

ESTUDOS SOBRE A VIROSE ENROLAMENTO DA FOLHA DA VIDEIRA NO ESTADO DE SÃO PAULO

HUGO KUNIYUKI

Orientador: ALVARO SANTOS COSTA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
~~Setembro, 1978~~

A minha mãe,
à minha esposa e
à memória de meu pai,

D E D I C O

AGRADECIMENTOS

O autor deseja consignar aqui, os seus sinceros agradecimentos:

- ao Dr. Álvaro Santos Costa, orientador, pelo incentivo, discussões, sugestões e críticas estimulantes, durante o desenvolvimento do trabalho e também, pela revisão dos originais;

- aos Professores Darcy M. da Silva, Hasime Tokeshi e Hiroshi Kimati, pelas críticas e sugestões apresentadas na revisão dos originais deste trabalho;

- aos Engenheiros Agrônomos Fernando P. Martins, Fernando M. Pereira, Hêlio J. Scaranari, José R. A. Santos Neto e Wilson C. Ribas, pelo valioso auxílio prestado;

- aos Engenheiros Agrônomos Elliot W. Kitajima e Jorge Vega, pelos exames de material de videira ao microscópio eletrônico;

- ao Engenheiro Agrônomo Yukiharu Suzukawa, pela ajuda prestada;

- aos colegas da Seção de Virologia do Instituto Agronômico de Campinas, principalmente ao Engenheiro Agrônomo Gerd W. Muller, pelo estímulo e sugestões apresentadas na elaboração desta dissertação;

- aos funcionários da Seção de Virologia que, de uma maneira ou outra, contribuíram para a execução deste trabalho;

- ao Instituto Agronômico do Estado de São Paulo, Campinas, pela oportunidade de aperfeiçoamento;

- ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão de bolsa de pesquisa.

ÍNDICE

	Página
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
5. RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DE OBSERVAÇÕES	21
5.1. Importância econômica: avaliação da incidência	21
5.2. Estudos sobre o círculo de hospedeiras	27
5.3. Sintomatologia	30
5.3.1. Descrição de sintomas do enrolamento da folha em campo	30
5.3.2. Avermelhamento ou amarelecimento das folhas de videira associados a outras causas	33
5.4. Videiras indicadoras	35
5.4.1. Comparação de videiras indicadoras quanto à rea- ções ao vírus do enrolamento da folha	35
5.4.2. Comparação de videiras indicadoras mantidas den- tro e fora de estufa	38
5.4.3. Plantio de videiras indicadoras sadias e infe- tadas em um mesmo vaso	39
5.5. Etiologia	40
5.5.1. Perpetuação	41
5.5.2. Transmissibilidade	41
5.5.2.1. Transmissão por união de tecidos	41
5.5.2.2. Tentativas de transmissão por inocula- ção mecânica	45

	Página
5.5.2.3. Transmissão pela semente	46
5.5.2.4. Vetor	46
5.5.3. Tentativas de observação de partículas virais ao microscópio eletrônico	47
5.6. Controle do enrolamento da folha	47
5.6.1. Indexação	48
5.6.2. Termoterapia	48
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÕES	63
8. SUMMARY	64
9. LITERATURA CITADA	66

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 Porcentagem de infecção pelo vírus do enrolamento da folha em amostras das principais variedades de copa cultivadas em São Paulo	23
2 Porcentagem de infecção pelo vírus do enrolamento da folha em amostras de seis variedades de copa, cultivadas em diferentes regiões vitícolas do Estado de São Paulo	25
3 Porcentagem de infecção pelo vírus do enrolamento da folha em amostras de plantas matrizes dos principais porta-enxertos de videira utilizados em São Paulo	26
4 Reação apresentada por plantas de diferentes espécies de <i>Vitis</i> inoculadas com o vírus do enrolamento da folha e resultados dos testes de recuperação	29
5 Comparação de videiras indicadoras quanto às reações ao vírus do enrolamento da folha da videira	37
6 Transmissão do vírus do enrolamento da folha pelo método da dupla-enxertia de gema, utilizando o porta-enxerto IAC 766	42
7 Comparação de quatro métodos de transmissão do vírus do enrolamento da folha por união de tecidos em duas videiras indicadoras	44

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Métodos de união de tecidos utilizados para a transmissão do vírus do enrolamento da folha da videira. A - Enxertia de gema inóculo. B - Enxertia de gema indicadora. C - Dupla-enxertia de gema (seta superior, gema indicadora e seta inferior, gema inóculo). D - Encostia	19
2 Sintomas induzidos pelo vírus do enrolamento da folha em videira. A - Folha da variedade LN-33 com enrolamento dos bordos, aspecto rugoso e avermelhamento das áreas internervais. B - Folha da variedade Sémillon com enrolamento dos bordos, aspecto rugoso e amarelecimento das áreas internervais	31
3 Sintomas associados à deficiência nutricional de magnésio em videira. A - Folha da variedade LN-33 com avermelhamento das áreas internervais. B - Folha da variedade Niagara Rosada com amarelecimento das áreas internervais....	34

1. RESUMO

A ocorrência de uma fitovirose idêntica à "grapevine leafroll" em vinhedos do Estado do São Paulo, anteriormente suspeitada pela observação de sintomas, foi confirmada experimentalmente. A moléstia vem sendo chamada de enrolamento da folha ou ainda, vermelhão ou amarelo. Foi identificada em material de Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina. Em São Paulo, a incidência foi de 100% nas variedades de copa Alphonse Lavallée, Barbera, Bonarda, IAC 138-22, IAC 116-31 (Rainha), Ma legue, Moscatel de Hamburgo, Niagara Branca, Niagara Rosada e Pirovano 87 (Diamante Negro); variou de 40 a 70% nas variedades Couderc, Isabel, Itália (Pirovano 65), Seibel 2 e Seyve Villard 5276. Plantas matrizes de porta-enxertos Golia, Kober 5BB, Rupestris du Lot, 106-8 (Traviú) e 420A mostraram incidência de 25 a 55%; porta-enxertos de criação mais recente (IAC 313 e IAC 766) apresentaram-se isentos do vírus.

Não existem dados experimentais que permitam avaliar as perdas induzidas pelo vírus do enrolamento da folha. Mas, nas observações de campo, foi notado que plantas infetadas eram menos desenvolvidas e menos produtivas do que plantas sem esse vírus.

Os sintomas típicos da moléstia consistem de enrolamento e avermelhamento ou amarelecimento das folhas, dependendo da variedade. Muitas variedades de enxerto e de porta-enxerto cultivadas em São Paulo não apresentam sintomas suficientemente distintivos para a diagnose do enro-

mento da folha, tornando necessário testes de transmissão para videiras indicadoras. Além disso, outros fatores, de natureza diversa, foram reconhecidos como capazes de causar sintomas semelhantes aos da virose.

Comportaram-se satisfatoriamente como indicadoras plantas clonais do híbrido LN-33 e da variedade Pinot Noir e clones novos feitos a partir de plantas de semente de Pinot Noir. A detecção do vírus nas videiras indicadoras foi mais segura, quando a leitura de sintomas foi feita nas folhas maduras dos ramos originados da brotação de primavera seguinte à da enxertia.

Resultados negativos foram obtidos em testes de transmissão do vírus do enrolamento da folha pela semente e por meios mecânicos. É negativa a evidência sobre a existência de um vetor do vírus. Não foi observada ao microscópio eletrônico partícula viral que pudesse ser associada à moléstia. Há, invariavelmente, perpetuação da doença através da multiplicação das plantas infetadas, mediante borbúlia e estaquia, sendo essa a razão da alta incidência do enrolamento da folha em São Paulo.

O enrolamento da folha pode ser eficientemente controlado pelo emprego de material propagativo sadio de copa e de cavalo. Foi possível encontrar clones sadios das variedades Isabel, Seibel 2, Golia, IAC 313, IAC 766, Kober 5BB, Rupestris du Lot, Traviú e 420A. Um clone sadio foi obtido por termoterapia de Niagara Rosada infetada pelo enrolamento da folha. Clones isentos do vírus do enrolamento da folha das variedades Couderc, Itália e Seyve Villard 5276 foram também obtidos, mas encontram-se infetados por outro vírus.

Está sendo organizada coleção de matrizes sadias das variedades de enxerto e de porta-enxerto mais importantes para a viticultura paulista e recomenda-se que um programa de certificação de plantas matrizes e produção de mudas certificadas seja colocado em prática no Estado de São Paulo. Isso seria também de vantagem para outras áreas vitícolas do país.

2. INTRODUÇÃO

A videira (*Vitis* spp.) constitui cultura de considerável importância dentro da produção agrícola de São Paulo. Segundo estimativas feitas para o ano de 1976/77, a cultura ocupou uma área de 8.400 hectares, abrangeu uma população em torno de 41 milhões de videiras e apresentou uma produção total de cerca de 131.000 toneladas de uva; nesse mesmo ano, somente a produção de uvas de mesa atingiu 113.000 toneladas com valor aproximado de 412 milhões de cruzeiro (SÃO PAULO, 1977 a, b). O Estado de São Paulo é o maior centro produtor brasileiro de uvas de mesa, apesar de ser também importante produtor de uvas para vinho.

A viticultura paulista baseia-se no cultivo de variedades americanas e híbridos franceses, embora a cultura de viníferas e híbridos destas, novos e tradicionais, que produzem uvas de finas qualidades, venha se desenvolvendo em ritmo acelerado em numerosos pontos do Estado (SANTOS NETO, 1969; PEREIRA e MARTINS, 1972; RIBAS, 1973).

Para a produção de uvas, tanto para mesa como para vinho, em termos econômicos, torna-se necessário plantas de alta capacidade produtiva e qualitativa, levando o viticultor a demonstrar crescente interesse pelo aprimoramento das técnicas de cultivo e por novas e melhores variedades.

Em São Paulo, muitas variedades de videira não vêm apresentando as características de produtividade e qualidade, que delas se

esperavam, apesar dos inúmeros trabalhos agronômicos aplicados à viticultura. Um dos fatores que mais contribuem para a redução da produtividade é a infecção virótica, principalmente porque a maioria dos atuais vinhedos resulta da multiplicação de materiais propagativos de variedades tradicionais de enxerto e de porta-enxerto, introduzidos há muitos anos do estrangeiro. Além disso, tanto as plantações anteriores como as constituídas por variedades de criação mais recente baseiam-se na utilização de porta-enxertos não testados quanto à sanidade.

Essas afirmativas estão apoiadas em estudos que vêm sendo desenvolvidos pelo autor na Seção de Virologia do Instituto Agronômico, que permitiram comprovar experimentalmente a ocorrência, bastante frequente, de moléstias de vírus nas plantações de São Paulo. Dentre as viroses constatadas, o enrolamento da folha, também conhecido como vermelhão ou amarelo (KUNIYUKI, 1972, 1973), destacou-se pela maior frequência com que tem sido encontrado nos vinhedos, evidenciando ser uma das mais importantes moléstias de vírus dessa planta em São Paulo. O autor considera essa doença como sendo idêntica à induzida pelo "grapevine leafroll virus", presente na maioria dos países vitícolas.

O objetivo do presente trabalho, executado a partir de 1970, foi o de obter elementos que resultassem em melhor conhecimento sobre a moléstia e conseqüentemente, auxiliassem na formulação de medidas de controle.

3. REVISÃO DE LITERATURA

A existência de uma anomalia da videira com sintomas semelhantes aos do enrolamento da folha já era conhecida em outros países, desde logo data. Uma das primeiras descrições é, segundo GOHEEN e HEWITT (1964), atribuída a um investigador francês de nome FABRE que, em 1853, descreveu sintomas de avermelhamento das folhas ("rougeau"), observou que a anomalia aparecia todo ano na videira, mas não associou nenhum parasita com a moléstia, concluindo que sua natureza era um mistério.

A primeira evidência experimental de que anomalia desse tipo era moléstia de vírus foi obtida em 1936 na Alemanha por SCHEU, citado por GOHEEN e COOK (1959), que relatou sua transmissão por enxertia. Estudos efetuados no decorrer dos anos mostraram que as doenças conhecidas em várias regiões vitícolas como "rougeau", "flavescence", "brunissure", "red leaf", "white Emperor", "leafroll", "Rollkrankheit", "accartocciamento fogliare" e "enroulement foliaire" eram apenas nomes dados em diferentes localidades para uma mesma doença (GOHEEN *et alii*, 1958; VUITTE-NEZ, 1958; GOHEEN e COOK, 1959; BELLI, 1969). Guardando prioridade e considerando que o enrolamento dos bordos foliares é o sintoma mais consistente da moléstia, GOHEEN *et alii* (1958) recomendam o nome "leafroll", que corresponde ao nome original "Rollkrankheit" dado por SCHEU. Desde então o nome "leafroll" (enrolamento da folha) vem sendo aceito pela maioria dos pesquisadores.

O vírus do enrolamento da folha é de distribuição mundial, ocorrendo nas Americas, do Norte (HARMON e SNYDER, 1946; GOHEEN *et alii*, 1958; GILMER, 1966), Central (TELIZ e GOHEEN, 1968) e do sul (HEWITT, 1965; KUNIYUKI, 1972; KUHN e SIQUEIRA, 1974), Europa (VUITTENEZ, 1958; DIAS, 1963; BOVEY, 1965; BALDACCI *et alii*, 1967; LEHOCZKY *et alii*, 1969), Ásia (TANNE e NITZANY, 1967; TANAKA, 1976), África (NEL e ENGELBRECHT, 1972) e Oceania (McKISSOCK, 1964; FRANCKI e CROWLEY, 1967).

Essa moléstia tem sido encontrada nas variedades de copa e de cavalo com incidência bastante variável nos vários países, chegando algumas variedades tradicionais de *V. vinifera* L. a apresentarem 100% de plantas infetadas (GOHEEN *et alii*, 1959; BELLI e CESATI, 1967; LEHOCZKY *et alii*, 1969; CHAMBERLAIN *et alii*, 1970; McGECHAN, 1970, VALAT, 1972; BOUBALS, 1972 b; BALDACCI *et alii*, 1972; NEL e ENGELBRECHT, 1972; TANAKA, 1976). Nas regiões dos Estados Unidos onde são cultivadas variedades de *V. labrusca* L., a incidência do enrolamento da folha tem sido limitada, pois são elas de cultivo muito mais recente do que as viníferas e portanto, não tiveram tempo de acumular muitos vírus (GILMER, 1966).

O enrolamento da folha é considerado uma das mais importantes moléstias de vírus da videira, pelas perdas quantitativas e qualitativas que ocasiona à produção viti-vinícola. Relatos de vários autores que trabalharam com numerosas variedades de *V. vinifera*, indicam que a infecção pelo vírus pode redundar em elevadas perdas, de até 76% na produção de uva (GOHEEN e COOK, 1959; BELLI e CESATI, 1967; BOVEY, 1970; LEGIN, 1972; OVER DE LINDEN e CHAMBERLAIN, 1970 a; LIDER *et alii*, 1975). Contudo, diferenças sensíveis não foram detectadas por HARMON e SNYDER (1946) e BOUBALS *et alii* (1967), que trabalharam respectivamente com as variedades de *V. vinifera* Emperor e Cinsaut. Esses fatos indicam que as perdas entre as viníferas dependem da variedade. As perdas causadas pelo vírus na produção de uvas híbridas, com exceção do Baco 22A, que apresenta sensível redução (OVER DE LINDEN e CHAMBERLAIN, 1970 a) e variedades de *V. labrusca* não são conhecidas. As variações nas perdas induzidas pelo vírus dependem, além da variedade, das estirpes do vírus e das condições ambientais (GOHEEN e COOK, 1959; ALLEY *et alii*, 1963).

O enrolamento da folha caracteriza-se também por induzir perdas qualitativas. Dependendo da variedade, os frutos não atingem a cor normal (HARMON e SNYDER, 1946; HARMON, 1956; GOHEEN *et alii*, 1958), tornam-se mais ácidos (LIDER *et alii*, 1975; KLIEWER e LIDER, 1976) e contém menor teor de açúcar (HARMON e SNYDER, 1946; GOHEEN e COOK, 1959; ALLEY *et alii*, 1963; BOVEY, 1970; LIDER *et alii*, 1975), perdendo as qualidades exigidas para consumo *in natura*, para produção de uva passa e para fabricação de vinho. Além disso, o baixo teor de açúcar atrasa a maturação dos frutos e portanto a colheita, causando problemas na produção de uva passa e vinho (GOHEEN, 1970). A cor dos vinhos é também reduzida em intensidade (ALLEY *et alii*, 1963).

De acordo com a literatura referente ao enrolamento da folha, todas as videiras de enxerto e de porta-enxerto, comercialmente cultivadas, têm-se mostrado susceptíveis ao vírus em questão. GOHEEN (1970) chega a assinalar que o vírus pode infectar todas as variedades e espécies do gênero *Vitis*. Imunidade ou resistência ao vírus não são conhecidas até o presente. No que se refere às hospedeiras herbáceas, TANNE *et alii* (1974) transmitiram mecanicamente o vírus do enrolamento da folha para as solanáceas *Nicotiana glutinosa* L., *N. tabacum* L., *N. debneyi* Domin., *Capsicum anuum* L., *Datura metel* L., *Lycopersicon esculentum* Mill. e *Petunia hybrica* Vilm.

A descrição dos sintomas típicos do enrolamento da folha tem-se baseado em variedades bastante sensíveis de *V. vinifera*. Nestas, as plantas infectadas distinguem-se por apresentar folhas enroladas para baixo, rugosas e quebradiças e com intensa coloração avermelhada ou amarelada das áreas internervais, dependendo da variedade (HARMON e SNYDER, 1946; GOHEEN *et alii*, 1958; VUITTENEZ, 1958). Crestamento decorrente da infecção pode ocorrer em folhas de algumas variedades (HARMON e WEINBERGER, 1956). Os sintomas foliares são evidentes a partir dos meados de verão. Durante a primavera, algumas variedades de *V. vinifera* e *V. labrusca* podem apresentar atraso na brotação de primavera e redução no vigor e no tamanho da planta (GOHEEN e COOK, 1959; BOVEY, 1970; OVER DE

LINDEN e CHAMBERLAIN, 1970 a; GOHEEN, 1970; LIDER *et alii*, 1975). Em muitas variedades de uvas brancas e vermelhas, as plantas infetadas se distinguem pela alteração da coloração normal dos frutos durante a época da colheita; a cor dos frutos de variedades pretas não é alterada (HARMON e SNYDER, 1946; HARMON, 1956; GOHEEN *et alii*, 1958). Os cachos são menores em número, tamanho e peso do que os de plantas sadias, embora o tamanho das bagas individuais seja aproximadamente o mesmo (GOHEEN e COOK, 1959; GOHEEN e HEWITT, 1964). Em algumas variedades de *V. labrusca* e seus híbridos, videiras infetadas apresentam menor porte, folhas levemente enroladas, rugosas e com crestamento, podendo algumas variedades apresentar frutos com coloração anormal durante a época de colheita (GOHEEN *et alii*, 1959; GOHEEN, 1970). O híbrido Baco 22A (*V. riparia* Michaux. x *V. vinifera* x *V. labrusca*) mostra severo nanismo e com folhas pequenas e cloróticas, quando infetadas por estirpes mais fortes do vírus (GOHEEN e HEWITT, 1964).

Nem todas as videiras mostram sintomas evidentes. Existem numerosas variedades e híbridos comerciais de copa que mostram sintomas obscuros ou não os exibem, quando infetados (GILMER, 1966; HEWITT, 1968; BOUBALS *et alii*, 1967; CHAMBERLAIN *et alii*, 1970). O vírus do enrolamento da folha causa infecção latente nas variedades mais conhecidas de porta-enxerto (GOHEEN *et alii*, 1958; HEWITT, 1968; GOHEEN, 1970; BOUBALS, 1972 b). Além da época do ano e das variedades, fatores como condições ambientais e estirpes do vírus causam variações nos sintomas ALLEY *et alii*, 1963; GOHEEN e HEWITT, 1964; COOK e GOHEEN, 1961; CHAMBERLAIN *et alii*, 1970; TAYLOR e WOODHAM, 1972).

O avermelhamento ou amarelecimento e enrolamento das folhas não são sintomas exclusivos da virose enrolamento da folha. Inúmeras anomalias, de natureza diversa, têm sido assinaladas causando essas alterações nas folhas. Tais sintomas resultam de: (a) fatores genéticos (BOUBALS, 1972 a); (b) deficiência de elementos nutricionais como potássio (COOK e GOHEEN, 1961) e magnésio (COOK e GOHEEN, 1961; BOVEY *et alii*, 1967); (c) danos provocados por ácaros (JACOB *et alii*, 1941; BOVEY *et alii*, 1967); (d) danos de insetos como trips, cigarrinhas e membracideos

VIDANO, 1963, 1970; BOVEY *et alii*, 1967); (e) infecção por fungos do gênero *Pythium*, que causa podridão do colo (ALLEY *et alii*, 1963); (f) infecção pelo "grapevine corky bark virus" (BEUKMAN e GOHEEN, 1970), que corresponde ao vírus do fendilhamento cortical em português; (g) seca (GOHEEN e HEWITT, 1964) e (h) operações culturais, como anelamento (GOHEEN e HEWITT, 1964).

O enrolamento da folha afeta também alguns processos fisiológicos da planta infetada. GOHEEN e SCHNATHORST (1961) constataram acúmulo de carboidratos na forma de amido e de açúcares nas folhas. HOEFERT e GIFFORD (1967 a) também relataram resultados semelhantes quanto ao acúmulo de amido nas folhas. Considera-se que esse alto teor de amido seja o responsável pelo desenvolvimento de folhas enroladas, rugosas, quebradiças e com crestamento do limbo de algumas variedades. Atribuiu-se também ao acúmulo de carboidratos o desenvolvimento de um número consideravelmente menor de manchas nas folhas e nos ramos causadas pelo oídio *Uncinula necator* (Schw.) Burril, (*Oidium tuckeri* Berk.), indicando aparente resistência dessas videiras infetadas pelo vírus do enrolamento da folha à infecção pelo fungo (GOHEEN e SCHNATHORST, 1961; GOHEEN, 1965). COOK e GOHEEN (1961) encontraram redução no teor de cálcio, magnésio e potássio na lâmina foliar e acúmulo muito grande de potássio (mais de 300%) no pecíolo de videiras infetadas pelo vírus do enrolamento da folha. MILIKAN *et alii* (1963, 1965) observaram menor teor de potássio e de manganês nas folhas infetadas. Com relação aos frutos, comparações evidenciaram que aqueles de plantas doentes apresentam menor teor de açúcar na época da colheita, em porcentagens variáveis, chegando-se a observar redução de até 57% em algumas variedades de *V. vinifera* (HARMON e SNYDER, 1946; HARMON, 1956; GOHEEN *et alii*, 1958; GOHEEN e COOK, 1959; ALLEY *et alii*, 1963; BOVEY, 1970; OVER DE LINDEN e CHAMBERLAIN, 1970 a; LEGIN, 1972; LIDER *et alii*, 1975; KLIEWER e LIDER, 1976). Esse baixo teor de açúcar também ocorre em algumas variedades e híbridos de *V. labrusca* (GOHEEN *et alii*, 1959; GOHEEN, 1970). Além disso, os frutos de videiras infetadas contêm maior concentração de ácido tartárico

e ácido málico (LIDER *et alii*, 1975; KLIEWER e LIDER, 1976), menor concentração de pigmentos de antocianina na casca das bagas (ALBACH *et alii*, 1959), menor concentração de prolina e arginina e teor bastante elevado de potássio (KLIEWER e LIDER, 1976).

Estudos anatômicos mostraram que o vírus do enrolamento da folha causa degeneração do floema (HOEFERT e GIFFORD, 1965, 1967 a) e formação de trabéculas no parênquima interfascicular e parênquima do floema (HOEFERT e GIFFORD, 1967 b). Segundo GOHEEN (1965), a degeneração do floema provavelmente afeta a translocação, provocando acúmulo de carboidratos nas folhas e redução no teor de açúcar nos frutos de videiras infetadas. Esses fatos levaram HOEFERT e GIFFORD (1967 a) a considerar esse vírus como associado aos tecidos do floema. A infecção da videira com o vírus do enrolamento da folha diminui o enraizamento das estacas e a porcentagem de pegamento das enxertias (BOUBALS, 1971; OVER DE LIDEN e CHAMBERLAIN, 1970 a; BOVEY *et alii*, 1974).

O enrolamento da folha já foi atribuído, desde épocas remotas, a várias causas como condições ambientais desfavoráveis, infecção por fungos, danos provocados por cochonilhas, deficiência de potássio, etc. (GOHEEN e COOK, 1959; HOEFERT e GIFFORD, 1967 a). Atualmente, a maioria dos autores o considera moléstia de vírus, pelo fato de ser transmissível por união de tecidos e por não ter sido encontrado nenhum fungo, bactéria ou outro patógeno associado ao enrolamento da folha. Por esses motivos, tentativas vêm sendo feitas no sentido de observar partículas virais do enrolamento da folha. A primeira referência pertence à OCHS (1959), que observou ao microscópio eletrônico, presença de partículas cilíndricas de 795 \AA (79,5 nm) de comprimento em extratos de videira infetada. Segundo HOEFERT e GIFFORD (1967 a), a validade desse resultado é questionável, pois não foi provada a infectividade dessas partículas. Recentemente, TANNE *et alii* (1977) encontraram partículas alongadas e flexíveis, medindo $13 \times 790 \text{ nm}$ em preparações de plantas-teste herbáceas que tinham sido inoculadas com extratos de videira com enrolamento da folha. Observaram também inclusões e outras manifestações cito

patológicas como cataventos, feixes de filamentos, formações cristalinas nos vacúolos e mitocôndrios gigantes nas secções ultrafinas de tecidos infetados dessas plantas herbáceas, mas não de tecidos infetados de videira. As características do vírus e a citologia dos tecidos infetados permitiram a esses autores classificá-lo no grupo do vírus Y da batata (*Solanum tuberosum* L.). As propriedades físicas e as relações serológicas do vírus não são conhecidas. A existência de diferentes estirpes do vírus é também assinalada por alguns autores, com base na intensidade e na presença ou ausência de sintomas em videiras (ALLEY *et alii*, 1963; GOHEEN e HEWITT, 1964; TAYLOR e WOODHAM, 1972). Contudo, não foi observado fenômeno da proteção, quando estirpe severa do vírus foi introduzida por enxertia em videiras infetadas por estirpes fracas do mesmo patógeno (GOHEEN e HEWITT, 1964). VUITTENEZ (1970 b) aponta que, embora a videira possa estar infetada por diferentes vírus ao mesmo tempo, a ocorrência de sinergismo ainda não foi provada. Quando o vírus do enrolamento da folha está presente juntamente com o vírus da folha-em-leque ("grapevine fanleaf virus"), na mesma planta, os efeitos costumam ser apenas aditivos no que concerne aos sintomas, crescimento e produção.

O vírus do enrolamento da folha é facilmente transmitido e recuperado de videira para videira por união de tecidos (HARMON e SNYDER, 1946; GOHEEN *et alii*, 1959; VUITTENEZ, 1958). As tentativas de transmissão mecânica do vírus a partir de extratos de videiras infetadas para videiras e outras plantas herbáceas têm dado resultados negativos, de acordo com a maioria dos autores. A única referência sobre caso positivo de transmissão mecânica é de TANNE *et alii* (1974), que conseguiram infetar plantas herbáceas mediante inoculação com extratos, purificados e não purificados, de videiras com enrolamento da folha. Não foi verificada a passagem do vírus pela semente (BOUBALS, 1969). A maioria dos autores não tem encontrado evidência de disseminação natural da moléstia (GOHEEN *et alii*, 1958; GOHEEN e HEWITT, 1964; LUHN e GOHEEN, 1970; BOUBALS, 1971). Contudo, HEWITT (1968) cita que dois pesquisadores, em

trabalhos independentes, obtiveram pequeno número de casos positivos de transmissão do vírus de videira infetada para sadia através da cochonilha branca ("mealy bug"). Assim sendo, HEWITT (1968, 1971) classifica o enrolamento da folha dentro do grupo de viroses da videira provavelmente transmitidos por vetores aéreos. Não existem relatos sobre a transmissão desse patógeno por outros métodos, além dos mencionados. O principal meio de disseminação da moléstia consiste, portanto, na utilização de material propagativo de videiras infetadas, tanto de enxerto como de porta-enxerto (GOHEEN *et alii*, 1958; GOHEEN, 1970; CHAMBERLAIN *et alii*, 1970; LUHN e GOHEEN, 1970; BOUBALS, 1971).

A diagnose do enrolamento da folha tem sido feita mediante observação de sintomas e utilização de videiras indicadoras. No primeiro caso, a moléstia pode ser diagnosticada através do estudo de sintomas, mas somente em variedades que mostram reações típicas, quando infetadas (GOHEEN *et alii*, 1959; BOVEY, 1965). Mas, na maior parte dos casos, os resultados conclusivos somente podem ser obtidos através de testes em videiras indicadoras. Estas são variedades ou híbridos que, uma vez infetados pelo vírus do enrolamento da folha, mostram sintomas característicos, permitindo reconhecer as plantas doentes com segurança. A diagnose consiste, portanto, em enxertar as referidas videiras com material cujo estado de sanidade se quer determinar. Com relação a essas plantas, uma série de clones de diferentes variedades já é conhecida no estrangeiro. A variedade Emperor foi a primeira a ser utilizada para a identificação do enrolamento da folha e se baseava na falta de coloração avermelhada normal dos frutos maduros, quando infetada (HARMON e WEINBERGER, 1956). Videiras indicadoras que mostram sintomas foliares passaram a ser adotadas, pois plantas de estaca necessitam de 3-4 anos para produção de frutos (GOHEEN *et alii*, 1959). Atualmente, a maioria dos autores vem utilizando videiras que reagem à infecção, dentro de 6-18 meses, com sintomas de avermelhamento e enrolamento das folhas, como as variedades de *V. vinífera* Cabernet, Carignane, Cinsaut, Gamay, Mission, Pinot Noir e o híbrido LN-33 (GOHEEN *et alii*, 1959; HEWITT, 1963; BOVEY,

1965; BALDACCI e BELLI, 1967; VUITTENEZ, 1970 a; CHAMBERLAIN *et alii*, 1970; TAYLOR e WOODHAM, 1972). GOHEEN e HEWITT (1964) recomendam também o híbrido Baco 22A, que reage à infecção, mostrando severo nanismo e clorose das folhas jovens, em 2-3 meses, quando infetado por estirpes fortes ou moderadas do vírus, para as condições da Califórnia; mas em outros países, o Baco 22A não tem dado bons resultados (LEHOCZKY *et alii*, 1969; VUITTENEZ, 1970 a; TAYLOR e WOODHAM, 1972). Segundo VUITTENEZ, 1970 a; TAYLOR e WOODHAM, 1972). Segundo VUITTENEZ (1970 a), cada região ou país deverá adotar as variedades mais adequadas, segundo sua adaptação ou sensibilidade.

A transmissão do vírus do enrolamento da folha por união de tecidos, para fins de diagnose em videiras indicadoras, tem sido feita por diferentes técnicas de enxertia de garfo e de gema, seja em material em estado dormente ou em pleno desenvolvimento (HEWITT *et alii*, 1962; GOHEEN e HEWITT, 1964; BOVEY, 1965; TAYLOR *et alii*, 1966; BALDACCI *et alii*, 1972). Contudo, o tempo para a obtenção de resultados através de cada técnica tem sido variável, compreendendo de 6 a 18 meses para as variedades que reagem com sintomas de avermelhamento e enrolamento das folhas e de 2 a 3 meses para o Baco 22A, cuja reação já foi mencionada.

Como a perpetuação do vírus do enrolamento da folha se dá através da propagação vegetativa, pois não tem vetor, torna-se óbvio que a moléstia pode ser facilmente controlada por meio da utilização de clones sadios de variedades de enxerto e de porta-enxerto (GOHEEN e HEWITT, 1964; GOHEEN, 1970).

Clones isentos desses vírus têm sido obtidos por meio da indexação e da termoterapia. A indexação tem sido feita mediante testes de videiras de sanidade a ser determinada em videiras indicadoras (GOHEEN *et alii*, 1959; BALDACCI *et alii*, 1967; VUITTENEZ, 1970 a). A termoterapia tem sido empregada para eliminação do vírus em partes propagativas de variedades totalmente infetadas. Para esse caso, a técnica utilizada com sucesso em videira é a que consiste em tratar plantas de estacas brotadas durante 2 meses dentro de câmara à temperatura mantida a

38°C, para posterior multiplicação dos ponteiros dos ramos aí emitidos (GIFFORD e HEWITT, 1961; GOHEEN *et alii*, 1965). Outras técnicas de aplicação de calor, combinadas ou não com cultura de tecidos, têm sido aplicadas para outros vírus de videira, mas ainda não foram experimentadas para o agente do enrolamento da folha (GALZY, 1964; GOHEEN *et alii*, 1965).

A obtenção de clones sadios tem sido a base para o desenvolvimento de programa de certificação de videira isenta de vírus do enrolamento da folha e outros vírus dessa planta em vários países (VUITTE NEZ, 1967; BALDACCI e BELLI, 1967; GOHEEN, 1970; OVER DE LINDEN e CHAMBERLAIN, 1970 b; BOUBALS, 1971; VALAT, 1972; NEL e ENGELBRECHT, 1972; TAYLOR e WOODHAM, 1972; DETH, 1973; BOVEY *et alii*, 1974). A adoção desse método para o Brasil já foi recomendada (KUNIYUKI e COSTA, 1976).

O controle das viroses da videira através da criação de variedades resistentes ainda se encontra no plano teórico (FRANÇA, 1970; GARTEL, 1971). Para o vírus do enrolamento da folha, não há necessidade de se aplicar essa medida de controle, pois o uso de material sadio possibilita o controle total da moléstia.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram em sua maioria realizados sob condições de estufa na Seção de Virologia do Instituto Agronômico, Campinas, SP. Alguns testes mais específicos foram executados ao ar livre. As observações de campo foram feitas em vinhedos das principais regiões vitícolas do Estado.

As videiras sadias e infetadas utilizadas nos experimentos pertenciam às diferentes variedades, espécies e híbridos, tanto de enxerto como de porta-enxerto. Foram elas obtidas na Seção de Viticultura e nas estações experimentais do Instituto Agronômico e nos vinhedos dos principais centros produtores como Atibaia, Capão Bonito, Itupeva, Jundiaí, Louveira, Mogi das Cruzes, São Roque, etc. Essa obtenção foi feita mediante coleta de estacas dormentes de 2-3 gemas (30-40 cm) durante a época da poda (julho-agosto) e posterior estabelecimento sob condições de estufa ou por meio de sementes. Os materiais propagativos infetados foram coletados de plantas previamente marcadas durante o período vegetativo, que tinham mostrado sintomas típicos do enrolamento da folha ou que não exibiam sintomas aparentes, mas estavam infetadas, de acordo com testes anteriores de transmissão. O reconhecimento de sintomas da moléstia em videiras de enxerto e de porta-enxerto, cultivadas em campo, foi efetuada duas ou até três vezes dentro do período que vai desde o amadurecimento do fruto até o amadurecimento da planta (dezembro a março, aproximadamente). Isso porque os sintomas da moléstia

manifestam-se com intensidade nessa época. As observações foram efetuadas durante dois a três anos sucessivos, dependendo da variedade.

Para os testes de levantamento da incidência do enrolamento da folha por união de tecidos, os materiais foram coletados, ao acaso, de plantas que já se encontravam em dormência. Nesse caso, a presença ou ausência de sintomas nessas videiras não era conhecida.

Os materiais sadios consistiram de clones novos obtidos de plantas de semente de variedades de interesse para as investigações, que se achavam totalmente infetadas em São Paulo e de plantas de variedades comerciais e não comerciais, de enxerto e de porta-enxerto, determinadas como isentas do vírus do enrolamento da folha através de estudo da sintomatologia e de testes com indicadoras. Esses materiais foram mantidos e multiplicados para estudos posteriores.

A identificação do enrolamento da folha foi baseada em videiras indicadoras usadas em outros países. Utilizaram-se clones velhos sadios de Carignane, LN-33 e Mission (GOHEEN *et alii*, 1959; HEWITT, 1963; TAYLOR e WOODHAM, 1972) e clones novos sadios, obtidos de semente, das variedades Cabernet Franc e Pinot Noir (VUITTENEZ, 1958; 1970 a). Posteriormente, plantas sadias da variedade Pinot Noir, obtidas por termoterapia, foram também utilizadas.

As sementes de videira utilizadas foram coletadas em janeiro e fevereiro, época da maturação dos frutos. Previamente à sementeira, essas sementes foram submetidas a um choque de frio, mantendo-as durante 30 dias dentro de um refrigerador comum (5°C), no meio de areia úmida colocada em caixas de Petri (INGLEZ DE SOUSA, 1969). As sementeiras foram feitas em vasilhas de barro de 32 x 32 x 8 cm ou 25 x 25 x 8 cm, num meio formado por uma mistura, não esterizada, de terra mais esterco de curral. Quando as platinhas atingiram 3 a 5 cm de altura, foram transplantadas individualmente para vasos e depois de atingirem 15 a 20 cm de altura, foram selecionadas quanto ao vigor e uniformidade.

Algumas videiras de maior interesse, incluindo plantas de semente, foram clonalmente multiplicadas segundo duas maneiras: (a) estaquia dos ramos dormentes de cada planta em pedaços de 20 a 30 cm de comprimento e (b) enxertia de gemas de ramos herbáceos dessas videiras em plantas de semente de crescimento vigoroso, para brotação e desenvolvimento. A adoção de cada método baseou-se na disponibilidade de material existente e na quantidade de material a ser obtido.

As plantas-teste herbáceas, destinadas à inoculação mecânica, consistiram de várias espécies normalmente utilizadas em estudos virológicos e foram obtidas de sementes produzidas e mantidas na Seção de Virologia.

A maioria das plantas experimentais utilizadas nos testes foi conduzida em vasos de barro ou de alumínio de 15 cm de diâmetro e 16 cm de altura. Videiras de maior porte foram plantadas em vasos de barro de 20 x 24 cm. O solo utilizado foi uma mistura de terra e esterco de curral em partes iguais. As videiras, na maioria dos casos, foram plantadas individualmente, mas o número de plantas herbáceas variou de 1 a 4 em cada vaso, dependendo da espécie.

As fontes de vírus do enrolamento da folha foram inicialmente constituídas de materiais propagativos coletados de plantas de variedades, de importância comercial ou não, exibindo sintomas típicos da moléstia e estabelecidos em vasos sob condições de estufa. Posteriormente, plantas sabidamente infetadas de outras variedades, mesmo sem sintomas, também passaram a ser utilizadas como fontes de inóculo. Na maior parte dos casos, procurou-se manter a identidade clonal desses materiais.

Quatro métodos de união de tecidos foram adotados para os testes de transmissão do vírus do enrolamento da folha, dependendo da disponibilidade de material propagativo sadio e infetado:

(a) enxertia de gema inóculo, que consistiu na união de gemas de planta infetada ou a ser testada em plantas de estaca de videiras indicadoras sadias, para que nestas fosse efetuada leitura de sintomas (Fig. 1,A);

(b) enxertia de gema indicadora sobre planta infetada ou a ser testada para efetuar leitura em sua brotação (Fig. 1,B);

(c) dupla-enxertia de gema, que se baseou na utilização de uma videira sadia, na qual enxertaram-se gemas de plantas infetadas ou a serem testadas e logo acima destas, uma gema de planta sadia da indicadora. Fez-se a leitura de sintomas nas folhas da brotação desta (Fig. 1,C) e

(d) encostia do tipo lateral inglesa, que consistiu em unir lateralmente ramo de uma planta indicadora com o de planta infetada ou a ser testada, para constituir o conjunto copa-cavalo. Para isso, fez-se um corte longitudinal nos ramos a serem unidos numa extensão de 5 a 10 cm e a seguir, uma incisão oblíqua no local cortado de cada ramo, porém em sentido inverso. Abriram-se os cortes, ajustaram-se as partes e amarraram-se os dois ramos com fita de plástico até a soldadura. Após o completo pagamento, fez-se a separação, mediante cortes gradativos do ramo a ser desligado (Fig. 1,D).

Para a adoção das mencionadas técnicas de enxertia, foram utilizadas somente videiras que se encontravam em estado herbáceo. Essas videiras compreendiam as usadas como cavalo e como fornecedoras de gemas, sadias e infetadas. Em todos os casos em que se procedeu à enxertia de gema, independente dos métodos, fez-se um corte ligeiramente oblíquo no ramo do cavalo (1 a 2 cm de comprimento) e a seguir, um outro corte com ângulo de 45° em relação ao primeiro (0,3 a 0,5 cm de profundidade) até atingir a extremidade inferior deste. Em seguida, retirou-se a placa resultante e encaixou-se um escudo, de igual tamanho, contendo uma gema. Quando as gemas serviram como fonte de inóculo, foram enxertadas de uma a três, permitindo-se que elas brotassem 5 a 10 cm, após o que foram despontadas. Os métodos da enxertia de gema inóculo, dupla-enxertia de gema e encostia também foram utilizados para os testes de recuperação do vírus para indicadoras. Estes foram efetuados, no caso de plantas de certas variedades que não mostraram sintomas quando inoculadas.

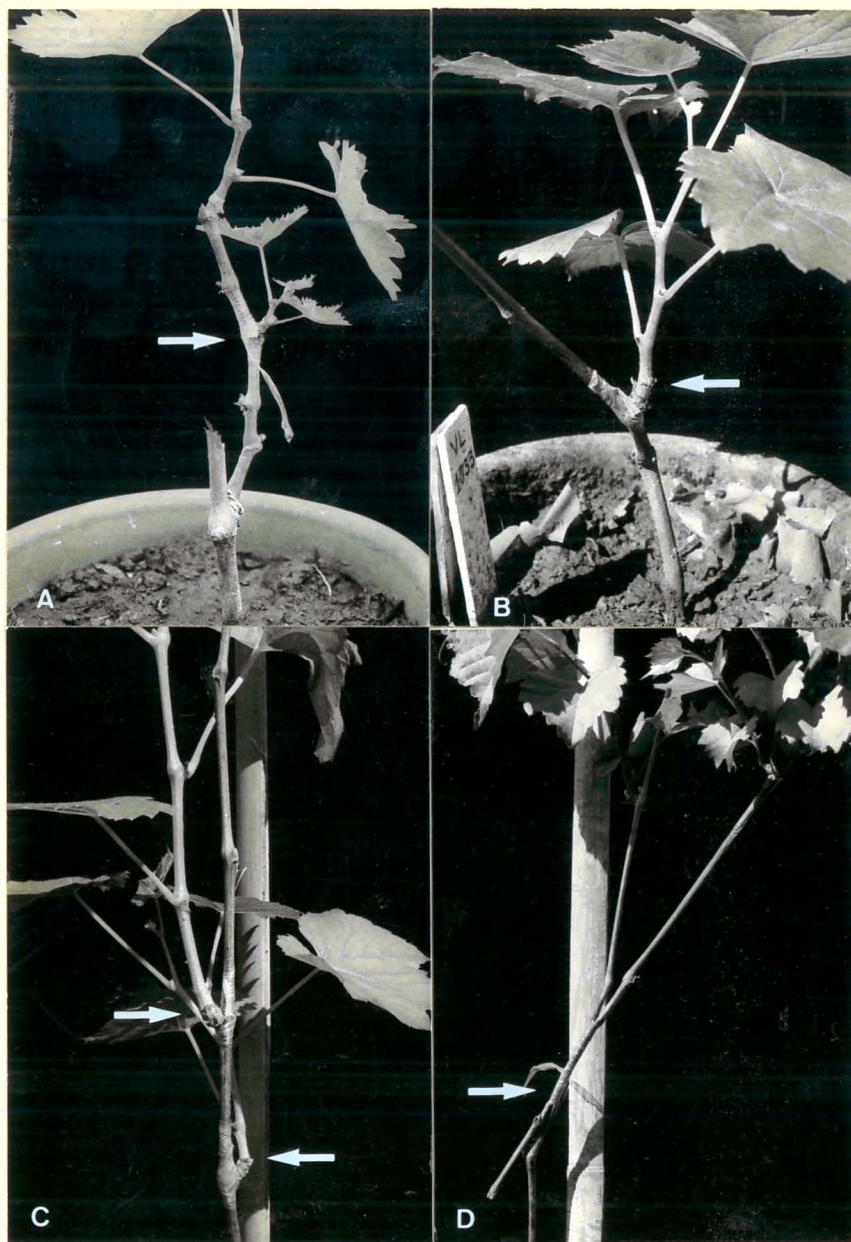


Figura 1. Métodos de união de tecidos utilizados para a transmissão do vírus do enrolamento da folha da videira. A - Enxertia de gema inóculo. B - Enxertia de gema indicadora. C - Dupla-enxertia de gema (seta superior, gema indicadora e seta inferior, gema inóculo). D - Encostia.

O reconhecimento de sintomas do enrolamento da folha nas videiras indicadoras baseou-se na observação de folhas maduras dos ramos originados de duas brotações consecutivas: a primeira, feita logo após a enxertia, no mesmo período vegetativo da planta e a segunda, originada depois do inverno, após a poda do ramo inicial. Em casos duvidosos, esperou-se a brotação seguinte ao segundo inverno.

Para as tentativas de transmissão do vírus do enrolamento da folha de videira para videira ou para plantas-teste herbáceas por meio da inoculação mecânica por fricção de suco, foi adotada, basicamente, a técnica mais empregada para os vírus mecanicamente transmissíveis dessa planta: maceração dos tecidos jovens de planta infetada em presença de uma solução de nicotina a 2,5% em água (CADMAN *et alii*, 1960; DIAS, 1965). O suco obtido (1:10 peso de tecido, volume diluente) foi esfregado na superfície das folhas das plantas a serem inoculadas, previamente polvilhadas com carborundo de malha 400, com posterior lavagem com água. As plantas herbáceas submetidas à inoculação mecânica foram mantidas durante 30 a 40 dias sob observação, ao lado de plantas não inoculadas. As videiras foram observadas durante 15 a 18 meses.

As tentativas de observação de partículas do vírus do enrolamento da folha em tecidos de videira infetada foram feitas no setor de microscopia eletrônica da Seção de Virologia do Instituto Agrônomo de Campinas.

As matrizes não infetadas pelo vírus do enrolamento da folha foram obtidas por propagação de plantas que tinham dado teste negativo quando indexadas em videiras indicadoras e através do tratamento de material infetado por termoterapia em câmara de temperatura controlada disponível na Seção de Virologia.

Os materiais e métodos mais específicos serão relatados juntamente com a apresentação dos resultados.

5. RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DE OBSERVAÇÕES

No presente capítulo, são relatados os resultados experimentais e de observações, obtidos de estudos sobre o enrolamento da folha da videira. Para maior facilidade na apresentação desses resultados, procurou-se adotar a seguinte seqüência, que, em linhas gerais, é utilizada por muitos autores: importância econômica, círculo de hospedeiras, sintomatologia, etiologia e controle.

5.1. Importância econômica: avaliação da incidência

O enrolamento da folha da videira que ocorre em outros países é considerado moléstia de bastante importância econômica. Em São Paulo, uma avaliação da importância econômica do tipo de enrolamento da folha presente nas plantações não tinha sido feita até há alguns anos, pois não se dispunha de conhecimentos suficientes sobre a moléstia. Ademais, material sadio de muitas das variedades de importância comercial no Estado não havia sido obtido, de tal modo que comparações experimentais para determinação das perdas qualitativas e quantitativas não podiam ser feitas. Já se dispõe presentemente de conhecimentos e material que permitem a realização de ensaios para essas determinações.

Observações de videiras cultivadas no campo, das variedades Itália e Seibel 2, mostraram que plantas infetadas eram aparentemente menos desenvolvidas e menos produtivas do que plantas normais de mesma variedade, crescendo nas proximidades.

Cultivadas em estufa sob as mesmas condições em vasos, foi observado que plantas infetadas das variedades Niagara Rosada e Pinot Noir apresentaram redução no vigor e no enraizamento das estacas em relação às plantas sadias dos mesmos clones, obtidos por termoterapia.

A incidência do enrolamento da folha foi determinada por meio de videiras indicadoras em amostras de 15 variedades de enxerto e 7 de porta-enxerto, coletadas de várias regiões vitícolas do Estado: Atibaia, Campinas, Capão Bonito, Ferraz de Vasconcelos, Ibiúna, Itupeva, Jundiaí, Louveira, Mogi das Cruzes, Morungaba, São Roque, Valinhos e Vinhedo. Os resultados dos testes reproduzidos na tabela 1 mostram que a incidência é bastante elevada. Dez das variedades de copa testadas mostraram 100% de infecção. Dentre essas, 3 eram variedades de uvas finas (Alphonse Lavallée, Moscatel de Hamburgo e Pirovano 87), 3 eram variedades tradicionais de uvas para vinho (Barbera, Bonarda e Malêgue), 2 eram variedades novas de uvas para vinho, obtidas no Instituto Agrônômico (IAC 138-22 e IAC 116-31) e 2 eram variedades americanas de uvas populares para mesa (Niagara Branca e Niagara Rosada). Das amostras testadas de Niagara Rosada, uma era representada por materiais propagativos de 8 plantas coletados de uma plantação de mais de 30 anos de idade, que, provavelmente, representa uma das primeiras multiplicações da planta original. A variedade Itália, videira mais importante como produtora de uva fina, mostrou 41% de infecção. A incidência do vírus nos híbridos franceses Couderc, Seibel 2 e Seyve Villard 5276, cultivados para produção de vinho, foi de 42, 66 e 70%, respectivamente. Os testes feitos com amostras da variedade americana Isabel, plantada principalmente para produção de vinho em São Paulo, indicaram uma porcentagem de infecção de 50%.

Tabela 1. Porcentagem de infecção pelo vírus do enrolamento da folha em amostras das principais variedades de copa cultivadas em São Paulo.

Variedades de uva	Nº de localidades amostradas	Nº de amostras testadas	Nº de plantas		Nº de infecção
			testadas	infectadas	
Itália	7	16	39	16	41
Seibel 2	3	7	19	8	42
Isabel	2	4	10	5	50
Couderc	1	1	3	2	66
Sevve Villard 5276	2	4	10	7	70
Alphonse Lavallée	2	2	4	4	100
Barbera	1	1	5	5	100
Bonarda	1	1	3	3	100
IAC 138-22	2	4	9	9	100
IAC 116-31	1	2	7	7	100
Malêgue	1	1	4	4	100
Moscatel de Hamburgo	2	2	5	5	100
Niagara Branca	6	10	26	26	100
Niagara Rosada	6	11	52	52	100
Pirovano 87	2	2	4	4	100

Quando os dados sobre a incidência do enrolamento da folha em seis das variedades de maior importância para São Paulo foram grupados por região (tabela 2), verificou-se que duas das variedades amostradas estavam totalmente infetadas em todos os locais estudados. Para as outras quatro variedades, houve variações bastante significantes, mas essas não são atribuídas a um efeito regional e sim à procedência do material de propagação.

Com relação às plantas matrizes de porta-enxertos, cujos resultados encontram-se na tabela 3, a incidência do enrolamento da folha mostrou ser mais baixa do que nas variedades de copa. Os cavalos de utilização mais comum no Estado de São Paulo, Traviú, Rupestris du Lot, Kober 5BB, Golia e 420A, mostraram incidência entre 25 e 55%. Todas as plantas testadas dos porta-enxertos de criação genética mais recente, IAC 313 e IAC 766, que vêm tendo crescente aceitação no Estado, deram resultados negativos de detecção do vírus do enrolamento da folha.

Amostras de material propagativo de cavalos, coletadas de vinhedos comerciais em que as variedades de copa estavam infetadas pelo vírus do enrolamento da folha, mostraram 100% de infecção. Em testes de 4 variedades de cavalo, os números de amostras testadas/infetadas foram os seguintes: Golia, 2/2; IAC 313, 2/2; Rupestris du Lot, 8/8 e Traviú, 6/6.

Ocasionalmente, a Seção de Virologia do Instituto Agrônomo de Campinas tem recebido material propagativo de videiras cultivadas em outros Estados, para estudo da natureza de anomalias que afetavam essas plantas. Durante as investigações, o vírus do enrolamento da folha foi constatado em amostras provenientes das seguintes regiões e variedades: Caldas, MG (Folha de Figo), Londrina, PR (Itália) e Caçador, SC (Alphonse Lavallée, Golden Queen, Itália e Pirovano 54).

Tabela 2. Porcentagem de infecção pelo vírus do enrolamento da folha em amostras de seis variedades de copa, cultivadas em diferentes regiões vitícolas do Estado de São Paulo.

Variedades	Porcentagem de infecção nas seguintes regiões ^(a)										
	AT	CB	FV	IB	IT	JD	LV	MC	SR	VD	VL
Isabel	-	33	-	-	-	-	-	-	57	-	-
Itália	60	25	33	40	29	25	-	63	-	-	-
Niagara Branca	-	100	-	-	-	100	100	-	100	100	100
Niagara Rosada	-	-	-	-	100	100	100	-	100	100	100
Seibel 2	-	25	-	-	-	80	-	-	30	-	-
Seyve Villard 5276	-	-	-	-	-	100	-	-	63	-	-

(a) AT= Atibaia, CB= Capão Bonito, FV=Ferraz de Vasconcelos, IB= Ibiúna, IT= Itupeva, JD= Jundiaí, LV= Louveira, MC= Mogi das Cruzes, SR= São Roque, VD= Vinhedo e VL= Valinhos.

Tabela 3. Porcentagem de infecção pelo vírus do enrolamento da folha em amostras de plantas matrizes dos principais porta-enxertos de videira utilizados em São Paulo.

Porta-enxertos	Nº de localidades amostradas	Nº de amostras testadas	Nº de plantas		% de infecção
			testadas	infectadas	
IAC 313	2	2	12	0	0
IAC 766	2	2	13	0	0
Kober 5BB	2	2	4	1	25
Rupestris du Lot	2	2	8	3	37
Traviú	3	4	8	3	37
Golia	2	2	5	2	40
420A	3	3	9	5	55

5.2. Estudos sobre o círculo de hospedeiras

Um estudo, embora limitado, do círculo de hospedeiras do vírus do enrolamento da folha foi desenvolvido a fim de verificar o comportamento de diferentes videiras quanto à susceptibilidade ou à resistência ao vírus, as reações apresentadas por essas videiras à infecção e a possibilidade de encontrar novas hospedeiras do vírus, entre videiras e plantas herbáceas.

Esse estudo foi feito mediante testes de transmissão por união de tecidos e por inoculação mecânica. As videiras utilizadas para transmissão por união de tecidos foram plantas clonais de diferentes variedades, espécies e híbridos do gênero *Vitis*, de importância comercial ou para fins de melhoramento. No caso das variedades Niagara Rosada e Pinot Noir, que estavam totalmente infetadas, trabalhou-se com clones obtidos por termoterapia. Em videiras, cuja sanidade com relação ao vírus não era conhecida, foram efetuados, ao mesmo tempo, testes de inoculação e de indexação por união de tecidos. Isso foi feito para as espécies *V. gigas* Fennel, *V. mexicana*, *V. shuttleworthii* House e *V. tiliacifolia* H e B. Para as demais videiras, foram efetuados somente testes de inoculação por união de tecidos, pois plantas isentas desse vírus já haviam sido anteriormente determinadas. O material fonte de vírus para a inoculação foi constituído de plantas sabidamente infetadas das variedades Niagara Rosada e Pinot Noir. Em todos os casos, foram efetuados testes de recuperação do vírus em videiras indicadoras LN-33 e PN-31. As tentativas de inoculação mecânica para plantas de semente de Pinot Noir e plantas herbáceas foram efetuadas mediante fricção do inóculo obtido pela maceração de diferentes tecidos de videira infetada em presença de vários diluentes.

Os resultados dos testes de transmissão por união de tecidos que se encontram na tabela 4 indicam que todas as videiras testadas comportam-se como susceptíveis ao vírus do enrolamento da folha, pois o patógeno foi facilmente recuperado para videira indicadora de todas as espécies e variedades. Das videiras testadas, somente as variedades e híbridos de *V. vinifera* L. e *V. labrusca* L. (com exceção da variedade Isabel) e o híbrido interespecífico LN-33 mostraram sintomas, sendo que a severidade dos mesmos foi variável. A variedade Pinot Noir e o híbrido LN-33 exibiram forte avermelhamento e forte enrolamento das folhas. As variedades Carignane e Mission apresentaram forte avermelhamento, mas o enrolamento era menos pronunciado do que o das videiras do grupo anterior. As folhas de plantas infetadas das variedades Concord e Niagara Rosada tornaram-se ligeiramente enroladas, rugosas e quebradiças, mas não mostraram mudanças na coloração das mesmas.

Nos testes de inoculação mecânica, considerados totalmente negativos, não foram notadas diferenças entre plantas inoculadas e plantas-controle da videira Pinot Noir e das espécies herbáceas testadas como *Bidens pilosa* L. (picão), *Capsicum annuum* L. (pimentão), *Chenopodium amaranticolor* Coste e Reyn., *Chenopodium quinoa* Willd., *Datura stramonium* L., *Lycopersicon esculentum* Mill. (tomateiro), *Gomphrena globosa* L., *Malva parviflora* L., *Nicotiana tabacum* L. (fumo), *Nicotiana glutinosa* L., *Phaseolus vulgaris* L. (feijoeiro), *Sida rhombifolia* L. (guanxuma) e outras.

Tabela 4. Reação apresentada por plantas de diferentes espécies de *Vitis* inoculadas com o vírus do enrolamento da folha e resultados dos testes de recuperação.

Videiras testadas	Reações ^(a) apresentadas pelas videiras testadas	Recuperação positiva (+) do vírus em videiras indicadoras
<i>V. champini</i> Planchon	-	+
<i>V. gigas</i>	-	+
<i>V. labrusca</i> 'Concord'	+	+
<i>V. mexicana</i>	-	+
<i>V. riparia</i> Michaux. 'Riparia Gloire'	-	+
<i>V. rupestris</i> Scheele 'du Lot'	-	+
<i>V. shuttleworthii</i>	-	+
<i>V. tiliaefolia</i>	-	+
<i>V. vinifera</i> 'Carignane'	++	+
'Mission'	++	+
'Pinot Noir'	+++	+
<i>V. berlandieri</i> Planchon x <i>V. riparia</i> '420A'	-	+
<i>V. labrusca</i> x <i>V. vinifera</i> 'Isabel'	-	+
'Niagara Rosada'	+	+
<i>V. smalliana</i> x Golia 'IAC 313'	-	+
<i>V. riparia</i> x <i>V. vinifera</i> x <i>V. rupestris</i> 'Golia'	-	+
<i>V. riparia</i> x <i>V. rupestris</i> x <i>V. cordifolia</i> Michaux. '106-8'	-	+
<i>V. vinifera</i> x <i>V. labrusca</i> x <i>V. riparia</i> x <i>V. candicans</i> Engelmann 'LN-33'	+++	+

(a) - = negativo; + = positivo, com gradação de sintomas, sendo + = sintomas fracos, ++ = sintomas moderados e +++ = sintomas fortes.

5.3. Sintomatologia

Como já foi mencionado, os sintomas do enrolamento da folha mudam conforme as variedades. Há também variedades que não mostram sintomas reconhecíveis, quando infetadas pelo vírus. Assim sendo, procurou-se melhor verificar os sintomas apresentados pela maioria das variedades de copa e de cavalo cultivadas em São Paulo, nas condições de campo. Procurou-se também reconhecer outros fatores que induzem nas videiras reações semelhantes às provocadas pelo enrolamento da folha e que podem levar a erros na identificação da virose.

5.3.1. Descrição de sintomas do enrolamento da folha em campo

Em videiras dentro da fase vegetativa compreendida pela brotação de primavera e início da maturação dos frutos, não são notados sintomas definidos do enrolamento da folha. Mas, em algumas variedades de copa, plantas infetadas mostram menor desenvolvimento na vegetação do ano do que plantas sadias.

Os sintomas típicos são observados geralmente a partir da época da maturação dos frutos, a qual, nas condições normais de cultivo da videira em São Paulo, corresponde aproximadamente ao final do mês de dezembro e os primeiros meses do ano seguinte. Nessa ocasião, plantas infetadas caracterizam-se pelo gradual enrolamento das folhas, inicialmente das basais, de tal modo que no fim do ciclo vegetativo, a maioria das folhas apresenta seus bordos virados para baixo. Ao mesmo tempo, essas folhas tornam-se avermelhadas ou amareladas, dependendo da variedade, com exceção das nervuras principais e áreas adjacentes do parênquima. Tornam-se também rugosas e quebradiças (Fig. 2, A e B). A severidade dos sintomas varia de ano para ano e segundo as variedades. Em plantas enva-

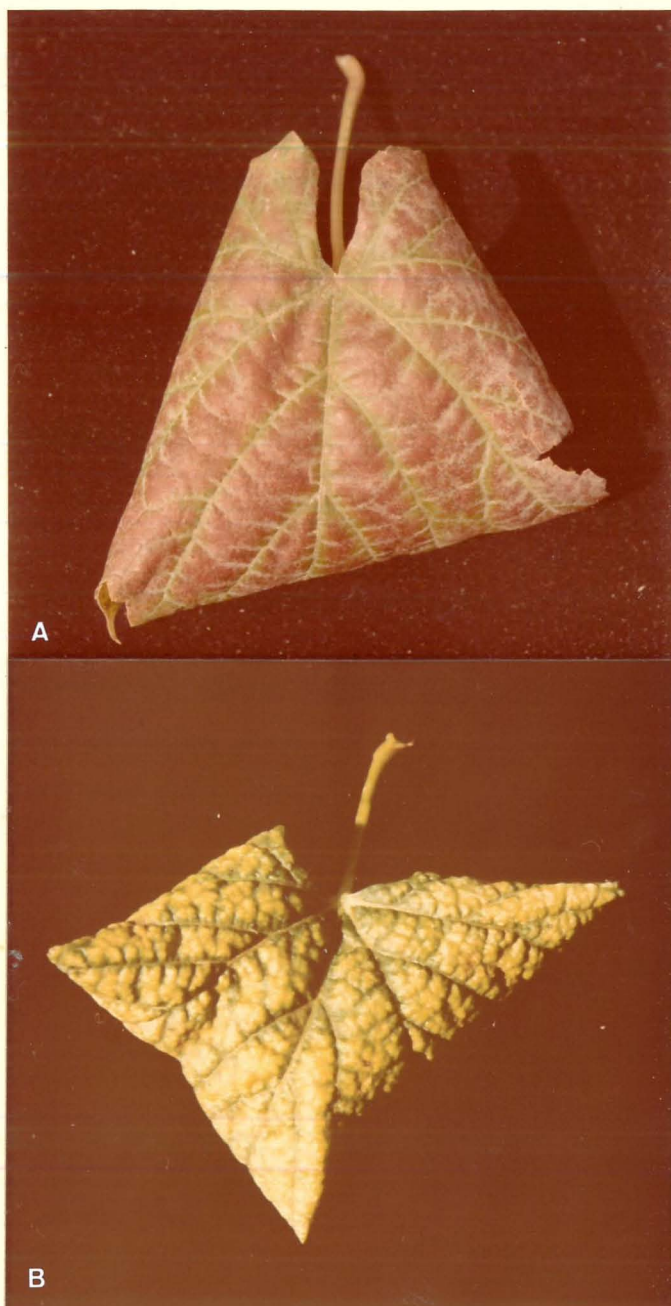


Figura 2. Sintomas induzidos pelo vírus do enrolamento da folha em videira. A- Folha da variedade LN-33 com enrolamento dos bordos, aspecto rugoso e avermelhamento das áreas internervais. B- Folha da variedade Sémillon com enrolamento dos bordos, aspecto rugoso e amarecimento das áreas internervais.

sadas e colocadas dentro de estufa, os sintomas do enrolamento da folha são semelhantes aos de plantas de mesma variedade cultivadas no campo.

As folhas de plantas sadias não mostram enrolamento e permanecem com coloração esverdeada, até atingir a senescência, quando então, adquirem a coloração branco-amarelada ou avermelhada, dependendo da variedade.

Os sintomas típicos são observados principalmente em plantações de variedades de *V. vinifera* (Alphonse Lavallée, Barbera, Bonarda, Diamante Negro e Moscatel de Hamburgo) e alguns híbridos desta espécie (IAC 138-22). A uva Itália infetada exibe uma coloração amarelada mais intensa do que a de folhas normais e um ligeiro enrolamento dos bordos foliares. As variedades Niagara Branca e Niagara Rosada mostram folhas ligeiramente enroladas, rugosas e quebradiças, mas sem alteração da coloração das mesmas. Algumas variedades de copa (Isabel, Seibel 2, Seibel 7053, Seibel 10096 e Seyve Villard 5276) e os cavalos de utilização mais comum em São Paulo (Golia, IAC 313, IAC 766, Kober 5BB, Rupestris du Lot, Traviú e 420A) não apresentam sintomas quando infetados pelo vírus do enrolamento da folha.

Em nenhum caso, foi observada alteração na coloração dos frutos de plantas infetadas.

Algumas videiras de campo das variedades de copa Alphonse Lavallée, Niagara Branca, Niagara Rosada e Seyve Villard 5276 e dos cavalos Kober 5BB e Rupestris du Lot, quando testadas em condições experimentais, deram resultados positivos para o vírus do enrolamento da folha e para o vírus do fendilhamento cortical em alguns casos e para o vírus do mosaico das nervuras, em outros. Essas plantas não apresentaram sintomas que sugerissem uma possível interação entre esses vírus.

5.3.2. Avermelhamento ou amarelecimento das folhas de videira associados a outras causas

Durante o estudo da sintomatologia do enrolamento da folha induzido por vírus, verificou-se a existência de outros fatores, que também provocam coloração avermelhada ou amarelada das folhas da videira. Mas, em geral, essas anomalias podem ser diferenciadas da virose, por meio de cuidadosa observação dos sintomas ou da sequência do aparecimento desses.

Dentre os fatores reconhecidos, a deficiência de magnésio mostrou ser o mais comum. Os sintomas da carência desse elemento consistiram de avermelhamento ou amarelecimento das áreas internervais das folhas basais, com faixas verdes ao longo das nervuras principais, sendo observados em numerosas variedades, na época da maturação dos frutos (Fig. 3, A e B). Amarelecimento das folhas foi visto em Dr. Julio, Itália, Niagara Branca, Niagara Rosada, Seibel 7053, Seibel 10096 e Seyve Villard 5276 e nos cavalos Rupestris du Lot e Traviú. Folhas vermelhas foram notadas em Carignane, LN-33, Pinot Noir e Seibel 2. Análise foliar feita na Seção de Química Analítica do Instituto Agronômico em amostras de videira com amarelo internerval revelou teor 1,5 a 2 vezes menor de magnésio do que o de folhas sem clorose, da mesma variedade. Para três variedades de copa analisadas, as médias dos teores de magnésio nas folhas cloróticas e normais foram os seguintes: 0,23 e 0,43% para Dr. Julio, 0,14 e 0,32% para Niagara Rosada e 0,31 e 0,48% para Seibel 7053. Em plantas envasadas, esse sintoma de avermelhamento ou amarelecimento foi facilmente controlado através de aplicação de magnésio no solo dos vasos.

Os outros fatores, de ocorrência pouco frequente, foram os seguintes: (a) danos provocados por ácaros; (b) excesso ou falta de umidade no solo; (c) queima de sol associada à mudança de planta em pleno crescimento dentro de estufa para fora da mesma; (d) infecção pelo fungo *Oidium tuckeri* Berk.; (e) senescência e (f) infecção pelo vírus do

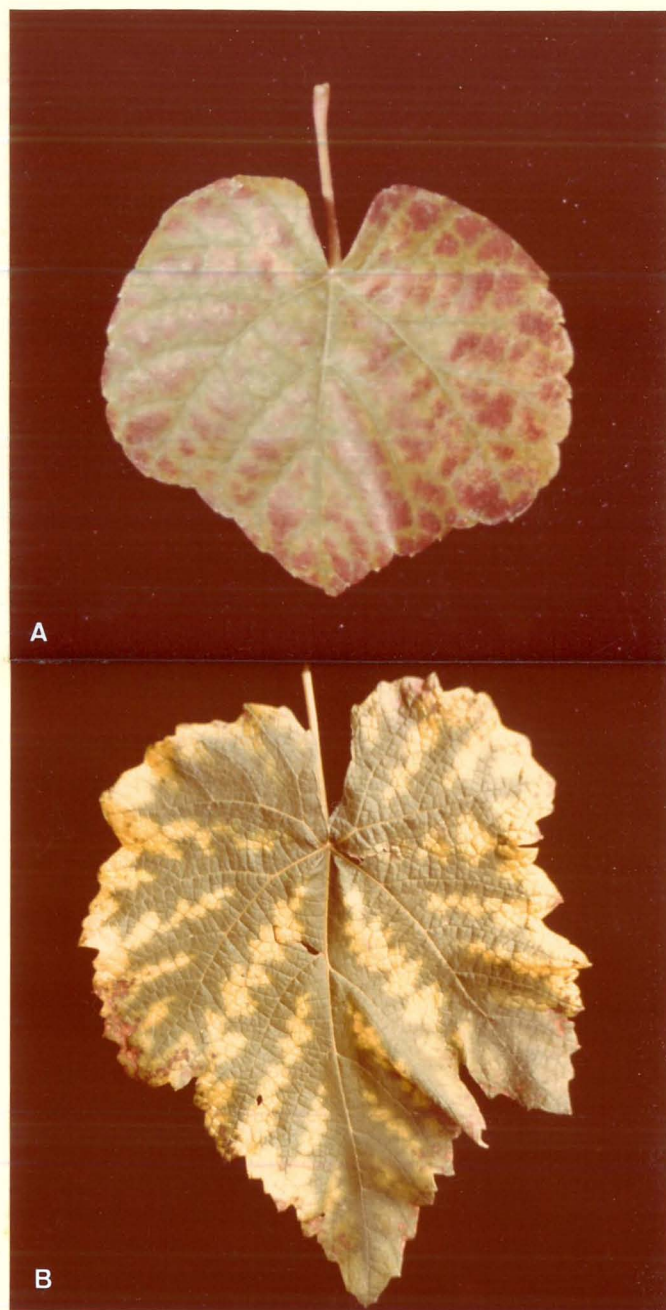


Figura 3. Sintomas associados à deficiência nutricional de magnésio em videira. A- Folha da variedade LN-33 com avermelhamento das áreas internervais. B- Folha da variedade Niagara Rosada com amarelamento das áreas internervais.

fendilhamento cortical no híbrido LN-33. O avermelhamento das folhas causado pelo vírus do enrolamento da folha pode ser distinguido do provocado pelo vírus do fendilhamento cortical, pelo fato de as plantas infetadas pelo segundo apresentarem lesões corticais nos ramos e coloração avermelhada somente das folhas basais e não mostrarem enrolamento dessas folhas.

5.4. Videiras indicadoras

As dificuldades em se efetuar a diagnose da moléstia através da sintomatologia e a necessidade de demonstrar a transmissibilidade tornam indispensável o uso de videiras indicadoras para a diagnose do enrolamento da folha. Nenhuma das variedades cultivadas em São Paulo serve como indicadora. Resultados dos testes efetuados mostraram que podem ser utilizadas como indicadoras do vírus do enrolamento da folha em São Paulo as mesmas variedades adotadas no estrangeiro como indicadoras do "grapevine leafroll". Procurou-se então, selecionar as melhores indicadoras para as condições paulistas, do ponto de vista da sintomatologia e da sensibilidade ao vírus.

5.4.1. Comparação de videiras indicadoras quanto às reações ao vírus do enrolamento da folha

Com o propósito de eleger uma ou mais variedades que apresentassem boa sensibilidade e segurança na detecção desse vírus, compararam-se clones velhos sadios das indicadoras já conhecidas Carignane, LN-33 e Mission (GOHEEN *et alii*, 1959; HEWITT, 1963; TAYLOR e WOODHAM, 1972), clones novos obtidos de semente das variedades Cabernet Franc e Pinot Noir (VUITTENEZ, 1958, 1970 a) e clones sadios de Pinot Noir obtidos de planta tratada por termoterapia. Os clones novos e os conseguidos por

tratamento de calor foram adotados pelo fato de todas as plantas das duas variedades existentes em São Paulo estarem totalmente infetadas pelo vírus do enrolamento da folha. Foram utilizados um clone novo de Cabernet Franc (CF-01) e dois clones novos de Pinot Noir (PN-31 e PN-36).

A inoculação foi feita enxertando-se uma gema de cada videira indicadora em planta infetada, por se tratar de um método de inoculação rigoroso, o que permitiria melhor avaliar as reações apresentadas pelas videiras indicadoras. As videiras fontes de vírus eram constituídas de plantas sabidamente infetadas das variedades de copa e de cavalo, com sintomas típicos (IAC 138-22, Pinot Chardonnay, Pinot Noir, Sémillon, Sultanina e Syrah), sem sintomas característicos (Itália, Niagara Branca e Niagara Rosada) e sem sintomas (Seibel 2, Kober 5BB, Rupestris du Lot, Traviú e 420A).

Os sintomas nas videiras indicadoras foram observados nas folhas maduras de duas brotações consecutivas, tendo sido os mesmos classificados em 3 graus: forte (Ft), quando o avermelhamento e o enrolamento eram severos; moderado (M), quando o avermelhamento e o enrolamento eram menos pronunciados do que no caso anterior; e fraco (Fr), quando o avermelhamento ainda estava presente, mas o enrolamento era menos evidente. Sintomas que fugiam à reação de cada variedade foram considerados duvidosos (D).

Os resultados dos testes efetuados encontram-se na tabela 5. Observa-se que todas as videiras consideradas indicadoras em outros países reagiram à infecção pelo vírus. Todas as plantas inoculadas de todas as variedades testadas mostraram sintomas nas folhas maduras dos ramos originados da brotação do ciclo vegetativo seguinte à enxertia, mas apenas algumas plantas dessas mesmas variedades mostraram sintomas nos ramos originados da primeira brotação da gema indicadora. Nesse caso, a variedade Pinot Noir foi a que melhor resultados apresentou, pois 61% das plantas exibiram sintomas na primeira brotação. Os resultados para as outras videiras foram os seguintes: PN-31, 54%; PN-36, 50%; LN-33, 50%; CF-01, 40%; Mission e Carignane, 33%. Não foram notadas diferenças na susceptibilidade entre as variedades e plantas obtidas de semente.

Tabela 5. Comparação de videiras indicadoras quanto às reações ao vírus do enrolamento da folha da videira.

Videiras fontes de vírus	Reações apresentadas em duas brotações consecutivas (1-2) da gema das variedades indicadoras abaixo ^(a) enxertadas em plantas de estaca das videiras fontes de vírus						
	Carig	CF-01	LN-33	Miss	PN	PN-31	PN-36
	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2
IAC 138-22	Fr-Fr ^(b)	D-M	Ft-Ft	A-Fr	D-Ft	Ft-Ft	D-Ft
Itália	A-Fr	M-M	D-Ft	D-Fr	Ft-Ft	Ft-Ft	D-Ft
Kober 5BB	D-Fr	-	D-Ft	-	Ft-Ft	Ft-Ft	-
Niagara Branca	D-Fr	M-M	Ft-Ft	D-Fr	D-Ft	D-Ft	Ft-Ft
Niagara Rosada	Fr-Fr	D-M	D-Ft	Fr-Fr	Ft-Ft	Ft-Ft	D-Ft
Pinot Chardonnay	-	-	D-Ft	A-Fr	Ft-Ft	-	-
Pinot Noir	D-Fr	D-M	Ft-Ft	D-Fr	Ft-Ft	Ft-Ft	D-Ft
Rupestris du Lot	Fr-Fr	A-M	Ft-Ft	D-Fr	Ft-Ft	Ft-Ft	-
Seibel 2	D-Fr	M-M	-	A-Fr	Ft-Ft	D-Ft	Ft-Ft
Sémillon	D-Fr	-	Ft-Ft	D-Fr	D-Ft	-	-
Sultanina	-	D-M	-	-	-	D-Ft	-
Syrah	Fr-Fr	M-M	D-Ft	Fr-Fr	D-Ft	D-Ft	Ft-Ft
Traviú	D-Fr	D-M	Ft-Ft	Fr-Fr	D-Ft	D-Ft	Ft-Ft
420A	D-Fr	-	D-Ft	Fr-Fr	Ft-Ft	-	-
% de plantas com sintomas na primeira brotação	33	40	50	33	61	54	50

(a) Carig= Carignane, CF-01= planta de semente de Cabernet Franc, LN-33, Miss= Mission, PN= Pinot Noir, PN-31 e PN-36= plantas de semente de Pinot Noir

(b) Ft= sintomas fortes, Fr= sintomas fracos, M= sintomas moderados, D= sintomas duvidosos e A= ausência de sintomas.

Com relação aos sintomas, observa-se que a variedade Pinot Noir e seus clones novos PN-31 e PN-36 e o híbrido LN-33 exibiram sintomas considerados fortes, a Cabernet Franc, sintomas medianos e as variedades Carignane e Mission, sintomas fracos. As duas últimas reagiram com facilidade a certos fatores que induzem coloração avermelhada das folhas e mostraram ser bastante susceptíveis ao oídio. Não foi observada influência das variedades fontes de vírus na sintomatologia das videiras indicadoras.

5.4.2. Comparação de videiras indicadoras mantidas dentro e fora da estufa

Os estudos sobre o enrolamento da folha vinham sendo feitos com videiras envasadas e colocadas sob proteção dentro de estufa. Mas as evidências obtidas de que o vírus não tem vetor, tornaram possível conduzir os experimentos também fora de casa-de-vegetação. Assim sendo, procurou-se observar videiras indicadoras infetadas mantidas em estufa e outras comparáveis colocadas ao ar livre, com a finalidade de verificar possível efeito da intensidade de luz na manifestação de sintomas nessas plantas. A possibilidade de se obter uma reação mais rápida ou uma leitura mais segura de sintomas também foi considerada.

Foram então utilizadas plantas sadias, enxertadas com borbulhas de plantas infetadas, das variedades indicadoras LN-33, Pinot Noir e PN-31, que reagem com sintomas fortes à infecção pelo vírus; e Mission, que reage com sintomas mais fracos. As enxertias foram feitas de novembro de 1975 a fevereiro de 1976, quando as plantas encontravam-se no estado herbáceo. O grupo de plantas formado pelas 4 variedades, foi dividido em 3 lotes: (a) o primeiro foi mantido dentro de estufa para vegetação durante a época normal de crescimento; (b) o segundo foi colocado fora de estufa durante o inverno, quando as plantas se encontravam em repouso

vegetativo, para que iniciassem a brotação já exposta à luz solar e (c) o último lote também foi colocado fora de estufa, mas durante a primavera, quando as videiras encontravam-se em pleno desenvolvimento dentro de casa-de-vegetação.

Durante o período de manifestação de sintomas, verificou-se que as reações das plantas colocadas fora de estufa foram mais fortes e apareceram mais rapidamente (15-20 dias antes) do que as de mesma variedade crescendo dentro de estufa. A colocação das plantas sob condições de iluminação solar direta não alterou o tipo de sintoma de cada variedade. Assim, variedades que apresentaram sintomas fortes dentro de estufa também exibiram sintomas fortes fora da mesma. O mesmo comportamento foi notado com relação às plantas da variedade Mission, que reage à infecção com sintomas mais fracos.

Com relação à época de colocação das videiras ao ar livre, aquelas que iniciaram a brotação fora de estufa apresentaram melhores resultados do que as colocadas já em desenvolvimento, do ponto de vista de intensidade e rapidez no aparecimento de sintomas.

Notou-se que as plantas colocadas dentro de estufa apresentaram maior desenvolvimento, principalmente em altura e levaram mais tempo para atingir a maturação do que as mantidas fora de estufa.

5.4.3. Plantio de videiras indicadoras sadias e infetadas em um mesmo vaso

Com a finalidade de melhor estudar os sintomas do enrolamento da folha e de desfazer a hipótese de que se tratasse de sintomas associados à deficiência de magnésio, foram efetuadas comparações entre videiras sadias e infetadas crescendo sob idênticas condições de solo, dentro de estufa.

No primeiro teste, foi constituído um grupo de 4 vasos, sendo plantadas em cada vaso, 2 estacas sadias de mesmo clone de PN-31, para enraizamento e brotação. Após os ramos atingirem tamanho suficiente para enxertia, uma planta de cada vaso foi inoculada com gemas da variedade Pinot Noir infetada pelo vírus do enrolamento da folha, enquanto a outra foi enxertada com gemas de plantas sadias da mesma variedade. Assim sendo, 4 plantas foram inoculadas e 4 constituíram-se nas plantas-controle.

No segundo teste, foram utilizados clones de PN-36. Estes eram plantas de estaca, cujos ramos foram podados antes do plantio, para posterior desenvolvimento. O número de plantas, técnica de inoculação e o manuseio foram idênticos aos do teste anterior.

No terceiro teste, foram utilizados 2 vasos, colocando-se em cada um, uma planta de estaca já infetada e uma outra sadia, da variedade Pinot Noir. Também nesse caso, os ramos haviam sido podados antes do plantio, para que iniciassem a brotação já dentro do vaso.

Em todos os testes, os sintomas de avermelhamento e enrolamento foram observados somente nas plantas inoculadas, em folhas maduras dos ramos originados da brotação seguinte ao inverno. As plantas-controle exibiram folhas verdes durante a vegetação e branco-amareladas, quando senescentes, sem enrolamento.

5.5. Etiologia

Os resultados dos estudos sobre aspectos etiológicos do enrolamento da folha feitos no Brasil adiante relatados confirmam a natureza virótica do agente causal e indicaram que ela é proximamente relacionada ao enrolamento da folha presente em outros países.

5.5.1. Perpetuação

No transcorrer dos estudos aqui descritos, observou-se que a perpetuação do vírus do enrolamento da folha se dá invariavelmente através da propagação vegetativa. Isso foi notado em todos os casos em que se procedeu à multiplicação de plantas infetadas, por estaquia ou enxertia de gema para brotação, seja de variedades que mostram sintomas, seja de variedades que não os exibem.

5.5.2. Transmissibilidade

5.5.2.1. Transmissão por união de tecidos

O vírus do enrolamento da folha que ocorre nos vinhedos do Estado de São Paulo é facilmente transmitido por união de tecidos. Isso foi verificado quando foram utilizados diferentes métodos de enxertia como encostia, enxertia de gema inóculo, enxertia de gema indicadora e dupla-enxertia de gema. A maioria dos testes de transmissão foi efetuada pelo método da dupla-enxertia de gema, que permite melhor aproveitamento das gemas indicadoras e das fontes de vírus. Nesse caso, foi utilizado o porta-enxerto IAC 766, comprovadamente sadio, que tem desenvolvimento bastante vigoroso. Os resultados dos testes efetuados por esse método encontram-se na tabela 6. Mostram que a reação das videiras indicadoras utilizadas, no que se refere à cor das folhas, é constante: vermelha, no caso de LN-33, Carignane e Mission; amarela, no caso de Moscatel Neyde, independentemente da cor apresentada pelas folhas das variedades utilizadas como fontes de vírus. A mesma tabela mostra que o enrolamento dos bordos foliares também é constante para todas as variedades inoculadas.

Tabela 6. Transmissão do vírus do enrolamento da folha pelo método da dupla-enxertia de gema, utilizando o porta-enxerto IAC 766.

Gema indicadora	Gema fonte de vírus	Gemas indicadoras		Sintomas da variedade ^(b)	
		pegadas	infectadas	fonte de vírus	indicadora
LN-33	Pinot Noir	2	2	verm-enro	verm-enro
LN-33	Syrah	3	3	verm-enro	verm-enro
LN-33	Pinot Chardonnay	3	3	amar-enro	verm-enro
LN-33	Sultanina	2	2	amar-enro	verm-enro
LN-33	IAC 766 (controle)	3	0	normal	normal
Mission	Pinot Noir	3	3	verm-enro	verm-enro
Mission	Syrah	2	2	verm-enro	verm-enro
Mission	Pinot Chardonnay	1	1	amar-enro	verm-enro
Mission	Sémillon	2	2	amar-enro	verm-enro
Mission	PN-31 (controle)	3	0	normal	normal
Carignane	Pinot Noir	2	2	verm-enro	verm-enro
Carignane	Syrah	1	1	verm-enro	verm-enro
Carignane	Moscatel Neyde	2	2	amar-enro	verm-enro
Carignane	IAC 766 (controle)	3	0	normal	normal
SMN ^(a)	Pinot Noir	3	3	verm-enro	amar-enro
SMN	Syrah	3	3	verm-enro	amar-enro
SMN	Moscatel Neyde	2	2	amar-enro	amar-enro
SMN	Sultanina	1	1	amar-enro	amar-enro
SMN	IAC 766 (controle)	2	0	normal	normal

(a) SMN= planta de semente da variedade Moscatel Neyde

(b) amar= amarelo; verm= vermelho e enro= enrolamento da folha.

A brotação das indicadoras que recebem gemas de videiras sadias apresentaram folhas verdes e sem enrolamento.

Durante os estudos de transmissão do vírus do enrolamento da folha por enxertia, foram notadas diferenças no que concerne à eficiência dos métodos empregados quanto ao pegamento. Assim sendo, testes foram efetuados para comparação dos métodos de encostia, enxertia de gema indicadora, dupla-enxertia de gema e enxertia de 1 ou 2 gemas-inóculo. Os resultados, que se encontram na tabela 7, mostram que, dentre os métodos testados, o da encostia é o que melhor resultado apresentou quanto ao pegamento (100%), vindo logo a seguir o método da enxertia de 2 gemas inóculo (93%) e enxertia de 1 gema inóculo (82%). A enxertia de gema indicadora e dupla-enxertia de gema apresentaram resultados apenas satisfatórios de pegamento, respectivamente com 64% e 46%. Em todos os testes, confirmaram-se os resultados preliminares de que o vírus é facilmente transmitido, desde que ocorra pegamento do enxerto. Não foi verificada transmissão nos casos em que houve apenas contato entre tecidos de material sadio e infetado. Com relação aos sintomas, observou-se que estes podem manifestar-se nas folhas dos ramos desenvolvidos pela gema indicadora após a enxertia, no mesmo ciclo vegetativo da planta, quando houve enxertia de gema indicadora ou dupla-enxertia de gema. Nos casos da encostia e enxertia de gema inóculo, os sintomas manifestaram-se mais frequentemente nos ramos originados da brotação de primavera seguinte. Quanto ao manuseio, verificou-se que todos os métodos testados foram de fácil e rápida execução.

Tabela 7. Comparação de quatro métodos de transmissão do vírus do enrolamento da folha por união de tecidos em duas videiras indicadoras.

videiras indicadas	videiras fontes de vírus	nº de enxertias feitas (f), com pegamento (p) e com transmissão positiva (t) nas inoculações das videiras indicadoras, segundo os métodos abaixo														
		encostia			enxertia de gema indicadora			dupla-enxertia de gema			enxertia de 1 gema inoculo			enxertia de 2 gemas inoculo		
		f	p	t	f	p	t	f	p	t	f	p	t	f	p	t
PN-31 (a)	PN (b)	3	3	3	3	2	2	4	1	1	5	4	4	-	-	-
PN-31	MN	3	3	3	3	1	1	3	1	1	3	3	3	-	-	-
PN-31	SY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	4	4
PN-31	SE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3	3
PN-36	PN	2	2	2	5	3	3	4	2	2	5	4	4	-	-	-
PN-36	MN	2	2	2	3	3	3	4	3	3	4	3	3	-	-	-
PN-36	SY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	4	4
PN-36	SE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3	3
TOTAL		10	10	10	14	9	9	15	7	7	17	14	14	15	14	14
% de pegamento		100			64			46			82			93		

(a) PN-31 e PN-36= plantas de semente da videira indicadora Pinot Noir

(b) PN= Pinot Noir; MN= Moscatel Neyde; SY= Syrah e SE= Sémillon

5.5.2.2. Tentativas de transmissão por inoculação mecânica

Numerosas tentativas foram feitas visando a transmissão do vírus do enrolamento da folha por inoculação mecânica para plantas-teste herbáceas e para videira, mediante fricção do inóculo nas folhas dessas plantas previamente polvilhadas com carborundo. Tecidos de diferentes partes de videira infetada, desde folhas até raízes, foram utilizados como fontes de inóculo. Os inóculos foram em sua maioria extraídos em presença de uma solução de nicotina a 2,5% em água. Outros diluentes à base de cafeína, sulfito de sódio, dietilditiocarbamato de sódio, ácido ascórbico, etc. e tampões fosfato, foram também utilizados. O pH dessas soluções variou de 7,0 a 9,0. Com os estratos preparados, inocularam-se várias plantas-teste, inclusive clones novos obtidos de semente da videira indicadora Pinot Noir, perfazendo um total de 58 espécies, com um mínimo de 10 plantas por espécie.

Três outros métodos foram utilizados, porém em menor escala. Um é o das picadas-de-agulha, que consistiu em depositar uma folha de videira infetada sobre o limbo de uma planta-teste, inclusive videira, e executar várias picadas nessas folhas com um feixe de agulhas. O outro é chamado de pica-couve, que consistiu em enrolar folha de videira infetada, cortar e imediatamente esfregar na superfície de uma folha de planta-teste, inclusive videira, previamente polvilhada com carborundo, fazendo a operação seguidamente. Nesses dois testes, foi inoculado um mínimo de 10 plantas por espécie testada. O último método foi o da pseudo-encostia, que consistiu em promover a união física dos ramos herbáceos de videira infetada com os de espécies de plantas-teste herbáceas. Nesse caso, foi inoculada uma média de 5 plantas por espécie.

Em todos os casos, não houve diferença entre plantas inoculadas e plantas controle das espécies herbáceas e videiras testadas, indicando que o vírus do enrolamento da folha não foi transmitido mecanicamente.

5.5.2.3. Transmissão pela semente

Cerca de 200 plantas de semente, de 18 variedades de videira, foram obtidas e cultivadas em vasos sob condições de estufa. As sementes foram coletadas de videiras exibindo sintomas de avermelhamento e enrolamento das folhas como Aramon, Cabernet, Gamay, Merlot, Pinot Noir e Syrah e de amarelecimento e enrolamento das folhas como Fernão Pires, Moscatel Neyde, Pirovano 7, etc.

As plantas resultantes de semente foram mantidas sob observação durante 1-2 anos, mas não apresentaram sintomas da moléstia. Contudo, quando clones obtidos de plantas de semente foram inoculados por união de tecidos com material infetado, houve manifestação dos sintomas característicos do enrolamento da folha.

5.5.2.4. Vetor

Em outros países, a evidência da existência de vetor do vírus do enrolamento da folha é negativa (GOHEEN e HEWITT, 1964; LUHN e GOHEEN, 1970; BOUBALS, 1971). Observações feitas em São Paulo, adiante descritas, apoiam esse ponto de vista.

Durante o desenvolvimento dos estudos sobre a moléstia, foram encontradas plantas sadias de Golia, Rupestris du Lot e Traviú, pertencentes à coleção de porta-enxertos da Estação Experimental de São Roque. Esses cavalos, com 20 a 30 anos de idade, encontravam-se plantados dentro de área cultivada com numerosas variedades de videira, muitas das quais infetadas pelo vírus em estudo.

Em Ferraz de Vasconcelos (SP), foram encontradas plantas sadias de uva Itália, com mais de 30 anos de idade, cultivadas ao lado de plantas infetadas, de acordo com testes de detecção do vírus.

5.5.3. Tentativas de observação de partículas virais ao microscópio eletrônico

Amostras foliares de plantas sabidamente infetadas das variedades IAC 138-22, Merlot, Moscatel Neyde, Niagara Rosada e Syrah foram submetidas para exame ao microscópio eletrônico da Seção de Virologia do Instituto Agrônomo (observações feitas pelos especialistas E. W. KITAJI MA e J. VEGA). Nas seções ultrafinas não foram observadas partículas atribuídas a vírus.

5.6. Controle do enrolamento da folha

Os vinhedos paulistas são formados através da multiplicação clonal de variedades novas e tradicionais, de enxerto e de porta-enxerto. Diante das evidências obtidas de que o vírus do enrolamento da folha não tem vetor e nem se transmite por meios mecânicos, pode-se postular que o controle da moléstia pelo uso de clones sadios será extremamente eficiente. Assim sendo, procurou-se estudar a possibilidade da obtenção desses clones através da indexação e termoterapia.

5.6.1. Indexação

Esse método consistiu em testar, individualmente, videiras das variedades de enxerto e de porta-enxerto de sanidade a ser determinada, mediante união de tecidos em videiras indicadoras, para encontrar plantas sadias destinadas à constituição de matrizes. Os materiais propagativos foram coletados de videiras que tinham sido previamente selecionadas do ponto de vista morfológico, durante a vegetação. As indicadoras foram mantidas sob observação durante 2-3 ciclos vegetativos; quando necessário.

Indivíduos com teste negativo para o vírus do enrolamento da folha foram encontrados para as variedades de copa Couderc, Isabel, Itália, Seibel 2 e Seyve Villard 5276; e de cavalo Golia, IAC 313, IAC 766, Kober 5BB, Rupestris du Lot, Traviú e 420A. Quando essas videiras isentas do enrolamento da folha foram testadas para outros vírus que ocorrem em São Paulo, foi verificado que somente as plantas das variedades Couderc, Itália e Seyve Villard 5276 estavam infetadas, por um vírus que causa uma moléstia chamada mosaico das nervuras.

Não foram encontradas plantas sadias das seguintes variedades de copa: Alphonse Lavallée, Barbera, Bonarda, IAC 138-22, IAC 116-31, Malegue, Moscatel de Hamburgo, Niagara Branca, Niagara Rosada e Pirovano 87.

5.6.2. Termoterapia

A obtenção de clones sadios através da aplicação de calor vem sendo estudada para as variedades que estavam totalmente infetadas. Três métodos foram investigados: (a) tratamento de estacas dor-

mentes em banho-maria a 52°C durante 1, 3 e 5 horas; (b) tratamento de estacas dormentes em estufa de ar quente a 38°C durante 30 dias e (c) tratamento de plantas brotadas, dentro de câmara térmica regulada a 38°C durante 50-60 dias, com multiplicação posterior do ápice desenvolvido sob tratamento (1 cm de comprimento), mediante enxertia em plantas de semente de videira de crescimento vigoroso.

No tratamento em banho-maria a 52°C, foram tratadas estacas dormentes da variedade de uva fina Diamante Negro (Pirovano 87). Houve brotação de 4 estacas de 5 tratadas por 1 hora, 5 de 5, por 3 horas e 5 de 5, por 5 horas. No método de ar quente, foram conseguidas 2, 1 e 3 plantas de cada 15 estacas tratadas das variedades Niagara Rosada, Syrah e Traviú, respectivamente. Observações e testes de detecção do vírus nos materiais sobreviventes mostraram que as estacas dormentes, tratadas segundo os dois métodos descritos, deram origem a plantas infetadas.

No método baseado na vegetação de videiras dentro de câmara térmica a 38°C, foram tratadas 1 planta de Niagara Rosada e 1 de Pinot Noir. Obtiveram-se 3 brotos da primeira variedade depois de 57 dias de tratamento e 4 da segunda, depois de 56 dias, que foram enxertados em plantas de semente de videira. Houve formação de apenas 1 planta de cada variedade. As observações de sintomas no clone de Pinot Noir e os testes de detecção do vírus no clone de Niagara Rosada, mediante uso de videiras indicadoras LN-33 e PN 31, não mostraram qualquer evidência de estarem infetados pelo vírus do enrolamento da folha.

6. DISCUSSÃO

As variedades de enxerto e de porta-enxerto de videira cultivadas em São Paulo, em sua grande maioria, foram introduzidas como material propagativo há muitos anos, da Europa e dos Estados Unidos, quando pouco se conhecia sobre as moléstias de vírus dessa planta. A maior parte das viroses conhecidas da videira foi identificada a partir de 1950 nessas regiões, mas os estudos mais significativos sobre epidemiologia e controle desenvolveram-se na década de 60 (BELLI, 1969). No caso do enrolamento da folha que ocorre no estrangeiro, considerado moléstia de vírus desde 1936, quando foi determinada sua transmissão por união de tecidos, os trabalhos sobre indexação foram iniciados em 1956 por HARMON e WEIBERGER e posteriormente, desenvolvidos por GOHEEN *et alii* (1959), ambos nos Estados Unidos. Esses fatos indicam que as introduções de muitas variedades cultivadas no Estado de São Paulo antecederam os estudos de seleção de plantas sadias desenvolvidas no mencionado país norte-americano e na Europa. Assim sendo, é quase uma certeza que muitos dos vírus mais tarde constatados nesses dois continentes também ocorram no Brasil, tendo sido introduzidos em material propagativo infetado. É também possível que ocorram em nossos vinhedos doenças induzidas por vírus que infetam plantas de nossa flora natural, como acontece com algumas outras cultivadas. É provável que as viroses existentes no Brasil sejam comuns aos vários Estados vitícolas nacionais, uma vez que têm sido intensas as trocas de material propagativo de copa e de cavalo entre as regiões produtoras.

Das viroses constatadas em São Paulo pelo autor, o enrolamento da folha destacou-se pela maior frequência com que tem sido observado em algumas variedades, evidenciando ser uma das mais importantes moléstias de vírus da videira no Estado. É também chamado vermelhão ou amarelo, pelo fato de as plantas infetadas de algumas variedades apresentarem sintomas de avermelhamento ou amarelecimento das folhas. Contudo, a denominação enrolamento da folha é mais utilizada, por ser o enrolamento dos bordos foliares um dos sintomas mais consistentes da moléstia.

Com base na sintomatologia e nos estudos de transmissibilidade e do círculo de hospedeiras, confirmou-se experimentalmente que o enrolamento da folha é idêntico ao "grapevine leafroll", moléstia de vírus que ocorre no estrangeiro (GOHEEN *et alii*, 1958; VUITTENEZ, 1958). Essa correspondência é também uma das razões da utilização do nome enrolamento da folha para a virose que ocorre em São Paulo.

Nos exames feitos ao microscópio electrónico, não foram observadas partículas de vírus que pudessem ser associadas ao enrolamento da folha nas secções ultrafinas de tecidos de videira sabidamente infetada. TANNE *et alii* (1977), que observaram partículas de 13 x 790 nm, do grupo do vírus Y da batata, em "dip" de plantas herbáceas que tinham sido inoculadas com extratos de folhas de videira infetada pelo enrolamento da folha, também não conseguiram detectar essas partículas em tecidos de videira. Esses autores atribuem esse fato à alta diluição ou a uma localização muito específica do vírus na videira ou ainda, à possibilidade de o vírus raramente aparecer como partícula madura nessa hospedeira. Entretanto, desde que não foi encontrada qualquer outra evidência física da presença do vírus em tecidos de videira, TANNE *et alii* (1977) preferiram denominar as partículas detectadas como vírus associado ao enrolamento da folha e não vírus do enrolamento. É possível que outros estudos possam melhor esclarecer a relação entre partículas alongadas do grupo Y da batata presente nas plantas-teste e a referida moléstia.

O vírus do enrolamento da folha foi facilmente transmitido por vários métodos de união de tecidos. Essa transmissão somente ocorreu nos casos em que houve união dos tecidos sadios e infetados. O simples contato físico entre esses tecidos não possibilitou a passagem do vírus. Esse fato geralmente tem sido associado com vírus de floema, pois esses agentes requerem o desenvolvimento de uma conexão vascular para transmissão por enxertia.

Testes de transmissão do vírus pela semente deram resultados negativos, o que concorda com os obtidos por BOUBALS (1969). A existência de plantas sadias com 20-30 anos de idade sob condições de campo, apesar de expostas à infecção pelo vírus durante muitos anos, mostra que o agente do enrolamento da folha não tem vetor ou este é muito pouco eficiente. Caso semelhante já foi assinalado na Califórnia por LUHN e GOHEEN (1970), que testando 110 videiras de uma plantação de 75 anos de idade, encontraram apenas 18% de plantas infetadas pelo vírus do enrolamento da folha, distribuídas ao acaso, reforçando as evidências obtidas por muitos autores de que não há ou há pouca disseminação natural do vírus (GOHEEN e HEWITT, 1964; BOUBALS, 1971).

As tentativas de transmissão do vírus do enrolamento da folha por inoculação mecânica também deram resultados negativos, concordando com os obtidos pela maioria dos autores. Entretanto, é interessante apontar que utilizando extratos de RNA de folhas infetadas ou de sucos resultantes da maceração de folhas em presença de detergente, TANNE *et alii* (1974) conseguiram infetar plantas herbáceas a partir de videiras com enrolamento da folha. Segundo esses autores, a extração do inóculo através dos dois métodos foi feita com base na hipótese de que o vírus do enrolamento da folha estaria tão firmemente ligado às estruturas intracelulares, que os meios comumente utilizados para a extração do suco seriam inadequados para a separação do vírus dessas estruturas. Possivelmente, os resultados negativos de inoculação por fricção de suco obtidos no presente estudo, também poderiam ser explicados com base nessa hipótese, uma vez que os diluentes utilizados na obtenção de suco foram os normalmente recomenda

dos para a transmissão de outros vírus, sejam da videira ou de outras plantas. Os outros métodos adotados, como pica-couve, picadas-de-agulha e pseudo-encostia, também deram resultados negativos. Apesar disso, é difícil interpretar esses resultados, pois os conhecimentos existentes a esse respeito são contraditórios. De um lado, existem estudos cujos resultados sugerem que o agente do enrolamento da folha da videira é vírus associado aos tecidos do floema. Isso porque o referido patógeno causa degeneração do floema (HOEFERT e GIFFORD, 1965, 1967 a) e provoca acúmulo de carboidratos nas folhas de planta infetada (GOHEEN e SCHNATHORST, 1961; HOEFERT e GIFFORD, 1967 a). Com base nessa suposição, os resultados negativos conseguidos aqui e por muitos autores de outros países nas tentativas de transmissão mecânica do vírus poderiam ser facilmente explicados, se levar em conta a generalização feita de que os vírus de floema são de difícil transmissão e introdução nesse tipo de tecido condutor. Entretanto, em recentes estudos, GARNSEY *et alii* (1977) conseguiram transmitir o vírus da tristeza de uma planta de citros infetada para outra sadia mediante utilização de instrumentos de corte contaminados. Como se sabe, esse vírus é considerado associado aos tecidos do floema (COSTA *et alii*, 1949; PRICE, 1966). Embora seja difícil entender como ocorre a introdução das partículas do vírus da tristeza em tecidos de citros, o resultado indica que os outros vírus de floema também podem ser transmitidos mecanicamente, dependendo dos métodos adotados. Por outro lado, as investigações feitas por TANNE *et alii* (1974, 1977) sugerem que o vírus isolado mecanicamente para plantas herbáceas a partir de videira com enrolamento da folha é associado ao parênquima, pois foi determinado como pertencente ao grupo do vírus Y da batata. Esses autores acrescentam também que, inoculando videiras saudáveis com extratos de RNA obtidos de planta herbácea infetada pelo vírus do enrolamento da folha, foi possível observar sintomas típicos da moléstia e posteriormente, reinfetar plantas herbáceas a partir dessas videiras inoculadas. Diante disso, torna-se bastante difícil conciliar esses resultados. Seria interessante desenvolver novos estudos, principalmente no sentido de obter a transmissão mecânica de vírus a partir de videira com enrolamento da folha e de observar partículas do vírus em tecidos des-

sa mesma planta, para melhor comparar os conhecimentos já existentes a esse respeito.

Os levantamentos feitos nas principais regiões vitícolas do Estado confirmaram experimentalmente a suposição inicial de que o enrolamento da folha era moléstia de incidência elevada.

As variedades tradicionais de *V. vinífera*, como era esperado, apresentaram alta incidência do vírus do enrolamento da folha. Isso porque, sendo videiras bastante antigas, devem ter acumulado vírus durante os seus muitos anos de propagação vegetativa. Além disso, é provável que para essa situação também tenha contribuído o fato de que as introduções iniciais de material propagativo já devem ter vindo infetadas e que a multiplicação do material sob as nossas condições só passa ter aumentado o teor do vírus acumulado. Isso porque a introdução geralmente se processa a partir de uma pequena quantidade de material de propagação. Se infetado, sua multiplicação irá dar origem a plantas totalmente infetadas. Outro aspecto bastante importante que favorece a introdução de material infetado é que muitas variedades não mostram sintomas quando infetadas pelo enrolamento da folha ou os exibem de modo pouco conspícuo. Mesmo que mostrem, a coleta de material é feita durante a época da dormência, de tal modo que não há possibilidade de se efetuar a seleção de plantas aparentemente sadias através da sintomatologia (KAHN *et alii*, 1963).

Os testes feitos com material de Niagara Branca mostraram 100% de infecção pelo vírus do enrolamento da folha. Portanto, o fato de a Niagara Rosada estar 100% infetada pelo vírus poderia ser explicado com base de que a planta de Niagara Branca, da qual se originou por mutação, já estava infetada pelo patógeno. Além disso, o fato de todas as oito plantas de Niagara Rosada, que tinham aproximadamente 30 anos de idade no ano da coleta de material (1973) e cultivadas na propriedade onde se deu a mutação, estarem infetadas, reforça essa hipótese.

A menor incidência do vírus do enrolamento da folha encontrada na variedade americana Isabel, na vinífera Itália, nos híbridos franceses Seibel 2, Couderc e Seyve Villard 5276 e nos cavalos Golia, IAC 313, IAC 766, Kober 5BB, Rupestris du Lot, 106-8 e 420A, provavelmente deve-se ao fato de serem eles, videiras de criação mais recente e por certo, não tiveram tempo de acumular vírus, como as antigas viníferas.

As variedades novas IAC 138-22 e Rainha apresentaram 100% de infecção nos testes realizados. Como essas variedades resultam de plantas de semente e como o vírus do enrolamento da folha não passa por esse meio, a alta incidência nessas videiras pode ser interpretada como decorrente da infecção das plantas originais, que devem ter sido enxertadas sobre cavalos infetados. Isso mostra a importância de multiplicar os "seedlings" prometedores em cavalos sadios, nos projetos de melhoramento da videira.

Nos testes de indexação, constatou-se que os materiais propagativos coletados das brotações espontâneas dos cavalos das combinações em que a copa estava infetada, mostraram resultados positivos na detecção do vírus. Embora isso fosse esperado, esses dados revelam a importância desse tipo de material para a perpetuação da moléstia. Nas condições normais de cultivo da videira em São Paulo, observações e indagações feitas pelo autor através dos anos, permitiram verificar que numerosos viticultores, principalmente os que cultivam variedades para vinho ou para produção de uvas populares de mesa, obtêm estacas de cavalos para ampliação do vinhedo de sua própria plantação já estabelecida ou da de outros viticultores. Os materiais são então coletados de maneira indiscriminada, seja das brotações de combinações ainda produtivas ou decadentes, em vias de serem substituídas por novas ou de porta-enxertos, que sobreviveram após a morte da copa. Além disso, um considerável número obtém de outros viticultores, estacas de ramos resultantes de decepamentos feitos em cavalos, que haviam sido plantados no ano anterior, para efetuar a garfagem de variedades de copa. Com exceção dos agricultores que plantam variedades de uvas finas, são poucos os que procuram materiais propagativos das plantas ma-

trizes de cavalos das estações experimentais do Instituto Agrônomico e cooperativas. O procedimento adotado por esses viticultores assume grande importância do ponto de vista epidemiológico quando a coleta de estacas de cavalo é feita nas regiões onde são cultivadas variedades altamente infetadas de copa, como as Niagaras e viníferas tradicionais. Isso implica na certeza de infecção dos enxertos de plantas sadias que forem feitos, seja de variedades novas ou antigas. O estabelecimento de um vinhedo nessas condições poderá apresentar uma porcentagem de infecção próxima de 100%.

Os resultados de determinação da incidência do vírus do enrolamento da folha mostraram que o nível de infecção de certas variedades plantadas em diferentes localidades do Estado apresentou variações significativas entre regiões. Entretanto, essas diferenças não podem ser interpretadas como decorrentes de efeito regional sobre a incidência do patógeno. Os valores observados para as variedades Isabel, Itália, Seibel 2 e Seyve Villard 5276 devem ser interpretados como correlacionados com o nível de infecção do material propagativo dessas variedades que foi introduzido nas respectivas localidades, visto não haver um vetor do vírus causador e nem ser reconhecida influência do ambiente sobre a moléstia.

A ocorrência do vírus do enrolamento da folha foi constatada em São Paulo em 1972 e posteriormente, no Rio Grande do Sul (KUHN e SIQUEIRA, 1974). Em materiais propagativos de videiras provenientes de outros estados brasileiros (Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina), o autor também constatou a ocorrência desse vírus. Esses fatos confirmam a suposição inicial de que muitos dos vírus encontrados no Brasil são comuns aos vários centros vitícolas nacionais, devido às intensas trocas de material propagativo de copa e de cavalo entre essas regiões. Embora o número de amostras procedentes daqueles estados tenha sido pequeno, foi o vírus do enrolamento da folha detectado na maior parte delas, sendo de se supor que a incidência da moléstia nessas regiões seja idêntica à encontrada em São Paulo.

A determinação das perdas quantitativas e qualitativas induzidas pelo vírus do enrolamento da folha nas principais variedades de uva cultivadas em São Paulo ainda não foi feita. A importância da moléstia como fator de perda só é reconhecida através de observações de plantas sadias e infetadas de algumas variedades, como Itália e Seibel 2. Nestas, as plantas infetadas têm mostrado redução no vigor e na produção em relação às sadias. O maior desenvolvimento notado nos clones sadios de Niagara Rosada e Pinot Noir, resultantes de plantas tratadas por termoterapia, quando deixadas crescer ao lado das infetadas, indica que o vírus exerce influência negativa sobre o vigor das plantas dessas variedades. Na variedade de *V. vinifera* Pinot Noir, isso já era conhecido em outros países (BOVEY *et alii*, 1975). Na Niagara Rosada, que é híbrida de *V. labrusca*, a ação do vírus não era conhecida. Como a planta dessa videira, submetida a tratamento de calor, havia sido testada e considerada sadia com relação aos outros vírus constatados em São Paulo, a diferença observada no desenvolvimento vegetativo, provavelmente, deve-se ao fato de ter havido inativação térmica do vírus do enrolamento da folha. Essa evidência pode ser reforçada pelas afirmativas de GOHEEN (1970), nos Estados Unidos, de que plantas infetadas de algumas variedades de *V. labrusca* e híbridos desta espécie são mais reduzidas em crescimento do que plantas sadias. Assim sendo, é provável que em comparações experimentais os clones sadios dessas videiras venham a mostrar consideráveis ganhos de produção. Isso também é de se esperar para algumas outras variedades cultivadas em São Paulo.

Resultados de transmissão do vírus do enrolamento da folha por união de tecidos mostraram que em todo material testado de espécies do gênero *Vitis* não foi encontrada resistência ao vírus. Todas comportaram-se como susceptíveis e houve facilidade na recuperação do vírus para videiras indicadoras. Isso corrobora as afirmações de GOHEEN (1970) de que o vírus pode infetar todas as variedades e espécies desse gênero.

Do ponto de vista de sintomas, somente variedades e híbridos de *V. vinífera* e *V. labrusca* mostraram reação, embora variassem em se verdade. Todas as outras não apresentaram sintomas definidos. Essas videiras que não mostram sintomas podem representar importante papel na epidemiologia da moléstia, pois podem perpetuar o vírus no caso de serem variedades de copa ou servem para infectar variedades sadias de copa quando utilizadas como cavalo. É de se presumir que, dentre essas videiras sem sintomas, existam variedades tolerantes de copa e nesse caso, as perdas sejam reduzidas ou inexistentes, a não ser que o cavalo seja extremamente susceptível. A incorporação genética de tolerância em variedades de valor que são bastante sensíveis, visando reduzir as perdas causadas pelo enrolamento da folha não se justifica, e nem mesmo a incorporação de resistência ou imunidade, se existentes, pois o uso de material sadio de enxerto e de porta-enxerto promove controle inteiramente satisfatório da moléstia, pois não há transmissão natural do vírus.

Ainda no estudo do círculo de hospedeiras, não foi conseguida pelo autor a transmissão mecânica do vírus do enrolamento da folha para plantas-teste herbáceas. O sucesso na transmissão poderia possibilitar a descoberta de uma planta indicadora de ciclo curto. Isso ofereceria a vantagem de permitir a detecção rápida do vírus em material propagativo de videira, ao contrário da diagnose da moléstia pela utilização de videiras indicadoras, que demanda em média 15 meses, o que é tempo muito longo.

Determinadas variedades de videira mostram amarelecimento do limbo quando infectadas pelo vírus do enrolamento da folha; outras, com maior tendência ao desenvolvimento de antocianina, apresentam avermelhamento. Essa diferença é característica da planta infectada e não é relacionada com a reação da planta fonte de vírus. Nos dois casos, as plantas sadias distinguem-se pela cor verde das folhas. Em muitas viníferas tradicionais cultivadas em São Paulo, esses sintomas de amarelecimento ou avermelhamento causados pelo vírus são tão generalizados que frequentemente levam os viticultores a considerar essa manifestação como decorrência natural

da maturação das plantas. Pelo mesmo motivo, sabe-se que a descrição de algumas variedades de videira feita em outros países, há muitos anos, foi baseada na observação de plantas com sintomas do enrolamento da folha (GOHEEN *et alii*, 1959; GOHEEN e COOK, 1959).

A diagnose segura do enrolamento da folha não pode ser feita através da observação de sintomas de plantas infetadas, mas tem que repousar no uso de videiras indicadoras. Isso porque somente viníferas tradicionais e alguns híbridos desta espécie mostram sintomas em campo. Muitas outras variedades cultivadas em São Paulo não mostram sintomas ou os exibem de modo pouco conspícuo. Além disso, os sintomas de avermelhamento ou amarelecimento e enrolamento das folhas podem ser provocados por outros fatores, como deficiência de magnésio, danos provocados por ácaros, infecção por oídio, efeito da insolação, excesso ou falta de umidade, senescência, etc.

O híbrido LN-33, a variedade Pinot Noir e dois clones novos obtidos de plantas de semente da variedade Pinot Noir, foram os que melhor se comportaram como videiras indicadoras. Dentre essas, o LN-33 tem merecido a preferência do autor, por ser planta de crescimento vigoroso e de fácil propagação sob condições de estufa. Mas todas essas videiras podem ser perfeitamente adotadas como indicadoras do enrolamento da folha para as condições de São Paulo.

O fato de algumas indicadoras inoculadas não apresentarem sintomas na brotação logo após a enxertia, mas apresentarem na brotação de primavera seguinte, mostra a necessidade de esperar por esta, antes que a diagnose negativa seja conclusiva.

Videiras indicadoras infetadas colocadas fora de estufa apresentaram sintomas mais fortes e mais cedo do que as mantidas dentro. Isso pode ser explicado na base de que sendo os sintomas do enrolamento da folha associados à maturação dos tecidos, aquelas de estufa, que levam mais tempo para atingir esse estágio, demorariam mais tempo para exibir sintomas. Assim sendo, os trabalhos de identificação da moléstia por meio de

videiras indicadoras podem ser perfeitamente efetuados fora de estufa, pois, além do ganho de tempo, não há perigo de contaminação pelo vírus do enrolamento da folha, porque este não tem vetor.

Os resultados obtidos nos experimentos de comparação de quatro métodos de transmissão por união de tecidos mostraram que cada qual apresenta vantagens e desvantagens para os trabalhos de indexação e melhor aproveitamento de material. A encostia e a enxertia de gema inóculo oferecem melhor pegamento dos enxertos e são de fácil execução. Apresentam a desvantagem de exigir uma planta de estaca de videira indicadora para cada material a ser testado. A dupla-enxertia de gema e a enxertia de gema indicadora, que mostraram resultados apenas satisfatórios no pegamento, apresentam as vantagens de exigir pequena quantidade de material de videira indicadora e de possibilitar maior frequência de leitura positiva na primeira brotação. É possível que, nesses dois métodos, a porcentagem de pegamento possa ser aumentada, mediante enxertia de duas ou até mais gemas indicadoras. A escolha de cada técnica depende portanto, da disponibilidade de material sadio no momento da enxertia. Entretanto, quando se pretende desenvolver estudos sobre as moléstias de vírus dessa planta, seja do enrolamento da folha ou outras, durante vários anos, é recomendável que se prepare um grande número de plantas de estaca da indicadora, para que se possa adotar o método da enxertia de gema inóculo. Isso porque é de fácil e rápida execução, além de apresentar alto índice de pegamento, principalmente quando se enxerta mais de uma gema inóculo.

A enxertia de gema indicadora em planta infetada e dupla enxertia de gema induziram manifestação de sintomas nas folhas da brotação corrente da indicadora em muitos casos, o que raramente se deu no caso da encostia e enxertia de gema inóculo. Esse resultado é fácil de ser explicado no caso da gema indicadora, pois esta, ao brotar, receberia vírus juntamente com os elaborados do cavalo. No caso da encostia, após a brotação do ramo inóculo, é de se esperar que o vírus seja levado primeiramente para as raízes e só mais tarde, para os brotos da indicadora. O processo de infecção seria, portanto, mais demorado do que no método anterior.

A inexistência de vetor indica que o controle do enrolamento da folha pode ser facilmente efetuado por meio da utilização de materiais propagativos sadios. Essa medida é considerada tão eficiente que, para certos vírus de plantas de propagação vegetativa, como a videira, pode-se pensar em termos de erradicação em determinadas áreas de cultivo, bastando que as atuais plantações sejam cuidadosamente substituídas por novas, na base de materiais sadios de copa e de cavalo.

Essa medida de controle já é aplicável para 3 variedades comerciais de copa (Isabel, Niagara Rosada e Seibel 2) e 7 de porta-enxerto (Golia, IAC 313, IAC 766, Kober 5BB, Rupestris du Lot, Traviú e 420A), pois foram obtidos clones sadios dessas videiras. Isso, contudo, ainda não é possível para 3 variedades de copa (Couderc, Itália e Seyve Villard 5276), pois embora estejam livres do vírus do enrolamento da folha, necessitam ser selecionadas com relação ao vírus do mosaico das nervuras, uma vez que estão infetadas por esse patógeno.

A obtenção de clones sadios mediante tratamento de plantas infetadas pelo vírus do enrolamento da folha dentro de câmara térmica (50-60 dias a 38°C) confirma os resultados conseguidos em outros países (GOHEEN *et alii*, 1965; OVER DE LINDEN e CHAMBERLAIN, 1970 b; BOVEY *et alii*, 1974). Assim sendo, através de mesmo método, é altamente provável que se obtenham clones sadios de outras variedades de importância comercial para São Paulo, que estejam totalmente infetadas pelo vírus do enrolamento da folha ou outros.

Com o material obtido através das maneiras indicadas, estão sendo constituídas matrizes que poderão fornecer material de propagação aos interessados, como já vem sendo feito para outras culturas no Estado. Espera-se também que a utilização de clones sadios possa propiciar melhores colheitas e maior longevidade produtiva das plantas, possibilitar a multiplicação de clones novos sem risco de infecção inicial e evitar o aparecimento de complexos viróticos. Além disso, a manutenção e propagação dessas matrizes não precisam ser feitas sob proteção, pois as viroses que ocorrem em São Paulo não têm vetores conhecidos.

A obtenção de matrizes sadias poderá propiciar o desenvolvimento de uma importante atividade dentro da própria viticultura, que consiste na produção e comercialização de material certificado por parte dos lavradores ou viveiristas produtores de mudas certificadas. Essa atividade pode constituir-se em importante fonte de lucro, pois assim é para algumas culturas onde ela já se encontra bem desenvolvida.

O uso de material sadio já é feito em outros países vitícolas e se tornou rotina em alguns deles. As vantagens que vem oferecendo às regiões que o adotaram têm sido indiscutíveis, pois videiras sadias têm-se distinguido pelo excelente vigor, regularidade no crescimento e por grande aumento na produção, de 10 a 70%, dependendo da variedade (BOVEY *et alii*, 1975). São Paulo, portanto, não poderia permanecer alheio nesse campo.

7. CONCLUSÕES

- o enrolamento da folha, moléstia que ocorre nos vinhedos do Estado de São Paulo, é considerado idêntico ao "grapevine leafroll" presente em outros países;

- apesar de não terem sido quantificadas, considera-se que o enrolamento da folha é causa de perdas sensíveis na produção vitícola do Estado, embora não sejam reconhecidas pelos viticultores;

- a transmissão do vírus do enrolamento da folha não ocorre sob condições naturais, pois não tem vetor e nem passa por meios mecânicos. A presença do vírus nos vinhedos resulta de sua perpetuação através da propagação vegetativa de plantas infetadas de copa, cavalo ou ambos;

- o controle do enrolamento da folha pode ser conseguido de modo inteiramente satisfatório, através do uso de material propagativo sado de copa e de cavalo;

- é de mais alta importância que cooperativas e outras entidades mais ligadas à viticultura concentrem seus esforços no sentido de que um programa destinado à certificação de matrizes e produção de mudas certificadas isentas de vírus seja colocado em prática. A aplicação dessa medida é essencial para a racionalização da viticultura paulista.

8. SUMMARY

STUDIES ON GRAPEVINE LEAFROLL IN THE STATE OF SÃO PAULO

The occurrence of a virus disease "enrolamento da folha", identical to grapevine leafroll, in vineyards of the State of São Paulo, Brazil, previously suspected by symptom observation, was experimentally confirmed. The disease is also known by the Portuguese names equivalent to red leaf or yellow leaf disease. It was also identified in tests with propagative materials from the states of Minas Gerais, Paraná and Santa Catarina. In São Paulo, transmission tests to indicator plants showed that the incidence of leafroll was 100% in the varieties Alphonse Lavallée, Barbera, Bonarda, IAC 138-22, IAC 116-31 (Rainha), Malegue, Muscat Hambur, Niagara, Pink Niagara and Pirovano 87; infection ranged from 40 to 70% in the varieties Couderc, Isabella, Italia (Pirovano 65), Seibel 2 and Seyve Villard 5276. Leafroll was present in percentages varying from 25 to 55% in the rootstock varieties Golia, Kober 5BB, Rupestris du Lot, 106-8 (Traviú) and 420A; the virus was not present in samples of two new rootstocks IAC 313 and IAC 766.

No experimental data are available to indicate the amount of losses caused by the grapevine leafroll virus. But it has been noticed that diseased plants of some varieties show reduction in growth and lower yields than healthy ones.

Typical foliar symptoms of leafroll consist of downward rolling and yellowing or reddening of the leaf blades, depending on the variety, during late summer and fall. Many rootstocks used in São Paulo show no symptoms when infected, and scion varieties may or may not show them. Thus, tests on indicator varieties are necessary for identification of the disease in most cases. Besides, other agents that cause reddening, yellowing or even rolling of grapevine leaves were recognized.

Graft inoculation tests showed that clones of LN-33, Pinot Noir and of new clones obtained from seedlings of Pinot Noir are good indicators for the leafroll virus under São Paulo conditions. Virus detection in these indicators was more reliable when symptoms were observed in mature leaves of shoots of the first spring flush formed after infection.

Negative results were obtained in transmission tests of grapevine leafroll virus by seed and by mechanical means. There is no evidence for the existence of a vector. No virus particles were observed in ultrathin sections of infected grapevine under the electron microscope. There is, invariably, perpetuation of the disease by propagation of infected plants. This is the principal cause of the high incidence of leafroll in São Paulo.

Control of leafroll can be easily accomplished by use of virus-free stocks. In indexing tests, it was possible to select healthy clones of the scion varieties Isabella and Seibel 2 and of the rootstocks Golia, IAC 313, IAC 766, Kober 5BB, Rupestris du Lot, 106-8 and 420A. Healthy clones of Pink Niagara, that was 100% infected with the leafroll virus, were obtained by heat therapy. Plants of Italia, Couderc and Seyve Villard 5276 were selected as leafroll virus-free, but these were infected with another virus.

A collection of virus-free parent plants for propagative material of the most important varieties used in São Paulo as scions and rootstocks is being established. It is recommended that a certification program of healthy stocks and production of certified plants be carried out in São Paulo. This will be of advantage also for other grape cultivating areas of Brasil.

9. LITERATURA CITADA

- ALBACH, R., R. E. KEPNER e A. D. WEBB, 1959. Comparison of anthocyan pigments of red vinifera grapes. II. Am. J. Enol. Vitic. Davis, 10: 164-172.
- ALLEY, C. J., A. C. GOHEEN, H. P. OLMO e A. T. KOYAMA, 1963. The effect of virus infections on vines, fruit and wines of Ruby Cabernet. Am. J. Enol. Vitic. Davis, 14:164-70.
- BALDACCI, E. e G. BELLI, 1967. Nuovi risultati sulla selezione clonale di viti esenti da virus. Riv. Pat. Veg. Pavia, 3:263-267. (série IV).
- BALDACCI, E., G. BELLI e E. REFATTI, 1967. Virosi e selezione della vite. Bologna, Ed. Agricole. 61 p. (2^o série, n^o 42).
- BALDACCI, E., G. BELLI, A. FORTUSINI e R. OSLER, 1972. Selezione sanitaria della vite in Italia setentrionale: risultati e considerazioni. IV^e Conférence du Groupe International d'Étude des Virus et des Maladies à Virus de la Vigne, Colmar, Fr., 1970. Ann. Phytopathol. Paris, INRA Publ. 72-4, p. 13-16. (número especial).
- BELLI, G., 1969. Rassegna delle ricerche sulle virosi della vite. Riv. Pat. Veg. Pavia, 5:17-36. (série IV).
- BELLI, G. e R. CESATI, 1967. Frequenza dell'accartocciamento fogliare della vite in Lombardia. Riv. Pat. Veg. Pavia, 3:105-112. (série IV).
- BEUKMAN, E. F. e A. C. GOHEEN, 1970. Grape corky bark. In: FRAZIER, N. W., Ed. Virus diseases of small fruits and grapevines. Berkeley, Univ. California, Div. Agr. Sci., p. 207-209.

- BOUBALS, D., 1969. Observations sur la non-transmission par graine de deux viroses chez la vigne (*Vitis vinifera* L.). Ann. Amél. Plantes. Paris, 19:213-219.
- BOUBALS, D., 1971. Importance économique des viroses de la vigne. Circonstances favorisant leur propagation. Lutte contre ses maladies. Bull. Off. Int. Vin. Paris, 44:5-39.
- BOUBALS, D., 1972 a. Observations sur l'infection par le virus de l'enroulement chez le Carignan et l'Alicante Bouschet. IV^e Conférence du Groupe International d'Étude des Virus et des Maladies à Virus de la Vigne, Colmar, Fr., 1970. Ann. Phytopathol. Paris, INRA Publ. 72-4. p. 27-30. (número especial).
- BOUBALS, D., 1972 b. Observations sur l'infection par le virus de l'enroulement chez les porte-greffes usuelles. IV^e Conférence du Groupe International d'Étude des Virus et des Maladies à Virus de la Vigne, Colmar, Fr., 1970. Ann. Phytopathol. Paris, INRA Publ. 72-4. p. 23-25. (número especial).
- BOUBALS, D., R. PISTRE e C. CAILLAUD, 1967. Observations sur la sélection sanitaire chez la vigne pour la virose de l'enroulement. Progr. Agric. Vitic. Montpellier, 84(4):95-99, (5):119-126.
- BOVEY, R., 1965. Identification of viruses in clonally propagated plants having one or more viruses. In: Proc. Int. Conf. on Virus and Vector on Perennial Hosts, with Special Reference to *Vitis*. Davis, Univ. California, Div. Agric. Sci., Dept. Plant Pathol., p. 223-227.
- BOVEY, R., 1970. Importance économique des viroses de la vigne. Bull. Off. Int. Vin. Paris, 43:124-138.
- BOVEY, R., J. J. BRUGGER, J. L. SIMON e A. JAQUINET, 1974. La sélection sanitaire de la vigne en Suisse romande. Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic. Changins, 6:77-83.
- BOVEY, R., H. LEYVRAZ, F. PELET, J. L. PITTON e J. L. SIMON, 1967. Possibilités et limites de la sélection visuelle dans la lutte contre les viroses de la vigne: une expérience avec quelques cépages rouges en Suisse romande. Vitis. Landau (Pfalz), 6:366-374.

- BOVEY, R., M. ROCHAIX e J. L. SIMON, 1975. Résultats et perspectives d'avenir de la sélection sanitaire de la vigne. Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic. Changins, 7:161-166.
- CADMAN, C. F., H. F. DIAS e B. D. HARRISON, 1960. Sap-transmissible viruses associated with diseases of grapevine in Europe and North America. Nature. London, 187:577-579.
- CHAMBERLAIN, E. E., A. J. OVER DE LINDEN e F. BERRY SMITH, 1970. Virus diseases of grapevines in New Zealand. N. Z. Jl. Agric. Res. - Wellington, 13:338-358.
- COOK, J. A. e A. C. GOHEEN, 1961. The effect of a virus disease, leaf-roll, on the mineral composition of grape tissue and a comparison of leafroll and potassium deficiency symptoms. Amer. Inst. Biol. Sci. Washington, publ. n° 8, p. 338-354.
- COSTA, A. S., T. J. GRANT e S. MOREIRA, 1949. Investigações sobre a tristeza dos citrus. II. Conceitos e dados sobre a reação das plantas cítricas à tristeza. Bragantia. Campinas, 9:59-80.
- DETH, P. S., 1973. The New York State grape certification program. N.Y. Food and Life Sci. Quart. Ithaca, 6:5
- DIAS, H. F., 1963. Estudo das viroses da videira. Agronomia Lusitana Oeiras, 25:73-77.
- DIAS, H. F., 1965. Mechanical transmission of viruses to herbaceous - hosts. In: Proc. Int. Con. on Virus and Vector on Perennial Hosts, with Special Reference to *Vitis*. Davis, Univ. California, Div. Agric. Sci., Dept. Plant Pathol., p. 235-247.
- FRANCA; OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN, 1970. Compte rendu des travaux de la Quatrième Conférence Internationale sur les Maladies à Virus de la Vigne, Montpellier, 1970. Bull. Off. Int. Vin. Paris, 43: 1118-1124.
- FRANCKI, R. I. B. e N. C. CROWLEY, 1967. Investigation of suspected grapevine viruses in South Australia. Australian J. Agric. Res. Melbourne, 18:461-466.

- GALZY, R., 1964. Technique de thermothérapie des viroses de la vigne. Ann. Épiphyties. Paris, 15:245-256.
- GARNSEY, S. M., D. GONSALVES e D. E. PURCIFULL, 1977. Mechanical transmission of Citrus tristeza virus. Phytopathology. St. Paul, 67:965-968.
- GARTEL, W., 1971. Importance économique des viroses de la vigne. Circonstances favorisant leur propagation. Lutte contre ces maladies. Bull. Off. Int. Vin. Paris, 44:40-46.
- GIFFORD, E. M., JR. e W. B. HEWITT, 1961. The use of heat therapy and in vitro shoot tip culture to eliminate fanleaf virus from the grapevine. Am. J. Enol. Vitic. Davis, 12:129-130.
- GILMER, R. M., 1966. Virus problems in grapes. In: Ann. Meeting. N. Y. State Hortic. Soc., Geneva. p. 179-180.
- GOHEEN, A. C., 1965. Reaction of grapevines to leafroll virus. In: Proc. Int. Conf. on Virus and Vector on Perennial Hosts, with Special Reference to *Vitis*. Davis, Univ. California, Div. Agric. Sci., Dept. Plant Pathol., p. 136-138.
- GOHEEN, A. C., 1970. Grape leafroll. In: FRAZIER, N. W., Ed. Virus diseases of small fruits and grapevines. Berkeley, Univ. California, Div. Agric. Sci., p. 209-212.
- GOHEEN, A. C. e J. A. COOK, 1959. Leafroll (red-leaf or rougeau) and its effects on vine growth, fruit quality, and yields. Am. J. Enol. Vitic. Davis, 10:173-181.
- GOHEEN, A. C. e W. B. HEWITT, 1964. Diagnosis of leafroll of grapevines. Riv. Pat. Veg. Pavia, 4:427-442. (série III).
- GOHEEN, A. C. e W. C. SCHNATHORST, 1961. Resistance to powdery mildew in leafroll-affected grapevines. Plant Dis. Repr. Beltsville, 45:641-643.
- GOHEEN, A. C., F. N. HARMON e J. H. WEINBERGER, 1958. Leafroll (white Emperor disease) of grapes in California. Phytopathology. St. Paul, 48:51-54.
- GOHEEN, A. C., W. B. HEWITT e C. J. ALLEY, 1959. Studies of grape leafroll in California. Am. J. Enol. Vitic. Davis, 10:78-84.

- GOHEEN, A. C., C. F. LUHN e W. B. HEWITT, 1965. Inactivation of grape vine viruses *in vivo*. In: Proc. Int. Conf. on Virus and Vector on Perennial Hosts, with Special Referente to *Vitis*. Davis, Univ. California, Div. Agric. Sci., Dept. Plant Pathol., p. 255-265.
- HARMON, F. N., 1956. White Emperor virus in Cardinal and Red Malaga grapes. Proc. Amer. Soc. Hortic. Sci. St. Joseph, 67:302-303.
- HARMON, F. N. e E. SNYDER, 1946. Investigations on the occurrence, transmission, spread, and effect of "white" fruit color in the Emperor grapes. Proc. Amer. Soc. Hortic. Sci. St. Joseph, 47:190-194.
- HARMON, F. N. e J. H. WEINBERGER, 1956. Foliage burn of vinifera grapes as a symptom of white Emperor disease. Plant Dis. Rept. Beltsville, 40:300-303.
- HEWITT, W. B., 1963. Maladies à virus des vignes de California: caractéristiques, modes de propagation, identification et méthodes de lutte. Bull. Off. Int. Vin. Paris, 36:45-56.
- HEWITT, W. B., 1968. Viruses and virus diseases of the grapevine. Rev. Appl. Mycol. London, 47:433-455.
- HEWITT, W. B., 1971. Les maladies à virus de la vigne. Symptômes. Mode de dissemination et répartition géographique. Bull. Off. Int. Vin. Paris, 44:97-125.
- HEWITT, W. B., 1965. Report to the Government of Chile on diseases and other problems of Chilean vineyards. Roma, F.A.O. Report n° 1962. 28 p. (Rev. Appl. Mycol. London, 47:115. 1968).
- HEWITT, W. B., A. C. GOHEEN, D. J. RASKI e G. V. GOODING, JR., 1962. Studies on virus diseases of the grapevine in California. Vitis. Landau (Pfalz), 3:57-83.
- HOEFERT, L. L. e E. M. GIFFORD, JR., 1965. Anatomical effects of leaf-roll virus in *Vitis vinifera* L. In: Proc. Int. Conf. on Virus and Vector on Perennial Hosts, with Special Reference to *Vitis*. Davis, Univ. California, Div. Agric. Sci., Dept. Plant Pathol., p. 319.
- HOEFERT, L. L. e E. M. GIFFORD, JR., 1967 a. Grapevine leafroll virus. History and anatomic effects. Hilgardia. Berkeley, 38:403-426.

- HOEFERT, L. L. e E. M. GIFFORD, JR., 1967 b. Trabeculae in the grapevine leafroll virus. Amer. J. Bot. Baltimore, 54:257-261.
- INGLEZ DE SOUSA, J. S., 1969. Uvas para o Brasil. São Paulo, Edições Melhoramentos. 454 p. (Biblioteca Agronômica Melhoramentos).
- JACOB, H. E., W. B. HEWITT e E. L. PROEBSTING, 1941. Red leaf of grapevines in California prevented by controlling mites. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. St. Joseph, 39:285-292.
- KAHN, R. P., W. B. HEWITT, A. C. GOHEEN, J. M. WALLACE, C. N. ROISTACHER, E. M. NUER, P. BRIERLEY, L. C. COCHRAN, R. L. MONROE, W. L. ACKERMAN; J. L. CRÉECH, G. A. SEATON e J. SCHOEN, 1963. Detection of viruses in foreign plant introductions under quarantine in the United States. Plant Dis. Repr. Beltsville, 47:261-265.
- KLIEWER, W. M. e L. A. LIDER, 1976. Influence of leafroll virus on composition of Burger fruits. Am. J. Enol. Vitic. Davis, 27:118-124.
- KUHN, G. B. e O. SIQUEIRA, 1974. Resultados preliminares na transmissão do enrolamento da folha (leafroll) da videira (*Vitis* spp.) no Estado do Rio Grande do Sul. VII Congresso Soc. Bras. Fitopatol., Brasília, DF. (resumo).
- KUNIYUKI, H., 1972. Evidência preliminar de transmissão do enrolamento (vermelhão ou amarelo) da videira em São Paulo. Rev. Soc. Bras. Fitopatol. Fortaleza, 5:165-166. (resumo).
- KUNIYUKI, H., 1973. Novos resultados sobre a transmissão do vermelhão ou amarelo (enrolamento da folha) da videira no Estado de São Paulo. VI Congresso Soc. Bras. Fitopatol., Pelotas, RS. (resumo).
- KUNIYUKI, H. e A. S. COSTA, 1976. Importância de um programa de certificação de videira em São Paulo. Rev. Soc. Bras. Fitopatol. Campinas, 9: 11-12. (resumo).
- LEGIN, R., 1972. Expérimentation pour étudier l'effect des principales viroses sur la végétation et la production de la vigne. IV Conférence du Groupe International d'Étude des Virus et des Maladies à Virus de la Vigne, Colmar, Fr., 1970. Ann. Phytopathol. Paris, INRA Publ. 72-4, p. 49-54. (número especial).

- LEHOCZKY, J., G. P. MARTELLI e G. SÁROSPATAKI, 1969. Leafroll of grapevine in Hungary. Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hungaricae. Budapest, 4:117-124.
- LIDER, L. A., A. C. GOHEEN e N. L. FERRARI, 1975. A comparison between healthy and leafroll-affected grapevine planting stocks. Am. J. Enol. Vitic. Davis, 26:144-147.
- LUHN, C. F. e A. C. GOHEEN, 1970. Viruses in early California grapevines. Plant Dis. Repr. Beltsville, 54:1055-1056.
- McGECHAN, J. K., 1970. Important virus diseases of grapevines in New South Wales. Agric. Gaz. N.S.W. Rydalmere, 81:349-352.
- McKISSOCK, A., 1964. Two important virus diseases of grapevines in New Zealand. N. Z. Jl. Agric. Wellington, 108:332-339.
- MILIKAN, D. F., E. E. PICKETT e D. D. HEMPHILL, 1963. Some preliminary observations on the potassium, magnesium and protein content of grape leaf tissue associated with the leafroll virus and low potassium nutrition. Plant Dis. Repr. Beltsville, 47:213-215.
- MILIKAN, D. F., S. R. KOIRTYOHANN e W. J. UPCHURCH, 1965. Effect of varying levels of potassium and the leaf roll virus upon mineral content of grape leaf tissue. Plant Dis. Repr. Beltsville; 49:36-38.
- NEL, A. C. e D. J. ENGELBRECHT, 1972. Grapevine virus diseases in South Africa and the influence of latent viruses in the nursery. IV Conférence du Groupe International d'Étude des Virus et des Maladies à Virus de la Vigne, Colmar, Fr., 1970. Ann. Phytopathol. Paris, INRA Publ. 72-4, p. 67-74. (nombreo especial).
- OCHS, G., 1959. Ein Virus als Erreger der Rollkrankheit der Rebe. Experientia. Basel, 15:303.
- OVER DE LINDEN, A. J. e E. E. CHAMBERLAIN, 1970 a. Effect of grapevine leafroll virus on vine growth and fruit yield and quality. N. Z. Jl. Agric. Res. Wellington, 13:689-698.
- OVER DE LINDEN, A. J. e E. E. CHAMBERLAIN, 1970 b. Production of virus-free grapevines in New Zealand. N. Z. Jl. Agric. Res. Wellington, 13:991-1000.

- PEREIRA, F. M. e F. P. MARTINS, 1972. Instruções para a cultura da videira, Campinas, Instituto Agrônomo. Boletim nº 199. 48 p.
- PRICE, W. C., 1966. Flexuous rods in phloem cells of lime plants infected with Citrus tristeza virus. Virology. New York, 29:285-294.
- RIBAS, W. C., 1973. Contribuição à ampelologia nacional. II. Melhores variedades da coleção ampelográfica da Estação Experimental de São Roque, S.P. Campinas, Instituto Agrônomo. Circular nº 28. 76 p.
- SANTOS NETO, J. R. A., 1969. A cultura da videira. O Agrônomo. Campinas, 21:67-108.
- SÃO PAULO, Secretaria da Agricultura, Instituto de Economia Agrícola, - 1977 a. Informações Econômicas. São Paulo, 7(5):1-83.
- SÃO PAULO, Secretaria da Agricultura, Instituto de Economia Agrícola, - 1977 b. Prognóstico 77/78. São Paulo. 273 p.
- TANAKA, S., 1976. Indexing grapes in Japan for viruses Ann. Phytopathol. Soc. Japan. Tokyo, 42:192-196.
- TANNE, E. e F. E. NITZANY, 1967. Virus diseases observed on grapevines in Israel. Phytopath. Medit. Bologna, 6:113-114.
- TANNE, E., I. SELA e I. HARPAZ, 1974. Transmission of grapevine leafroll virus to herbaceous plants. Phytopath. Z. Berlin e Hamburgo, 80: 176-180.
- TANNE, E., I. SELA, M. KLEIN e I. HARPAZ, 1977. Purification and characterization of a virus associated with the grapevine leafroll disease. Phytopathology. St. Paul, 67:442-447.
- TAYLOR, R. H. e R. C. WOODHAM, 1972. Indexing grapevines for viruses in Australia. IV Conférence du Groupe International d'Étude des Virus et des Maladies à Virus de la Vigne, Colmar, Fr., 1970. Ann. Phytopathol. Paris, INRA Publ. 72-4, p. 85-87. (Número especial).
- TAYLOR, R. H., R. C. WOODHAM e A. W. ALLAN, 1966. Green grafting: a useful technique for the detection of grapevine viruses. Australian Journ. Exptl. Agr. and Animal Husb. Melbourne, 7:91-95.
- TELIZ, D. e A. C. GOHEEN, 1968. Diseases of grapevines in Mexico. Plant Dis.Reptr. Beltsville, 52:372-374.

- VALAT, C., 1972. Note concernant les travaux de sélection sanitaire conduits par l'Association Nationale Technique pour l'Amélioration de la Viticulture. IV Conférence du Groupe International d'Étude des Virus et des Maladies à Virus de la Vigne, Colmar, Fr., 1970. Ann. Phytopathol. Paris, INRA Publ. 72-4, p. 89-94. (nombre especial).
- VIDANO, C., 1963. Alterazioni provocate da insetti in *Vitis*, osservate, sperimentate, e comparate. Ann. Fac. Sci. Agr. Univ. Torino. Torino, 1:513-644.
- VIDANO, C., 1970. Virus-like symptoms on grapevine induced by insects. In: FRAZIER, N. W., Ed. Virus diseases of small fruits and grapevines. Berkeley, Univ. California, Div. Agric. Sci., p. 256-260.
- VUITTENEZ, A., 1958. Transmission par greffage d'une virose du type "enroulement foliaire" commune dans les vignobles de l'est et du centre est de la France. C. R. Acad. Agric. France. Paris, 44:313-316.
- VUITTENEZ, A., 1967. La sélection sanitaire de la vigne. Bull. Tech. Information. Colmar, France. n° 216. 16 p.
- VUITTENEZ, A., 1970 a. Méthodes de diagnostic des viroses de la vigne. Bull. Off. Int. Vin. Paris, 43:926-943.
- VUITTENEZ, A., 1970 b. Fanleaf of grapevine. In: FRAZIER, N. W., Ed. Virus diseases of small fruits and grapevines. Berkeley, Univ. California, Div. Agric. Sci., p. 217-228.