folhas associado-3; intumescimento dos ramos da videira

ABSTRACT

The viticulture industry is an activity of great importance in Brazil. The production area increased significantly in the last years, but with the necessity of certified planting stocks increased its importation. The lack of control and quality certification system of planting stocks makes possible the transmission of diseases, mainly viruses, from vegetative material. The Government of Santa Catarina State has established the general guidelines for the production and commercialization of planting stocks, which foresee a periodic diagnose of viruses. Among these, the grapevine leafroll associated-3 and the grapevine corky bark presents high incidence in the different regions of wine production in the world. For diagnose of this and others viruses, the certification program indicates the ELISA test, and diagnose by RT-PCR. The aim of this work was to proceed the diagnosis of the incidence of grapevine leafroll associated-3 and the grapevine corky bark in plants growing in different regions of Santa Catarina State, as well as to compare types of used samples in diagnose techniques. Leaves samples were collected during the vegetative period, and canes were collected during the dormancy period of the Paulsen 1103 (*V. berlandieri* x *V. rupestris*) and VR-043-43 (*V. rotundifolia* x *V. vinifera*) rootstocks and of the varieties Cabernet Sauvignon (*V. vinifera*), Chardonnay (*V. vinifera*), Bordô (*V. labrusca*) and Niágara Branca (*V. labrusca*) from Serrana, Vale do Itajaí, and Vale do Rio do Peixe regions and Florianópolis (UFSC). The incidence of the grapevine leafroll associated-3 ranged from 0.0% in UFSC to 47.1% in the Serrana region. For grapevine corky bark this incidence ranged from 0.0% in UFSC and Vale do Rio Itajaí to 17.6% in Serrana region. In leaves it was detected the grapevine leafroll associated virus-3 in 20.5% of the samples and the grapevine virus B in 10.2% of the samples. Use of leaves samples was more effective than the canes in the detection of two viruses, despite the necessity of adjustments in the methodologies used in diagnose techniques.

KEYWORDS: *Vitis*; ELISA; RT-PCR; grapevine leafroll associated-3; grapevine corky bark

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BSA** – *bovine serum albumin* (albumina de soro bovino)
- cDNA** – DNA complementar
- CESM/SC** – Comissão Estadual de Sementes e Mudas de Santa Catarina
- CIDASC** – Companhia de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina
- CTAB** – *cethyltrimethyl ammonium bromide* (cetiltrimetil brometo de amônio)
- DAS** – *double antibody sandwich* (sanduíche de anticorpo duplo)
- DNA** – ácido desoxirribonucléico
- dATP** – deoxiadenosina trifosfato
- dCTP** – deoxicitidina trifosfato
- dGTP** – deoxiguanosina trifosfato
- dNTPs** – deoxinucleotídeos trifosfatos
- DTT** – dithiothreitol
- dTTP** – deoxitimidina trifosfato
- EDTA** – ácido etileno-diamino-tetraacético
- ELISA** – *enzyme-linked immunosorbent assay* (ensaio imunoadsorvente de enzima ligada)
- GLRaV-3** – *grapevine leafroll-associated virus-3* (vírus do enrolamento das folhas associado-3)
- GVB** – *grapevine virus B* (vírus do intumescimento dos ramos da videira)
- IC** – imunocaptura
- IgG** – imunoglobulina
- IgG-PA** – IgG-fosfatase alcalina
- M-MLV** – *Moloney-murine leukemia virus* (vírus da leucemia murina de Moloney)
- PCR** – *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)
- PEG** – polietilenoglicol
- p-NPP** – *para*-nitrofenilpirofosfato
- PTA-I** – *plate trapped antigen-indirect* (antígeno ligado à placa – indireto)
- PVP** – polivinilpirrolidona
- RNA** – ácido ribonucléico
- RT-PCR** – *reverse transcription* - PCR (PCR com transcrição reversa)
- SDA** – Secretaria de Estado do Desenvolvimento Rural e da Agricultura
- SDS** – dodecil sulfato de sódio
- TRIS** – tris(hidroximetil)aminometano
- UFSC** – Universidade Federal de Santa Catarina

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Incidência do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos da videira em amostras de plantas doadoras de propágulos, coletadas na região do Vale do Rio Itajaí, Estado de Santa Catarina, de acordo com o teste de ELISA..... 51
- Tabela 2.** Incidência do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos da videira em amostras de plantas doadoras de propágulos, coletadas na região Serrana, Estado de Santa Catarina, de acordo com o teste de ELISA..... 51
- Tabela 3.** Incidência do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos da videira em amostras de plantas doadoras de propágulos, coletadas na região do Vale do Rio do Peixe, Estado de Santa Catarina, de acordo com o teste de ELISA..... 51
- Tabela 4.** Incidência do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos da videira em amostras de plantas doadoras de propágulos, coletadas no Centro de Ciências Agrárias da UFSC, de acordo com o teste de ELISA..... 52
- Tabela 5.** Detecção do vírus do enrolamento das folhas associado-3 pelo teste de ELISA com a utilização de folhas coletadas no final do período vegetativo e de sarmentos coletados durante o período de dormência de plantas doadoras de propágulos provenientes do Estado de Santa Catarina..... 67
- Tabela 6.** Detecção do vírus do intumescimento dos ramos da videira pelo teste de ELISA com a utilização de folhas coletadas no final do período vegetativo e de sarmentos coletados durante o período de dormência de plantas doadoras de propágulos provenientes do Estado de Santa Catarina..... 68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visualização de detalhe de gel produzido na detecção do vírus do enrolamento das folhas associado-3 em amostras de videira (*Vitis* spp) por RT-PCR. Observe-se, à esquerda, no orifício número 2, os tamanhos de banda correspondentes ao marcador utilizado e, nos demais orifícios, a ausência de amplificação de bandas a partir das amostras coletadas..... 57

Figura 2. Visualização de detalhe de gel produzido na detecção do vírus do intumescimento dos ramos da videira em amostras de videira por RT-PCR. Observe-se, à esquerda, no orifício número 1, os tamanhos de banda correspondentes ao marcador utilizado e, nos demais orifícios, a presença de bandas inespecíficas, de tamanhos diferentes do esperado (594 pares de bases), o qual é indicado pela seta..... 57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 A Videira.....	17
2.2 Vírus.....	19
2.2.1 O vírus GLRaV-3.....	21
2.2.2 O vírus GVB.....	23
2.3 Virose: Enrolamento das Folhas Associado-3.....	24
2.4 Virose: Intumescimento dos Ramos da Videira.....	27
2.5 O Teste de ELISA.....	29
2.6 A RT-PCR.....	32
2.7 Tipos de Amostras Utilizadas para Detecção de Viroses.....	36
3 OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo Geral.....	39
3.2 Objetivo Específico.....	39
4 ESTUDO PRELIMINAR SOBRE A INCIDÊNCIA DAS VIROSES DO ENROLAMENTO DAS FOLHAS ASSOCIADO-3 E DO INTUMESCIMENTO DOS RAMOS DA VIDEIRA EM PLANTAS DOADORAS DE PROPÁGULOS DE SANTA CATARINA	40
4.1 Introdução.....	40
4.2 Material e Métodos.....	41
4.2.1 Material vegetal.....	41
4.2.2 Estimativa da suficiência amostral.....	43
4.2.3 ELISA.....	44
4.2.3.1 Detecção do GLRaV-3.....	44
4.2.3.2 Detecção do GVB.....	46
4.2.4 RT-PCR.....	46
4.3 Resultados e Discussão.....	50
4.4 Conclusões.....	60

5 COMPARAÇÃO ENTRE TIPOS DE AMOSTRAS USADAS NAS TÉCNICAS DE ELISA E DE RT-PCR PARA DETECÇÃO DOS VÍRUS DO ENROLAMENTO DAS FOLHAS ASSOCIADO-3 E DO INTUMESCIMENTO DOS RAMOS DA VIDEIRA EM PLANTAS DOADORAS DE PROPÁGULOS DE SANTA CATARINA.....	62
5.1 Introdução.....	62
5.2 Material e Métodos.....	64
5.2.1 Material vegetal.....	64
5.2.2 Estimativa da suficiência amostral.....	64
5.2.3 ELISA.....	65
5.2.3.1 Detecção do GLRaV-3.....	65
5.2.3.2 Detecção do GVB.....	65
5.2.4 RT-PCR.....	65
5.3 Resultados e Discussão.....	66
5.4 Conclusões.....	70
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a viticultura ocupa uma área de mais de 63.000 ha, tendo movimentado, somente no ano de 2000, em exportações e importações, mais de US\$ 130 milhões (PROTAS *et al.*, 2002). A atividade é desenvolvida desde as regiões tropicais secas do Nordeste, irrigadas para produção de uvas de mesa, até as regiões frias e subtropicais do Sul, tradicionalmente produtoras de uva para vinho. Historicamente, a viticultura se constitui numa exploração agrícola fixadora do homem a terra, caracterizando-se pela produção familiar com o emprego intensivo de mão-de-obra, gerando renda elevada com a utilização de pequenas áreas (DESPLOBINS, 2001; SILVA, 2002).

Seu desenvolvimento em Santa Catarina, Estado responsável por 4% da produção nacional de uvas e por 5% da de vinhos e mosto (BRITO, 2002), é resultado da introdução de variedades de videira de origem européia e americana, baseado em uma cultura vitivinícola milenar dos imigrantes italianos (DESPLOBINS, 2001; SILVA, 2002). A principal região produtora é o Vale do Rio do Peixe (BRITO, 2002), com uma produção voltada sobretudo à elaboração de vinhos de consumo corrente e suco de uva (PROTAS *et al.*, 2002).

Entre as variedades produtoras que têm despertado grande interesse pelo produtor catarinense encontram-se a Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*, tinta), a Chardonnay (*V. vinifera*, branca), a Bordô (*V. labrusca*, tinta) e a Niágara Branca (*V. labrusca*, branca) e os porta-enxertos mais utilizados no Estado têm sido o Paulsen 1103 (*V. berlandieri* x *V. rupestris*) e o VR-043-43 (*V. rotundifolia* x *V. vinifera*).

Transformações vêm ocorrendo rapidamente no setor, no país inteiro, principalmente com aumento do consumo de vinhos finos e derivados de variedades nobres (*V. vinifera*). Sendo assim, a área de produção tem sofrido um acréscimo acentuado com a renovação dos

vinhedos e novos plantios (SILVA, 2002), sendo esperado, nos próximos cinco anos, um substancial crescimento na oferta de uvas para elaboração de vinhos finos (BRITO, 2002). Somente em Santa Catarina os produtores planejam implantar mil ha de videira nos próximos quatro anos (SILVA, 2002).

Para a implantação e renovação dos vinhedos, atualmente os viticultores brasileiros e catarinenses enfrentam sérios problemas relacionados à falta de mudas de qualidade genética e sanitária comprovadas (certificadas) de empresas produtoras especializadas (viveiristas) nacionais (SILVA, 2002). Dessa forma, o setor vitivinícola optou pela crescente importação de mudas, originárias da França, Itália e África do Sul, tendo alcançado a marca de mais de 1,752 milhão de mudas importadas nos anos de 2000/2001 (BRASIL, 2002).

Entretanto, a importação de mudas gera três graves problemas: o primeiro ligado à não concordância das estações do ano do país em relação aos países de origem das mudas, obrigando a armazenagem das mudas em câmara fria, o que pode causar problemas ao seu crescimento e vigor; o segundo está ligado à introdução de patógenos e à adaptação dos porta-enxertos europeus aos solos brasileiros, tipicamente ácidos e álicos; e o terceiro problema refere-se ao custo da muda importada, que chega a R\$ 5,00 a unidade, dificultando sua aquisição pela maioria dos produtores (SILVA, 2002).

Além disso, a inexistência de um sistema oficial ou privado de controle e certificação de qualidade das mudas, a fim de impedir a difusão de mudas portadoras de patógenos, tem possibilitado a transmissão de diversas doenças, principalmente as viroses, através de materiais vegetativos contaminados (SILVA, 2002), que diversas vezes não apresentam sintomas característicos (KUHN, 1989a).

Pela gravidade da situação, o Governo do Estado, através da SDA, com a participação da UFSC e sob a coordenação da CIDASC, estabeleceu como estratégia o uso de um programa de certificação de mudas, associado a medidas que impedem a entrada, trânsito e comercialização de materiais vegetativos contaminados (SILVA, 2002). Assim, foram estabelecidas pela SDA as “Normas e padrões para produção e comercialização de plantas-matrizes e mudas de videira (*Vitis* spp) no Estado de Santa Catarina”, aprovadas pela CESM/SC em 07 de dezembro de 2001 e publicadas na Portaria nº 008/2002/GABS (SANTA CATARINA, 2002).

A videira é a espécie lenhosa que contém o maior número de viroses (WALTER & MARTELLI, 1997). Dentre outros quesitos a serem obedecidos para a produção e comercialização de plantas-matrizes e mudas de videira, as normas anteriormente mencionadas determinam o controle sanitário de plantas-matrizes e mudas, principalmente no tocante à detecção periódica de doenças sistêmicas transmissíveis (viroses). De acordo com as recomendações quanto ao controle sanitário, deverá ser verificada a presença das seguintes viroses: enrolamento das folhas associado-1, enrolamento das folhas associado-3, folha em leque ou entrenó curto, mosaico, intumescimento dos ramos, canelura dos troncos e mancha das nervuras, e outras, se conveniente e necessário. A tolerância para ocorrência de viroses é de 0% para plantas-matrizes e mudas básicas, de até 2% para plantas-matrizes e mudas certificadas e de até 5% para mudas fiscalizadas (SANTA CATARINA, 2002).

Entre as viroses citadas, o enrolamento das folhas associado-3 e o intumescimento dos ramos da videira apresentam incidência significativa em vinhedos das regiões vitícolas do país, inclusive de Santa Catarina. Elas são facilmente disseminadas pela multiplicação vegetativa de porta-enxertos e variedades produtoras afetadas (KUHN, 1989a; KUHN & NICKEL, 1998), além de ocorrer também nos países exportadores de mudas para os nossos

produtores (CREDI & GIUNCHEDI, 1996). Essas doenças podem causar: redução do vigor e da longevidade da planta; definhamento dos ramos e até morte da planta em cultivares mais suscetíveis; diminuição no número, tamanho e peso dos cachos; maturação incompleta dos frutos; redução no teor de açúcar da uva e conseqüente queda na qualidade do vinho (KUHN & FAJARDO, 2002).

Para a diagnose das viroses estabelecidas no programa de certificação a metodologia indicada é a técnica sorológica baseada na reação anticorpo-antígeno (ELISA). Quando necessário, podem ser recomendados outros métodos de diagnose, como a indexagem biológica em indicadoras e a detecção molecular por PCR. As amostras utilizadas na execução de testes sorológicos e moleculares deverão ser coletadas no período de crescimento vegetativo (folhas) e de dormência (sarmentos) das plantas (SANTA CATARINA, 2002).

O teste de ELISA baseia-se no princípio básico da sorologia, em que o antígeno é reconhecido por um anticorpo (imunoglobulina) específico, formando o complexo anticorpo-antígeno, associado a propriedades colorimétricas (ALMEIDA, 1995), sendo sensível (detecta até entre 20 e 100 ng de vírus), acurado e rápido (GARNSEY & CAMBRA, 1993). O objetivo da indexagem biológica é detectar a presença de viroses em plantas de variedades de interesse mediante o uso de diferentes tipos possíveis de enxertia, em casa de vegetação ou a campo, utilizando plantas indicadoras que apresentam resposta sintomatológica conhecida em relativamente pouco tempo (GARAU *et al.*, 1997). A técnica de PCR, mais precisamente a de RT-PCR, permite a amplificação de um fragmento específico de cDNA sintetizado a partir do RNA viral, possibilitando a detecção de seqüências específicas de ácidos nucléicos, sendo de uma sensibilidade até 1000 vezes maior do que o teste de ELISA (MINAFRA *et al.*, 1997). As técnicas citadas de detecção viral são importantes na diagnose de viroses e vêm sendo

usadas amplamente no mundo inteiro, inclusive no Brasil, por diversos pesquisadores (KUHN, 1992; FAJARDO *et al.*, 2002; VILLA & REGINA, 2002).

Atualmente, existem apenas quatro viveiristas no Estado produzindo mudas fiscalizadas aprovadas pela CIDASC. Tendo em vista a importância da atividade vitivinícola em Santa Catarina, a crescente competitividade do setor e a necessidade de adequação dos produtores de mudas às normas de produção de mudas recentemente estabelecidas para o Estado, torna-se fundamental diagnosticar a incidência das viroses recomendadas em plantas utilizadas como fonte de propágulos existentes em Santa Catarina, visando à futura definição de plantas a serem certificadas e utilizadas para produção em larga escala de mudas certificadas que abastecerão os produtores catarinenses. A realização deste estudo é importante não somente na região do Vale do Rio do Peixe, principal região produtora de uva do Estado, mas também em outras regiões do Estado com destaque na produção de uva, como o Vale do Rio Itajaí e a região Serrana, nas quais também existem plantas doadoras de propágulos, assim como naquelas plantas que são mantidas no Centro de Ciências Agrárias da UFSC, bastante procuradas para obtenção de estacas para produção de mudas. O teste de ELISA foi definido oficialmente como teste padrão para certificação, mas também é conveniente a utilização de outros métodos capazes de melhorar a segurança do processo, como a RT-PCR.

Neste contexto, este trabalho visou proceder a um estudo preliminar sobre a incidência das viroses do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos da videira, consideradas as mais importantes na atividade vitícola no mundo, em plantas doadoras de propágulos de algumas variedades de interesse para o Estado existentes em diferentes regiões de Santa Catarina. Objetivou-se também proceder à comparação entre tipos de amostras (folhas e sarmentos) utilizadas na execução das técnicas de ELISA e de RT-PCR.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Videira

A videira pertence à família *Vitaceae* e seu provável centro de origem paleontológico é a Groenlândia, onde se encontram os vestígios mais antigos de seu cultivo, com cerca de seis mil anos de idade. Atualmente, considera-se a existência de três centros de origem da videira: Eurásia, Ásia e América (GIOVANNINI, 1999).

A videira se adaptou e se difundiu pouco a pouco por diversas regiões do globo terrestre. Sua difusão ocorreu em duas direções principais, uma américo-asiática e outra euro-asiática, originando, respectivamente, as variedades de uva chamadas “americanas” e “européias ou viníferas” (EPAGRI, 1998).

A família *Vitaceae* compreende 14 gêneros, entre os quais se encontra o gênero *Vitis*. A esse gênero pertencem os sub-gêneros *Euvitis* – que engloba as espécies *V. riparia*, *V. rupestris*, *V. berlandieri* e *V. labrusca* (de onde derivam diversos porta-enxertos e variedades americanas, como Bordô e Niágara Branca) e *V. vinifera* (à qual fazem parte as variedades viníferas, como Cabernet Sauvignon e Chardonnay) – e *Muscadinia*, ao qual pertence a espécie *V. rotundifolia* (CHAUVET & REYNIER, 1984).

O porta-enxerto Paulsen 1103 (*V. berlandieri* x *V. rupestris*), originário da Itália, é o mais utilizado em Santa Catarina, apresentando moderada resistência à fusariose (*Fusarium oxysporum f.sp. herbemontis*) e suscetibilidade à pérola-da-terra (*Eurhizococcus brasiliensis*). Entretanto, vem crescendo o uso do porta-enxerto VR-043-43 (*V. rotundifolia* x *V. vinifera*), originário dos Estados Unidos, também resistente à fusariose (*F. oxysporum f.sp. herbemontis*), que vem sendo apontado como uma alternativa de tolerância e/ou resistência à pérola-da-terra (*E. brasiliensis*) em Santa Catarina (SCHUCK *et al.*, 2002).

Cabernet Sauvignon, originária da França, é uma variedade de coloração tinta de *V. vinifera*, moderadamente sensível à antracnose (*Elsinoe ampelina*) e sensível ao oídio (*Uncinula necator*) e ao míldio (*Plasmopara viticola*), sendo bastante utilizada para elaboração de vinhos tintos finos de alta qualidade. A variedade Chardonnay (*V. vinifera*), também originária da França, de película branca, é resistente à antracnose (*E. ampelina*), sensível ao oídio (*U. necator*) e moderadamente sensível ao míldio (*P. viticola*), tendo grande utilização na fabricação de vinhos brancos finos e espumantes de notável qualidade (GIOVANNINI, 1999, SOUSA & MARTINS, 2002).

Além disso, a variedade de coloração tinta Bordô (*V. labrusca*), originária dos Estados Unidos, altamente resistente à antracnose (*E. ampelina*) e tolerante ao oídio (*U. necator*) e ao míldio (*P. viticola*), produz mosto de boa coloração e alta acidez, sendo muito utilizada em vinhos tintos e de alta procura pela indústria de sucos. A variedade de coloração branca Niágara Branca (*V. labrusca*), também originária dos Estados Unidos, é resistente à antracnose (*E. ampelina*) e ao míldio (*P. viticola*) e tolerante ao oídio (*U. necator*), sendo muito utilizada como uva de mesa e na elaboração de vinhos brancos (GIOVANNINI, 1999; SOUSA & MARTINS, 2002).

Pode-se denominar sarmento ou vara os ramos de videira, dormentes ou em vegetação, de cujos nós advêm as folhas, gavinhas e inflorescências (SOUSA, 1996), utilizados para a produção de estacas de porta-enxertos e variedades produtoras (SANTA CATARINA, 2002). As normas de produção e certificação de plantas-matrizes e mudas estabelecidas para o Estado determinam a utilização de sarmentos e de folhas na execução das técnicas de diagnose viral (SANTA CATARINA, 2002).

Um corte em um ramo permite identificar suas partes principais: o cilindro central, onde se encontram a medula, o xilema e o floema, o córtex e a epiderme (GIOVANNINI,

1999). No caso dos vírus causadores do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos da videira, torna-se importante essa identificação, haja vista que esses vírus estão localizados no floema (MONETTE *et al.*, 1990; KUHN & NICKEL, 1998; KARASEV, 2000).

2.2 Vírus

A palavra vírus, originária do latim, significa veneno. A definição de vírus é um assunto extremamente complexo e uma das conceituações mais recentes define vírus como um conjunto formado por uma ou mais moléculas de ácido nucléico, normalmente envolto por uma capa protetora de proteína ou lipoproteína (BEDENDO, 1995).

No tocante à composição, os vírus são constituídos praticamente de capa protéica e ácido nucléico. A capa envolve e protege o elemento infeccioso do vírus, representado pelo ácido nucléico, ou genoma – o qual contém informação genética para a replicação da partícula – e todos os elementos genéticos responsáveis pelas características da partícula do vírus. (CARVALHO, 1987; BEDENDO, 1995; GARCÍA-ARENAL & GARCÍA, 2000). Nos vírus de partícula filamentosa, cerca de 5% da mesma é representada pelo ácido nucléico. A capa não possui propriedade infectiva (BEDENDO, 1995).

A replicação de uma partícula de vírus envolve basicamente quatro etapas distintas: a penetração na célula hospedeira; a liberação ou desnudamento do ácido nucléico; a síntese de ácido nucléico e proteína; e a maturação ou acoplamento destes dois componentes, dando origem a uma nova partícula (AGRIOS, 1988; GARCÍA-ARENAL & GARCÍA, 2000).

A penetração na célula vegetal hospedeira ocorre através de ferimentos ou pelo corte realizado para enxertia (BEDENDO, 1995). Uma vez no interior da célula, a capa protéica é

removida e o ácido nucléico liberado (GARCÍA-ARENAL & GARCÍA, 2000). O RNA viral liberado passa a atuar junto ao ribossomo, induzindo a formação da enzima RNA polimerase, que servirá como molde para a síntese de RNA viral, à medida que for gradativamente se separando do RNA viral ao qual estava acoplada, através do pareamento de nucleotídeos complementares àqueles que a constitui. A síntese da capa protéica tem início logo após a formação dos RNA virais na célula hospedeira. Estes novos ácidos nucléicos atuam como RNA mensageiros e induzem os ribossomos a produzirem moléculas de proteínas que formarão os capsômeros. Nesse processo, toda a “maquinaria” da célula é utilizada, envolvendo ribossomos, aminoácidos e RNA de transferência, a qual passa a produzir proteína necessária à formação das partículas virais, sempre sob a “orientação” do vírus (CARVALHO, 1987; AGRIOS, 1988; BEDENDO, 1995).

Após a fase de síntese do ácido nucléico e da proteína, ocorre a etapa de acoplamento ou maturação, com a constituição da capa protéica que abrigará o ácido nucléico. Essa capa protegerá o material genético do vírus dos agentes químicos e físicos presentes no interior da célula hospedeira ou no seu exterior. Tanto a síntese quanto o acoplamento dos componentes virais ocorre no citoplasma da célula hospedeira (BEDENDO, 1995; GARCÍA-ARENAL & GARCÍA, 2000).

O floema atua na distribuição dos vírus para locais distantes do seu ponto de penetração na planta. O movimento do vírus do ponto de penetração até o floema se dá através de um movimento célula a célula pelos plasmodesmos. Os vírus são transportados na forma de partículas completas, atingindo, a partir do ponto de penetração, primeiramente as raízes (exceto nos casos de enxertia), em seguida as folhas jovens e posteriormente a planta toda, caracterizando uma infecção sistêmica (BEDENDO, 1995; GARCÍA-ARENAL &

GARCÍA, 2000). Apesar da ocorrência sistêmica dos vírus, a sua concentração varia nos diferentes órgãos e tecidos da planta (BOSCIA *et al.*, 1997).

A transmissão mecânica de vírus através da seiva não tem importância em condições naturais de campo, assumindo um papel relevante no aspecto experimental, pois o contato entre plantas, propiciando a passagem do vírus presente numa planta doente para uma planta sadia constitui-se num fato raro. Para a videira, a transmissão por sementes e pólen não tem qualquer importância (BEDENDO, 1995). Por outro lado, a propagação vegetativa de plantas, com práticas como a união de tecidos (enxertia) e o plantio e propagação (plantio de estacas, gemas, etc.), constitui-se numa forma eficiente de perpetuação e disseminação de vírus (BEDENDO, 1995; KUHN & NICKEL, 1998). Além disso, a importância da transmissão por insetos, fundamental em várias culturas, para a videira é motivo de discordância entre diferentes autores (GARAU *et al.*, 1995; HABILÍ *et al.*, 1995; PETERSEN & CHARLES, 1997; SFORZA *et al.*, 2000).

Depois de infectada, é impossível curar a planta já cultivada no campo pelos métodos tradicionalmente utilizados para outras doenças. No campo, o único meio viável de controlar doenças causadas por vírus é através da utilização de material vegetativo sadio de porta-enxerto e variedade produtora, obtido mediante seleção sanitária (que envolve uma série de atividades e testes de identificação, como ELISA), termoterapia ou cultura *in vitro* (KUHN & NICKEL, 1998; KUHN, 1999).

2.2.1 O vírus GLRaV-3

O vírus causador do enrolamento das folhas associado-3 tem o genoma constituído de RNA fita simples (ssRNA), com senso positivo (KITAJIMA *et al.*, 1997), e pertence à família *Closteroviridae* e ao gênero *Closterovirus* (MARTELLI, 1997).

Além disso, é um vírus monoparticulado, flexível e filamentososo de 12 x 1200-2000 nm de comprimento, com simetria helicoidal e com passo da hélice de 3,4-3,8 nm. O ssRNA genômico tem de 15,5 a 20 kb (mil bases) e é protegido por uma única proteína capsidial de 26-43 kDa (KITAJIMA *et al.* 1997), e a polimerase viral tem massa molecular de 61 kDa (LING *et al.*, 1998).

O GLRaV-3 é considerado restrito (MONETTE *et al.*, 1990) ou associado ao floema (KARASEV, 2000) e aparentemente transmissível por via mecânica para hospedeiros herbáceos, cujo espectro é restrito, basicamente, a *Nicotiana* spp (MONETTE *et al.*, 1990), o que requer técnicas especializadas (KARASEV, 2000). A disseminação a longa distância ocorre através do material propagativo infectado, durante o processo de formação das mudas, independente do método de enxertia utilizado, não havendo informação de transmissão por ferramentas de poda ou pelo contato das raízes (KUHNS & NICKEL, 1998). A disseminação natural do vírus nos vinhedos, por vetores, começou a ser considerada a partir da década de 80 (KUHNS & NICKEL, 1998) e diversos autores começaram a constatar que ele pode ser transmitido, experimentalmente, de videira para videira pelas cochonilhas *Heliococcus bohemicus*, *Phenacoccus aceris*, *Planococcus citri*, *Pl. ficus*, *Pl. longispinus*, *Pseudococcus affinis*, *Ps. calceolariae*, *Ps. longispinus* e *Pulvinaria vitis* (TANNE *et al.*, 1989; BOSCIA *et al.*, 1993; BELLI *et al.*, 1994; GOLINO *et al.*, 1995; CABALEIRO & SEGURA, 1997; PETERSEN & CHARLES, 1997; SFORZA *et al.*, 2000). Na Austrália, Habili *et al.* (1995) observaram que a transmissão natural de GLRaV-3 parecia não estar ligada à presença de cochonilhas de qualquer espécie, enquanto Petersen & Charles (1997) conseguiram a transmissão experimental do vírus por cochonilhas somente no primeiro ínstar dos insetos.

A associação dos vírus dessa família com o floema e, em muitos casos, sua restrição ao floema, resulta em baixos traços desses vírus em plantas infectadas, extração de pouca

quantidade dos vírus e baixas produções durante a sua purificação, o que torna essa família de vírus difícil de estudar. Além disso, seu genoma longo em relação aos de outros vírus e a dificuldade de transmissão mecânica resulta num atraso na pesquisa com essa família comparado com outras famílias de vírus (KARASEV, 2000).

2.2.2 O vírus GVB

O vírus causador do intumescimento dos ramos da videira tem o genoma constituído de RNA fita simples (ssRNA), com senso positivo, e pertence ao gênero *Vitivirus*, sem família definida (MARTELLI *et al.*, 1997).

Além disso, o GVB é um vírus flexível e filamentososo de 12 x 725-825 nm de comprimento, com passo da hélice de 3,5 nm (MARTELLI *et al.*, 1997). Seu genoma tem cerca de 7,6 kb e é protegido por uma única proteína capsidial com massa molecular de 21,6-23 kDa (BOSCIA *et al.*, 1993; MINAFRA *et al.*, 1994).

O GVB é restrito ao floema e transmissível por inoculação mecânica para uma gama de hospedeiros herbáceos, a maioria *Nicotiana* spp. A transmissão é feita através do material vegetativo, seja pela multiplicação por estacas ou gemas, seja através de enxertia, não havendo nenhuma constatação de contaminação de plantas através de ferramentas de poda (KUHN & NICKEL, 1998). Há apenas poucas evidências, através da transmissão experimental e com algumas controvérsias, de disseminação natural do vírus por vetores, pelas cochonilhas *Pseudococcus ficus* e *Pseudococcus affinis* e *Planococcus affinis* (ROSCIGLIONE & GUGERLI, 1989; BOSCIA *et al.*, 1993; GARAU *et al.*, 1995) e pela cigarrinha *Scaphoideus littoralis* (MOUTOUS & HEVIN, 1986).

2.3 Virose: Enrolamento das Folhas Associado-3

A natureza viral da doença do enrolamento das folhas, considerada a mais importante e disseminada doença de origem viral que ocorre na videira, foi demonstrada pela primeira vez na Alemanha, nos anos 30. Na Califórnia, a doença foi inicialmente chamada de *white emperor disease* (KUHNS & NICKEL, 1998). No Brasil, ela foi primeiramente identificada no Estado de São Paulo (KUNYUKI, 1972) e, atualmente, já foi constatada em diversos países, como Austrália (HABILI *et al.*, 1995), Canadá (MACKENZIE *et al.*, 1996), Itália (CREDI & GIUNCHEDI, 1996), Estados Unidos (KOVACS *et al.*, 2001) e Chile (HERRERA & MADARIAGA, 2001).

As plantas afetadas apresentam sintomas que variam com as condições climáticas, a época do ano, a fertilidade do solo, a estirpe do vírus, a intensidade da infecção e a variedade de videira (KUHNS & NICKEL, 1998), mas a ausência de sintomas de enrolamento em determinadas variedades não necessariamente indica que sua performance agrônômica não é afetada pela doença (KOVACS *et al.*, 2001). Os sintomas são facilmente reconhecidos em variedades sensíveis, em especial no fim do ciclo vegetativo, antes da queda das folhas. Em plantas muito afetadas, os sintomas podem começar a se pronunciar a partir da floração, mas é mais comum que se expressem na época próxima à maturação da uva (KUHNS & NICKEL, 1998). Alguns sintomas podem não ser diagnosticados facilmente por alguém que não conheça bem a doença, e, desta forma, ela pode não ser notada, ou alguma alteração na performance da planta pode estar sendo relacionada equivocadamente a outras causas (KARASEV, 2000).

O sintoma mais característico da doença é o enrolamento dos bordos da folha para baixo, observado com relativa facilidade nas variedades viníferas (*Vitis vinifera*) tintas e brancas (KUHNS & NICKEL, 1998).

Nas viníferas tintas, o limbo toma uma coloração vermelho-violácea, permanecendo o tecido ao longo das nervuras principais com a cor verde normal, embora em plantas muito afetadas a coloração violácea possa atingir todo o tecido foliar. Nas viníferas brancas infectadas, o limbo toma uma leve coloração amarelo-pálida, às vezes mais pronunciada no tecido ao longo das nervuras principais. Se a infecção é severa, as plantas afetadas podem ser facilmente detectadas. Já no caso de estirpes menos agressivas do vírus, a diferenciação entre plantas doentes e sadias de viníferas brancas torna-se mais difícil, ocorrendo apenas um leve enrolamento das folhas e clorose entre as nervuras principais. Nas variedades viníferas, tanto as brancas como as tintas, o limbo das folhas das plantas infectadas tem aspecto rugoso, quebradiço e de consistência mais grossa do que nas folhas de plantas sadias. Os sintomas causados pela virose, independentemente da variedade, aparecem sempre a partir da base dos ramos, evoluindo para as demais folhas da extremidade. Dependendo do nível de infecção, os sintomas podem restringir-se às folhas da base dos ramos (MARTELLI, 1993a; KUHN & NICKEL, 1998; MARTELLI & WALTER, 1998).

As videiras americanas e híbridas, que predominam em área cultivada no Brasil, não mostram os sintomas característicos da doença. Observam-se, apenas em variedades como Niágara Branca, Niágara Rosada e Concord, leve enrolamento e, às vezes, queimadura entre as nervuras principais, bem como redução no desenvolvimento da planta. Os porta-enxertos não mostram qualquer sintoma nas folhas, quando infectados pelo vírus, o que torna impossível a distinção entre plantas sadias e doentes pela simples observação ocular (MARTELLI, 1993a; KUHN & NICKEL, 1998; KUHN & FAJARDO, 2002).

As áreas descoloridas (avermelhadas ou amareladas) aparecem no espaço entre as nervuras do lado abaxial das folhas no início do verão, tornando-se progressivamente mais fortes e se estendendo até cobrir completamente a superfície foliar inteira, com as nervuras

principais podendo ou não permanecer com a cor verde normal. Em casos severos, áreas necróticas podem se desenvolver nos tecidos entre as nervuras (MARTELLI, 1993a).

No cacho, o sintoma mais comum, em especial nas variedades viníferas tintas, é a maturação irregular e retardada dos frutos, que chega a não se completar em plantas muito afetadas pela doença. Além disso, nas plantas mais afetadas, o número e o tamanho dos cachos são menores. Nos ramos de plantas doentes de variedades sensíveis verifica-se um acentuado enfraquecimento, que dá à planta um aspecto nítido de definhamento (MARTELLI, 1993a; KUHN & NICKEL, 1998).

Vale alertar que sintomas de avermelhamento ou amarelamento das folhas, semelhantes aos causados pela virose, podem ser induzidos por outras causas, como: deficiência de potássio, de magnésio ou de boro; ataque de cigarrinhas e ácaros; asfixia da planta pelo excesso de umidade; infecção por outros patógenos (outros vírus, fitoplasmas e fungos radiculares); efeito fitotóxico de pesticidas e outras causas que interrompam a circulação normal da seiva da planta (KUHN & NICKEL, 1998).

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

1992; CREDI & BABINI, 1997, CABALEIRO *et al.*, 1999; KOVACS *et al.*, 2001); e prejuízo na qualidade do vinho (KUHN, 1989a).

2.4 Virose: Intumescimento dos Ramos da Videira

Esta doença foi descrita pela primeira vez na Califórnia com o nome de *grapevine rough bark*, sendo posteriormente denominada *grapevine corky bark* e considerada de origem viral (KUHN & NICKEL, 1998). No Brasil, foi constatada em 1978 na região vitícola do Rio Grande do Sul (KUHN, 1992). Atualmente, o intumescimento dos ramos da videira ocorre na maioria dos países vitícolas, como França (MOUTOUS & HEVIN, 1986), África do Sul (ENGELBRECHT & KASDORF, 1990), Itália (BOSCIA *et al.*, 1993) e Tunísia (MAHFOUDHI *et al.*, 1998).

Nas variedades americanas, como Bordô, Isabel, Niágara Rosada e Niágara Branca, os sintomas são facilmente observados e se caracterizam pelo intumescimento dos entrenós do ramo do ano, com fendilhamento longitudinal do tecido afetado. Ao se fazer um corte transversal na região intumescida do ramo maduro, nota-se o tecido de aspecto corticento, de cor marrom-escuro, que prolifera em direção à medula. Estes sintomas podem ser observados também no pecíolo das folhas próximas às regiões afetadas dos ramos. Com o amadurecimento do ramo, o tecido da região intumescida morre e fica com esse aspecto corticento. Sob este tecido observam-se caneluras. Os ramos afetados tendem a se curvar para baixo, sendo destacados da planta com facilidade, principalmente quando há formação de tecido corticento na região de sua inserção. A maturação do ramo é irregular e, normalmente, ele seca total ou parcialmente no período de repouso da planta. Nas plantas muito afetadas, a brotação é retardada e fraca (KUHN, 1992; MARTELLI & WALTER, 1998; KUHN & NICKEL, 1998; KUHN, 1999).

As folhas podem apresentar clorose no fim da primavera e tendem a enrolar os bordos para baixo, caindo mais tardiamente no outono (KUHN & NICKEL, 1998), além de possuírem consistência coriácea e eventual necrose ao longo das nervuras principais (KUHN, 1999). Em algumas variedades viníferas e híbridas, pode ser observado o avermelhamento ou amarelamento das folhas, que se evidencia no outono. Esta coloração anormal abrange toda a área foliar, inclusive os tecidos ao longo das nervuras. No entrenó da base do ramo do ano ocorrem fissuras e há formação de tecido corticento na região de inserção (KUHN & NICKEL, 1998).

A planta definha gradativamente, com seca parcial ou total dos ramos afetados, e pode morrer em poucos anos. Outro sintoma associado à presença do vírus é o engrossamento na região da enxertia, principalmente em mudas de um a três anos. Forma-se um volume excessivo de tecido de consistência esponjosa na região e acima da enxertia (MARTELLI, 1993b; KUHN & NICKEL, 1998). Em determinadas combinações de enxerto/porta-enxerto infectadas, o engrossamento é muito pouco visível. Na região afetada, o tecido intumescido morre e fica com aspecto corticento, apresentando fendilhamentos longitudinais. Porém, quando esse tecido é retirado, verifica-se, na superfície do tecido soldado, a presença de caneluras que avançam em direção ao tronco da produtora e raramente ao tronco do porta-enxerto (KUHN, 1992). A severidade de sintomas varia de acordo com o porta-enxerto utilizado (CREDI *et al.*, 1991) e os sintomas podem ser latentes em muitas variedades (CREDI & BABINI, 1997). As mudas que apresentam engrossamento forte dificilmente sobrevivem além do terceiro ano após a enxertia (KUHN, 1992).

A produção diminui acentuadamente e os frutos não completam a maturação, ocorrendo, ao longo dos anos, definhamento gradativo e morte total ou parcial da planta. Nas plantas enxertadas costumam ocorrer rebrotes dos porta-enxertos (KUHN, 1992).

O intumescimento dos ramos da videira induz a redução do vigor, a queda na produção e o definhamento de ramos em cultivares suscetíveis (KUHN & NICKEL, 1998). Diferentes autores têm verificado queda da produção (CREDI *et al.*, 1991; GARAU *et al.*, 1994; KUHN & NICKEL, 1998; KUHN & FAJARDO, 2002), redução do vigor e definhamento nos ramos da planta (KUHN, 1999; KUHN & FAJARDO, 2002), queda no teor de açúcar, resultado da maturação incompleta dos frutos (CREDI *et al.*, 1991; MARTELLI, 1993b; KUHN & NICKEL, 1998; KUHN & FAJARDO, 2002), e morte da planta (MARTELLI, 1993b; KUHN & NICKEL, 1998; KUHN & FAJARDO, 2002).

2.5 O Teste de ELISA

O teste de ELISA é uma técnica sorológica de diagnose amplamente utilizada para a identificação de viroses. A presença do antígeno (proteína do vírus) na seiva infectada é indiretamente detectada através de uma reação colorimétrica, que se desenvolve por causa da reação de uma enzima (geralmente fosfatase alcalina ou peroxidase) conjugada a anticorpos, na presença de um substrato apropriado (BOSCIA *et al.*, 1997).

O teste de ELISA é sensível, acurado, rápido, simples (GARNSEY & CAMBRA, 1993), barato e fácil de executar (BOSCIA *et al.*, 1997). Seu sucesso é devido às numerosas vantagens que oferece em comparação com técnicas biológicas: sensibilidade para detectar concentrações muito baixas de antígeno; rapidez; possibilidade de trabalho em grande escala; uso com extrato de plantas e preparações de vírus purificadas; especificidade; possibilidade de obtenção de medidas quantitativas; possibilidade de automação e de padronização; baixo custo; durabilidade dos reagentes e equipamentos simples (CLARK & ADAMS, 1977).

Os anticorpos podem ser obtidos do soro de um animal imunizado e reagirão especificamente com o antígeno para o qual eles foram formados, podendo ser poli ou

monoclonais. Várias enzimas podem ligar-se a moléculas de anticorpo para formar uma molécula conjugada que tem atividade enzimática e é também sorologicamente ativa. Anticorpos conjugados a enzimas podem ser detectados quando são expostos a um substrato, que muda de cor como resultado da ação da enzima. A quantidade ou taxa de mudança de cor pode ser usada para medir a quantidade de anticorpo presente (GARNSEY & CAMBRA, 1993). Quando o anticorpo da detecção é o mesmo da conjugação com a enzima tem-se o que se chama de ensaio direto (DANIELS, 1994).

Um conceito fundamental para o teste de ELISA é que proteínas tais como anticorpos e proteínas da capa de vírus adsorvem fortemente à superfície de certos plásticos como poliestireno e cloretos de polivinil (GARNSEY & CAMBRA, 1993). Esses materiais são freqüentemente referidos como adsorventes ou como a fase sólida nos protocolos de ELISA (MARTIN, 1998, CAMBRA *et al.*, 2000). Essa ligação a materiais imunoadsorventes não é específica e não é uma reação sorológica tal como ocorre entre moléculas de antígeno e anticorpo. Se uma mistura de anticorpos é exposta a um plástico imunoadsorvente, todos se ligarão. Similarmente, quando o extrato cru de uma planta doente é colocado em uma placa de ELISA, as proteínas do patógeno e as proteínas do hospedeiro presentes no extrato ligar-se-ão à placa. Os componentes não reativos podem ser removidos por lavagem e não interferirão nos passos subsequentes. Uma adsorção indesejada de anticorpo ou antígeno à placa pode ser evitada usando-se detergentes não iônicos como o Tween-20 em soluções em incubação. Assim, o tampão usado no revestimento de placas com anticorpo de captura não contém Tween-20, mas ele é incorporado nos passos subsequentes do teste (GARNSEY & CAMBRA, 1993).

Numerosas variações do teste de ELISA podem ser verificadas. A seleção do método mais adequado dependerá de vários fatores, como por exemplo: a praticidade; o número de

amostras a serem analisadas; a sensibilidade requerida no diagnóstico; o interesse de identificação de novas estirpes do vírus dentro das amostras coletadas; dentre outros (ALMEIDA, 1995).

Entre os diversos variantes do teste de ELISA, o DAS é um teste direto e é o mais comumente usado, desde sua descrição por Clark & Adams (1977). A superfície imunoabsorvente é uma placa plástica de microtitulação com paredes desenhadas para o teste de ELISA. Uma solução diluída de anticorpo não conjugado é adicionada às paredes da placa, e o anticorpo adsorvido no plástico torna-se o anticorpo de captura. Após lavagem para remover qualquer excesso de anticorpo, a amostra (antígeno) é adicionada. Antígenos específicos ao anticorpo de captura adsorvido aderem a ele, mas outras proteínas permanecem em solução e são removidas por lavagem. O antígeno aderido ao anticorpo de captura é detectado pela adição de outro anticorpo, conjugado previamente a uma enzima específica, específico para o antígeno. Quando um substrato específico à enzima é adicionado no passo final, uma coloração se desenvolve como resultado da ação da enzima. A intensidade de coloração e sua taxa de desenvolvimento são correlacionadas à quantidade de anticorpo conjugado ligado ao antígeno, que por sua vez foi capturado pelo anticorpo aderido à placa (GARNSEY & CAMBRA, 1993). As reações de cada passo ocorrem durante um período de incubação que pode variar de 2 a 16 horas, dependendo da temperatura selecionada, que varia de 4 a 37 °C (BOSCIA *et al.*, 1997).

Outro variante do teste de ELISA é o PTA-I, realizado indiretamente. Nesta metodologia, o antígeno é adsorvido diretamente na superfície da placa e detectado pelo uso de um anticorpo não marcado específico ao antígeno mais um anticorpo conjugado específico ao anticorpo anterior e não ao antígeno, o que possibilita a detecção de diferentes estirpes de um vírus. As lavagens e incubações realizadas a cada passo podem ser realizadas da mesma

forma que no DAS, bem como a adição do substrato para desenvolvimento da reação colorimétrica (GARNSEY & CAMBRA, 1993).

Para a realização do teste, diferentes tampões têm sido utilizados, basicamente com TRIS, NaCl, PVP, Tween-20, PEG, Na₂CO₃, NaHCO₃, BSA, MgCl₂.6H₂O, KCl, dietanolamina, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, dietanolamina e água destilada, em diferentes combinações e proporções (BOSCIA *et al.*, 1997).

Para controle, cada placa de amostras deve conter ao menos uma amostra saudável (livre de vírus) e uma amostra positiva conhecidas. Os resultados podem ser quantificados com uma leitora de placas (BOSCIA *et al.*, 1997).

2.6 A RT-PCR

A aplicação de técnicas moleculares para a detecção de viroses de videira tem sido realizada nos últimos anos graças à disponibilidade de seqüências de ácidos nucléicos clonadas, permitindo o desenvolvimento de *primers* (iniciadores) usados em amplificação por PCR. Um aspecto relevante das técnicas moleculares é o grande aumento de sensibilidade, que pode ser de cem a mil vezes maior do que no teste de ELISA (MARTIN *et al.*, 2000).

A PCR é uma técnica *in vitro* que permite, entre outras coisas, a amplificação de uma região específica do DNA que fica entre duas regiões do DNA de seqüências conhecidas (NEWTON & GRAHAM, 1997). Um ensaio padrão de RT-PCR permite a amplificação de um fragmento específico de cDNA sintetizado a partir do RNA viral, possibilitando a detecção de seqüências específicas de ácidos nucléicos, sendo de alta sensibilidade para uma ou mais viroses, e pode ser facilmente executado se for dada atenção para a correta escolha de

primers e para um protocolo de extração capaz de fazer a limpeza suficiente do molde viral para as reações enzimáticas (CANDRESSE *et al.*, 1998; MARTIN *et al.*, 2000).

Uma quantidade muito pequena de tecido vegetal é requerida (10-100 mg) e uma rápida maceração em um tampão comum geralmente libera uma quantidade suficiente de partículas virais e/ou RNA para ser preparada. A seiva crua (não tratada) e não clarificada deve ser diluída de 1: 10 a 1: 100 (MINAFRA *et al.*, 1997). A redução da quantidade de substâncias inibidoras melhorará a reação enzimática até um limite de perda do sinal de amplificação devido à baixa concentração do molde viral. Uma desnaturação térmica ou química pode ser necessária, mas alguns protocolos passam diretamente à síntese de cDNA. A presença de hexanucleotídeos aleatórios ou de um oligonucleotídeo complementar específico apronta essa última reação, após pareamento no molde viral (MINAFRA *et al.*, 1997; CANDRESSE *et al.*, 1998).

Uma transcriptase reversa sintetiza uma fita de cDNA a partir do RNA genômico do vírus, para passar por amplificação. Uma alíquota da mistura da reação de cDNA é adicionada à mistura da PCR, ou alternativamente uma reação num único tubo pode ser feita para o cDNA e a PCR, aumentando o volume para o segundo passo para reduzir a concentração de MgCl₂ e mudar o pH do tampão (MINAFRA *et al.*, 1997; CANDRESSE *et al.*, 1998).

As DNA polimerases são enzimas que catalisam a síntese de cadeias longas de polinucleotídeos a partir de monômeros de dNTPs usando uma das fitas parentais originais como molde para a síntese de uma fita complementar nova, requerendo para isso o uso de *primers* (NEWTON & GRAHAM, 1997). A DNA polimerase termoestável de *Thermus aquaticus*, Taq polimerase, é a mais usada em PCR (CANDRESSE *et al.*, 1998). Os dNTPs usados normalmente compreendem dATP, dCTP, dGTP e dTTP. Esses dNTPs ligam-se ao grupo 3'-hidroxil livre do *primer* e formam uma fita complementar à fita molde. O tampão

mais comum utilizado com a Taq polimerase (geralmente preparado em uma concentração de 10x, diluído a 1: 10 (v/v) antes do uso) tem os seguintes componentes: TRIS-HCl, KCl, MgCl₂ e gelatina (NEWTON & GRAHAM, 1997).

A amplificação por PCR é obtida pelo uso de *primers* de oligonucleotídeos (moléculas de fita simples de DNA que são complementares aos finais de uma seqüência definida de um molde de DNA), também conhecidos como *amplimers*. Os *primers* são estendidos sobre um DNA (molde) desnaturado de fita simples por uma DNA polimerase, na presença de dNTPs sob condições de reação adequadas. Isso resulta na síntese de novas fitas de DNA complementares às fitas padrões. Neste estágio, estas fitas existem como moléculas de fita dupla de DNA. A síntese de fitas pode ser repetida por desnaturação por calor de uma fita dupla de DNA, pareamento de *primers* por resfriamento da mistura e extensão de *primers* por uma DNA polimerase a uma temperatura adequada para a reação enzimática. Cada repetição de síntese de DNA compreende um ciclo de amplificação. Cada nova fita de DNA sintetizada torna-se um molde para qualquer ciclo de amplificação adicional e assim a seqüência alvo de DNA amplificada é seletivamente amplificada ciclo após ciclo. A eficiência de uma PCR irá variar de molde para molde e de acordo com o grau de otimização conduzido (NEWTON & GRAHAM, 1997; CANDRESSE *et al.*, 1998; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A desnaturação inicial do molde de DNA a 92-100 °C é suficiente para desnaturar completamente o DNA para que os *primers* possam parear após o resfriamento. O passo de pareamento dos *primers* é um parâmetro importante na otimização de uma PCR específica, e sua temperatura deve ser otimizada experimentalmente. A extensão dos *primers* é geralmente executada a 72 °C por 2 minutos. O número de ciclos geralmente varia entre 25 e 35 (NEWTON & GRAHAM, 1997; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A eletroforese de uma alíquota da PCR em gel de agarose ou poliacrilamida seguida pela visualização, após corar com brometo de etídeo, é um dos mais simples métodos de detecção dos produtos da PCR (NEWTON & GRAHAM, 1997; CANDRESSE *et al.*, 1998). Após corar com brometo de etídeo, a transiluminação ultravioleta permite a visualização do DNA no gel. O gel pode ser fotografado para fornecer um registro permanente do resultado experimental. Geralmente três tipos de informação podem ser derivados da análise de produtos de PCR específicos: detecção da presença da seqüência de DNA alvo e variações dentro dela, quantificação do rendimento de uma amplificação de PCR para determinar a quantidade absoluta ou relativa do DNA ou RNA alvo inicial, e análise de seqüências (NEWTON & GRAHAM, 1997).

A utilização da RT-PCR para diagnóstico de viroses responde às exigências de sensibilidade, mas esta técnica é acompanhada da extração de ácidos nucléicos, da transcrição de RNA viral em cDNA e da análise dos produtos de amplificação, por técnicas que dificultam sua utilização em análises de rotina sobre um grande número de amostras (MARINHO, 2001). Além disso, o custo da PCR ainda é um fator limitante para sua utilização em grande escala, devido ao preço dos reagentes e do termociclador utilizados (EIRAS *et al.*, 1998; MARTIN *et al.*, 2000). Entretanto, a maior sensibilidade da RT-PCR pode diminuir ou eliminar alguns problemas decorrentes das limitações normalmente impostas ao teste de ELISA, como a época do ano para coleta de amostras, o tipo de amostra a coletar ou a influência do estado fisiológico da planta nos resultados obtidos (MACKENZIE *et al.*, 1997). Um procedimento de RT-PCR automatizado, usando reagentes de baixo custo e com um tempo de execução comparável ao do teste de ELISA para um grande número de amostras, tornará a técnica de RT-PCR muito competitiva e de ampla aplicação (MINAFRA *et al.*, 1997).

2.7 Tipos de Amostras Utilizadas para Detecção de Viroses

A distribuição errática e a baixa concentração dos vírus nos tecidos hospedeiros nem sempre permite sua satisfatória e reproduzível detecção por ELISA. Até mesmo a RT-PCR, capaz de detectar alguns vírus em níveis próximos a fentogramas, requer uma etapa de extração ou imunocaptura que pode tornar o procedimento trabalhoso (NOTTE *et al.*, 1997).

Os resultados do teste de ELISA em tecidos de videira são altamente condicionados a fatores como qualidade de reagentes e tipo de tecido, bem como época de coleta. Infelizmente, esses parâmetros não são os mesmos para diferentes viroses. Portanto, seu conhecimento é fundamental para evitar interpretações erradas dos resultados dos testes (BOSCIA *et al.*, 1997). Até mesmo com os melhores anticorpos monoclonais disponíveis, o teste precisa ser realizado com amostras coletadas na época em que a concentração viral está em seu pico para obter-se um resultado confiável (HABILI *et al.*, 1997), visto que essa concentração varia amplamente durante o ano (MARTIN *et al.*, 2000). Além disso, o (PTA-I)-ELISA é geralmente menos sensível que o DAS-ELISA para uso com extratos vegetais crus e pode não ser efetivo quando a concentração do antígeno na amostra é baixa, pois como a ligação à placa não é específica, diversas proteínas presentes no extrato poderão ligar-se a ela, competindo pelos sítios de ligação existentes na placa (GARNSEY & CAMBRA, 1993).

Assim, a seleção de amostras apropriadas para o teste de ELISA é crítica (BOSCIA *et al.*, 1997; KUHN & NICKEL, 1998). Neste sentido, Monis & Bestwick (1996) observaram que a concentração do GLRaV-3 em tecidos mais jovens em amostras coletadas no topo das plantas é menor do que em tecidos mais velhos em amostras coletadas na base das plantas. Desta forma, uma amostragem mal realizada pode levar a falsos resultados negativos (SOUSA, 1998).

Com relação à RT-PCR, Rowhani *et al.* (1997) consideram que as estratégias de amostragem para detecção do GLRaV-3 através dessa técnica em amostras coletadas a campo ainda devem ser otimizadas. Os métodos usuais para preparação das amostras são muitas vezes complicados, por incluírem maceração de tecidos vegetais, centrifugação e uso de solventes orgânicos ou precipitação por etanol, além de existir uma produção de moldes de ácido nucléico viral muito maior do que a necessária na reação de PCR. Além disso, o tipo de tecido infectado pode ter efeito na facilidade com que o ácido nucléico viral é liberado (THOMSON & DIETZGEN, 1995) e sabe-se que a videira contém compostos que inibem as reações enzimáticas nos ácidos nucléicos extraídos (REZAIAN & KRAKE, 1987).

Para detecção do GLRaV-3 podem ser usadas brotações verdes e pecíolos de folhas maduras coletadas no período vegetativo, mas as melhores fontes de antígeno são nervuras de folhas maduras da base dos ramos e raspas do córtex de ramos maduros. Para a detecção do GVB, além de nervuras de folhas maduras da base dos ramos, podem ser usadas raspas do córtex de sarmentos coletados no período de dormência das plantas (BOSCIA *et al.*, 1997). Como esses dois vírus são restritos ao floema, a amostra deve sempre conter este tecido. Tecidos frescos (folhas e pecíolos) podem ser armazenados por cerca de dez dias a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ em sacos plásticos, ou a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou menos por maiores períodos. Sarmentos, se enrolados em papel úmido, podem permanecer nessas mesmas condições por até mais de um ano (GARNSEY & CAMBRA, 1993). Flores e frutos não são boas fontes de amostra (LING *et al.*, 2001).

A maior sensibilidade da técnica de RT-PCR em comparação ao teste de ELISA – até 1000 vezes maior, conforme Minafra *et al.* (1997) – pode ser uma grande vantagem do uso dessa técnica em casos em que a concentração viral na amostra coletada é muito baixa, principalmente no período de dormência das plantas (MARTIN *et al.*, 2000).

Diversos autores têm utilizado diferentes tipos de amostras no teste de ELISA com sucesso. Utilizando folhas, Engelbrecht & Kasdorf (1990) detectaram o GLRaV-3 e o GVB na África do Sul e Golino *et al.* (1995) detectaram o GLRaV-3 nos Estados Unidos. No Brasil, Villa & Regina (2002) detectaram o GLRaV-3 utilizando folhas adultas coletadas no final do período vegetativo das plantas. Com o uso de folhas maduras e de sarmentos maduros coletados no período de dormência das plantas, Credi & Giunchedi (1996) verificaram a ocorrência do GLRaV-3, e, com o uso de sarmentos maduros, Bonavia *et al.* (1996) detectaram o GVB, ambos na Itália. Além disso, Kovacs *et al.* (2001) usaram sarmentos coletados na época de dormência das plantas para detecção do GLRaV-3 nos Estados Unidos. Com a utilização de folhas, Petersen & Charles (1997) verificaram a ocorrência do GLRaV-3 na Nova Zelândia.

Na realização da técnica de RT-PCR, Nickel *et al.* (2002) e Fajardo *et al.* (2002) utilizaram folhas maduras para detecção do GVB e do GLRaV-3, respectivamente, ambos no Brasil, enquanto Ling *et al.* (2001) recomendam a utilização de sarmentos, independente da época de coleta, como amostra confiável para detecção do GLRaV-3, tanto nesta técnica quanto no teste de ELISA. Belli *et al.* (1994) usaram folhas e Mackenzie *et al.* (1997) folhas e flores, coletadas na primavera e no verão, e gemas, coletadas durante o ano todo, para detecção do GLRaV-3, ambos na Itália. Além disso, Minafra & Hadidi (1994), utilizaram sarmentos coletados na época de dormência das plantas e folhas maduras para verificar a ocorrência do GLRaV-3 e do GVB na Itália, enquanto Acheche *et al.* (1999) usaram sarmentos coletados na época de dormência das plantas para detecção do GLRaV-3 na Tunísia.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar um estudo preliminar sobre a incidência das viroses do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos da videira em plantas doadoras de propágulos dos porta-enxertos Paulsen 1103 e VR-043-43 e das variedades produtoras Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Bordô e Niágara Branca existentes em diferentes regiões do Estado de Santa Catarina.

3.2 Objetivo Específico

Comparar a utilização de amostras constituídas de folhas, coletadas no final do período vegetativo das plantas, e de sarmentos, coletados durante o período de dormência das plantas, nas técnicas de ELISA e de RT-PCR, para detecção dos vírus causadores das viroses do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos da videira em plantas doadoras de propágulos dos porta-enxertos Paulsen 1103 e VR-043-43 e das variedades produtoras Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Bordô e Niágara Branca existentes em diferentes regiões do Estado de Santa Catarina.

4 ESTUDO PRELIMINAR SOBRE A INCIDÊNCIA DAS VIROSES DO ENROLAMENTO DAS FOLHAS ASSOCIADO-3 E DO INTUMESCIMENTO DOS RAMOS DA VIDEIRA EM PLANTAS DOADORAS DE PROPÁGULOS DE SANTA CATARINA

4.1 Introdução

Santa Catarina é responsável por 4% da produção nacional de uvas e por 5% da produção de vinhos e mosto (BRITO, 2002). Nesse Estado, a atividade vitivinícola apresenta expressão econômica principalmente na região do Vale do Rio do Peixe, com uma produção voltada principalmente à elaboração de vinhos de consumo corrente e suco de uva, e com grande parte da demanda de uva atendida com produto oriundo do Rio Grande do Sul (PROTAS *et al.*, 2002).

Santa Catarina possui uma produção anual acima de 50 mil toneladas e uma área de cultivo de mais de 3.400 ha (EPAGRI, 2002). Tem sido observado um acréscimo acentuado da área de produção mediante a renovação de vinhedos e a implantação de novos plantios. A introdução de mudas contaminadas provenientes de outros Estados brasileiros e do exterior, aliada à técnica tradicional de produção de mudas no próprio Estado, tem possibilitado a transmissão de diversas doenças, principalmente as viroses (SILVA, 2002), devido ao não atendimento de requisitos sanitários (KUHN, 1989b). Atualmente, verifica-se no Estado a presença de no mínimo seis viroses, que são limitantes à produção, reduzindo de forma acentuada a qualidade, produtividade e longevidade dos vinhedos (SILVA, 2002). Dentre as viroses da videira constatadas no Brasil, o enrolamento das folhas associado-3 destaca-se em importância (FAJARDO *et al.*, 2002), permanecendo de forma latente em algumas cultivares, o que não significa ausência de prejuízo em sua performance agrônômica (KOVACS *et al.*, 2001). Além disso, o intumescimento dos ramos da videira possui uma incidência acima de

60% em alguns vinhedos no sul do país, sendo altamente relevante economicamente (NICKEL *et al.*, 2002).

A diagnose do enrolamento das folhas associado-3 apenas visualmente pode ser difícil (KARASEV, 2000), pois estirpes de fraca virulência ou não virulentas do vírus podem não causar sintomas aparentes (KOVACS *et al.*, 2001), o que torna fundamental a utilização de outros métodos de diagnose.

Até o momento, muito pouco se sabe sobre a incidência das viroses do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos da videira nas regiões vitivinícolas do Estado de Santa Catarina, sobretudo em plantas doadoras de propágulos mantidas por empresas públicas ou privadas utilizados na produção de mudas.

Neste sentido, este estudo foi realizado com o objetivo de estudar diagnosticar, de forma preliminar, a incidência das viroses do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos da videira, em amostras obtidas de plantas doadoras de propágulos de diferentes variedades, coletadas em vários municípios do Estado de Santa Catarina.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Material vegetal

Para a realização dos testes foram utilizadas amostras constituídas de sarmentos e de folhas obtidas de plantas doadoras de propágulos dos porta-enxertos Paulsen 1103 (10 plantas) e VR-043-43 (9 plantas) e das variedades produtoras Cabernet Sauvignon (40 plantas), Chardonnay (9 plantas), Bordô (10 plantas) e Niágara Branca (10 plantas), perfazendo um total de 88 plantas avaliadas, sendo feitas duas repetições por planta em cada teste.

As amostras foram coletadas em municípios das regiões do Vale do Rio Itajaí (oito plantas do município de Rodeio e três de Ascurra), Serrana (30 plantas do município de São Joaquim e quatro de Bom Retiro) e do Vale do Rio do Peixe (26 plantas do município de Videira), mantidas em empresas públicas/privadas produtoras de mudas, mantendo-se, a pedido, o sigilo da origem das amostras, e de 17 plantas mantidas em casa de vegetação no Centro de Ciências Agrárias da UFSC, no município de Florianópolis. As amostras do Vale do Itajaí foram coletadas de todas as plantas doadoras de propágulos da principal empresa produtora de mudas da região; as da região Serrana foram coletadas de plantas selecionadas por três empresas produtoras de mudas; as da região do Vale do Rio do Peixe foram coletadas de plantas selecionadas pela principal empresa produtora de mudas da região. No Centro de Ciências Agrárias foram coletadas amostras de todas as plantas daquelas variedades avaliadas neste trabalho existentes no local, que são utilizadas em diversos estudos e como fonte de propágulos para viveiristas e produtores de uva.

Os sarmentos (5 por planta, com 5 gemas) foram coletados durante o período de dormência (entre julho e agosto) e as folhas (10 folhas da base dos ramos por planta) no final do período vegetativo das plantas (entre abril e junho). Os sarmentos foram embalados em papel toalha úmido, colocados em saco plástico escuro identificado e armazenados à temperatura de 4 °C até a realização dos testes. As folhas foram embaladas em saco plástico escuro identificado e armazenadas à temperatura de -20 °C até a realização dos testes.

Para comparação entre os valores médios de incidência obtidos em cada região, foi elaborada uma tabela de contingência, considerando as frequências esperadas e observadas das viroses em cada região, e utilizado o teste χ^2 , cujo resultado foi obtido pelo somatório do quadrado do desvio das frequências esperadas em cada região.

Os resultados obtidos na execução das duas técnicas foram utilizados, com diferentes enfoques, para as discussões e conclusões apresentadas neste capítulo e no subsequente, de acordo com o tipo de estudo conduzido em cada capítulo.

4.2.2 Estimativa da suficiência amostral

Para cálculo da suficiência amostral, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$n = \frac{A \cdot [1 + \bullet \cdot (1 + 4 \cdot (p_1 - p_2) / A)]^2}{4 \cdot (p_1 - p_2)^2}, \text{ onde:}$$

p_1 e p_2 ($p_1 > p_2$) são as frequências de amostras infectadas em cada região obtidas com os testes e $A = \{[(t_{\hat{\alpha}(\bullet)}) \cdot \bullet \cdot (2 p_m \cdot (1 - p_m))] + [(t_{2\hat{\alpha}(\bullet)}) \cdot \bullet \cdot (p_1 \cdot (1 - p_1) + p_2 (1 - p_2))]\}^2$, onde $t_{\hat{\alpha}(\bullet)}$ e $t_{2\hat{\alpha}(\bullet)}$ são os valores críticos de uma tabela de distribuição de t -Student para \bullet graus de liberdade ($1 - \hat{\alpha}$ é a chance de detectar diferença entre duas proporções) e $p_m = (p_1 + p_2) / 2$.

Considerando os valores de incidência média obtidos para cada virose em cada região amostrada, e considerando $\hat{\alpha} = 0,05$ e $\hat{\alpha} = 0,20$, verificamos através dos cálculos acima que o mínimo de amostras a serem coletadas seria de 552, logo, o número de amostras coletadas (88) teria sido insuficiente. Entretanto, deve-se considerar que: este foi um estudo apenas preliminar da incidência de viroses pelo Estado de Santa Catarina, realizado apenas com plantas usadas como fonte de propágulos existentes no Estado; existem apenas quatro produtores de mudas de videira em Santa Catarina atualmente registrados na CIDASC (nenhum das variedades produtoras Cabernet Sauvignon e Chardonnay e dos porta-enxertos Paulsen 1103 e VR-043-43); no Centro de Ciências Agrárias foram coletadas amostras de todas as plantas existentes daquelas variedades objeto deste trabalho; e a maioria das plantas utilizadas pelos viveiristas são clones de um número muito reduzido de indivíduos e, portanto, a população de plantas a serem amostradas já era naturalmente de tamanho bastante reduzido.

Assim, além de amostras daquelas empresas registradas na CIDASC que se dispuseram a fornecer amostras de plantas de seus viveiros, também foram coletadas amostras de outras empresas, públicas e privadas, não registradas naquele órgão. Desta forma, pode-se afirmar que para execução deste trabalho foram coletadas amostras representativas de quase todas as plantas existentes no Estado que são utilizadas por viveiristas e/ou instituições de pesquisa na obtenção de estacas para produção de mudas de videira, mesmo que estatisticamente isso não possa ser demonstrado.

Utilizando-se a fórmula $n_0 = 1 / E^2$, onde n_0 = tamanho da amostra e E = erro amostral, e considerando o número de amostras coletadas (88), verifica-se que o erro amostral deste estudo foi de 10,66%.

4.2.3 ELISA

4.2.3.1 Detecção do GLRaV-3

Para detecção do vírus causador do enrolamento das folhas associado-3 pelo teste de ELISA a metodologia usada foi a de DAS, descrita por Clark & Adams (1977), seguindo as recomendações do fabricante dos anticorpos comerciais utilizados (Agritest, Itália). Os anticorpos utilizados foram policlonais.

Para a retirada do extrato do sarmento, primeiramente foi feita uma leve raspagem do ramo com canivete, retirando e eliminando a casca; em seguida foi efetuada uma raspagem um pouco mais intensa (profunda) com o objetivo da retirada de tecidos do floema. Em torno de 1,0 g de material vegetal (floema) foi macerado em sacos de extração apropriados na presença de 10 mL de tampão de extração, pH 8,2, constituído de TRIS a 0,625% (p/v), NaCl a 0,8%, PVP-40 a 2% (p/v), PEG a 1% (p/v) e Tween-20 a 0,05% (v/v), permanecendo nesta condição até sua utilização. Para retirada do extrato das folhas, cerca de 1,0 g de nervuras

principais e pecíolos foi macerado em sacos de extração apropriados na presença de 10 mL de tampão de extração, permanecendo nesta condição até sua utilização.

Inicialmente, foi feita a cobertura dos orifícios da placa de microtitulação com 200 μ L de tampão de cobertura, pH 9,6, constituído de Na_2CO_3 a 0,159% (p/v) e NaHCO_3 a 0,293% (p/v), com IgG previamente dissolvida (1: 1000, v/v). A placa foi incubada em estufa a 37 °C durante 2 horas.

Após a incubação, a placa de microtitulação foi lavada três vezes com tampão de lavagem, pH 7,4, constituído de NaCl a 0,8% (p/v), KH_2PO_4 a 0,02% (p/v), Na_2HPO_4 a 0,29% (p/v), KCl a 0,02% (p/v), 0,5 mL de Tween-20 a 0,05% (v/v) e seca com uma toalha de papel. Em seguida, foram colocados 200 μ L de cada amostra e 200 μ L das amostras que serviram como controles positivo e negativo nos orifícios da placa de microtitulação, que foi incubada em estufa a 37 °C durante 2 horas.

Após a incubação, a placa de microtitulação foi novamente lavada três vezes com tampão de lavagem e seca com uma toalha de papel. A seguir, foram adicionados aos orifícios da placa de microtitulação 200 μ L de tampão conjugado, pH 7,4, constituído de TRIS a 0,24% (p/v), NaCl a 0,8% (p/v), PVP-40 a 0,2% (p/v), Tween-20 a 0,05% (v/v), BSA a 0,2% (p/v), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 0,02% (p/v) e KCl a 0,02% (p/v), com IgG-PA previamente dissolvida (1: 1000, v/v). A placa foi incubada em estufa a 37 °C durante 2 horas.

Após a incubação, a placa de microtitulação foi novamente lavada três vezes com tampão de lavagem e seca com uma toalha de papel. Em seguida, foram colocados nos orifícios da placa de microtitulação 200 μ L de tampão substrato, pH 9,8, constituído de dietanolamina a 9,7% (v/v), com *p*-NPP previamente dissolvido (1,0 mg/mL).

Por fim, a placa de microtitulação foi mantida a temperatura ambiente e em local escuro, para leitura dos resultados em leitora apropriada (modelo EL 800 da Bio-Tek Instruments, Estados Unidos), efetuando-se 3-5 leituras num intervalo de 1-2 horas. Foram considerados positivos os resultados cujos valores de leitura foram iguais ou superiores a duas vezes a média das leituras obtidas com o controle negativo.

4.2.3.2 Detecção do GVB

Para detecção do vírus causador do intumescimento dos ramos da videira pelo teste de ELISA foi utilizada uma metodologia indireta (PTA-I), descrita por Garnsey & Cambra (1993), com modificações, seguindo as recomendações do fabricante dos anticorpos comerciais utilizados (Agritest, Itália). Os anticorpos utilizados no teste foram monoclonais.

Para a retirada do extrato do sarmento e das folhas, foi utilizada a mesma metodologia descrita no item 4.2.3.1, mas sem adição de Tween-20 ao tampão de extração.

Os passos seguintes foram realizados de forma semelhante à descrita no item 4.2.3.1, mas com as seguintes diferenças e na seguinte ordem: adição das amostras e controles à placa de microtitulação diretamente; incubação e lavagem da placa; adição de IgG dissolvida em tampão conjugado; incubação e lavagem da placa; adição de (anti-IgG)-PA dissolvida em tampão conjugado; incubação e lavagem da placa; adição de *p*-NPP dissolvido em tampão substrato; e leitura dos resultados.

4.2.4 RT-PCR

Para a extração do RNA viral foram utilizadas três metodologias.

A metodologia de extração número 1 foi uma modificação da descrita por Rowhani *et al.* (1993). Aproximadamente 1,0 g de cada amostra (pecíolos e nervuras principais de folhas ou floema de sarmentos) foi macerado em almofariz com nitrogênio líquido. Cada amostra foi transferida para um tubo de centrífuga, onde foram adicionados 10,0 mL de tampão de extração ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 95 mM, KH_2PO_4 30 mM, sacarose 292 mM, PVP-10 180 mM, ácido ascórbico 30 mM e 1,5% (p/v) de BSA-fração V, pH 7,6). Cada amostra foi incubada no tampão durante 10 a 20 minutos em gelo. Após a incubação, foi feita nova maceração em almofariz com nitrogênio líquido. Em seguida, cada amostra foi centrifugada a 12000 rpm durante 3 a 4 minutos e o sobrenadante foi recolhido. O sobrenadante foi centrifugado a 12000 rpm durante 20 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado. O *pellet*, quando formado, foi ressuspense em 2 mL de tampão de ressuspensão (EDTA 10 mM, TRIS 50 mM, pH 8,0, e 0,1% de 2-mercaptoetanol). A seguir, foram adicionados 250 μ L de SDS 10% e foi feita a incubação a 60 °C durante 10 minutos. Após a incubação, foram adicionados e misturados 800 μ L de acetato de potássio 5 M e foi feita a incubação em gelo durante 30 minutos. Após a incubação, cada amostra foi centrifugada a 12000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante foi recolhido. Ao sobrenadante, foram adicionados e misturados 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,4, e 1 volume de isopropanol gelado e foi feita a incubação a -20 °C durante 1 hora. Após a incubação, cada amostra foi centrifugada a 12000 rpm durante 20 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet*, quando formado, foi lavado com 3 mL de etanol (70%) frio, foi feita a centrifugação a 12000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi seco a temperatura ambiente. Por fim, o *pellet* foi ressuspense em 50 μ L de TE (TRIS 10 mM e EDTA 1 mM), para obtenção do RNA total para a síntese do cDNA.

A metodologia de extração número 2 foi baseada na descrita por Doyle & Doyle (1987). Cerca de 150 mg de cada amostra (pecíolos e nervuras principais de folhas ou floema de sarmentos) foram macerados em almofariz com nitrogênio líquido. Cada amostra foi transferida para um tubo de centrífuga e foram adicionados 700 μ L de tampão de extração (2% de CTAB; NaCl 1,4 M; EDTA 20mM; TRIS-HCl 100 mM, pH 8,0; 1% de PVP-40 e 0,2% de 2-mercaptoetanol). Cada amostra foi incubada a 60 °C durante 60 minutos, com resfriamento após a incubação. Para uma primeira extração, foram acrescentados 700 μ L de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico, 24:1, v/v) e o tubo foi invertido durante 5 minutos. Em seguida, cada amostra foi centrifugada a 10000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi recolhido. Foram acrescentados 50 μ L de uma solução de 10% de CTAB e NaCl 1,4 M e o tubo foi invertido durante 5 minutos, repetindo-se o processo de extração com CIA por três vezes. O sobrenadante foi recolhido, foram acrescentados 400 μ L de etanol absoluto frio (-20 °C) e foi feita a incubação a -20 °C durante 30 minutos. Após a incubação, cada amostra foi centrifugada a 10000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet*, quando formado, foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol (70%). Foram adicionados ao *pellet* 500 μ L de uma solução NaCl 1 M e foi feita a incubação a 60°C durante 10 minutos. A seguir, foi feita nova incubação a 4 °C durante 60 minutos e, após a incubação, centrifugação a 15000 rpm durante 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Foram adicionados ao *pellet*, quando formado, 350 μ l de etanol absoluto. O *pellet* foi lavado uma vez com 1 mL de etanol (95%) e foi seco a temperatura ambiente. O *pellet* foi ressuspensão em 100 μ L de TE (TRIS 10 mM e EDTA 1 mM), com 10 μ g/mL de DNase, e foi feita a incubação a 35 °C durante 2 a 12 horas para digestão do DNA e obtenção do RNA total para a síntese do cDNA.

Por fim, a metodologia de extração número 3 foi realizada com o kit de extração 'RNeasy Plant Mini Kit' (Qiagen, Estados Unidos), seguindo as recomendações do fabricante.

Após a extração do RNA, foi feita a síntese do cDNA, conforme metodologia descrita por Fajardo *et al.* (2000). Primeiramente, foram colocados em um tubo *eppendorf* 5 µL de RNA total, 4,5 µL de água destilada e 0,5 µL do *primer* complementar utilizado, aquecendo a 80-90 °C durante 2 minutos. Para o GVB, foi utilizado o *primer* complementar GVB7038 (5' ACTCGTCAGACAACTCTATATC 3') e para o GLRaV-3 o *primer* complementar C547 (5' ATTAACCTTGACGGATGGCACGC 3'). A seguir, foi aguardado o resfriamento da amostra a temperatura ambiente durante 3 minutos. Após o resfriamento, foram adicionados 15 µL do MIX para cDNA (5 µL de tampão da transcriptase reversa 5x, 1 µL de dNTPs (2,5 µM), 1 µL de RNase (40 U/µL), 1 µL de transcriptase reversa M-MLV (200 U/µL), 2,5 µL de DTT e 4,5 µL de água destilada). Em seguida, a amostra foi incubada a 37 °C durante 1 hora.

O desenvolvimento da PCR foi feito conforme metodologia descrita por Fajardo *et al.* (2000). Primeiramente, o MIX da PCR foi preparado, com 27 µL de água destilada, 5 µL de dNTPs (2,5 µM), 5 µL de tampão da Taq polimerase, 0,5 µL de Taq polimerase (5 U/µL), 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µL do *primer* complementar utilizado e 0,5 µL do *primer* viral (homólogo) utilizado. Para o GVB, foram utilizados o *primer* complementar GVB7038 (5' ACTCGTCAGACAACTCTATATC 3') e o *primer* viral GVB6445 (5' ATGGAAAATATATCCCGGATGG 3') e para o GLRaV-3 foram utilizados o *primer* complementar C547 (5' ATTAACCTTGACGGATGGCACGC 3') e o *primer* viral H229 (5' ATAAGCATTCGGGATGGACC 3'). Em seguida, foram adicionados 40 µL do MIX a 10 µL do cDNA produzido e a amostra foi colocada no termociclador para amplificação (aquecimento a 94 °C por 5 minutos e 35 ciclos de amplificação compostos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, pareamento a 48 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, e com uma extensão final a 72 °C por 7 minutos).

O produto da amplificação foi analisado em gel de agarose, feito com 1,5% de agarose e tampão TBE 5x, pH 8,0 (TRIS-HCl 451 mM, ácido bórico 450 mM e EDTA 10 mM) diluído antes do uso para 1x. Para a eletroforese, foram usados, em orifícios separados, 20 µL de cada amostra e 8 µL do marcador de tamanho “1 Kb Plus DNA Ladder” (Invitrogen, Estados Unidos) e tampão de corrida suficiente para a cuba utilizada (tampão TBE 1x, pH 8,0). Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídeo, agitando por 10 minutos. Por fim, foi feita a visualização dos resultados com uso de luz ultravioleta.

4.3 Resultados e Discussão

Com a utilização do teste de ELISA, o vírus do enrolamento das folhas associado-3 foi detectado em apenas uma amostra coletada na região do Vale do Rio Itajaí (Tabela 1) e uma amostra coletada na região do Vale do Rio do Peixe (Tabela 3), o que corresponde a 9,1% e 3,8% de incidência média, respectivamente, nas amostras coletadas nessas regiões. No caso das amostras coletadas na região Serrana (Tabela 2), o GLRaV-3 foi detectado em 16 amostras, todas da variedade Cabernet Sauvignon, o que corresponde a 47,1% de incidência média nas amostras dessa região. Esse vírus não foi detectado em nenhuma amostra do porta-enxerto VR-043-43 e das variedades produtoras Chardonnay e Bordô (Tabelas 1 a 4). Segundo o valor calculado no teste χ^2 (19,29489) e o valor χ^2 tabelado (para 3 graus de liberdade), as diferenças de incidência do vírus GLRaV-3 verificadas entre as regiões amostradas são significativas ao nível de 5% de probabilidade. Os valores observados nas duas primeiras regiões (Tabelas 1 e 3) foram inferiores aos verificados por Fajardo *et al.* (2002), que detectaram o GLRaV-3 em 14,7% das amostras oriundas da Serra Gaúcha (RS) e do Vale do São Francisco (PE e BA), e aos verificados por Villa & Regina (2002), que detectaram esse vírus em 15,8% das amostras oriundas da região de Caldas (MG). Os valores

observados na região Serrana (Tabela 2), por sua vez, são superiores aos verificados por esses autores e semelhantes aos obtidos por Digiario *et al.* (2000), que detectaram esse vírus em 56,2% das amostras coletadas no sul da Itália, e aos obtidos por Mahfoudhi *et al.* (1998), que o detectaram em 41,3% das amostras, neste caso provenientes apenas de plantas-matrizes, coletadas na Tunísia.

Tabela 1. Incidência do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos da videira em amostras de plantas doadoras de propágulos, coletadas na região do Vale do Rio Itajaí, Estado de Santa Catarina, de acordo com o teste de ELISA.

Variedades	Enrolamento das folhas associado-3			Intumescimento dos ramos da videira		
	Número de amostras coletadas	Número de amostras infectadas	Percentagem de amostras infectadas	Número de amostras coletadas	Número de amostras infectadas	Percentagem de amostras infectadas
Paulsen 1103	05	01	20,0	05	00	0,0
Bordô	03	00	0,0	03	00	0,0
Niágara Branca	03	00	0,0	03	00	0,0
MÉDIA (%)			9,1			0,0

Tabela 2. Incidência do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos da videira em amostras de plantas doadoras de propágulos, coletadas na região Serrana, Estado de Santa Catarina, de acordo com o teste de ELISA. Florianópolis, 2003.

Variedades	Enrolamento das folhas associado-3			Intumescimento dos ramos da videira		
	Número de amostras coletadas	Número de amostras infectadas	Percentagem de amostras infectadas	Número de amostras coletadas	Número de amostras infectadas	Percentagem de amostras infectadas
Cabernet Sauvignon	30	16	53,3	30	05	16,7
Chardonnay	04	00	0,0	04	01	25,0
MÉDIA (%)			47,1			17,6

Tabela 3. Incidência do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos da videira em amostras de plantas doadoras de propágulos, coletadas na região do Vale do Rio do Peixe, Estado de Santa Catarina, de acordo com o teste de ELISA. Florianópolis, 2003.

Variedades	Enrolamento das folhas associado-3			Intumescimento dos ramos da videira		
	Número de amostras coletadas	Número de amostras infectadas	Percentagem de amostras infectadas	Número de amostras coletadas	Número de amostras infectadas	Percentagem de amostras infectadas
Paulsen 1103	03	00	0,0	03	00	0,0
VR-043-43	06	00	0,0	06	01	16,7
Bordô	03	00	0,0	03	02	66,7
Niágara Branca	06	01	16,7	06	00	0,0
Cabernet Sauvignon	05	00	0,0	05	00	0,0
Chardonnay	03	00	0,0	03	00	0,0
MÉDIA (%)			3,8			11,5

Tabela 4. Incidência do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos da videira em amostras de plantas doadoras de propágulos, coletadas no Centro de Ciências Agrárias da UFSC, de acordo com o teste de ELISA. Florianópolis, 2003.

Variedades	Enrolamento das folhas associado-3			Intumescimento dos ramos da videira		
	Número de amostras coletadas	Número de amostras infectadas	Porcentagem de amostras infectadas	Número de amostras coletadas	Número de amostras infectadas	Porcentagem de amostras infectadas
Paulsen 1103	02	00	0,0	02	00	0,0
VR-043-43	03	00	0,0	03	00	0,0
Bordô	04	00	0,0	04	00	0,0
Niágara Branca	01	00	0,0	01	00	0,0
Cabernet Sauvignon	05	00	0,0	05	00	0,0
Chardonnay	02	00	0,0	02	00	0,0
MÉDIA (%)			0,0			0,0

Ao se considerar que as amostras utilizadas no presente estudo foram obtidas somente a partir de plantas doadoras de propágulos e não de plantas localizadas em vinhedos para produção de uva, a simples constatação da presença do vírus GLRaV-3, independentemente da frequência em que foi detectado nas diferentes regiões amostradas, é preocupante, haja vista que essas plantas são utilizadas por muitos produtores como fonte de material propagativo. A alta incidência da virose do enrolamento das folhas associado-3 observada nas amostras da variedade Cabernet Sauvignon coletadas na região Serrana (Tabela 2) é alarmante, considerando que essa é uma das variedades preferidas para a elaboração de vinhos finos em Santa Catarina. Desta forma, a utilização das plantas infectadas com o GLRaV-3 como fonte de propágulos para produção de mudas pode estar auxiliando para uma rápida disseminação da virose pelo Estado de Santa Catarina. Essa situação é ainda mais grave em relação aos porta-enxertos e às variedades americanas e híbridas, pois Kuhn (1989b) considera que a ausência de sintomas do enrolamento das folhas associado-3, observada nestes casos, acaba facilitando a difusão da doença pelas regiões produtoras, tendo em vista a intensa troca de material de propagação entre regiões e países. Com a continuidade de disseminação do GLRaV-3 pode-se, em poucos anos, chegar a índices de contaminação como os verificados na região de Missouri (Estados Unidos) por Milkus & Goodman (1999) e Kovacs *et al.* (2001), que constataram a presença do enrolamento das folhas associado-3 em

até 100% e 97%, respectivamente, de amostras coletadas de variedades americanas e híbridas provenientes de alguns vinhedos daquela região.

Ainda com a utilização do teste de ELISA, o vírus do intumescimento dos ramos da videira foi detectado em sete amostras coletadas na região Serrana (Tabela 2) e em três amostras da região do Vale do Rio do Peixe (Tabela 3), o que corresponde a 20,6% e 11,5% de incidência média, respectivamente, nas amostras coletadas nessas regiões, não tendo sido detectado em nenhuma amostra coletada na região do Vale do Rio Itajaí (Tabela 1). Esse vírus não foi detectado em nenhuma amostra do porta-enxerto Paulsen 1103 e da variedade produtora Niágara Branca (Tabelas 1, 3 e 4). Entretanto, segundo o valor calculado no teste χ^2 (4,61904) e o χ^2 tabelado (para 3 graus de liberdade), as diferenças de incidência do vírus GVB verificadas entre as regiões amostradas não são significativas ao nível de 5% de probabilidade, o que não permite afirmar que existam realmente diferenças de incidência entre essas regiões. Os valores obtidos nas regiões Serrana (Tabela 2) e do Vale do Rio do Peixe (Tabela 3) foram muito superiores aos observados por Mahfoudhi *et al.* (1998), que detectaram esse vírus em 0,6% das amostras provenientes de plantas-matrizes da Tunísia. A ausência de detecção desse vírus, tal como ocorreu com as amostras coletadas da região do Vale do Rio Itajaí (Tabela 1), também foi verificada por Villa & Regina (2002) com amostras coletadas na região de Caldas (MG).

Mais uma vez, a simples constatação da presença do intumescimento dos ramos da videira em algumas amostras coletadas também é preocupante, considerando que essas amostras são oriundas de plantas utilizadas como fonte de propágulos para produção de mudas, utilizadas por diversos produtores catarinenses. Na região Serrana, cinco das amostras infectadas foram da variedade Cabernet Sauvignon (Tabela 2), uma das mais utilizadas por produtores catarinenses na elaboração de vinhos finos, com algumas delas apresentando

também o enrolamento das folhas associado-3. Na região do Vale do Rio do Peixe, em apenas uma amostra coletada da variedade Bordô não se detectou o GVB (Tabela 3), o que pode estar auxiliando na sua rápida disseminação em vinhedos dessa variedade pelo uso das plantas infectadas na produção de mudas. Assim, a continuidade da produção de mudas a partir das plantas infectadas poderá rapidamente disseminar a virose do intumescimento dos ramos da videira por Santa Catarina, alcançando índices de contaminação acima de 60%, como verificado por Nickel *et al.* (2002) em alguns vinhedos do Rio Grande do Sul. Isso poderá causar o definhamento de vinhedos inteiros, tal como ocorreu com vinhedos da variedade Cabernet Sauvignon antes dos dez anos de idade no Rio Grande do Sul, fato mencionado por Kuhn (1999).

A ausência de detecção de um dos vírus causadores das viroses diagnosticadas neste estudo em algumas variedades, sobretudo nas amostras coletadas em plantas doadoras de propágulos mantidas no Centro de Ciências Agrárias da UFSC (Tabela 4), pode ser explicada porque muitas das plantas amostradas foram introduzidas a partir de 1996 de diferentes instituições de pesquisa do exterior (caso específico das plantas amostradas do Centro de Ciências Agrárias), passaram por termoterapia ou foram obtidas pela micropropagação de segmentos caulinares, já sendo esperado seu bom estado fitossanitário. Em outros casos, a inexistência ou a inobservância de uma rigorosa seleção sanitária, diferenças entre as variedades amostradas, a presença de vetores das doenças ou diferenças na agressividade das estirpes dos vírus pode ter sido a causa da maior incidência das viroses em determinadas regiões amostradas.

Entretanto, em algumas amostras em que não se constatou a presença de nenhum dos dois vírus pelo teste de ELISA, havia sintomas de viroses nas plantas que foram fontes dessas amostras. Nesse caso, a reação negativa obtida no teste de ELISA pode ser atribuída, entre

outras razões, à baixa concentração do vírus no tecido ou à sensibilidade insuficiente do teste de ELISA (BELLI *et al.*, 1994). Na detecção de diferentes vírus causadores do enrolamento das folhas, Monis & Bestwick (1996) verificaram a necessidade de maior tempo de incubação do substrato para obtenção de maiores valores de leitura na leitora de placas. Portanto, pode haver a necessidade de modificar a metodologia de detecção de ambos os vírus pelo teste de ELISA aumentando o tempo de incubação das placas de microtitulação.

Kovacs *et al.* (2001) também obtiveram resultados inconsistentes ao detectar o GLRaV-3 por ELISA em anos diferentes, com amostras coletadas nas mesmas plantas do ano anterior, enquanto Credi & Giunchedi (1996) não se surpreenderam com a ausência de reações positivas ao detectar o GLRaV-3 em alguns extratos de plantas afetadas pelo enrolamento das folhas, pois partículas de outros vírus do gênero *Closterovirus* poderiam estar envolvidas nos sintomas apresentados por essas plantas. Isso pode ser um indicativo da presença de outras viroses que apresentam sintomas semelhantes aos das viroses diagnosticadas neste estudo nas plantas amostradas. Ressalte-se que, com relação ao enrolamento das folhas, são conhecidos atualmente pelo menos oito vírus (GLRaV -1 a -8) sorologicamente distintos que causam sintomas semelhantes nas plantas (KARASEV, 2000).

Não se pode deixar de considerar que a técnica de DAS-ELISA possui alta especificidade e, desta forma, estirpes de um mesmo vírus podem não ser detectadas por determinado anticorpo, ao contrário de métodos indiretos do teste de ELISA (ALMEIDA, 1995). Assim, talvez seja recomendável utilizar um método de ELISA indireto para a detecção do GLRaV-3, tal qual foi utilizado para a detecção do GVB. Mas aqui convém frisar que o método indireto encontra na sua menor sensibilidade em relação ao DAS-ELISA (GARNSEY & CAMBRA, 1993) uma limitação.

No teste de ELISA o tipo de anticorpo usado também pode influenciar a efetividade do teste. A utilização de anticorpos policlonais no teste pode complicar a caracterização de infecções virais por causa de reações com as proteínas da planta hospedeira e da ocorrência de infecções virais múltiplas ainda não caracterizadas (MONIS & BESTWICK, 1997). Neste sentido, Ling *et al.* (2000) conseguiram os melhores resultados na detecção do GLRaV-3 por DAS-ELISA ao utilizarem um anticorpo policlonal para captura do antígeno e um anticorpo monoclonal como anticorpo conjugado. Neste trabalho, foram utilizados anticorpos policlonais para a detecção do GLRaV-3 por DAS-ELISA. A utilização de anticorpos monoclonais talvez possa proporcionar a detecção desse vírus num maior número de amostras, sobretudo naquelas coletadas em plantas sintomáticas, pois segundo Hu *et al.* (1990) o desenvolvimento de anticorpos monoclonais específicos para o GLRaV-3 tem favorecido o aumento da confiabilidade e da efetividade da detecção do vírus por DAS-ELISA.

Para muitos patógenos virais de plantas com genomas de RNA, a técnica de RT-PCR provou ser muito mais efetiva quando comparada com as metodologias usadas para o teste de ELISA, especialmente em situações em que o vírus está presente em baixa concentração ou anticorpos de boa qualidade não estão disponíveis (MACKENZIE *et al.*, 1997).

Contudo, na detecção dos dois vírus pela técnica de RT-PCR, os resultados não foram consistentes, não sendo possível a visualização de nenhum produto da PCR (Figura 1) ou, em outros casos, havendo a visualização de bandas inespecíficas (Figura 2), de tamanhos diferentes dos esperados (de 340 pares de bases, no caso do GLRaV-3, e de 594 pares de bases, no caso do GVB), resultados que podem indicar a ocorrência de degradação do RNA viral durante o transporte ou armazenagem de tecidos ou extratos vegetais (NASSUTH *et al.*,

2000). Para se evitar amplificações inespecíficas, pode ser necessário aumento da temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos (EIRAS *et al.*, 1998).

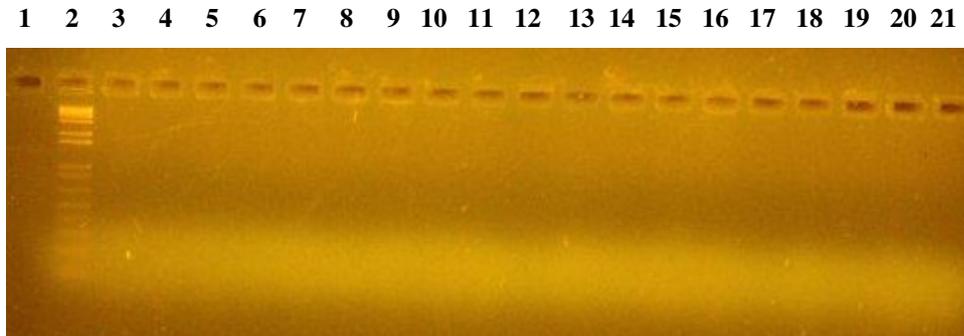


Figura 1. Visualização de detalhe de gel produzido na detecção do vírus do enrolamento das folhas associado-3 em amostras de videira (*Vitis* spp) por RT-PCR. Observe-se, à esquerda, no orifício número 2, os tamanhos de banda correspondentes ao marcador utilizado e, nos demais orifícios, a ausência de amplificação de bandas a partir das amostras coletadas.

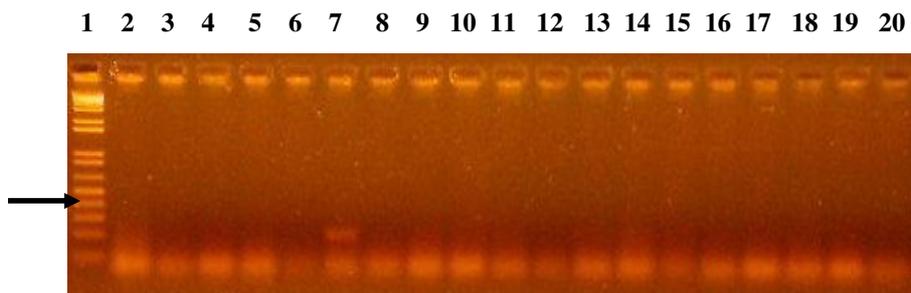


Figura 2. Visualização de detalhe de gel produzido na detecção do vírus do intumescimento dos ramos da videira em amostras de videira (*Vitis* spp) por RT-PCR. Observe-se, à esquerda, no orifício número 1, os tamanhos de banda correspondentes ao marcador utilizado e, nos demais orifícios, a presença de bandas inespecíficas, de tamanhos diferentes do esperado (594 pares de bases), o qual é indicado pela seta.

Além disso, pode ter havido falha na extração do RNA viral pela interferência de componentes do tecido vegetal, que inibem a extração do RNA viral (REZAIAN & KRAKE, 1987), ou inibem a atividade das enzimas transcriptase reversa M-MLV ou Taq polimerase (NASSUTH *et al.*, 2000). De modo semelhante, Ling *et al.* (2001) inicialmente obtiveram resultados inconsistentes na realização de RT-PCR para detecção do GLRaV-3, obtendo melhores resultados somente após uma segunda amplificação por PCR.

Mackenzie *et al.* (1997) utilizaram uma metodologia de extração baseada no uso do kit de extração 'RNeasy Plant Mini Kit' (Qiagen, Estados Unidos), o mesmo utilizado neste trabalho, que mitigou os efeitos de compostos fenólicos e outras substâncias inibitórias, evitando o uso de solventes orgânicos e fenol, e que foi extremamente rápida. Além disso, ao utilizar a metodologia de extração de RNA de Rowhani *et al.* (1993), com pequenas modificações, também testada neste trabalho, Fajardo *et al.* (2002) obtiveram sucesso na realização da reação de PCR, pois conseguiram preparações de RNA total de videira de boa qualidade, ausentes de compostos oxidados. Assim, uma modificação das metodologias de extração de RNA aqui adotadas, da mesma forma que realizada por esses autores, pode auxiliar a superar problemas encontrados na extração de RNA das amostras para melhorar a detecção de vírus da videira pela técnica de RT-PCR.

Uma técnica de RT-PCR modificada em que o RNA viral é preparado diretamente a partir de partículas virais capturadas por anticorpos, chamada (IC)-RT-PCR, também foi uma alternativa descrita para tentar minimizar os efeitos dos inibidores da PCR (MINAFRA & HADIDI, 1994). Acheche *et al.* (1999) conseguiram melhores resultados com a técnica de (IC)-RT-PCR do que sem a utilização da imunocaptura, mas, ao detectar o GLRaV-3 em vetores, obtiveram a amplificação de bandas inespecíficas, enquanto Nassuth *et al.* (2000) encontraram problemas ao utilizar a (IC)-RT-PCR para detecção de vírus da videira, o que indica que a imunocaptura é um procedimento que também necessita de uma otimização para possibilitar aumento da efetividade da técnica de RT-PCR na detecção de vírus da videira.

Além disso, a eficiência e especificidade da PCR são determinadas por muitos fatores, como: perfil térmico das reações (temperatura e períodos de incubação); concentração de magnésio; qualidade do molde viral e sua concentração; composição e pH do tampão da PCR; concentração de dNTPs; presença de inibidores ou contaminantes; escolha das enzimas;

primers utilizados e sua concentração (NEWTON & GRAHAM, 1997), parâmetros que devem ser otimizados.

Existem casos em que metodologias utilizadas na execução do teste de ELISA podem não disponibilizar a especificidade requerida na detecção de viroses da videira, principalmente quando o que se está buscando é uma padronização e uma normatização do setor de produção de mudas, trocas de germoplasma, importação e exportação de mudas, como o que está ocorrendo no Estado de Santa Catarina. Assim, a utilização de técnicas moleculares ainda pode ser indispensável para diagnoses mais acuradas.

Nesse sentido, para Fajardo *et al.* (2002), a PCR, associada a testes sorológicos (ELISA), viabiliza a indexação de matrizes ou material propagativo básico de videira, justamente por não sofrer muitas das limitações normalmente impostas aos testes sorológicos.

Entretanto, na RT-PCR, procedimentos de extração mais longos e mais complicados podem levar à contaminação, e os reagentes utilizados, tanto quanto a natureza complicada dessa técnica torna-a mais cara para uso na detecção de um único vírus do que o teste de ELISA comumente usado (NASSUTH *et al.*, 2000). Além disso, o custo da PCR em termos de extração de enzimas é ainda muito alto comparado ao teste de ELISA, e como muitos vírus de plantas têm genomas constituídos de RNA, ainda há o custo adicional da transcriptase reversa requerida para síntese do cDNA que serve como molde para a reação de PCR (MARTIN *et al.*, 2000). Desta forma, protocolos mais baratos para extração de DNA e/ou RNA de tecidos vegetais são necessários para aplicação prática das técnicas moleculares em diagnósticos de laboratório. Assim, a capacidade do teste de ELISA para utilização em grande número de amostras tem feito com que várias técnicas moleculares estejam sendo modificadas para um formato semelhante ao seu (MARTIN *et al.*, 2000).

Os resultados verificados na detecção dos vírus GLRaV-3 e GVB pelas técnicas de ELISA e RT-PCR indicam a necessidade de otimização de protocolos para a utilização dessas técnicas de forma confiável na detecção de vírus da videira, sobretudo nas plantas que estão sendo utilizadas como doadoras de propágulos para produção de mudas. Além disso, considerando o maior custo da RT-PCR, mas também sua maior sensibilidade, pode ser aconselhável o uso do teste de ELISA para um grande número de amostras e da RT-PCR quando os resultados com o teste de ELISA não forem conclusivos ou naqueles testes negativos por ELISA. Assim, a RT-PCR poderia ser um teste complementar ao teste de ELISA, sem necessariamente substituí-lo.

A alta incidência ou o aumento da incidência do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos da videira nas regiões vitivinícolas de Santa Catarina poderão prejudicar sensivelmente o objetivo das indústrias vinícolas, que é a utilização de uvas de alta qualidade para elaboração de vinhos finos.

Existe a possibilidade de ocorrência de outras viroses nas plantas amostradas, não diagnosticadas neste estudo. É fundamental a eliminação das plantas infectadas pelos vírus do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos da videira e a diagnose imediata de outras viroses nas plantas atualmente consideradas isentas de viroses antes que elas continuem a ser usadas como fonte de material de propagação por vários produtores de Santa Catarina.

4.4 Conclusões

As viroses do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos encontram-se presentes em variedades de plantas doadoras de propágulos de videira (*Vitis* spp) existentes em Santa Catarina, tendo sido diagnosticadas pelo teste de ELISA.

Nas amostras coletadas de plantas doadoras de propágulos do porta-enxerto VR-043-43 e das variedades produtoras Chardonnay e Bordô não foi detectado o vírus do enrolamento das folhas associado-3 pelo teste de ELISA.

Nas amostras coletadas de plantas-matrizes do porta-enxerto Paulsen 1103 e da variedade produtora Niágara Branca não foi detectado o vírus do intumescimento dos ramos da videira pelo teste de ELISA.

As plantas doadoras de propágulos das variedades amostradas mantidas no Centro de Ciências Agrárias da UFSC encontram-se livres das viroses do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos da videira, de acordo com os resultados obtidos no teste de ELISA.

Com a utilização da técnica de RT-PCR não foi possível a detecção dos vírus do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos da videira.

Os resultados obtidos neste estudo indicam a necessidade de otimização dos protocolos utilizados no teste de ELISA e na técnica de RT-PCR para sua utilização na detecção dos vírus do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos da videira, visando à produção de mudas isentas de viroses a partir das plantas testadas.

É fundamental a eliminação das plantas doadoras de propágulos infectadas pelos vírus do enrolamento das folhas da videira e do intumescimento dos ramos da videira e a diagnose imediata de outras viroses da videira naquelas plantas atualmente consideradas livres de viroses para continuidade de utilização dessas plantas como fonte de material de propagação.

5 COMPARAÇÃO ENTRE TIPOS DE AMOSTRAS USADAS NAS TÉCNICAS DE ELISA E DE RT-PCR PARA DETECÇÃO DOS VÍRUS DO ENROLAMENTO DAS FOLHAS ASSOCIADO-3 E DO INTUMESCIMENTO DOS RAMOS DA VIDEIRA EM PLANTAS DOADORAS DE PROPÁGULOS DE SANTA CATARINA

5.1 Introdução

A videira é a espécie lenhosa que contém o maior número de viroses (WALTER & MARTELLI, 1997), mas problemas ainda são encontrados na detecção de alguns vírus causadores dessas viroses. No caso do vírus do enrolamento das folhas associado-3, isso pode ocorrer parcialmente devido à distribuição irregular e à baixa concentração do vírus no tecido da videira (MONIS & BESTWICK, 1996), à possível ocorrência de variantes sorológicos naturais do vírus e à existência de compostos fenólicos no tecido da videira, que podem interferir nos testes (ACHECHE *et al.*, 1999).

A efetividade do teste de ELISA pode ser afetada pela distribuição errática e a baixa concentração dos vírus nos tecidos hospedeiros (NOTTE *et al.*, 1997), pelo tipo de tecido sendo testado (folha, pecíolo, raiz, etc.) e pela época do ano em que as amostras são coletadas (ROWHANI & GOLINO, 1995). Desta forma, uma amostragem mal realizada pode levar a falsos resultados negativos (SOUSA, 1998).

Com relação à RT-PCR, os tecidos vegetais variam na facilidade com que o ácido nucléico viral pode ser liberado e na presença de fatores inibitórios. A natureza da parede celular, a presença de polissacarídeos e metabólitos secundários reativos, o tipo de tecido infectado e o tipo de infecção viral podem ter um efeito nos resultados obtidos (THOMSON & DIETZGEN, 1995). Atualmente, sabe-se que a videira contém compostos que inibem as reações enzimáticas nos ácidos nucléicos extraídos (REZAIAN & KRAKE, 1987).

Maiores concentrações do vírus do enrolamento das folhas associado-3 são verificadas próximo à base da planta (MONIS & BESTWICK, 1996). Estes autores consideram que pecíolos e sarmentos maduros coletados na base das plantas são amostras igualmente confiáveis para detecção do vírus pelo teste de ELISA.

Rowhani *et al.* (1997) usaram folhas maduras e sarmentos coletados no período vegetativo das plantas na detecção do vírus do enrolamento das folhas associado-3 por ELISA e RT-PCR em plantas de diferentes variedades coletadas nos Estados Unidos, enquanto Kovacs *et al.* (2001) usaram sarmentos coletados na época de dormência das plantas para detecção desse vírus por ELISA em variedades americanas, nos Estados Unidos. Na execução da técnica de RT-PCR, Nickel *et al.* (2002) utilizaram folhas maduras para detecção do vírus do intumescimento dos ramos da videira no Brasil. Além disso, as “Normas e padrões para produção e comercialização de plantas-matrizes e mudas de videira (*Vitis* spp) no Estado de Santa Catarina” determinam que as amostras utilizadas na execução de testes sorológicos e moleculares para detecção de vírus da videira deverão ser coletadas no período de crescimento vegetativo (folhas) e de dormência (sarmentos) das plantas (SANTA CATARINA, 2002).

Desta forma, este estudo objetivou comparar a utilização de amostras constituídas de folhas, coletadas no final do período vegetativo das plantas, e de sarmentos, coletados durante o período de dormência das plantas, nas técnicas de ELISA e de RT-PCR, para detecção dos vírus causadores do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos da videira em diferentes variedades de plantas doadoras de propágulos de porta-enxertos e variedades produtoras existentes no Estado de Santa Catarina.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Material vegetal

O material vegetal utilizado foi o mesmo descrito no item 4.2.1. Os resultados obtidos na execução das técnicas de ELISA e RT-PCR quando da condução do estudo descrito no capítulo 4, mas relacionados ao objetivo deste estudo, foram utilizados para as discussões e conclusões apresentadas no presente capítulo.

5.2.2. Estimativa da suficiência amostral

Para cálculo da suficiência amostral, foi utilizada a fórmula descrita no item 4.2.2.

Considerando os valores de incidência média obtidos para cada virose de acordo com cada tipo de amostra utilizada, e considerando $\alpha = 0,05$ e $\hat{a} = 0,20$, verificamos através dos cálculos acima que o mínimo de amostras a serem coletadas seria de 356, logo, o número de amostras coletadas (88) teria sido insuficiente. Entretanto, deve-se considerar que: este estudo foi realizado apenas com plantas usadas como fonte de propágulos existentes no Estado; existem apenas quatro produtores de mudas de videira em Santa Catarina atualmente registrados na CIDASC (nenhum das variedades produtoras Cabernet Sauvignon e Chardonnay e dos porta-enxertos Paulsen 1103 e VR-043-43); no Centro de Ciências Agrárias foram coletadas amostras de todas as plantas existentes daquelas variedades objeto deste trabalho; e a maioria das plantas utilizadas pelos viveiristas são clones de um número muito reduzido de indivíduos e, portanto, a população de plantas a serem amostradas já era naturalmente de tamanho bastante reduzido. Assim, além de amostras daquelas empresas registradas na CIDASC que se dispuseram a fornecer amostras de plantas de seus viveiros, também foram coletadas amostras de outras empresas, públicas e privadas, não registradas

naquele órgão. Desta forma, pode-se afirmar que para execução deste trabalho foram coletadas amostras representativas de quase todas as plantas existentes no Estado que são utilizadas por viveiristas e/ou instituições de pesquisa na obtenção de estacas para produção de mudas de videira, mesmo que estatisticamente isso não possa ser demonstrado.

Utilizando-se a fórmula $n_0 = 1 / E^2$, onde n_0 = tamanho da amostra e E = erro amostral, e considerando o número de amostras coletadas (88), verifica-se que o erro amostral deste estudo foi de 10,66%.

5.2.3 ELISA

5.2.3.1 Detecção do GLRaV-3

A metodologia usada para detecção do GLRaV-3 pelo teste de ELISA está descrita no item 4.2.3.1. A detecção deste vírus nas amostras coletadas foi realizada quando da condução do estudo apresentado no capítulo 4.

5.2.3.2 Detecção do GVB

A metodologia usada para detecção do GVB pelo teste de ELISA está descrita no item 4.2.3.2. A detecção deste vírus nas amostras coletadas foi realizada quando da condução do estudo apresentado no capítulo 4.

5.2.4 RT-PCR

A metodologia usada na execução da técnica de RT-PCR está descrita no item 4.2.4. A detecção do GLRaV-3 e do GVB nas amostras coletadas foi realizada quando da condução do estudo apresentado no capítulo 4.

5.3 Resultados e Discussão

Na detecção do vírus do enrolamento das folhas associado-3 pelo teste de ELISA, resultados discrepantes foram observados de acordo com o tipo de amostra coletada do porta-enxerto Paulsen 1103 e da variedade produtora Cabernet Sauvignon (Tabela 5), o que resultou na detecção desse vírus em 20,5% (18 amostras) do total de amostras das variedades avaliadas, quando foram utilizadas folhas, e em 12,5% (11 amostras) do total de amostras das variedades avaliadas, quando foram utilizados sarmentos (Tabela 5). Em ambas as variedades mencionadas, o vírus foi detectado num maior número de plantas quando se utilizaram amostras foliares para a detecção (detecção em uma planta contra nenhuma planta quando foram utilizados sarmentos, no caso do porta-enxerto Paulsen 1103, e em 16 plantas contra dez, no caso da variedade Cabernet Sauvignon), o que pode indicar que a concentração desse vírus seja maior neste tipo de amostra. Entretanto, segundo os valores calculados no teste χ^2 (1,68966 considerando o total de amostras coletadas; 1,38462 considerando apenas as amostras da variedade Cabernet Sauvignon; e 1,00000 considerando apenas as amostras da variedade de porta-enxerto Paulsen 1103) e o valor de χ^2 tabelado (3,841, para 1 grau de liberdade), as diferenças de incidência do vírus GLRaV-3 verificadas entre os tipos de amostras utilizadas não são significativas ao nível de 5% de probabilidade, o que não permite afirmar neste estudo que existam realmente diferenças entre os tipos de amostras usadas na detecção do vírus GLRaV-3 pelo teste de ELISA. Cumpre frisar que todas as plantas consideradas infectadas com o uso de sarmentos também foram consideradas infectadas quando do uso de folhas para a diagnose. Sabe-se que a existência de compostos fenólicos no tecido da videira pode interferir nos testes (ACHECHE *et al.*, 1999), e, nesse caso, uma possível maior concentração desses compostos nos sarmentos dessas variedades pode ter colaborado nas diferenças observadas. Resultados opostos foram verificados por Ling *et al.*

(2001), que ao comparar a utilização de sarmentos ou folhas na detecção do vírus do enrolamento das folhas associado-3 por ELISA, obtiveram melhores resultados com sarmentos.

Tabela 5. Detecção do vírus do enrolamento das folhas associado-3 pelo teste de ELISA com a utilização de folhas coletadas no final do período vegetativo e de sarmentos coletados durante o período de dormência de plantas doadoras de propágulos provenientes do Estado de Santa Catarina. Florianópolis, 2003.

Variedades	Folhas			Sarmentos		
	Número de amostras coletadas	Número de amostras infectadas	Porcentagem de amostras infectadas	Número de amostras Coletadas	Número de amostras infectadas	Porcentagem de amostras infectadas
Paulsen 1103	10	01	10,0 ^{ns}	10	00	0,0 ^{ns}
VR-043-43	09	00	0,0	09	00	0,0
Bordô	10	00	0,0	10	00	0,0
Niágara Branca	10	01	10,0	10	01	10,0
Cabernet Sauvignon	40	16	40,0 ^{ns}	40	10	25,0 ^{ns}
Chardonnay	09	00	0,0	09	00	0,0
MÉDIA (%)			20,5 ^{ns}			12,5 ^{ns}

^{ns} Médias na mesma linha não diferentes estatisticamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste χ^2

Quando o foco foi a detecção do vírus do intumescimento dos ramos da videira, também foram obtidos resultados diferentes na detecção desse vírus pelo teste de ELISA de acordo com o tipo de amostra utilizada, mas somente nos testes realizados com a variedade Cabernet Sauvignon (Tabela 6), o que resultou na detecção desse vírus em 10,2% (nove plantas) do total de amostras das variedades avaliadas, quando foram utilizadas folhas, e em 4,5% (quatro plantas) do total de amostras das variedades avaliadas, quando foram utilizados sarmentos (Tabela 6). Mais uma vez, a utilização de folhas possibilitou a detecção do vírus em um maior número de amostras e todas as amostras consideradas infectadas com o uso de sarmentos também foram consideradas infectadas quando do uso de folhas. Entretanto, segundo os valores calculados no teste χ^2 (1,92308 considerando o total de amostras coletadas; e 2,66667 considerando apenas as amostras da variedade Cabernet Sauvignon) e o valor de χ^2 tabelado (3,841, para 1 grau de liberdade), as diferenças de incidência do vírus GVB verificadas entre os tipos de amostras utilizadas não são significativas ao nível de 5% de probabilidade, o que não permite afirmar neste estudo que existam realmente diferenças entre

os tipos de amostras usadas na detecção do vírus GVB pelo teste de ELISA. Convém enfatizar que o (PTA-I)-ELISA, usado na detecção do vírus do intumescimento dos ramos da videira por ELISA, é geralmente menos sensível que o DAS-ELISA para uso com extratos vegetais crus e pode não ser efetivo quando a concentração do antígeno na amostra é baixa (GARNSEY & CAMBRA, 1993). Assim, os sarmentos coletados de plantas da variedade Cabernet Sauvignon poderiam estar apresentando concentrações virais abaixo do limite de detecção inerente a essa variante do teste de ELISA.

Tabela 6. Detecção do vírus do intumescimento dos ramos da videira pelo teste de ELISA com a utilização de folhas coletadas no final do período vegetativo e de sarmentos coletados durante o período de dormência de plantas doadoras de propágulos provenientes do Estado de Santa Catarina. Florianópolis, 2003.

Variedades	Folhas			Sarmentos		
	Número de amostras coletadas	Número de amostras infectadas	Porcentagem de amostras infectadas	Número de amostras Coletadas	Número de amostras infectadas	Porcentagem de amostras infectadas
Paulsen 1103	10	00	0,0	10	00	0,0
VR-043-43	09	01	11,1	09	01	11,1
Bordô	10	02	20,0	10	02	20,0
Niágara Branca	10	00	0,0	10	00	0,0
Cabernet Sauvignon	40	05	12,5 ^{ns}	40	01	2,5 ^{ns}
Chardonnay	09	01	11,1	09	00	0,0
MÉDIA (%)			10,2 ^{ns}			4,5 ^{ns}

^{ns} Médias na mesma linha não diferentes estatisticamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste χ^2

Desta forma, os resultados obtidos com a utilização de sarmentos coletados durante o período de dormência mostraram ser menos consistentes na detecção dos dois vírus pelo teste de ELISA, em duas das variedades avaliadas. Ainda que esses resultados não sejam estatisticamente distintos daqueles obtidos com a utilização de amostras foliares coletadas no final do período vegetativo das plantas, eles não corroboram o que recomendam Ling *et al.* (2001), de que a utilização de sarmentos, independente da época de coleta, é uma amostra confiável para detecção do vírus do enrolamento das folhas associado-3. Entretanto, Monis & Bestwick (1996), ao compararem diferentes tipos de amostras, coletadas durante diferentes épocas do ano, na detecção do vírus do enrolamento das folhas associado-3 pelo teste de ELISA, observaram maiores concentrações do vírus naquelas amostras coletadas durante o

período vegetativo das plantas. Isso pode auxiliar na explicação dos resultados obtidos neste estudo, já que os sarmentos aqui utilizados e que proporcionaram resultados menos consistentes na execução do teste de ELISA foram coletados durante o período de dormência das plantas. Da mesma forma, Kovacs *et al.* (2001) usaram sarmentos coletados na época de dormência das plantas para detecção do vírus do enrolamento das folhas associado-3 por ELISA e obtiveram resultados inconsistentes ao repetir este teste num ano seguinte, com o mesmo tipo de amostra. Assim, pode ser aconselhável a coleta de sarmentos também durante o período vegetativo das plantas para possibilitar a obtenção de resultados semelhantes, em números absolutos, aos observados quando do uso de amostras foliares no teste de ELISA.

Em algumas amostras, mesmo coletadas de plantas que demonstravam sintomas de viroses, não se constatou a presença de nenhuma das duas viroses diagnosticadas. Esse resultado pode ser um indicativo da presença de outras viroses que apresentam sintomas semelhantes aos das viroses do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos da videira. Ao menos com relação ao enrolamento das folhas, são conhecidos atualmente pelo menos oito vírus (GLRaV -1 a -8) sorologicamente distintos, que causam sintomas semelhantes nas plantas (KARASEV, 2000). Além disso, a ocorrência de variantes naturais dos vírus pode interferir na realização dos testes (ACHECHE *et al.*, 1999).

Os resultados apresentados neste capítulo referem-se apenas ao teste de ELISA, visto que na realização da RT-PCR não se obteve a detecção dos dois vírus diagnosticados neste trabalho. Na execução desta técnica, houve a amplificação de bandas inespecíficas, de tamanhos diferentes dos esperados, ou de nenhuma banda, independente do tipo de amostra utilizado. De modo semelhante, Ling *et al.* (2001) inicialmente obtiveram resultados inconsistentes na realização de RT-PCR com a utilização de sarmentos coletados na época de dormência e de folhas para detecção do vírus do enrolamento das folhas associado-3, obtendo

melhores resultados somente após uma segunda amplificação por PCR. Desta forma, ainda existe a necessidade de adequação do protocolo utilizado na execução da técnica de RT-PCR, o que foi abordado de maneira mais ampla no Capítulo 4, ao se realizar um estudo preliminar da incidência das duas viroses por diferentes regiões do Estado de Santa Catarina.

5.4 Conclusões

Na detecção do vírus do enrolamento das folhas associado-3 em amostras das variedades Paulsen 1103 e Cabernet Sauvignon, o uso de folhas, coletadas no final do período vegetativo das plantas, mostrou resultados mais consistentes na execução do teste de ELISA, comparado com o uso de sarmentos coletados durante o período de dormência das plantas.

Na detecção do vírus do intumescimento dos ramos da videira em amostras da variedade Cabernet Sauvignon, o uso de folhas, coletadas no final do período vegetativo das plantas, mostrou resultados mais consistentes na execução do teste de ELISA, comparado com o uso de sarmentos coletados durante o período de dormência das plantas.

O uso de amostras foliares, coletadas no final do período vegetativo, e de sarmentos, coletados durante o período de dormência das plantas, não possibilitou a detecção das viroses do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos da videira pela utilização da técnica de RT-PCR.

Os resultados obtidos neste estudo indicam a necessidade de otimização dos protocolos utilizados no teste de ELISA e na técnica de RT-PCR para sua utilização na detecção dos vírus do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos da videira.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A atividade vitivinícola tem, inegavelmente, grande importância para a economia catarinense e vem, paulatinamente, passando por avanços em toda a cadeia produtiva.

Para que esse crescimento, sobretudo de qualidade, possa continuar a ocorrer, é fundamental que se dê atenção à produção de mudas de videira igualmente de qualidade, não só genética, mas também sanitária.

Nesse contexto, o estabelecimento das ‘Normas e padrões para produção e comercialização de plantas-matrizes e mudas de videira (*Vitis* spp) no Estado de Santa Catarina’ pela SDA no final de 2001 mostrou-se como um marco importante na busca da produção de uvas e vinhos de qualidade cada vez melhor.

A detecção de viroses da videira, anteriormente feita somente mediante testes biológicos, ganhou ferramentas essenciais com o advento de técnicas sorológicas e moleculares. Assim, será possível evitar a propagação e a difusão de mudas infectadas pelas regiões produtoras de Santa Catarina; mudas que muitas vezes não demonstram sintomas, mas sofrem influência em sua performance agrônômica e auxiliam na disseminação dos vírus causadores dessas doenças.

Os estudos aqui desenvolvidos demonstraram que duas das viroses da videira com grande incidência mundial, o enrolamento das folhas associado-3 e o intumescimento dos ramos da videira, estão presentes em território catarinense em plantas doadoras de propágulos de diferentes regiões produtoras, em alguns casos de forma preocupante. Os resultados obtidos servem como auxílio para o sistema de certificação de mudas estabelecido pela SDA, permitindo recomendar a necessidade de definição de um programa de seleção clonal, genética e sanitária, para as principais variedades de videira de interesse para Santa Catarina,

para a criação de um banco de germoplasma ou coleção de plantas-matrizes básicas para o fornecimento de material de propagação para viveiristas e produtores das principais variedades.

Além disso, os resultados aqui apresentados mostraram que as metodologias usadas na execução do teste de ELISA e da RT-PCR, técnicas mundialmente utilizadas para diagnose viral, ainda precisam de ajustes, para que se alcance, ao mesmo tempo, maior economia, praticidade, efetividade e confiabilidade na sua execução.

Sendo assim, a pesquisa possui papel de destaque para que continuem a ser desenvolvidas e aperfeiçoadas metodologias cada vez melhores de detecção viral que auxiliarão na obtenção, manutenção e controle de plantas-matrizes básicas, fundamentais para produção de mudas certificadas, que por sua vez possibilitarão que o setor vitivinícola continue sua caminhada rumo à produção de uvas de melhor qualidade e à elaboração de vinhos internacionalmente consumidos e admirados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHECHE, H.; FATTOUCH, S.; M'HIRSI, S.; MARZOUKI, N.; MARRAKCHI, M. Use of optimised PCR methods for the detection of GLRaV-3: a closterovirus associated with grapevine leafroll in Tunisian grapevine plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, Piscataway, v. 17, n. 1, p. 31-42, 1999.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 3 ed. San Diego: Academic Press, 1988. 803 p.

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

BEDENDO, I. P. Vírus. In: BERGAMIN FILHO, A. B.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia**. 3 ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 132-160.

BELLI, G.; FORTUSINI, A.; CASATI, P.; BELLI, L.; BIANCO, P. A.; PRATI, S. Transmission of a grapevine leafroll associated closterovirus by the scale insect *Pulvinaria vitis* L. **Rivista di Patologia Vegetale**, Roma, n. 4, p. 105-108, 1994.

BONAVIA, M.; DIGIARO, M.; BOSCIA, D.; BOARI, A.; BOTTALICO, G.; SAVINO, V.; MARTELLI, G. P. Studies on "corky rugose wood" of grapevine and on the diagnosis of grapevine virus B. **Vitis**, Geneva, v. 35, n. 1, p. 53-58, 1996.

BOSCIA, D.; DIGIARO, M.; FRESNO, J.; GREIF, C.; GRENAN, S.; KASSEMAYER, H. H.; PROTA, V. A.; SEQUEIRA, O. A. de. ELISA for the detection and identification of grapevine viruses. In: WALTER, B. (Ed.). **Sanitary selection of the grapevine: protocols for detection of viruses and virus-like diseases**. Paris: INRA, 1997. p. 129-156.

_____; SAVINO, V.; MINAFRA, A.; NAMBA, S.; ELICIO, V.; CASTELLANO, M. A.; GONSALVES, D.; MARTELLI, G. P. Properties of a filamentous virus isolated from grapevines affected by corky bark. **Archives of Virology**, New York, v. 130, n. 2, p. 109-120, 1993.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Delegacia Federal no Rio Grande do Sul. Serviço de Fiscalização e Fomento da Produção Vegetal. **Importação de mudas de videira no ano 2001**. Porto Alegre: SFFV/DDR/DFA/RS, 2002. 6 p.

BRITO, F. A. de. Uva. In: **Síntese anual da agricultura de Santa Catarina: 2001-2002**. Florianópolis: Instituto Cepa/SC, 2002. p. 87-89.

CABALEIRO, C.; SEGURA, A. Field transmission of grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV-3) by the mealybug *Planococcus citri*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n. 3, p. 283-287, 1997.

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

CAMBRA, M.; GORRIS, M. T.; TERRADA, M. E. Caracterización, diagnóstico y detección serológica de virus. In: LLÁCER, G.; LÓPEZ, M. M.; TRAPERO, A.; BELLO, A. (Ed.). **Patología Vegetal**. 2 ed. Madri: Grupo Mundi-Prensa, 2000, v. 1. p. 207-253.

CANDRESSE, T.; HAMMOND, R. W.; HADIDI, A. Detection and identification of plant viruses and viroids using polymerase chain reaction (PCR). In: HADIDI, A.; KHETARPAL, R. K.; KOGANEZAWA, A. (Ed.). **Plant Virus Disease Control**. St. Paul: APS Press, 1998. p. 399-416.

CARVALHO, M. G. de. **Viroses vegetais e fitovírus**. Viçosa: UFV, 1987. 54 p.

CHAUVET, M.; REYNIER, A. **Manual de viticultura**. 3. ed. Madri: Ediciones Mundi-Prensa, 1984. 279 p.

CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the micro-plate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, Cambridge, v. 34, n. 3, p. 475-483, 1977.

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

_____; GIUNCHEDI, L. Grapevine leafroll-associated viruses and grapevine virus A in selected *Vitis vinifera* cultivars in northern Italy. **Plant Pathology**, Oxford, v. 45, n. 6, p. 1110-1116, 1996.

_____; SILVESTRONI, O.; SANTUCCI, A.; CANOVA, A. Variation in grapevine rootstock susceptibility to the rugose wood disease "legno riccio". **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 30, n. 1, p. 41-46, 1991.

DANIELS, J. Métodos imunológicos utilizados na diagnose de doenças de plantas. In: LUZ, W. C. da. (Ed.). **Revisão anual de patologia de plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 53-72, 1994.

DESPLOBINS, G. **Resistance ou reactivite des producteurs face aux incitations des dispositifs institutionnels**: les viticultures Riograndense et Catarinense du sud-brésilien. 2001. 157f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Centre National d'études Agronomiques des Régions Chaudes, Montpellier.

DIGIARO, M.; SIMEONE, V.; SAVINO, V. Stato sanitario delle varietà ad uva da tavola di recente introduzione in Puglia. **Informatore Fitopatologico**, Roma, v. 50, n. 7-8, p. 54-58, 2000.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, St. Louis, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.

EIRAS, M.; RESENDE, R. de O.; ÁVILA, A. C. de. Detecção de vírus de plantas através de reação em cadeia da polimerase. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 5-11, mar., 1998.

ENGELBRECHT, D. J.; KASDORF, G. G. F. Field spread of corky bark, black, leafroll and shiraz decline diseases and associated viruses in South African grapevines. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 22, p. 347-354, 1990.

EPAGRI. **Normas técnicas para o cultivo da videira em Santa Catarina**. Florianópolis: EPAGRI, 1998. 50 p.

_____. **Frutas de clima temperado**: situação da safra 2001/2002 e previsão da safra 2002/2003. Videira: EPAGRI, 2002. 18 p.

FAJARDO, T. V. M.; KUHN, G. B.; EIRAS, M.; NICKEL, O. Caracterização parcial de um isolado do *Grapevine fanleaf virus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 5, p. 505-511, set.-out., 2000.

_____; KUHN, G. B.; EIRAS, M.; NICKEL, O. Detecção de *Closterovirus* em videira e caracterização parcial de um isolado do *Grapevine leafroll-associated virus 3*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 58-64, jan.-fev., 2002.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

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

_____; PROTA, V. A.; BOSCIA, D.; FIORI, M.; PROTA, U. *Pseudococcus affinis* Mask., new vector of grapevine trichoviruses A and B. **Vitis**, Geneva, v. 34, n. 1, p. 67-68, 1995.

_____; PROTA, V. A.; PIREDÀ, R.; PROTA, U. New observations on corky bark in Sardinia. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 33, n. 2, p. 168-171, 1994.

GARCÍA-ARENAL, F.; GARCÍA, J. A. Estructura y expresión del genoma de los virus de plantas. In: LLÁCER, G.; LÓPEZ, M. M.; TRAPERO, A.; BELLO, A. (Ed.). **Patología Vegetal**. 2 ed. Madrid: Grupo Mundi-Prensa, 2000, v. 1. p. 37-75.

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

GIOVANNINI, E. **Produção de uvas para vinho, suco e mesa**. Porto Alegre: Renascença, 1999. 364 p.: il.

GOLINO, D. A.; SIM, S. T.; ROWHANI, A. Transmission studies of leafroll associated virus and grapevine corky bark associated virus by the obscure mealybug. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 46, n. 3, p. 408, 1995.

HABILI, N.; FAZELI, C. F.; EWART, A.; HAMILTON, R.; CIRAMI, R.; SALDARELLI, P.; MINAFRA, A.; REZAIAN, M. A. Natural spread and molecular analysis of grapevine leafroll-associated virus 3 in Australia. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 6, p. 1418-1422, 1995.

_____; FAZELI, C. F.; REZAIAN, M. A. Identification of a cDNA clone specific to grapevine leafroll-associated virus 1, and occurrence of the virus in Australia. **Plant Pathology**, Oxford, v. 46, n. 3, p. 516-522, 1997.

HERRERA, M. G.; MADARIAGA, V. M. Presencia e incidencia de virus de la vid en la zona central de Chile. **Agricultura Técnica**, Chillán, v. 61, n. 4, p. 393-400, 2001.

HU, J. S.; GONSALVES, D.; TELIZ, D. Characterization of closterovirus-like particles associated with grapevine leafroll disease. **Journal of Phytopathology**, Oxford, v. 128, n. 1, p. 1-14, 1990.

KARASEV, A. V. Genetic diversity and evolution of closteroviruses. **Annual Review of Phytopatology**, St. Paul, v. 38, p. 293-324, 2000.

KITAJIMA, E. W.; ÁVILA, A. C. de; RESENDE, R. O. Taxonomia de vírus de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 5-24, mar., 1997.

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

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

_____. Identificação, incidência e controle do vírus do enrolamento da folha da videira no Estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, n. 3-4, p. 220-226, out.-dez., 1989b.

_____. Intumescimento dos ramos da videira ("corky bark"), doença constatada no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 4, p. 399-406, dez., 1992.

_____. **Vírus do intumescimento dos ramos associado à morte de plantas de cultivares *Vitis vinifera***. Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPUV, 1999. 4 p. Comunicado Técnico, 32.

_____; FAJARDO, T. V. M. Viroses da videira no Brasil. In: EMBRAPA. **Curso de capacitação técnica em viticultura: módulo 3**. Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPUV, 2002. p. 1-6.

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

KUNIYUKI, H. Evidência preliminar de transmissão do enrolamento (vermelhão ao amarelo) de videira em São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, Brasília, v. 5, n. 2, p. 165-166, 1972.

LING, K. S.; ZHU, H. Y.; DRONG, R. F.; SLIGHTOM, J. L.; MCFERSON, J. R.; GONSALVES, D. Nucleotide sequence of the 3'-terminal two-thirds of the grapevine leafroll-associated virus-3 genome reveals a typical monopartite closterovirus. **Journal of General Virology**, Cambridge, v. 79, n. 5, p. 1299-1307, may, 1998.

_____; ZHU, H. Y.; JIANG, Z. Y.; GONSALVES, D. Effective application of DAS-ELISA for detection of grapevine leafroll associated-3 using a polyclonal antiserum developed from recombinant coat protein. **European Journal of Plant Pathology**, Amsterdam, v. 106, n. 4, p. 301-309, 2000.

_____; ZHU, H. Y.; PETROVIC, N.; GONSALVES, D. Comparative effectiveness of ELISA and RT-PCR for detecting grapevine leafroll-associated closterovirus-3 in field samples. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 52, n. 1, p. 21-27, 2001.

MACKENZIE, D. J.; JOHNSON, R. C.; WARNER, C. Incidence of four important viral pathogens in Canadian vineyards. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, n. 5, p. 955-958, 1996.

_____; MCLEAN, M. A.; MUKERJI, S.; GREEN, M. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n. 2, p. 222-226, 1997.

MAHFOUDHI, N.; DIGIARO, M.; SAVINO, V.; TERLIZZI, B. di. Viruses and virus diseases of grapevine in Tunisia. **EPPO Bulletin**, Paris, v. 28, n. 1-2, p. 197-204, 1998.

MARINHO, V. L. de A. Técnicas imunológicas e moleculares no diagnóstico de vírus de plantas. In: LUZ, W. C. da. (Ed.). **Revisão anual de patologia de plantas**, Passo Fundo, v. 9, p. 383-401, 2001.

MARTELLI, G. P. True virus diseases: leafroll. In: MARTELLI, G. P. (Ed.). **Graft-transmissible diseases of grapevines: handbook for detection and diagnosis**. Roma: FAO, 1993a. p. 37-44.

_____. True virus diseases: rugose wood complex. In: MARTELLI, G. P. (Ed.). **Graft-transmissible diseases of grapevines: handbook for detection and diagnosis**. Roma: FAO, 1993b. p. 45-54.

_____. Grapevine virology highlights 1994-1997. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE (ICVG), 12, 1997, Oeiras. **Extended Abstracts**. Oeiras: EAN/ INIA-MDRP, 300 p. p. 5-14.

_____; MINAFRA, A.; SILDARELLI, P. *Vitivirus*, a new genus of plant viruses. **Archives of Virology**, New York, v. 142, n. 9, p. 1929-1932, 1997.

_____; WALTER, B. Virus certification of grapevines. In: HADIDI, A.; KHETARPAL, R. K.; KOGANEZAWA, A. (Ed.). **Plant Virus Disease Control**. St. Paul: APS Press, 1998. p. 261-276.

MARTIN, R. R. Advanced diagnostic tools as an aid to controlling plant virus diseases. In: HADIDI, A.; KHETARPAL, R. K.; KOGANEZAWA, A. (Ed.). **Plant Virus Disease Control**. St. Paul: APS Press, 1998. p. 381-391.

_____; JAMES, D.; LÉVESQUE, C. A. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. **Annual Review of Phytopathology**, St. Paul, v. 38, p. 207-239, 2000.

MILKUS, B. N.; GOODMAN, R. N. A survey of Missouri vineyards for the presence of five grape viruses. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 50, n. 1, p. 133-134, 1999.

MINAFRA, A.; GREIF, C.; ROMERO, J. Molecular tools for the detection of grapevine viruses. In: WALTER, B. (Ed.). **Sanitary selection of the grapevine: protocols for detection of viruses and virus-like diseases**. Paris: INRA, 1997. p. 157-170.

_____; HADIDI, A. Sensitive detection of grapevine virus A, B or leafroll-associated III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 47, n. 1-2, p. 175-187, apr., 1994.

_____; SALDARELLI, P.; GRIECO, F.; MARTELLI, G. P. Nucleotide sequence of the 3' terminal region of the RNA of two filamentous grapevine viruses. **Archives of Virology**, New York, v. 137, n. 2, p. 249-261, 1994.

MONETTE, P. L.; GODKIN, S. E.; JAMES, D. Mechanical transmission of a closterovirus from a *in vitro* shoot tip cultures of a leafroll-affected grapevine to *Nicotiana benthamiana*. **Vitis**, Geneva, v. 29, n. 1, p. 49-55, 1990.

MONIS, J.; BESTWICK, R. K. Detection and localization of grapevine leafroll associated closteroviruses in greenhouse and tissue culture grown plants. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 47, n. 2, p. 199-205, 1996.

_____; _____. Serological detection of grapevine associated closteroviruses in infected grapevine cultivars. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, n. 7, p. 802-808, 1997.

MOUTOUS, G.; HEVIN, M. Transmission expérimentale de la maladie de l' écorce liégeuse de la vigne, "Corky bark", par la cicadelle *Scaphoideus litorallis* Ball (Homoptera: Jassidae). **Agronomie**, Paris, v. 6, n. 4, p. 387-392, 1986.

NASSUTH, A.; POLLARI, E.; HELMECZY, K.; STEWART, S.; KOFALVI, S. A. Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts. **Journal of Virological Methods**, v. 90, n. 1, p. 37-49, 2000.

NEWTON, C. R.; GRAHAM, A. **PCR**. 2 ed. Cheshire: BIOS Scientific Publishers, 1997. 192 p.

NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M.; ARAGÃO, F. J. L.; CHAGAS, C. M.; KUHN, G. B. Detection and coat protein gene characterization of an isolate of grapevine virus B from corky bark-affected grapevines in Southern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 3, p. 279-284, maio-jun., 2002.

NOTTE, P. la; MINAFRA, A.; SALDARELLI, P. A spot-PCR technique for the detection of phloem-limited grapevine viruses. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 66, n. 2, p. 103-108, 1997.

PETERSEN, C. L.; CHARLES, G. Transmission of grapevine leafroll-associated closteroviruses by *Pseudococcus longispinus* and *P. calceolariae*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 46, n. 3, p. 509-515, 1997.

PROTAS, J. F. da S; CAMARGO, U. A.; MELO, L. M. R. de. A viticultura brasileira: realidade e perspectivas. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 1, 2002, Andradas. **Anais. . .** Caldas: EPAMIG-FECD, 2002. 340 p.: il., p. 17-32.

REZAIAN, M. A.; KRAKE, L. R. Nucleic acid extraction and virus detection in grapevine. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 17, n. 3, p. 277-285, 1987.

ROSCIGLIONE, B.; GUGERLI, P. Transmission of grapevine leafroll disease and an associated closterovirus to healthy grapevine by the mealybug *Planococcus ficus* Signoret. In: MEETING ICVG, 9, 1989, Kiryat Anavim. **Proceeding. . .** Kiryat Anavim: ICVG, p. 67-69.

ROWHANI, A.; CHAY, C.; GOLINO, D. A.; FALK, B. W. Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf virus in grapevine tissue. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 5, p. 749-753, 1993.

_____; GOLINO, D. A. ELISA test reveals new information about leafroll disease. **California Agriculture**, Davis, v. 49, n. 1, p. 26-29, jan.-fev., 1995.

_____; UYEMOTO, J. K.; GOLINO, D. A. A comparison between serological and biological assays in detecting grapevine leafroll associated viruses. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n. 5, p. 799-801, 1997.

SANTA CATARINA. Secretaria de Estado do Desenvolvimento Rural e da Agricultura. Portaria n° 008/2002/GABS – SDA, de 5 de abril de 2002. **Diário Oficial – SC**, Florianópolis, 17 maio 2002, n. 16.887, p. 25-29.

SCHUCK, E.; DALBÓ, M. A.; ROSIER, J. P.; DUCROQUET, J.-P. H. J. Porta-enxertos para a cultura da videira. **Jornal da fruta**, Lages, n. 119, 2002, p. 14-15.

SFORZA, R.; KOMAR, V.; GREIF, C. New scale insect vectors of grapevine closteroviruses. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF VIRUS AND VIRUS-LIKE DISEASES OF GRAPEVINE, 13, 2000, Adelaide. **Proceedings. . .** Adelaide: ICVG, 220 p. p. 14-15.

SILVA, A. L. da. Programa de certificação de mudas de videira em Santa Catarina. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 1, 2002, Andradas. **Anais. . .** Caldas: EPAMIG-FECD, 2002. 340 p.: il. p. 215-231.

SOUSA, E. Diagnose das principais viroses da videira. In: Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo, 4, 1998, Évora. **Anais. . .** Évora: UTL, 1998. p. 161-165.

SOUSA, J. S. I. de (Coord.). **Uvas para o Brasil**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1996. v. 1, 791 p.: il.

_____; MARTINS, F. P. **Viticultura Brasileira**. Piracicaba: FEALQ, 2002. v. 9, 368 p.: il.

TANNE, E.; NAVEH, L.; SELA, I. Serological and molecular evidence for the complexity of the leafroll disease of grapevine. **Plant Pathology**, Oxford, v. 38, n.1, p.183-189, 1989.

THOMSON, D.; DIETZGEN, R. G. Detection of DNA and RNA plant viruses by PCR and RT-PCR using a rapid virus release protocol without tissue homogenization. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 54, n. 3, p. 85-95, 1995.

VILLA, F.; REGINA, M. de A. Ocorrência de viroses em clones da cultivar Folha de Figo (*Vitis labrusca* L.) na região de Caldas, MG. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 1, 2002, Andradas. **Anais. . .** Caldas: EPAMIG-FECD, 2002. 340 p.: il. p. 337-340.

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

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

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