VÍRUS DO MOSAICO DAS NERVURAS DA VIDEIRA NO ESTADO DE SÃO PAULO

HUGO KUNIYUKI
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Dr. ÁLVARO SANTOS COSTA

Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz",
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Agronomia, Área de Concentração:
Fitopatologia

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro - 1988

K96v Kuniyuki, Hugo
Vírus do mosaico das nervuras da videira no
Estado de São Paulo. Piracicaba, 1988.
96p. ilustr.

Tese - ESALQ
Bibliografia.

1. Mosaico das nervuras em uva - São Paulo
(Estado) 2. Uva - Doença - São Paulo (Estado)
3. Virose vegetal - São Paulo (Estado) 4. Vírus
fitopatogênico - São Paulo (Estado) I. Escola
Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piraci
caba

CDD 634.828

VÍRUS DO MOSAICO DAS NERVURAS DA VIDEIRA
NO ESTADO DE SÃO PAULO

HUGO KUNIYUKI

Aprovada em: 02.03.89

Comissão julgadora:

Prof. Dr. DARCY MARTINS DA SILVA	ESALQ/USP
Prof. Dr. HIROSHI KIMATI	ESALQ/USP
Prof. Dr. VLADIMIR RODRIGUES SAMPAIO	ESALQ/USP
Dr. ÁLVARO SANTOS COSTA	IAC
Dr. GERD WALTER MÜLLER	IAC

Dr. ÁLVARO SANTOS COSTA
Orientador

À minha esposa e

à memória de minha mãe,

D E D I C O

AGRADECIMENTOS

O autor deseja expressar 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 pesquisadores científicos Fernando P. Martins e Hélio S. Scaranari (Estação Experimental de Jundiaí), Maurilo M. Terra e Erasmo J. P. Pires (Seção de Viticultura) e Ivan J.A. Ribeiro (Seção de Microbiologia Fitotécnica), do Instituto Agronômico de Campinas, pela colaboração prestada;

- ao engenheiro agrônomo Antonio Y. Kishino, do Instituto Agronômico do Paraná, Londrina, PR., pelo auxílio prestado;

- aos colegas da Seção de Virologia do Instituto Agronômico de Campinas, pelo apoio e sugestões apresentados durante o desenvolvimento deste trabalho;

- aos funcionários da Seção de Virologia que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho;

- ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão de bolsa de pesquisa;

- ao Instituto Agronômico de Campinas, pela oportunidade de aperfeiçoamento.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	xii
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
4. RESULTADOS	25
4.1. Importância econômica	25
4.1.1. Avaliação da incidência em São Paulo	25
4.1.2. Incidência em amostras procedentes de outros estados do Brasil	31
4.1.3. Avaliação das perdas	31
4.2. Círculo de hospedeiras	34
4.3. Sintomatologia	36
4.3.1. Sintomas do mosaico das nervuras em variedades de copa	36
4.3.2. Sintomas do mosaico das nervuras em porta-enxertos	40
4.3.3. Anomalias de outras causas com sintomas semelhantes aos da virose mosaico das nervuras	42
4.4. Videiras indicadoras	42

4.4.1. Comparação de videiras indicadoras infectadas por 3 isolados do vírus do mosaico das nervuras e mantidas dentro e fora de casa de vegetação	44
4.4.2. Outros fatores que podem influir na manifestação de sintomas em indicadoras mantidas ou colocadas fora de casa de vegetação	46
4.4.3. Tentativas visando induzir o aparecimento de sintomas do mosaico das nervuras nas indicadoras após a brotação de primavera	48
4.5. Etiologia	50
4.5.1. Perpetuação	50
4.5.2. Transmissibilidade	51
4.5.2.1. Transmissão por união de tecidos	51
4.5.2.2. Ligações com cuscuta	55
4.5.2.3. Tentativas de inoculação mecânica	55
4.5.2.4. Transmissão pela semente.	55
4.5.2.5. Vetor	56
4.5.3. Tentativas de visualização de partículas semelhantes a vírus ao microscópio electrónico	58
4.5.4. Isolados do vírus do mosaico das nervuras	58
4.5.4.1. Isolados das variedades Kioho e Olimpia	58
4.5.4.2. Isolado fraco do vírus do mosaico das nervuras obtido da variedade Itália ..	62

	Página
4.6. Controle	64
4.6.1. Indexação	65
4.6.2. Medidas curativas	65
4.6.2.1. Termoterapia	65
4.6.2.2. Microenxertia	67
5. DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

LISTA DE TABELAS

TABELA		Página
1	Porcentagem de infecção pelo vírus do mosaico das nervuras em amostras das principais variedades de copa de videira cultivadas ou mantidas em coleção em São Paulo	26
2	Porcentagem de infecção pelo vírus do mosaico das nervuras em amostras de 12 variedades de copa procedentes de importantes regiões vitícolas do Estado de São Paulo	29
3	Porcentagem de infecção pelo vírus do mosaico das nervuras em amostras de plantas matrizes dos principais porta-enxertos de videira utilizados ou mantidos em coleção em São Paulo	30
4	Porcentagem de infecção pelo vírus do mosaico das nervuras em material propagativo de 5 porta-enxertos coletado de plantações comerciais	32
5	Incidência do vírus do mosaico das nervuras em material propagativo de videira procedente de outros estados do Brasil	33
6	Reação apresentada por plantas de diferentes variedades e híbridos de <i>Vitis</i> inoculados com o vírus do mosaico das nervuras e recuperação para videira indicadora Rupestrís du Lot	35

TABELA

Página

7	Reações apresentadas pelas variedades <u>Itália</u> , LN-33 e <u>Rupestis</u> do <u>Lot</u> às infecções mistas do vírus do mosaico das nervuras com outros vírus constatados em São Paulo	39
8	Visualização de sintomas em videiras <u>ind</u> icadoras infetadas por 3 isolados do vírus do mosaico das nervuras e mantidas dentro e fora de casa de vegetação	45
9	Efeito de diferentes ambientes no <u>apareci</u> mento de sintomas do mosaico das nervuras nos novos crescimentos das videiras <u>ind</u> icadoras após a brotação de primavera	49
10	Transmissão do vírus do mosaico das <u>nervu</u> ras pela enxertia de gema de plantas <u>infe</u> tadas de diferentes variedades de <u>videi</u> ra em 3 porta-enxertos que exibem sintomas da moléstia	52
11	Influência dos métodos de enxertia na <u>ma</u> nifestação dos sintomas do mosaico das nervuras na videira indicadora <u>Rupestis</u> do <u>Lot</u>	54
12	Inoculação por enxertia dos vírus do <u>mo</u> saico das nervuras de <u>Kioho</u> e <u>Olimpia</u> e recuperação para videira indicadora <u>Rupes</u> tris do <u>Lot</u>	59

TABELA

Página

13	Inoculação por enxertia dos isolados comuns e de Kioho do vírus do mosaico das nervuras em variedades de copa e de porta-enxerto e recuperação para videira indicadora Rupestris du Lot	61
14	Reações obtidas nos testes de proteção para verificar a relação entre os isolados comuns e os de Kioho e Olimpia do vírus do mosaico das nervuras	63

VIRUS DO MOSAICO DAS NERVURAS DA VIDEIRA NO ESTADO DE SÃO PAULO

Autor: HUGO KUNIYUKI

Orientador: Dr. ÁLVARO SANTOS COSTA

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo ampliar os conhecimentos sobre a virose denominada mosaico das nervuras que ocorre nos vinhedos do Estado de São Paulo, com ênfase em aspectos referentes à sintomatologia, etiologia, epidemiologia e controle.

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de patologia, microscopia eletrônica e cultura de tecidos e nas casas de vegetação e canteiros da Seção de Virologia do Instituto Agronômico de Campinas. O material propagativo utilizado nos experimentos foi de diferentes variedades de copa e de porta-enxerto de videira, cultivadas ou mantidas nas principais regiões vitícolas do Estado.

Evidências obtidas através da sintomatologia em indicadoras comprovaram que o vírus do mosaico das nervuras que ocorre em São Paulo é idêntico ao vírus da "grapevine fleck disease" que ocorre em outros países. O vírus foi também registrado em material procedente de Goiás, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. No Estado de São Paulo, testes de indexação feitos em 44 variedades de copa demonstraram que 12, entre as quais a Itália e Itália Rubi, achavam-se 100% infectadas; as outras 32 apresentaram porcentagens de infecção entre 17 e 87%. Dos 19 porta-enxertos, 7 apresentaram-se livres do vírus e 12 com incidências entre 12 e 75%.

O vírus do mosaico das nervuras foi facilmente transmitido e recuperado por união de tecidos, mas não passou pela semente, por inoculação mecânica e por cuscuta. As evidências sobre a existência de vetor foram negativas. Concluiu-se que a ocorrência do vírus resulta de sua perpetuação através da propagação vegetativa de plantas infectadas de copa e de porta-enxerto de videira. Não foi observada partícula viral ao microscópio electrónico que pudesse ser associada a doença. Foram registrados 3 isolados diferentes pertencentes ao complexo do vírus do mosaico das nervuras; nas interações entre 2 deles (isolados comuns e os de Kioho e Olimpia) foram observados os fenômenos da proteção e da supressão.

A grande maioria das variedades de copa não mostrou sintomas de infecção; dos porta-enxertos, apenas 3 (Golia, Kober 5BB e Rupestris du Lot) foram capazes de os exibir de maneira nítida, os quais consistiram de palidez das nervuras menores das folhas jovens e médias da brotação de primavera. Tornou-se indispensável o emprego de videiras indicadoras para a diagnose da moléstia, sendo determinado que o porta-enxerto Rupestris du Lot é o mais indicado para essa finalidade. O Kober 5BB deve ser incluído nos testes de identificação dos isolados do vírus.

O mosaico das nervuras pode ser facilmente controlado através do emprego de material propagativo sadio. Clones livres de vírus de variedades de copa e de porta-enxerto de importância para a viticultura de São Paulo e de outras áreas do país foram conseguidos através de testes de indexação e de termoterapia. Coleção de plantas matrizes sadias dessas videiras foi organizada no Instituto Agrônomo de Campinas, para fornecimento de material propagativo aos interessados.

GRAPEVINE FLECK VIRUS IN THE STATE OF SÃO PAULO

Author: HUGO KUNIYUKI

Adviser: Dr. ÁLVARO SANTOS COSTA

SUMMARY

The present investigation was undertaken with the purpose of obtaining more information on a virus disease named "mosaico das nervuras" (grapevine fleck disease), that occurs in vineyards of the State of São Paulo, Brazil, with emphasis on aspects concerning symptomatology, etiology, epidemiology and control.

The experiments were carried out at the Virus Department of the Instituto Agronômico, Campinas, SP. The propagative material used in the studies was from different scion and rootstock varieties cultivated in the most important grape-growing areas of the State.

Symptoms on the indicator plants showed that the "mosaico das nervuras" is a disease induced by the grape vine fleck virus, that occurs in other grape-growing countries. The virus was also detected in propagative material from the states of Goiás, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul and Santa Catarina. In the State of São Paulo, results of indexing tests to indicator plants showed that 12 scion varieties, including Italia and Italia Ruby, were 100% infected with the virus and 32 others were infected in percentages varying from 17 to 87%. Of the 19 rootstock varieties tested, 7 were free of the virus and 12 were infected, with incidence of 12 to 75%.

The grapevine fleck virus was easily transmitted and recovered by tissue union; it was not transmitted by seed, by mechanical inoculation and by a species of cuscutea that grows under São Paulo conditions. There is also no evidence for the existence of a vector. Thus, the principal cause of the presence of the disease in the vineyards is the perpetuation of the virus through the vegetative propagation of infected plants. No virus particles were observed under the electron microscopy that could be associated to the disease. Three different isolates of the grapevine fleck virus complex were found in São Paulo. The phenomena of protection and suppression were verified in the interaction between 2 isolates of the virus.

Most scion and rootstock varieties were symptomless when infected by the virus; 3 rootstocks (Golia, Kober 5BB and Rupestris du Lot) showed typical symptoms, that consist of clearing in the third and fourth order veins of the young and medium-aged leaves of the spring growth. Thus, tests on indicator varieties are necessary for identification of the disease in most cases. The rootstock Rupestris du Lot is a good indicator for the grapevine fleck disease under São Paulo conditions; it is important to use the rootstock Kober 5BB in identification tests of the virus isolates.

Control of the grapevine fleck disease can be easily accomplished by use of virus-free stocks. Healthy clones of the most important scion and rootstock varieties cultivated in São Paulo and other grape-growing areas of Brasil were found by indexing to indicator varieties or obtained by heat treatment. Virus-free foundation stock of these grapevines was established at the Instituto Agrônômico to provide propagative material to growers and nursery men.

1. INTRODUÇÃO

A cultura da videira (*Vitis* spp.) representa uma das mais importantes produções frutíferas do Brasil, constituindo-se em uma atividade de considerável expressão sócio-econômica. No ano agrícola de 1986/87, a área colhida foi de 58.483 hectares e a produção de uvas de mesa e para vinho foi de 589.483 toneladas (ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL, 1986). No Estado de São Paulo, para o ano agrícola de 1987/88, foi estimada uma área de cerca de 8.900 hectares, uma população em torno de 38 milhões de videiras e uma produção aproximada de 92.000 toneladas de uva de mesa e 11.500 toneladas de uvas para vinho (INFORMAÇÕES ECONÔMICAS 3/88). Na safra de 1986/87, a uva de mesa atingiu o valor de 801 milhões de cruzados (PROGNÓSTICO 1987/88).

A viticultura paulista caracteriza-se pelo cultivo de variedades americanas de uvas comuns de mesa e para vinho, viníferas produtoras de uvas finas de mesa e híbridos franceses para vinho. Algumas variedades criadas por hibridação e selecionadas no Instituto Agronômico de Campinas também estão sendo plantadas nas principais áreas vitícolas do Estado para produção de uvas de mesa e para vinho (SANTOS NETO, 1969; PEREIRA & MARTINS, 1972 e OJIMA et alii, 1984).

Apesar da importância representada por essa atividade, sabe-se, desde longa data, que existe uma série

de problemas que afetam o vigor e a longevidade das plantas, diminuem a produção quantitativa e qualitativamente e reduzem a cotação da uva no mercado. Em um diagnóstico da situação atual da cultura em São Paulo, alguns fatores de natureza cultural e fitossanitária foram enumerados como os causadores desses problemas. E um dos fatores mencionados tem sido o uso de material propagativo infetado por viroses (OJIMA et alii, 1984).

Segundo investigações feitas na Seção de Virologia do Instituto Agrônomo de Campinas, já é conhecida a ocorrência de 5 viroses distintas nos vinhedos paulistas (KUNIIYUKI, 1981). Sob o ponto de vista da Virologia Vegetal, isso, contudo, não constitui novidade, pois os atuais clones da maioria das variedades de copa e de porta enxerto plantadas em São Paulo e no resto do país resultam da multiplicação de material propagativo introduzido há longos anos de países que hoje enfrentam sérios problemas com moléstias de vírus.

Dentre os vírus registrados em São Paulo, o do mosaico das nervuras (KUNIIYUKI, 1976) tem-se destacado pela frequência com que tem sido detectado nas plantações de uva. Esse vírus é considerado semelhante ao da "grapevine fleck disease" descrita por HEWITT et alii (1972). Muitos aspectos referentes ao mosaico das nervuras ainda não são suficientemente conhecidos no Brasil, tornando interessante a obtenção de maiores informações acerca da sintomatologia, etiologia, epidemiologia e controle e da situação em que se encontra a viticultura paulista no tocante a essa moléstia.

O presente trabalho aborda as investigações feitas em que se procurou acumular conhecimentos sobre o mosaico das nervuras em São Paulo, principalmente na área de patologia e, ao mesmo tempo, oferecer elementos que auxiliassem de

maneira positiva na solução dos problemas que existem nos vi
nhedos paulistas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A moléstia da videira conhecida por mosaico das nervuras foi constatada pela primeira vez por HEWITT et alii (1962) nos Estados Unidos. Esses pesquisadores deram a denominação de "grapevine fleck disease" devido aos sintomas de palidez de pequenos comprimentos das nervuras menores das folhas de videira *Rupestis* du Lot, passando esse nome a ser adotado na língua inglesa. Em trabalho posterior, HEWITT et alii (1972) demonstraram experimentalmente a transmissibilidade da moléstia por união de tecidos e com base nesse resultado, consideram-na ser causada por um vírus. Essa virose tem recebido outros nomes, como "marbrure" na França (VUITTENEZ, 1966), "jaspeado clorótico latente" na Espanha (PEÑAGLESIAS, 1978), "maculatura infettiva" na Itália (TRIOLO & MATERAZZI, 1987) e "marmoreado" em Portugal (PEDROSO, 1987).

Desde o registro da moléstia feito em 1962 até o presente, o vírus do mosaico das nervuras já foi assinalado em diversos outros países, tais como na França (VUITTENEZ, 1966 e 1970), Austrália (McGECHAN, 1970), África do Sul (ENGELBRECHT & NEL, 1971), Suíça (BOVEY, 1972a), Espanha (PEÑAGLESIAS & AYUSO, 1973), Ucrânia, URSS (SHTERENBERG et alii, 1973), Brasil (KUNIYUKI, 1976), Itália (REFATTI & GRANATA, 1980), Japão (TERAI & YANO, 1980), Moldavia, URSS (VERDEREVSKAJA et alii, 1983) e Portugal (PEDROSO, 1987). Segundo MARTELLI (1986), o mosaico das nervuras tem sido comumente registrado em diversos países do Mediterrâneo (Argélia, Chipre,

Israel, Jordânia, Tunísia e Turquia). Nos Estados Unidos, KAHN et alii (1979) detectaram o vírus do mosaico das nervuras através de testes de indexação em material propagativo introduzido de 18 países, como a Alemanha, Argentina, Índia, Irã, Inglaterra, Líbano, México, Nova Zelândia, além de alguns outros já mencionados como o Brasil. O mosaico das nervuras foi incluído dentro do grupo das viroses da videira que são de distribuição mundial (GOHEEN, 1977; UYEMOTO et alii, 1978; BOVEY et alii, 1980 e MARTELLI, 1986).

O mosaico das nervuras ocorre com frequência variável nos principais países vitícolas. Nos Estados Unidos, o vírus tem sido recuperado de numerosas variedades cultivadas em diferentes áreas da Califórnia (HEWITT et alii, 1962). Na França, VUITTENEZ (1970) verificou que 20% das 304 plantas selecionadas anteriormente como sadias encontravam-se infetadas, sendo que a variedade Chasselas achava-se com porcentagem de infecção de 40%. Em amostras das variedades Chasselas e Cardinal de plantações comerciais, BOUBALS (1971) determinou níveis de infecção de 95 e 100%, respectivamente. Ainda na França, VALAT (1972) verificou que 18 dos 29 clones de 9 variedades de mesa e 16 das 66 plantas de variedades de vinho, considerados sadios, estavam infetados pelo vírus; os 12 porta-enxertos testados estavam livres do vírus. Na Itália, entre 22 variedades de *V. vinífera* testadas, 11 encontravam-se infetadas; o vírus também foi detectado em plantas matrizes de 3 porta-enxertos (REFATTI & GRANATA, 1980). Na África do Sul (NEL & ENGELBRECHT, 1972) e na Espanha (PEÑA-IGLESIAS & AYUSO, 1973), o mosaico das nervuras tem sido detectado de maneira generalizada nas variedades de copa e de porta-enxerto cultivadas nesses países. Na Austrália, McGECHAN (1970) assinala que o vírus está presente em todas as plantações de videira nas quais são empregados os porta-enxertos Rupestris du Lot e 420A, mas Woodham et alii (1973) afirmam que esse patógeno tem sido raro nas vi-

deiras submetidas a testes de indexação. Na Ucrânia (URSS), foi comprovado que o vírus do mosaico das nervuras ocorre com incidência de 70% nas variedades locais e que 9 das 15 variedades europeias achavam-se infetadas com incidência de 55% (SHTERENBERG et alii, 1973). Na República da Moldávia (URSS), em teste de 2.000 plantas de numerosas variedades, 37,6% das videiras de copa e 8,6% de cavalos encontravam-se infetados (VERDEREVSKAJA et alii, 1983). No Japão, 42% das 53 plantas indexadas da variedade Koshu indicaram estar infetadas pelo vírus do mosaico das nervuras (TERAI & YANO, 1980).

Não existem ainda muitas informações acerca da importância do mosaico das nervuras em relação às perdas quantitativas e qualitativas. RIVES, citado por BOUBALS (1971), que não menciona a fonte de informação, estima que a moléstia reduz o rendimento de 6 a 7% na variedade Chasselas. No Japão, ocorre uma moléstia denominada "ajinashika" ("teste less" na língua inglesa), que se caracteriza por causar grande redução no teor de açúcar dos frutos e que é considerada ser induzida pelo vírus do mosaico das nervuras ou então, pela combinação desse vírus com o do enrolamento da folha; nas variedades Koshu e Bacco 22A, os frutos de videira com "ajinashika" apresentam teor de açúcar de 10 a 14°Brix em comparação com os de plantas aparentemente normais, que mostram de 17 a 22°Brix (TERAI & YANO, 1980 e 1985).

Apesar desses fatos, nem todos concordam em considerar a moléstia como sendo de importância econômica. HUGLIN, também mencionado por BOUBALS (1971), selecionou um clone da variedade Gewürztraminer que, embora infetado pelo vírus, tem-se mostrado bastante interessante pela sua produtividade. Caso semelhante foi observado por BOVEY (1972a) com clones da variedade Chasselas. Assim sendo, BOVEY et alii (1980) colocam o vírus do mosaico das nervuras dentro do grupo dos vírus da videira que têm baixa patogenicidade e re

duzida importância econômica. GOHEEN (1980) também acha que o vírus não causa ou causa pouco dano à produção de uva. Embora as informações sobre a importância da moléstia sejam ainda escassas, a França, através da Associação Nacional para o Melhoramento Técnico da Videira, inclui o vírus do mosaico das nervuras como um dos 3 vírus (juntamente com os do enrolamento da folha e o da folha em leque) que devem ser detectados nos testes de indexação do material propagativo de videira (HUGLIN et alii, 1980).

Segundo HEWITT et alii (1962 e 1972) e VUITTENEZ (1970), os sintomas característicos do mosaico das nervuras são observados em plantas infetadas do porta - enxerto *Rupestrís* du Lot, também conhecido por St. George. Consistem de palidez das nervuras menores, geralmente das terciárias e quaternárias, das folhas jovens e médias. O número dessas manchas de pequenos comprimentos é bastante variável, de uma a várias. Folhas com sintomas intensos são onduladas e distorcidas e muitas delas, com os bordos virados para cima. De acordo com alguns autores (McGECHAN, 1970; HEVIN et alii, 1973a; VUITTENEZ, 1978 e WATANABE et alii, 1986), os sintomas foliares são restritos aos crescimentos feitos em climas amenos na primavera e no outono. As plantas afetadas de *Rupestrís* du Lot apresentam um porte mais compacto e o vigor é reduzido (VUITTENEZ, 1970; SCHTERENBERG et alii, 1973 e REFATTI & GRANATA, 1980).

Além do porta-enxerto *Rupestrís* du Lot, poucas videiras têm sido listadas como apresentando sintomas. Segundo VUITTENEZ (1970 e 1978), o vírus afeta severamente *V. rupestrís* e alguns poucos híbridos de *V. rupestrís* com *V. berlandieri*, como o 99R. NEL & ENGELBRECHT (1972) também observam grande redução de vigor do porta-enxerto 99R quando infetado pelo vírus. Há menção de que os porta-enxertos 5 C (BOVEY, 1972a) e Teleki J-1-6-14 (CORBETT & WIID, 1985) tam-

bem exibem sintomas da moléstia. A reação observada por diferentes autores quanto ao porta-enxerto Kober 5BB não tem sido concordante. HEWITT et alii (1972) e BOVEY (1972a) observaram reações em plantas inoculadas desse cavalo, semelhantes às presentes em Rupestris du Lot, mas esse tipo de sintoma não foi notado por LEGIN & VUITTENEZ (1973), REFATTI et alii (1978) e REFATTI & GRANATA (1980). Segundo LEGIN & VUITTENEZ (1973), as reações apresentadas por Kober 5BB seriam induzidas por um outro vírus causador de uma moléstia denominada "mosaïque des nervures" ou "vein mosaic" que existe na Europa e que costuma ocorrer juntamente com o "grapevine fleck disease" em muitas variedades. A grande maioria das variedades de copa e de porta-enxerto de importância econômica nos diversos países não mostra sintomas visíveis quando infetada pelo vírus causador do mosaico das nervuras (HEWITT et alii, 1972; BOVEY et alii, 1980 e MARTELLI, 1986).

Diferentes vírus podem infetar simultaneamente as videiras, mas a formação de complexos no sentido de alterações sintomatológicas ou sinergismo ainda não foi observada. Na literatura especializada, é bastante comum encontrar referências sobre a ocorrência do vírus do mosaico das nervuras infetando as videiras em combinações com outros vírus, sem contudo, causar mudanças nas reações ou no desenvolvimento vegetativo devido a interações entre esses agentes (VUITTENEZ, 1970; ENGELBRECHT & NEL, 1971; HEWITT et alii, 1972; LEGIN, 1972; WOODHAM et alii, 1973; PEÑA-INGLESÍAS & AYUSO, 1973 e KRAKE & WOODHAM, 1978). Contudo, SHTERENBERG et alii (1973) notaram que a videira indicadora Rupestris du Lot, quando infetada pelos vírus do mosaico das nervuras e do mosaico amarelo da folha em leque, exibe uma coloração amarelada nas nervuras terciárias e quaternárias e tecidos adjacentes. NEL & ENGELBRECHT (1972) verificaram grande redução no vigor da combinação copa-cavalo de certas variedades, quando infetada simultaneamente pelos vírus do mosaico das nervu

ras e enrolamento da folha. TERAÍ & YANO (1985) observaram que plantas da variedade Baco 22A apresentaram maior redução no teor de açúcar dos frutos, quando infetadas simultaneamente pelos vírus do mosaico das nervuras e do enrolamento da folha, do que quando infetadas isoladamente.

Sintomas de palidez das nervuras em videira não são devidos apenas ao vírus do mosaico das nervuras. BOVEY et alii (1980) menciona a ocorrência de uma anomalia de natureza genética que induz sintomas de clareamento das nervuras muito semelhantes àqueles do mosaico das nervuras em algumas variedades, como a Chasselas.

Os efeitos da infecção causada pelo vírus do mosaico das nervuras sobre os processos fisiológicos da planta são muito pouco conhecidos. A única menção é a feita por TERAÍ & YANO (1980 e 1985) de que os frutos de videira com "ajinashika" apresentam menor teor de açúcar do que os das sadias. Em estudos anatômicos, VUITTENEZ (1970) e BOVEY (1972a) não conseguiram encontrar trabéculas nos ramos de plantas infetadas por esse vírus. Necrose dos tecidos do floema foram observadas em material de videira com "ajinashika" (NAMBA et alii, 1979).

A diagnose do mosaico das nervuras só tem sido feita através da observação de sintomas característicos na videira indicadora Rupestris du Lot, a qual vem sendo empregada por todos os pesquisadores que investigam essa moléstia. Além disso, esse porta-enxerto é também indicadora de alguns outros vírus da videira (MARTELLI, 1986). A diagnose da virose consiste portanto em enxertar plantas de Rupestris du Lot com material propagativo de videira cujo estado de sanidade se quer determinar.

A transmissão do vírus por união de tecidos

tem sido feita por diferentes técnicas de enxertia, seja em estado herbáceo ou dormente, sendo que a mais empregada é a borbulhia em placa ("chip budding"), por ser a mais fácil de executar em larga escala (HEWITT et alii, 1972; VALAT, 1972; VUITTENEZ, 1973; BOVEY et alii, 1974 e REFATTI & GRANATA, 1980). O tempo para obtenção de resultados tem sido variável, de 2 a 3 meses até 24 meses. De modo geral, a enxertia é feita durante a primavera e verão de um ano e a leitura dos sintomas durante a primavera do ano seguinte.

Devido ao longo tempo demandado para o aparecimento de sintomas nas videiras indicadoras inoculadas experimentalmente, investigações vêm sendo feitas no sentido de encurtar esse período. HEVIN et alii (1973a) adotaram a técnica da enxertia em ramos verdes no verão e conseguiram observar sintomas em plantas de Rupestris du Lot mantidas em solução hidropônica depois de 20 a 30 dias da inoculação. Adotando também a técnica da enxertia verde em fins de primavera, WATANABE et alii (1986) conseguiram notar sintomas fracos da moléstia em plantas de Rupestris du Lot mantidas em campo e no telado decorridos 14 a 23 dias da enxertia. MINK & PARTONS (1977) verificaram que a expressão dos sintomas do mosaico das nervuras ocorreu de maneira nítida 40 dias depois que plantas já infetadas da indicadora Rupestris du Lot foram colocadas em câmara de crescimento a 22°C e sob 24 horas de luz. Quando as plantas foram submetidas a um "precondicionamento" a 32°C durante 9 dias, sintomas evidentes foram observados aos 15 dias de exposição a 22°C.

Tentativas vêm sendo feitas no sentido de caracterizar o vírus do mosaico das nervuras. Até o presente, as suas propriedades físicas e bioquímicas e relações serológicas não são conhecidas. Em exames ao microscópio eletrônico das células companheiras e de parênquima do floema de folhas e frutos de plantas com "ajinashika" da variedade Ko-

shu, NAMBA et alii (1979) observaram partículas de 28 nm de diâmetro. VERDEREVSKAJA et alii (1983) notaram partículas isométricas de 23 a 30 nm de diâmetro em agregados arciformes ou circulares rodeados por uma membrana dupla em células companheiras do floema de folhas de videira infetada. Mais recentemente, NAMBA et alii (1986) voltaram a observar partículas isométricas limitadas ao floema, de 25 nm de diâmetro, em videira com "ajinashika". Por outro lado, CORBETT & WIID (1985) não conseguiram notar partículas semelhantes a vírus em extratos de pecíolos, casca dos entre-nós e folhas novas de videiras que exibiam sintomas típicos do mosaico das nervuras. A existência de isolados fracos e fortes do complexo do vírus do mosaico das nervuras é também conhecida, com base na intensidade de sintomas na indicadora *Rupestris* du Lot (TRIOLO & MATERAZZI, 1987).

A possibilidade de o mosaico das nervuras ser de origem procariótica foi descartada por TRIOLO & RESTA (1985), pois obtiveram resultados negativos nos testes de aplicação de antibióticos a base de tetraciclina e nos testes citológicos baseados no corante de Dienes.

O agente causal do mosaico das nervuras indica ter certa resistência ao calor. Com base na termoterapia, RIVES (1972) concluiu que o mosaico amarelo do complexo da folha em leque ("grapevine fanleaf") e o mosaico das nervuras eram causados por vírus diferentes, pois cultivando plantas da variedade Sémillon simultaneamente infetadas pelos 2 agentes a 37°C durante 3 meses, verificou que suas propagações estavam livres do primeiro, mas não do segundo vírus. GOHEEN & LUHN (1973) e GOHEEN (1977) incluem o agente do mosaico das nervuras dentro do grupo de vírus moderadamente estáveis *in vivo* à temperatura de 38°C, que é comumente adotada em tratamento de calor. MARTELLI (1986) também afirma que o vírus é eliminado com certa dificuldade através da termoterapia.

Os resultados de termoterapia obtidos por RIVES (1972), de que o vírus do mosaico amarelo e o vírus do mosaico das nervuras são diferentes, foram confirmados por BOVEY (1972a) que não encontrou relação serológica entre os 2 agentes.

O vírus do mosaico das nervuras é facilmente transmitido por união de tecidos. O agente causal ainda não foi transmitido mecanicamente ou seja, através de fricção de suco de videiras infetadas em plantas-teste herbáceas e em videiras (VUITTENEZ, 1970; HEWITT et alii, 1972; BOVEY, 1972a e VERDEREVSKAJA et alii, 1983). Tentativas de transmissão através de encostia de videira infetada em plantas-teste como *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *Gomphrena globosa* e *Vinca rosea* bem como testes de recuperação a partir dessas plantas deram resultados negativos (HEWITT et alii, 1972). Resultados de observações e de testes de indexação demonstraram também que o vírus do mosaico das nervuras não se transmite através de semente (DOAZAN & BELLEGARDE, 1977; DOAZAN, 1978 e HEVIN et alii, 1973b). Não foram notados casos de infecção de plantas sadias por pólen de plantas infetadas (DOAZAN & BELLEGARDE, 1977 e DOAZAN, 1978). Em outro tipo de experimento, WOODHAM & KRAKE (1983) conseguiram infetar plantas sadias da variedade indicadora *Rupestris* do Lot através de união por meio de cuscuta (*Cuscuta campestris*) com plantas com mosaico das nervuras. Não conseguiram, contudo, infetar plantas herbáceas como *C. quinoa*, *G. globosa*, *Nicotiana* spp., cowpea, feijoeiro, etc., por meio de ligações com cuscuta ou inoculação mecânica com tecidos de cuscuta que havia se estabelecido em videira infetada. A disseminação do vírus do mosaico das nervuras sob condições naturais não é conhecida. HEWITT (1968), em uma tentativa de agrupar as viroses existentes na época, inclui o vírus dentro do grupo dos que não têm vetores conhecidos, mas provavelmente transmitidos por insetos. VUITTENEZ (1978) afirma que, como o

mosaico das nervuras é de identificação mais recente, não existe ainda evidência definida sobre uma possível disseminação natural através de vetor. Assim sendo, a ocorrência do vírus nos vinhedos é atribuída à perpetuação através da propagação vegetativa de material infetado de copa e de cavalo (BOUBALS, 1971; GOHEEN, 1977; UYEMOTO et alii, 1978; BOVEY et alii, 1980 e MARTELLI, 1986).

Embora muito pouco se conheça sobre a origem do vírus do mosaico das nervuras, HEWITT (1978) o inclui como um dos vírus que teriam aparecido no centro de origem de *V. vinífera* ou seja, nas proximidades do mar Cáspio e na Ásia Menor. As videiras européias têm tolerância ao vírus (uma forma de resistência), sendo comumente aceito que as formas resistentes geralmente aparecem nos centros de origem das espécies.

O mosaico das nervuras pode ser facilmente controlado através do emprego de material propagativo sadio de variedades de copa e de porta-enxerto, visto que não há evidência sobre a existência de um vetor do vírus (VALAT, 1972; DETH, 1973; BOVEY et alii, 1974 e 1975; MARTELLI et alii, 1978; UYEMOTO et alii, 1978; GOHEEN, 1980 e YAMAGUCHI, 1983).

A obtenção de clones sadios tem sido feita por meio da indexação de plantas empregando videiras indicadoras e da adoção de medidas curativas, como a termoterapia e cultura de tecidos. A técnica da termoterapia mais utilizada é aquela que se baseia na manutenção de plantas infetadas para vegetação dentro de câmara a 36-38°C durante período mínimo de 60 dias para posterior propagação dos ápices de 10 a 50 mm de comprimento dos brotos emitidos (GOHEEN et alii, 1965; BOVEY, 1972b; BOVEY et alii, 1974; RIVES, 1972; OTTENWAEELTER et alii, 1973; MARTELLI et alii, 1978 e KUNIYUKI & BETTI, 1987). Outra técnica de tratamento por calor

adotada com sucesso na eliminação do vírus do mosaico das nervuras baseia-se na enxertia de gemas dormentes infectadas em porta-enxertos sadios e manutenção dessas combinações em câmara a 38°C durante 60 dias no mínimo (GOHEEN & LUHN, 1973 e MARTELLI et alii, 1978).

Combinações da termoterapia com cultivo *in vitro* também vêm sendo experimentadas, com obtenção de resultados positivos na eliminação do vírus do mosaico das nervuras. São os casos do cultivo de ápices caulinares em meio nutritivo submetidos a 2 ou 3 tratamentos iguais e sucessivos a 35°C durante 3 meses (VALAT et alii, 1979), da microenxertia de meristema (0,1 a 0,3 mm) de videiras submetidas a 37°C durante 1 mês e meio em entre-nós enraizados e cultivados *in vitro* (AYUSO & PEÑA-INGLESIAS, 1978) e da enxertia de ápices caulinares de 1 a 2 mm de plantas submetidas a 38°C durante 60 a 600 dias em plantinhas de semente crescendo em meio de cultura (BASS et alii, 1978). Além disso, BARLASS et alii (1982) conseguiram regenerar plantas livres do mosaico das nervuras quando cultivaram tecidos contendo meristema de cerca de 1 mm de comprimento em meio líquido e a seguir, subdivididos e colocados em meio de cultura sólido para desenvolvimento e enraizamento.

A seleção ou uso de material de videira resistente ao vírus do mosaico das nervuras não são empregados nos principais centros vitícolas do mundo. Para esse vírus, não há necessidade de se aplicar essa medida de controle, pois não existem evidências de disseminação natural e conseqüentemente, a utilização de material propagativo sadio promove o controle da moléstia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram em sua maioria conduzidos sob condições de casa de vegetação e ao ar livre na Seção de Virologia do Instituto Agronômico de Campinas. Alguns testes mais específicos foram feitos nos laboratórios de patologia, microscopia eletrônica e de cultura de tecidos dessa Seção. Observações de campo foram feitas em vinhedos de algumas importantes regiões vitícolas de São Paulo.

O material propagativo utilizado nos experimentos pertenceu às diferentes variedades e híbridos de videira, tanto de copa como de porta-enxerto. Esse material foi coletado de plantas mantidas na Seção de Viticultura e nas estações experimentais de Jundiaí e de São Roque do Instituto Agronômico; e de plantas cultivadas nas principais áreas produtoras do Estado como Atibaia, Itupeva, Jundiaí, Louveira, Mogi das Cruzes, São Miguel Arcanjo, São Roque, etc. A coleta foi feita de ramos lenhosos e dormentes de julho a agosto, quando as plantas encontravam-se em repouso de inverno. Uma parte dos ramos coletados de cada videira foi dividida em estacas de 2 a 3 gemas (300 a 400 mm) e colocadas em vasos para enraizamento, brotação e posterior utilização da planta obtida. A outra parte foi guardada em geladeira a aproximadamente 5°C, sendo os ramos retirados apenas para as enxertias das gemas durante a época de crescimento vegetativo.

As observações para estudo da sintomatologia foram feitas em campo 2 a 3 vezes dentro do período que vai desde a brotação de primavera (setembro) até o início da maturação dos frutos (dezembro), uma vez que em videiras sensíveis os sintomas são perceptíveis 1 a 2 meses após o início do desenvolvimento vegetativo. Exames de sintomas foram também feitos de abril a junho, nas novas brotações da copa e nas brotações espontâneas dos porta-enxertos. As observações foram efetuadas durante 2 a 3 anos consecutivos.

Para os testes de determinação da incidência do vírus do mosaico das nervuras por união de tecidos, os ramos foram coletados separadamente por planta e de plantas ao acaso durante a fase de repouso de inverno. Nesse período, não era possível reconhecer os sintomas da moléstia nas variedades que os exibem em época apropriada.

A identificação do mosaico das nervuras foi baseada nas reações apresentadas pela videira indicadora *Rupestris* du Lot (St. George), que é rotineiramente adotada para detecção do vírus em outros países (HEWITT et alii, 1972 e BOVEY et alii, 1980), e também pelos porta-enxertos Kober 5BB e Golia.

Os materiais sadios foram representados por clones de variedades comerciais e não comerciais de copa e de porta-enxerto, considerados livres do vírus do mosaico das nervuras através de testes de indexação empregando videiras indicadoras ou então, através da termoterapia.

As fontes de vírus usadas para o desenvolvimento dos estudos foram representadas por plantas da indicadora *Rupestris* du Lot infectadas por isolados comuns, dada a facilidade de manuseio pelo fato de mostrarem sintomas. Plantas de uva Itália também foram empregadas como fornecedoras

de inóculo, pelos fatos de estarem infetadas com alta incidência pelo vírus e de serem facilmente encontradas em campo para obtenção de material propagativo. Outros isolados do vírus de interesse aos experimentos foram mantidos nas plantas nas quais foram detectados, independente de variedade. Esse mesmo procedimento foi adotado para as diferentes combinações do vírus do mosaico das nervuras com outros vírus da videira assinalados em São Paulo, sejam para as encontradas naturalmente em condições de campo (cascudo, enrolamento da folha e fendilhamento cortical), sejam para as feitas artificialmente, representadas por combinações das quais fez parte o vírus do mosaico do Traviú.

As plantas de videira utilizadas em alguns experimentos foram obtidas de sementes coletadas em janeiro e fevereiro, época da maturação dos frutos sob condições normais de cultivo da videira em São Paulo. Essas sementes foram submetidas a um tratamento preliminar, mantendo-as durante 1 mês ou mais, estratificadas em areia umedecida em caixas de Petri a temperatura em torno de 5°C num refrigerador (SANTOS NETO, 1955). Após completado o período de tratamento, a sementeira foi feita em recipientes de plástico ou de barro, de 320 x 320 x 80 mm ou 250 x 250 x 80 mm, cheios de mistura de terra mais esterco de curral, não esterilizado. De modo geral, o tratamento baseado no choque de frio foi feito de junho a julho e a sementeira em agosto e setembro, pois nessa época, a temperatura e a luminosidade são mais favoráveis para boa germinação das sementes e rápido crescimento das plantas. Quando estas atingiram 30 a 50 mm de altura, foram transplantadas individualmente ou em grupos de 2 a 3 para vasos, dependendo da finalidade dos experimentos.

As plantas herbáceas empregadas nos testes de inoculação mecânica foram representadas por numerosas espécies comumente adotadas nos estudos com vírus. Essas plan-

tas foram conseguidas do setor de produção de plantas testes da Seção de Virologia do Instituto Agronômico.

A maioria das plantas utilizadas nos estudos foi manuseada e mantida em vasos de alumínio de 150 mm de diâmetro e 160 mm de altura. Mas a quase totalidade das plantas inoculadas das videiras indicadoras foi transferida para recipientes maiores, normalmente sacos plásticos de 280 mm de diâmetro e 350 mm de altura. Videiras sadias e infetadas destinadas à propagação foram mantidas em sacos plásticos de 400 a 500 mm de diâmetro e 500 a 600 mm de altura, ou então, plantadas diretamente no solo.

Os testes baseados na enxertia foram executados mediante adoção de diferentes técnicas, mas as mais empregadas foram:

a) enxertia de brotos de 50 a 100 mm, de crescimento vigoroso, por garfagem em ramos herbáceos de plantas de estaca, para que nestas fosse observado o aparecimento de sintomas. O pegamento da enxertia foi observado depois de 15 a 30 dias (Figura 1, A);

b) enxertia de gema em planta de estaca, para que nesta fosse observado o aparecimento de sintomas. Essa técnica foi adotada tanto com material em estado herbáceo como lenhoso, sendo o pegamento da enxertia confirmado depois de 15 a 30 dias para o primeiro caso e de 2 a 3 meses para o segundo caso (Figura 1, B e C);

c) enxertia de gema indicadora em ramos de planta infetada ou a ser testada para efetuar a leitura de sintomas em sua brotação. De modo geral, o pegamento pode ser avaliado aos 15 a 30 dias da enxertia, quando o material era herbáceo e aos 35 a 50 dias, quando o material era lenhoso (Figura 1, D).

Figura 1. Métodos de união de tecidos empregados para a transmissão do vírus do mosaico das nervuras da videira. A - Enxertia de broto por garfagem. B - Enxertia de gema de ramo herbáceo. C - Enxertia de gema de ramo dormente. D - Enxertia de gema indicadora de ramo dormente.

Nas técnicas mencionadas em (a) e (b), os brotos e as gemas foram provenientes de plantas infetadas ou a serem testadas; as plantas de estaca foram de variedades indicadoras ou então, de variedades cuja susceptibilidade se procurou verificar.

As enxertias foram feitas dentro do período de agosto a fevereiro, portanto em época em que as videiras estão em pleno desenvolvimento vegetativo sob condições de casa de vegetação. No caso da enxertia de brotos, foi adotada a garfagem do tipo fenda completa, segundo a qual a parte inferior do garfo é cortada na forma de cunha e a seguir, introduzida na fenda perpendicular (10 a 20 mm) feita no ramo podado da planta receptora. Nos casos em que se procedeu a enxertia de gema, independente dos métodos, fez-se um corte ligeiramente oblíquo no ramo da planta receptora (10 a 20 mm de comprimento) e a seguir, outro corte com ângulo de 45° em relação ao primeiro (3 a 5 mm de profundidade) até atingir a extremidade inferior deste. Em seguida, retirou-se o pedaço resultante e encaixou-se um outro, de igual tamanho e maturação, contendo uma gema. Essa técnica, quando aplicada em material lenhoso, é denominada "chip budding" na língua inglesa. Nas enxertias em que se adotou tecidos herbáceos, as partes foram mantidas unidas até o pegamento com fitas de plástico. No caso da enxertia de gema de ramo lenhoso, a amarração foi feita com elástico e a seguir, coberta totalmente com cera de abelha derretida. Na enxertia de gema indicadora, é indispensável o decepamento da planta logo acima do ponto de união dos tecidos, para favorecer a brotação daquela.

O reconhecimento de sintomas do mosaico das nervuras nas videiras indicadoras baseou-se na observação de folhas jovens e médias dos ramos resultantes da brotação de primavera originadas depois do inverno seguinte ao ciclo em

que foi feita a enxertia (8 a 15 meses); nos casos negativos, essa leitura foi repetida nas folhas da brotação formada depois do segundo inverno (20 a 27 meses). Nos testes de seleção de material propagativo sadio, considerou-se um clone como livre do vírus do mosaico das nervuras quando os resultados nas indicadores foram negativos durante 3 ciclos vegetativos verdadeiros.

Nos experimentos em que se procurou induzir o aparecimento de sintomas do mosaico das nervuras nas brotações fora de época, videiras indicadoras infetadas em crescimento vigoroso foram colocadas para desenvolvimento ao ar livre, tanto ao sol como à sombra, sob condições de laboratório e dentro de câmara de temperatura amena. Neste caso, o tratamento consistiu na colocação de videiras, durante alguns dias, dentro de câmara de temperatura a 20°C e sob 10 horas de iluminação diária, fornecida por 2 lâmpadas fluorescentes de 40W, do tipo luz do dia, situadas no teto, a cerca de 3 metros das plantas (GUIRADO et alii, 1986).

As tentativas de transmissão do vírus do mosaico das nervuras por inoculação mecânica foram feitas mediante maceração de tecidos novos de videira infetada (folhas, raízes, calos, etc.) em presença de nicotina a 2,5% em água e posterior fricção do suco obtido na superfície das folhas das videiras e das plantas-teste herbáceas previamente polvilhadas com carborundo. Essa técnica é a mais adotada para os vírus mecanicamente transmissíveis da videira (CADMAN et alii, 1960; DIAS, 1965). Outros diluentes, tais como a base de cafeína, sulfito de sódio, dietilditiocarbamato de sódio, tampão fosfato e borato, etc., também foram empregados, porém em menor escala. O pH dos diluentes variou de 7,0 a 10,0. As plantas herbáceas inoculadas foram mantidas sob observação durante 30 a 40 dias e as videiras, durante 15 a 20 meses.

Quatro outros métodos de inoculação mecânica foram também adotados, mas em menor escala. O primeiro, chamado de pica-couve, consistiu em enrolar folha de videira com mosaico das nervuras, cortar e logo em seguida, esfregar na superfície das folhas das plantas-teste, inclusive videira. O segundo foi a pseudo-encostia, que consistiu em promover a união física dos ramos herbáceos de videira infetada com os das espécies herbáceas. O terceiro baseou-se em cortar pequenos pedaços de pecíolos, ramos novos ou casca de ramos herbáceos de videira infetada dentro de uma solução de tampão fosfato pH 7,0 ou 8,0, adicionado ou não de sulfito de sódio, coar em papel de filtro e logo em seguida, efetuar 50 a 60 cortes na casca dos ramos verdes e lenhosos de videiras sadias com a lâmina do canivete de enxertia molhada no suco obtido. O último método consistiu em depositar gotas do suco conseguido de acordo com o método adotado no terceiro caso, na superfície cortada de um ramo de videira sadia, logo acima do ponto de inserção de um broto em crescimento vigoroso.

As tentativas de observação de partículas virais associadas ao mosaico das nervuras em tecidos de videira infetada foram feitas no Setor de Microscopia Electrônica da Seção de Virologia do Instituto Agrônomo, pela técnica de imersão foliar rápida e de secções ultrafinas.

A obtenção de material propagativo sadio foi feita empregando 2 métodos: (a) seleção através de testes de indexação de plantas de campo utilizando videiras indicadoras, principalmente o *Rupestris* do Lot e (b) adoção de medidas curativas, como a termoterapia e microenxertia.

Com relação à termoterapia, 2 técnicas foram adotadas: (a) tratamento de estacas dormentes a 38°C em estufa de ar quente (FANEM, modelo 061/4), sob condições escu-

ras, até apresentar sinal de perda de viabilidade. Após o tratamento, as gemas dessas estacas foram enxertadas em porta-enxertos sadios, para obtenção de plantas. A fim de impedir perda de umidade, as estacas com 1 gema ou com 2 ou mais foram cobertas totalmente ou apenas nas extremidades com cera de abelha derretida, embrulhadas em papel alumínio e acondicionadas em sacos plásticos com suas aberturas fechadas com fita adesiva (YUKI et alii, 1973) e (b) tratamento baseado na manutenção das plantas infetadas para vegetação dentro de câmara de temperatura controlada a 36-38°C e sob 12-16 horas de iluminação diária durante período mínimo de 60 dias. Em seguida, ápices caulinares de cerca de 10 mm de comprimento dos brotos apicais e axilares emitidos durante o tratamento foram enxertados em plantas de semente ou de estaca sadias (KUNIYUKI & BETTI, 1987). Propagações foram também feitas mediante enraizamento em meio de cultura de ápices de 2 a 3 mm dos brotos emitidos (KUNIYUKI et alii, 1987).

A microenxertia consistiu na tentativa de enxertia de ápices caulinares, medindo cerca de 0,5 a 0,7 mm e com 2 a 3 primórdios foliares, retirados de brotos vigorosos de plantas infetadas, não submetidas a tratamento de calor. As enxertias foram feitas segundo 2 técnicas: (a) deposição dos ápices contendo meristema no corte feito na casca dos ramos jovens e suculentos de plantas de estaca sadias e mantidas sob condições de casa de vegetação e (b) colocação do segmento caulinar na região do anel vascular da superfície exposta do caule decepado de plântulas de semente estioladas obtidas em meio de cultura. As operações para obtenção desses ápices e deposição dos mesmos nos porta-enxertos foram feitas com auxílio de microscópio estereoscópico.

Nos estudos que envolveram cultivo *in vitro*, foi adotado o meio básico de MURASHIGE & SKOOG (1962), com pH ajustado a 5,6. Para o enraizamento dos ápices de 2 a 3

mm de plantas submetidas a termoterapia, foram adicionados o carvão ativado (5,0 g/l) e 6-benzilaminopurina (5,0 μM). Para as tentativas de microenxertia, foram acrescentados ao meio básico, a benziladenina (1,4 μM) e ácido indol butírico (0,7 μM). A seguir, as partes propagativas foram mantidas em condições de laboratório, com temperatura aproximada de 25 a 27°C e com fotoperíodo de 16 horas.

O material e métodos mais específicos serão descritos junto com a apresentação dos resultados.

4. RESULTADOS

4.1. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

4.1.1. Avaliação da incidência em São Paulo

Determinações feitas através do emprego de videiras indicadoras em amostras de 44 variedades de copa e de 19 porta-enxertos demonstraram que o vírus do mosaico das nervuras encontra-se presente em vinhedos de todas as principais regiões vitícolas do Estado. Os resultados dos testes feitos para as variedades de copa encontram-se na Tabela 1. Indicam que todas as variedades testadas encontravam-se infectadas pelo vírus em maior ou menor porcentagem. Doze achavam-se 100% infectadas e 32 com incidências entre 17 e 87%. Quando se contou o número de plantas testadas de todas as variedades, a porcentagem de infecção atingiu 58%. Observa-se que a uva Itália (Pirovano 65), variedade mais importante como produtora de uva fina do Estado, achava-se 100% infectada. Dentre as amostras testadas dessa videira, uma era representada por 4 plantas com aproximadamente 30 anos de idade na época da coleta de material propagativo, que foi feita em 1972, na propriedade do senhor Arakawa, em Ferraz de Vasconcelos, SP. A Itália Rubi, também conhecida por Itália Rosada, resultante de mutação somática da variedade Itália, também estava 100% infectada. Ainda de acordo com a Tabela 1, as 16 variedades criadas no Instituto Agrônomo de Campinas (séries IAC da Seção de Viticultura, Jundiaí 242 e Jundiaí 930

Tabela 1. Porcentagem de infecção pelo vírus do mosaico das nervuras em amostras das principais variedades de copa de videira cultivadas ou mantidas em coleção em São Paulo.

Variedades de copa	Nº de localidades amostradas	Nº de plantas		% de infecção
		testadas	infetadas	
Alphonse Lavallée	2	10	6	60
Aramon	1	1	1	100
Barbera	1	8	4	50
Bonarda	1	10	6	60
Cabernet Franc	1	9	3	33
Concord	1	13	4	30
IAC 116-31	2	7	2	28
IAC 138-22	4	22	10	45
IAC 457-11	2	9	9	100
IAC 460-1	1	6	6	100
IAC 514-6	2	10	4	40
IAC 536-2	1	4	2	50
IAC 842-4	2	9	3	33
IAC 871-13	3	20	4	20
IAC 871-41	4	19	6	31
IAC 960-12	2	10	5	50
IAC 775-26	2	12	12	100
IAC 1398-21	2	10	7	70
IAC 1596-16	2	6	6	100
Isabel	4	33	10	30
Itália	13	108	108	100
Itália Rubi	6	56	56	100
Jacquez	1	3	1	33
JD 242	1	8	3	37
JD 930	1	6	3	50

Tabela 1. Porcentagem de infecção pelo vírus do mosaico das nervuras em amostras das principais variedades de copa de videira cultivadas ou mantidas em coleção em São Paulo (continuação)

Variedades de copa	Nº de localidades amostradas	Nº de plantas		% de infecção
		testadas	infetadas	
Kioho	4	36	36	100
Kioho Rosada	1	4	4	100
Merlot	2	10	3	30
Moscatel de Hamburgo	2	10	7	70
Moscatel Rosado	1	8	2	25
Niagara Branca	9	135	62	46
Niagara Rosada	12	235	78	33
Olimpia	3	17	17	100
Perlona	2	8	7	87
Pinot Noir	1	10	4	40
Seibel 2	5	53	30	56
Seibel 5455	1	3	3	100
Seibel 7053	2	10	6	60
Seibel 10096	1	8	6	75
Sémillon	1	12	5	42
SR 496-15	1	6	1	17
Sultanina	2	8	2	25
Syrah	1	10	3	30
Seyve Villard 5276	4	48	48	100
Total		1040	605	58

da Estação Experimental de Jundiaí e SR 496-15 da Estação Experimental de São Roque) apresentaram porcentagens de infecção entre 17 e 100%. A incidência média do vírus nessas variedades foi de 50%, quando se calculou a relação entre o número de plantas testadas e infetadas. A incidência do vírus em plantas das variedades Kioho e Olimpia, originadas de material propagativo introduzido do Japão, e de Kioho Rosada, mutante somático de Kioho, foi de 100%. Considerando apenas as variedades de maior importância dentro da viticultura comercial de São Paulo (IAC 138-22, IAC 871-13, IAC 871-41, Isabel, Itália, Itália Rubi, Niagara Branca, Niagara Rosada, Seibel 2 e Seyve Villard 5276), a incidência média foi de 56%.

Quando os dados sobre a incidência do vírus do mosaico das nervuras em 12 variedades foram agrupados por região (Tabela 2), observou-se que as 7 variedades parcialmente infetadas mostraram variações bastante significativas entre diferentes localidades do Estado. Nesse caso, as regiões de Mairinque e São Roque foram as que apresentaram maior frequência do vírus. Para as outras 5 variedades que já se achavam totalmente infetadas, obviamente, o índice de infecção foi o mesmo para todas as regiões consideradas.

Com relação às plantas matrizes dos porta-enxertos, os resultados encontram-se na Tabela 3. Dos 19 porta-enxertos testados, 7 apresentaram-se livres do vírus e 12 com porcentagens de infecção entre 12 e 75%. Quando se considerou o número total de plantas testadas dos 19 porta-enxertos, a incidência do vírus foi de 18%. Os porta-enxertos tradicionais mais empregados em São Paulo (Kober 5BB, Rupes-tris du Lot, Traviú e 420A) mostraram porcentagem de infecção entre 12 e 24%. Os obtidos no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC 313, IAC 571-6, IAC 572, IAC 766 e SR 26) deram resultados negativos nos testes feitos.

Tabela 2. Porcentagem de infecção pelo vírus do mosaico das nervuras em amostras de 12 variedades de uva procedentes de importantes regiões vitícolas do Estado de São Paulo.

Variedades	Porcentagem de infecção nas seguintes localidades (1)												
	AT	CB	CP	IB	IT	JD	LV	MA	MC	MM	SM	SR	VD
IAC 138-22	-	33	20	-	-	-	50	-	-	-	-	62	-
IAC 871-13	-	-	0	-	-	30	20	-	-	-	-	-	-
IAC 871-41	-	-	33	-	33	25	40	-	-	-	-	-	-
Isabel	-	42	-	-	-	0	25	-	-	-	-	33	-
Itália	100	100	-	100	100	100	100	-	100	100	100	-	-
Itália Rubi	100	-	-	100	100	100	-	-	100	-	100	-	-
Kioho	100	-	100	-	100	-	-	-	-	100	-	-	-
Niagara Branca	-	50	-	-	30	40	20	73	-	-	-	80	10
Niagara Rosada	-	26	-	-	28	33	38	62	-	-	20	80	20
Olimpia	100	-	-	-	100	-	-	-	-	100	-	-	-
Seibel 2	-	20	-	-	-	33	-	60	-	-	-	85	50
Seyve Villard 5276	-	100	-	-	-	100	-	100	-	-	-	100	-

(1) AT = Atibaia, CB = Capão Bonito, CP = Campinas, IB = Ibiúna, IT = Itupeva, JD = Jundiá, LV = Louveira, MA = Mairinque, MC = Mogi das Cruzes, MM = Monte Mor, SM = São Miguel Arcanjo, SR = São Roque e VD = Vinhedo.

Tabela 3. Porcentagem de infecção pelo vírus do mosaico das nervuras em amostras de plantas matrizes dos principais porta-enxertos de videira utilizados ou mantidos em coleção em São Paulo.

Porta-enxertos	Nº de localidades amostradas	Nº de plantas		% de infecção
		testadas	infetadas	
Couderc	1	2	1	50
Golia	3	15	2	13
IAC 313	2	15	0	0
IAC 571-6	1	10	0	0
IAC 572	1	6	0	0
IAC 766	2	12	0	0
Kober 5BB	3	24	3	12
Riparia Portalis	1	2	1	50
Rupestres du Lot	4	42	10	24
S04	1	5	1	20
SR 26	1	3	0	0
<i>V. champini</i>	1	3	0	0
5C	1	3	1	33
8B	1	4	3	75
99R	1	5	0	0
110R	1	5	1	20
420A	2	13	4	30
101-14	2	8	6	75
106-8	2	21	3	14
Total		198	36	18

Ocasionalmente, foi obtido um pequeno número de amostras de material propagativo de 5 porta-enxertos mais comumente empregados no Estado e testado para o vírus do mosaico das nervuras. Essa obtenção foi feita mediante coleta de ramos dos cavalos plantados pelos viticultores para ampliação do vinhedo, não se conhecendo portanto as procedências de cada material. Na Tabela 4 estão os resultados conseguidos, segundo os quais a incidência variou de 30 a 83%. A incidência mais alta foi verificada para o IAC 313.

4.1.2. Incidência em amostras procedentes de outros estados do Brasil

Ao longo dos anos, a Seção de Virologia do Instituto Agrônomo de Campinas tem recebido, de maneira eventual, material propagativo de videiras cultivadas em outros estados brasileiros, para ser submetido a testes de indexação empregando videiras indicadoras dos diferentes vírus dessa planta. Os resultados obtidos para o vírus do mosaico das nervuras estão apresentados na Tabela 5. Mostram que a grande maioria das variedades testadas já estavam infectadas pelo vírus, em porcentagens semelhantes às de São Paulo. As plantas das variedades Cabernet Sauvignon, Merlot e Ruby Cabernet, que deram resultados negativos nos testes de detecção do vírus, resultaram de material propagativo introduzido como livres do vírus mais comuns que ocorrem nos países tradicionalmente vitícolas.

4.1.3. Avaliação das perdas

As perdas quantitativas e qualitativas causadas pelo vírus do mosaico das nervuras não foram ainda determinadas experimentalmente em São Paulo, pois até há poucos

Tabela 4. Porcentagem de infecção pelo vírus do mosaico das nervuras em material propagativo de 5 porta-enxertos coletado de plantações comerciais.

Porta-enxertos	Localidades amostradas (1)	Nº de plantas		% de infecção
		Testadas	Infetadas	
106-8	IT, JD e SR	13	4	30
420A	IT, JD e MC	7	5	71
IAC 313	JD e SR	12	10	83
Kober 5BB	FV e IB	6	2	33
Rupestres du Lot	JD, MC e SR	18	12	66

(1) FV = Ferraz de Vasconcelos, IB = Ibiúna, IT = Itupeva, JD = Jundiaí, MC = Mogi das Cruzes e SR = São Roque.

Tabela 5. Incidência do vírus do mosaico das nervuras em material propagativo de videira procedente de outros estados do Brasil.

Estado	Origem ⁽¹⁾	Variedade	Nº plantas		% de infecção
			Test.	Inf.	
Goiás	EMGOPA	Itália	5	5	100
	EMGOPA	Patricia	4	1	25
Minas Gerais	viticultor	Jacquez	5	5	100
	viticultor	Folha de Figo	10	6	60
	viticultor	Isabel	8	4	50
	viticultor	IAC 871-13	5	1	20
Paraná	viticultor	Itália	10	10	100
	viticultor	Itália Rubi	15	15	100
	viticultor	Kioho	9	9	100
	viticultor	Kioho Rosada	3	3	100
Rio Grande do Sul	viticultor	Bordeaux	6	2	33
	viticultor	Isabel	4	2	50
	viticultor	Itália	3	3	100
	E.E.Cx.Sul	Perlona	6	6	100
	E.E.Cx.Sul	Sémillon	12	5	42
	E.E.Cx.Sul	Ruby Cabernet	1	0	0
	EMBRAPA	Cabernet Sauvignon	1	0	0
	EMBRAPA	Merlot	1	0	0
Santa Catarina	viticultor	Alphonse Lavallée	5	5	100
	viticultor	Golden Queen	3	2	66
	viticultor	Itália	5	5	100
	viticultor	Perlona	3	3	100

(1) EMGOPA = Empresa Goiana de Pesquisa Agropecuária, E.E.Cx.Sul = Estação Experimental de Caxias do Sul, RS e EMBRAPA = Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Bento Gonçalves, RS.

anos, não se dispunha de clones comprovadamente isentos de vírus das principais variedades para a realização de ensaios comparativos.

Observações feitas permitiram notar que plantas sadias das variedades Itália, Itália Rubi, Kioho e Seyve Villard 5276, obtidas através da termoterapia, eram bem mais vigorosas do que as do mesmo clone infetadas pelo vírus. As plantas sadias dos porta-enxertos Kober 5BB e Rupestris du Lot, obtidas através de testes de indexação, também apresentaram maior desenvolvimento vegetativo em relação às infetadas.

4.2. CÍRCULO DE HOSPEDEIRAS

Experimentos de transmissão foram executados no sentido de determinar o círculo de hospedeiras do vírus do mosaico das nervuras que ocorre comumente em São Paulo e também, de verificar as reações apresentadas à infecção por essas plantas.

Os resultados dos testes de transmissão por união de tecidos, em que foram inoculadas 3 a 5 plantas sadias do mesmo clone de diferentes variedades, híbridos e espécies de *Vitis*, encontram-se na Tabela 6. Mostram que todas as videiras foram susceptíveis ao vírus do mosaico das nervuras, uma vez que este foi recuperado para a indicadora Rupestris du Lot de todas as videiras testadas. Apenas 3 porta-enxertos exibiram sintomas, todos do tipo palidez das nervuras menores, sendo eles o Golia, Kober 5BB e Rupestris du Lot. Não foram notadas alterações na intensidade de sintomas em Rupestris du Lot nos testes de recuperação e nem encontrada alguma dificuldade na recuperação desse vírus de algumas das videiras inoculadas.

Tabela 6. Reação apresentada por plantas de diferentes variedades e híbridos de *Vitis* inoculados com o vírus do mosaico das nervuras e recuperação para videira indicadora Rupestris du Lot.

Videiras testadas	Reação positiva (+) ou negativa (-) apresentada pelas videiras testadas	Recuperação positiva(+) do vírus em videiras in- dicadoras
<i>V. bourquina</i> : Jacquez	-	+
<i>V. caribaea</i> (De Candolle)	-	+
<i>V. champini</i> Planchon	-	+
<i>V. gigas</i> Fennel	-	+
<i>V. labrusca</i> L.: Concord	-	+
<i>V. riparia</i> Michaux: Riparia Gloire	-	+
<i>V. rupestris</i> Scheele: du Lot	+	+
<i>V. vinifera</i> L.: Cabernet Franc	-	+
Itália	-	+
Mission	-	+
Pinot Noir	-	+
<i>V. labrusca</i> x <i>V. vinifera</i> : Isabel	-	+
Niagara	-	+
<i>V. berlandieri</i> Planchon x <i>V. riparia</i> :		
420A	-	+
Kober 5BB	+	+
<i>V. riparia</i> x <i>V. rupestris</i> : 101-14	-	+
<i>V. smalliana</i> x Golia: IAC 313	-	+
<i>V. riparia</i> x <i>V. rupestris</i> x <i>V. cordifolia</i> Michaux: 106-8 (Traviu)	-	+
<i>V. riparia</i> x <i>V. vinifera</i> x <i>V. rupestris</i> : Golia	+	+
<i>V. vinifera</i> x <i>V. rupestris</i> x <i>V. lincecumii</i> Buckley: Seibel 2	-	+
<i>V. vinifera</i> x <i>V. labrusca</i> x <i>V. riparia</i> x <i>V. candicans</i> Engelmann: LN-33	-	+

Tentativas feitas para transmitir o vírus do mosaico das nervuras através de inoculação mecânica em diversas plantas herbáceas deram resultados negativos, conforme descritos adiante.

4.3. SINTOMATOLOGIA

De modo geral, os sintomas do mosaico das nervuras não são facilmente reconhecíveis nas principais variedades de copa e de porta-enxerto cultivadas em São Paulo. São poucas as videiras que exibem sintomas perceptíveis. Por isso, procurou-se estudar melhor as reações apresentadas pelas videiras de maior importância para a viticultura paulista à infecção pelo vírus. Aproveitou-se também a oportunidade para reconhecer as anomalias de outras causas que apresentam sintomas semelhantes aos do mosaico das nervuras e que podem conduzir a erros na diagnose da virose.

4.3.1. Sintomas do mosaico das nervuras em variedades de copa

A grande maioria das variedades de copa examinadas, sejam de importância econômica para o Estado de São Paulo ou apenas mantidas em coleção, não mostram sintomas do mosaico das nervuras. Esses foram observados em algumas poucas videiras. A variedade Seyve Villard 5276 apresenta folhas jovens cloróticas, as quais, sob condições de luminosidade mais baixa, mostram palidez de algumas nervuras menores; essas manchas cloróticas podem também atingir trechos das nervuras secundárias. Nas variedades Kioho e Olimpia, introduzidas do Japão, as plantas exibem folhas da brotação de primavera com manchas cloróticas de pequenos comprimentos e ligeira assimetria do limbo; algumas mostram amarelecimen

to do limbo adjacente às nervuras principais ou secundárias (Figura 2,A e B). Além disso, apresentam desenvolvimento anormal dos ramos e maturação desuniforme dos frutos.

Algumas plantas de campo de variedades de copa como Itália, Niagara Branca, Niagara Rosada, Perlona, Pinot Noir, etc., quando indexadas, deram resultados positivos para o vírus do mosaico das nervuras e também para os vírus do enrolamento da folha, fendilhamento cortical e cascudo, revelando ocorrência de infecção simultânea. Não foi possível verificar casos de mudança nas reações das videiras assim infetadas. Contudo, em plantas de Itália, Niagaras e Perlona, que se achavam infetadas por 3 ou 4 vírus ao mesmo tempo, verificou-se uma redução bastante evidente no desenvolvimento vegetativo.

Com o propósito de avaliar possíveis interações entre os vírus registrados em São Paulo, plantas da variedade Itália e dos porta-enxertos LN-33 e Rupestris du Lot, que normalmente são adotados como indicadores desses agentes, foram submetidas a inoculações com o vírus do mosaico das nervuras em diferentes combinações com os outros presentes nos vinhedos paulistas. Os resultados conseguidos depois de 3 a 5 anos de observações encontram-se na Tabela 7. Não houve ocorrência de sinergismo ou algum outro tipo de interação que resultasse na mudança das reações de cada videira à infecção por cada vírus. As plantas, quando reagiram à infecção por determinados vírus, o fizeram com sintomas definidos para cada um destes. Além disso, foi verificado que as videiras Itália e LN-33, quando infetadas por 3 ou mais vírus, principalmente quando da mistura fez parte o vírus do fendilhamento cortical, apresentaram maior redução no vigor das plantas do que quando infetadas isoladamente.

Figura 2. Sintomas induzidos pelo vírus do mosaico das nervuras. A - Folha jovem da variedade Kioho com palidez das nervuras menores. B - Folha madura de Kioho com amarelecimento do parênquima adjacente a algumas nervuras principais e secundárias.

Tabela 7. Reações apresentadas pelas variedades Itália, LN-33 e Rupestris du Lot às infecções mistas do vírus do mosaico das nervuras com outros vírus constatados em São Paulo.

Vírus ou combinação viral (1)	Itália						LN-33						Rupestris du Lot					
	Sintomas apresentados(2)						Sintomas apresentados						Sintomas apresentados					
	CA	MN	EF	FC	MT		CA	MN	EF	FC	MT		CA	MN	EF	FC	MT	
MN	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-		-	+	-	-	-	
MN+EF	-	-	+	-	-		-	-	+	-	-		-	+	-	-	-	
MN+MT	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-		-	+	-	-	+	
MN+FC	-	-	-	+	-		-	-	-	+	-		-	+	-	-	-	
MN+CA	+	-	-	-	-		-	-	-	-	-		+	+	-	-	-	
MN+EF+FC(3)	-	-	+	+	-		-	-	+	+	-		-	+	-	-	-	
MN+EF+CA	+	-	+	-	-		-	-	+	-	-		+	+	-	-	-	
MN+EF+MT	-	-	+	-	-		-	-	+	-	-		-	+	-	-	+	
MN+EF+FC+CA(3)	+	-	+	+	-		-	-	+	+	-		+	+	-	-	-	

(1) CA = cascudo; MN = mosaico das nervuras; EF = enrolamento da folha; FC = fendilhamento cortical e MT = mosaico do Traviú.

(2) - = sem sintomas e + = com sintomas

(3) maior redução de vigor em plantas das variedades Itália e LN-33.

4.3.2. Sintomas do mosaico das nervuras em porta-enxertos

Dos porta-enxertos examinados, apenas 3 foram capazes de exibir sintomas nítidos do mosaico das nervuras: Golia, Kober 5BB e Rupestris du Lot.

Os sintomas em plantas infetadas de Rupestris du Lot consistem de manchas cloróticas de pequenos comprimentos das nervuras de terceira e quarta ordens e áreas adjacentes do limbo, constituindo um mosaico das nervuras (Figura 3,A), donde o nome dado à virose. Apresentam ainda superfície ondulada e ligeira curvatura dos bordos para cima. Esses sintomas manifestam-se com intensidade nas folhas jovens e médias da brotação de primavera. O número dessas manchas cloróticas em cada folha e o número de folhas com sintomas em cada planta são bastante variáveis. Nas condições de campo, o mosaico das nervuras pode ser facilmente visto em plantas infetadas e não enxertadas desse porta-enxerto ou nas suas brotações espontâneas de combinações enxertadas. Essas manchas persistem pouco tempo, pois desaparecem a medida que as folhas vão se tornando maduras e a temperatura vai se elevando com o decorrer do tempo; e não mais aparecem nas folhas das novas brotações do mesmo ciclo vegetativo. Sob condições de São Paulo, o melhor período para observação de sintomas corresponde aproximadamente aos meados de agosto a meados de outubro, estando o aparecimento de sintomas dentro desse intervalo em função de a brotação de primavera ser precoce ou tardia.

O porta-enxerto Golia apresenta sintomas idênticos aos do Rupestris du Lot. O cavalo 5BB também mostra sintomatologia parecida à dos dois porta-enxertos (Figura 3,B), mas, em casos severos, as folhas tornam-se assimétricas, as manchas tornam-se maiores e apresentam bordos cloróticos.

Figura 3. Sintomas de palidez das nervuras induzidos pelo vírus do mosaico das nervuras. A - Folha do porta-enxerto *Rupestris* du Lot. B - Folha do porta-enxerto Kober 5BB.

Nos outros cavalos examinados, como o Traviú, IAC 313, IAC 766, 420A, 101-14, etc., não foram notados sintomas de infecção pelo vírus do mosaico das nervuras.

4.3.3. Anomalias de outras causas com sintomas semelhantes aos da virose mosaico das nervuras

Durante o desenvolvimento das investigações sobre o mosaico das nervuras, algumas anomalias foram reconhecidas como apresentando sintomas que poderiam causar confusão com os da virose em estudo. Os fatores causadores dessas anomalias foram os seguintes: (a) infecção inicial pelo fungo causador da antracnose *Elsinoe ampelina* (De Bary) Shear, principalmente nas folhas novas; (b) danos por picadas de insetos, provavelmente tripses, que resultam em numerosas pontuações translúcidas, principalmente nas folhas novas e médias das partes mais sombreadas; (c) infecção pelo vírus do mosaico do Traviú nos porta-enxertos Kober 5BB e Rupestris du Lot (Figura 4,A), que reagem à infecção através de numerosas pontuações translúcidas; (d) danos de inseticidas e herbicidas; (e) danos de alimentação do ácaro branco (*Polyphagotarsonemus latus*) e rajado (*Tetranychus urticae*); (f) toxemia resultante de alimentação por formas jovens da cochonilha *Parassaissetia nigra* (Figura 4,B) e (g) fatores de natureza genética, que provocam clareamento de algumas nervuras menores.

4.4. VIDEIRAS INDICADORAS

Como a grande maioria das variedades de copa e de porta-enxerto cultivadas ou mantidas no Estado de São Paulo não exhibe sintomas perceptíveis do mosaico das nervuras, verificou-se que o emprego de videiras indicadoras é indispensável para a diagnose da moléstia. Em São Paulo, 3

Figura 4. Sintomas associados a outras causas que podem ser confundidos com os do mosaico das nervuras. A - Folha de Rupestris du Lot com pontuações translúcidas induzidas pelo vírus do mosaico do Traviu ao lado de uma sadia. B - Folha da variedade Itália com palidez das nervuras associada à cochonilha *Parasaissetia nigra*.

porta-enxertos podem ser utilizados como indicadores do mosaico das nervuras, pois exibem sintomas evidentes da moléstia quando infectadas pelos isolados comuns. São eles o Rupestris du Lot, que já é indicadora do "grapevine fleck disease", o Kober 5BB e o Golia. Contudo, notou-se que eles não se comportam igualmente, quando ocorrem variações ambientais. Assim sendo, comparações e observações foram feitas no sentido de esclarecer esses fatos para tornar os testes diagnósticos mais eficientes. Aproveitou-se a oportunidade para também verificar se um desses porta-enxertos poderia se sobressair do ponto de vista da sintomatologia e sensibilidade ao vírus e conseqüentemente, poderia ser rotineiramente usado para padronização dos estudos experimentais.

4.4.1. Comparação de videiras indicadoras infectadas com 3 isolados do vírus do mosaico das nervuras e mantidas dentro e fora de casa de vegetação

Logo no início das investigações, observou-se que as plantas indicadoras do mosaico das nervuras mantidas dentro de casa de vegetação não manifestavam sintomas nítidos da virose ou muitas delas simplesmente não os exibiam. Plantas comparáveis que tinham sido colocadas ao ar livre deram resultados mais confiáveis.

Com o objetivo de melhor verificar esse tipo de reação, grupos comparáveis de plantas bem estabelecidas em vasos das indicadoras Golia, Kober 5BB e Rupestris du Lot infectadas pelos isolados comuns e de Kioho foram mantidos dentro e fora de casa de vegetação, em experimentos realizados em 1977, 1978 e 1979. Um isolado fraco foi adicionado a partir de 1978. Os resultados, que são encontrados na Tabela 8, mostram que a porcentagem de plantas com sintomas foi bastante alta para o grupo das indicadoras mantidas fora de

Tabela 8. Visualização de sintomas em videiras indicadoras infetadas por 3 isolados do vírus do mosaico das nervuras e mantidas dentro e fora de casa de vegetação.

Videiras indicadoras	Isolados do vírus	Experimento I (1)						Experimento II				Experimento III			
		DCV		FCV		FCV		DCV		FCV		DCV		FCV	
		IN/CS	%	IN/CS	%	IN/CS	%	IN/CS	%	IN/CS	%	IN/CS	%	IN/CS	%
Rupestris du Lot	Comum	10/5	50	10/10	100	10/4	40	10/9	90	9/5	55	10/10	100		
	Kioho	10/6	60	10/10	100	10/5	50	10/10	100	8/3	37	10/10	100		
	Fraco	-	-	-	-	5/0	0	5/4	80	6/0	0	4/4	100		
Kober 5BB	Comum	10/6	60	10/8	80	10/6	60	10/9	90	8/4	50	8/7	87		
	Kioho	10/0	0	9/0	0	5/0	0	3/0	0	3/0	0	3/0	0		
	Fraco	-	-	-	-	4/0	0	6/0	0	3/0	0	5/0	0		
Golia	Comum	10/2	20	10/8	80	10/3	30	8/8	100	6/0	0	6/5	83		
	Kioho	10/4	40	10/10	100	6/2	33	5/4	80	5/1	20	5/5	100		
	Fraco	-	-	-	-	6/0	0	6/0	0	3/0	0	3/0	0		

(1) DCV = dentro de casa de vegetação; FCV = fora de casa de vegetação, IN = número de plantas infetadas, CS = número de plantas com sintomas visíveis e % = percentagem de plantas com sintomas.

casa de vegetação, principalmente das infetadas pelos isolados comuns e de Kioho. As plantas de Kober 5BB, mantidas tanto dentro como fora de casa de vegetação, não reagiram com sintomas visíveis à infecção pelos isolados de Kioho. Foi notado que os sintomas de todas as plantas de Rupestris do Lot infetadas pelos isolados de Kioho apareceram mais precocemente, eram mais fortes e persistiram por mais tempo do que os induzidos pelos isolados comuns. Algumas plantas das 3 indicadoras não manifestaram sintomas nas leituras feitas em cada ano, pois a sua brotação de primavera se deu com atraso, ultrapassando como consequência a época adequada para o aparecimento das reações. O isolado fraco somente induziu o aparecimento de sintomas em Rupestris do Lot mantido fora de casa de vegetação.

4.4.2. Outros fatores que podem influir na manifestação de sintomas em indicadoras mantidas ou colocadas fora de casa de vegetação

Além do efeito positivo na manifestação de sintomas do mosaico das nervuras quando as plantas indicadoras foram mantidas para crescimento fora de casa de vegetação, os seguintes resultados de observações foram obtidos para plantas de Kober 5BB e principalmente de Rupestris do Lot, por ser este o mais utilizado:

a) as 2 variedades de videira manifestaram sintomas nítidos em quase todas as plantas infetadas, quando a brotação de primavera se processou dentro de um período de temperatura amena; além disso, quando sobreveio um período de temperatura amena de alguns dias, seja no fim de primavera ou no verão, foi observado que as plantas que estavam em crescimento vigoroso, principalmente aquelas plantadas diretamente no solo, exibiram sintomas perceptíveis;

b) em determinados anos, foi verificado que muitas plantas infetadas das indicadoras não exibiram sintomas, pois as folhas logo se tornaram rígidas e amareladas. Em geral, isso ocorreu quando o desenvolvimento dos ramos novos da brotação de primavera coincidiu com período longo de temperatura alta. Notou-se também que muitas plantas não apresentaram sintomas, quando a brotação de primavera se deu com atraso;

c) durante a ocorrência desse período de temperatura alta, observou-se que as plantas de estaca enraizadas, inoculadas e colocadas fora de casa de vegetação no mesmo ano foram mais sensíveis às condições adversas do ambiente, pois geralmente não apresentaram sintomas devido ao menor crescimento vegetativo. Por outro lado, as videiras bem estabelecidas em vasos e que já se encontravam no mínimo no segundo ciclo vegetativo após a enxertia de inoculação foram capazes de exibir sintomas nítidos. De modo semelhante, as plantadas diretamente no solo há 2 anos no mínimo também deram bons resultados;

d) folhas de ponteiro das brotações axilares ou resultantes da poda do ramo inicial das indicadoras infetadas geralmente não apresentaram sintomas ou então, exibiram apenas em pequeno número de plantas e com baixa intensidade;

e) indicadoras infetadas em início de brotação de primavera ou já brotadas, ambas em condições de casa de vegetação, não apresentaram sintomas quando colocadas fora de estufa, pois logo sofreram queimaduras e as novas folhas adquiriram aspecto rígido e coloração amarelada;

f) videiras indicadoras infetadas crescendo em vasos pequenos (150 mm de diâmetro e 160 mm de altura) fora

de casa de vegetação não deram bons resultados, pois o desenvolvimento das mesmas foi reduzido e as folhas logo atingiram a maturação. Ao contrário, aquelas mantidas em recipientes grandes (sacos plásticos de 280 mm de diâmetro e 350 mm de altura ou maiores) ou plantadas diretamente no solo, geralmente apresentaram bons resultados;

g) indicadoras preparadas a partir de estacas com diâmetro menor do que 5 mm geralmente não apresentaram bons resultados nos testes de indexação no mesmo ano que foram colocadas fora de casa de vegetação. Isso por que o desenvolvimento dessas plantas foi bastante reduzido. O mesmo ocorreu com estacas de diâmetro maior do que 20 mm.

4.4.3. Tentativas visando induzir o aparecimento de sintomas do mosaico das nervuras nas indicadoras após a brotação de primavera

Devido ao fato de as videiras indicadoras manifestarem sintomas do mosaico das nervuras apenas nas folhas de brotação de primavera e de modo transitório, a diagnose da moléstia só pode ser feita uma vez por ano e durante curto período de tempo. Quando se torna impossível reconhecer os sintomas devido às adversidades climáticas, a obtenção de resultados é deixada para a brotação de primavera do ano seguinte. Procurou-se então verificar a possibilidade de forçar a manifestação de sintomas nas indicadoras infetadas fora da época normal.

Na Tabela 9, são encontrados os resultados obtidos, quando plantas vigorosas e bem estabelecidas em recipientes grandes dos porta-enxertos Kober 5BB e Rupestris du Lot, anteriormente infetadas pelos isolados comuns do vírus do mosaico das nervuras e com novos crescimentos após a poda dos ramos da brotação de primavera, foram submetidas a

Tabela 9. Efeito de diferentes ambientes no aparecimento de sintomas do mosaico das nervuras nos novos crescimentos das videiras indicadoras após a brotação de primavera.

Tratamento	Rupestris du Lot				Kober 5BB			
	Janeiro (1)		Fevereiro		Janeiro		Fevereiro	
	IN	CS	IN	CS	IN	CS	IN	CS
Luz solar direta	10	2	18	2	10	1	12	3
Sombra, ar livre	10	3	12	4	10	3	10	1
Ambiente sala, 25°C	10	1	9	0	10	0	10	0
Câmara a 20°C, 12 dias	10	0	12	1	10	0	8	0
Câmara a 20°C, 7 dias e depois luz solar direta	10	2	10	1	9	1	8	0
Câmara a 20°C, 7 dias e depois ar livre à sombra	10	4	10	2	10	3	9	0
Casa de vegetação a 30°C por 10 dias e depois câmara a 20°C por 12 dias	10	0	12	0	10	0	8	0

(1) IN = plantas anteriormente infetadas e CS = plantas com sintomas.

diferentes combinações de luz e de temperatura, durante os meses de janeiro e fevereiro de 1988. Observa-se que as plantas mantidas em casa de vegetação e depois em câmara deram resultados totalmente negativos. Quando as plantas dos 2 porta-enxertos foram colocadas apenas em câmara ou sob condições de laboratório, apenas 1 planta de Rupestris du Lot de cada tratamento mostrou sintomas da moléstia. Resultados positivos foram conseguidos quando as plantas foram mantidas dentro de câmara e depois colocadas ao ar livre, sendo melhor à sombra do que ao sol. Dentre os tratamentos testados, os melhores resultados foram conseguidos quando as indicadores apenas cresceram ao ar livre, porém à sombra. Em todos os casos positivos, os sintomas foram sempre mais fracos do que os costumeiramente observados em folhas de brotação de primavera. Notou-se também que as folhas adquiriram coloração amarelada aos 10-12 dias, quando as videiras foram colocadas dentro de câmara a 20°C e sob 12 a 14 horas de luz, fornecida por 2 lâmpadas fluorescentes de 40 W, do tipo do dia, situadas a 3 metros das plantas. Considerando a soma das plantas de todos os tratamentos, para os 2 porta-enxertos, o número de plantas com sintomas foi maior em Rupestris du Lot do que em Kober 5BB. Da mesma forma, o número de plantas que exibiram sintomas dos 2 porta-enxertos foi maior em janeiro do que em fevereiro.

4.5. ETIOLOGIA

4.5.1. Perpetuação

O vírus do mosaico das nervuras se perpetua invariavelmente através da propagação vegetativa. Isso foi demonstrado em todos os casos em que foi feita a propagação de plantas infetadas, sejam de variedades que mostram sintomas (Golia, Kober 5BB e Rupestris du Lot), como daquelas

que não os exibem (Isabel, Itália, Niagara Rosada, Seibel 2, Traviú, 420A, etc.). Foi verificado também que esse fenômeno não depende do método de multiplicação e do tamanho e maturação da parte da videira empregada para esse propósito.

4.5.2. Transmissibilidade

As seguintes maneiras de transmissão natural e experimental foram consideradas, para estudar a epidemiologia do vírus do mosaico das nervuras.

4.5.2.1. Transmissão por união de tecidos

Foi comprovado que o vírus do mosaico das nervuras é facilmente transmitido e recuperado por diferentes métodos de união de tecidos, tais como garfagem, encostia, enxertia de gema inóculo ou da indicadora, dupla-enxertia de gema, etc. A transmissibilidade do vírus não dependeu do método de enxertia e do tamanho e maturação da parte da videira empregada para enxertia. Na Tabela 10, são encontrados os resultados dos testes de transmissão mediante enxertia de gemas de plantas infetadas de algumas variedades de copa e de porta-enxerto em plantas sadias dos cavalos Golia, Kober 5BB e Rupestris du Lot. Todas as plantas inoculadas foram infetadas pelo vírus. Contudo, plantas de Kober 5BB enxertadas com material propagativo das variedades Kioho e Olimpia não exibiram sintomas de mosaico das nervuras, embora o vírus tivesse sido recuperado com facilidade para a videira indicadora Rupestris du Lot, pois induziram sintomas característicos de palidez das nervuras menores.

Nesses testes, foi verificado que os sintomas do mosaico das nervuras não se manifestaram de maneira conspícua nas folhas dos ramos desenvolvidos por muitas plantas das indicadoras ainda no mesmo ciclo vegetativo em que foi

Tabela 10. Transmissão do vírus do mosaico das nervuras pela enxertia de gema de plantas infetadas de diferentes variedades de videira em 3 porta-enxertos que exibem sintomas da moléstia.

Videiras fontes de vírus e controle	Número de plantas inoculadas e infetadas das videiras indicadoras abaixo		
	Rupestris du Lot	Kober 5BB	Golia
Infetadas			
IAC 138-22	5/5	5/5	3/3
Itália	5/5	5/5	5/5
Itália Rubi	5/5	5/5	3/3
Niagara Branca	5/5	5/5	5/5
Seibel 2	5/5	5/5	3/3
Seyve Villard 5276	5/5	5/5	3/3
Kioho	5/5	5/5 ⁽¹⁾	3/3
Olimpia	5/5	5/5 ⁽¹⁾	3/3
Kober 5BB	5/5	5/5	5/5
Rupestris du Lot	5/5	5/5	5/5
420A	5/5	3/3	2/2
Sadias			
Itália	5/0	5/0	3/0
Kioho	5/0	3/0	3/0
Niagara Branca	3/0	3/0	3/0
Seyve Villard 5276	5/0	3/0	3/0
Kober 5BB	3/0	3/0	2/0
Rupestris du Lot	3/0	3/0	2/0
420A	3/0	2/0	2/0

(1) As plantas inoculadas de Kober 5BB não exibiram sintomas quando enxertadas com material de Kioho e Olimpia, mas estavam infetadas de acordo com testes de recuperação empregando o porta-enxerto Rupestris du Lot.

feita a enxertia, mas tornaram-se bastante evidentes nas brotações de primavera dos anos subsequentes. Na Tabela 11, estão apresentados os resultados em que se procurou verificar o efeito dos diferentes métodos de enxertia na manifestação dos sintomas da moléstia na indicadora *Rupestris* du Lot. Verifica-se que a enxertia de gema herbácea da indicadora e a dupla-enxertia, que consistiu na enxertia de uma gema indicadora e de uma gema inóculo em uma mesma videira sadia, apresentaram resultados superiores aos dos outros métodos testados no mesmo ano da enxertia; mas, a porcentagem de plantas com sintomas foi baixa, no máximo 20%, em relação ao número de plantas inoculadas. A garfagem de brotos de 50 a 100 mm e a encostia deram resultados negativos. As enxertias de gemas de plantas infetadas em indicadoras também deram resultados pouco satisfatórios, com apenas 8% de plantas com sintomas. Mas todos os métodos apresentaram a mesma eficiência ou seja, todas as plantas inoculadas mostraram sintomas independente do método de enxertia a partir da brotação oriunda depois do primeiro inverno.

Não foi verificado um único caso de transmissão do vírus, quando houve apenas contato físico entre tecido sadio e infetado, devido ao não pegamento das enxertias.

Não foram executados testes para verificar a eficiência dos diferentes métodos de enxertia quanto ao pegamento. Entretanto, foi verificado através dos anos que as técnicas de enxertia de brotos de 50 a 100 mm de comprimento por garfagem e a enxertia de gemas, herbáceas ou dormentes, de plantas infetadas ou a serem testadas em videiras indicadoras ofereceram porcentagens de pegamento de 80 a 90% e até 100%, quando as operações foram executadas em épocas apropriadas (agosto a fevereiro).

Tabela 11. Influência dos métodos de enxertia na manifestação dos sintomas do mosaico das nervuras na videira indicadora Rupestris du Lot.

Método de enxertia	Brotação do mesmo ano da enxertia(1)		Primeira brotação após cada inverno	
	TEST/CS	%	TEST/CS	%
Garfagem (brotos do inóculo)	30/0	0	30/30	100
Encostia	20/0	0	20/20	100
Dupla-enxertia de gema	30/6	20	30/30	100
Borbulhia (enxertia de gema herbácea do inóculo)	40/3	8	40/40	100
Borbulhia (enxertia de gema dormente do inóculo)	50/4	8	50/50	100
Borbulhia (enxertia de gema herbácea da indicadora)	30/5	17	30/30	100
Borbulhia (enxertia de gema dormente da indicadora)	30/2	7	30/30	100

(1) TEST = número de plantas testadas, CS = número de plantas com sintomas e % = porcentagem de plantas com sintomas.

4.5.2.2. Ligações com cuscuta

Nove plantas da indicadora Rupestris du Lot foram unidas com plantas da variedade Itália infetada pelo vírus do mosaico das nervuras por meio de cuscuta, durante todo o ciclo vegetativo desta (cerca de 50 dias), mas não foram observados sintomas de infecção durante 2 anos de observações. A cuscuta utilizada, que pertence a uma espécie não identificada mas comumente encontrada em cercas vivas, apresentou bom desenvolvimento vegetativo quando colocada em videira.

4.5.2.3. Tentativas de inoculação mecânica

Várias tentativas foram feitas no sentido de verificar se o vírus do mosaico das nervuras é transmissível por inoculação mecânica. Centenas de plantas de 35 espécies herbáceas e das videiras Kober 5 BB e Rupestris du Lot foram inoculadas através de fricção do inóculo na superfície das folhas previamente polvilhadas com carborundo, mas nenhuma apresentou sintomas de infecção.

Os resultados também foram totalmente negativos, quando numerosas plantas herbáceas e das videiras indicadoras Kober 5BB e Rupestris du Lot foram inoculadas através de 4 outros métodos, chamados de pica-couve e pseudo-encostia e os baseados em cortes com lâmina contaminada e na deposição do inóculo na superfície cortada.

4.5.2.4. Transmissão pela semente

Foi testado um total de 340 plantas originárias de sementes colhidas de videiras sabidamente infetadas de 4 variedades de copa (IAC 138-22, 28 plantas de semente; Itália, 60; Kioho, 10 e Seyve Villard 5276, 42) e de 2 por-

ta-enxertos (Golia, 100 e Kober 5BB, 100). O *Rupestris* do Lot não foi testado por que não produz sementes.

Não foi notado nenhum sintoma que sugerisse transmissão do vírus nas plantas de semente de Golia e Kober 5BB, depois de 2 a 3 anos de observações. Quando clones resultantes da propagação vegetativa de 10 plantas de semente de Kober 5BB e 20 de Golia foram inoculados com o vírus do mosaico das nervuras, houve manifestação de sintomas característicos da virose, ao passo que as plantas de onde se originaram esses clones permaneceram sem alteração. Resultados dos testes de indexação das plantas de semente das 4 variedades de copa acima mencionadas foram negativos.

Dentre as plantas de semente obtidas das videiras testadas, algumas mostraram ser pouco vigorosas ou apresentaram anomalias foliares, tanto na forma como na pigmentação. Testes de transmissão feitos mediante enxertia de gemas de 3 plantas anômalas de Itália, 2 de Kioho e 5 de Golia em plantas sadias das respectivas variedades deram resultados negativos.

4.5.2.5. Vetor

Embora o vírus do mosaico das nervuras ocorra com alta incidência dentro dos vinhedos paulistas, a existência de disseminação por meio de vetor ainda não foi observada até o momento. Além disso, devido ao fato de as principais variedades de copa e de porta-enxerto não apresentarem sintomas visíveis, torna-se difícil essa determinação. Procurou-se então fazer observações no sentido de obter algumas informações a esse respeito.

Na Estação Experimental de São Roque do Instituto Agrônomo de Campinas, foram encontradas plantas li-

vres do vírus do mosaico das nervuras dos porta-enxertos Golia, Kober 5BB, Rupestris du Lot e Traviú, através de testes de indexação. Essas plantas tinham entre 20 a 30 anos de idade na época da coleta de material propagativo em 1971. Observações feitas naquelas plantas de Golia, Kober 5BB e Rupestris du Lot e testes de indexação em 3 plantas de Traviú, ainda existentes em 1982, não permitiram detectar casos de infecção. Além disso, em 1978, verificou-se que apenas 1 clone de 4 testados de Niagara Branca, originados de material propagativo estabelecido em 1928 nessa Estação, achava-se infetado pelo vírus. Um clone de Isabel, também resultante de material estabelecido em 1928, também encontrava-se livre do vírus.

Em Ferraz de Vasconcelos, foi encontrada em 1973, uma planta bastante antiga de Kober 5BB, com mais de 40 anos de idade segundo alguns viticultores da região, que não exibia sintomas do mosaico das nervuras, embora rodeada por plantas de uva Itália infetadas pelo vírus, conforme testes posteriores de indexação. Suas propagações também não mostraram sintomas.

Em um vinhedo de São Roque, observações feitas de 1973 a 1979 em 3 plantas de Rupestris du Lot sem sintomas não permitiram notar evidências de transmissão natural do vírus. Essas plantas cresciam em meio a uma plantação de Niagara Branca enxertada no mesmo cavalo, onde a grande maioria das brotações espontâneas desse porta-enxerto costumava exibir sintomas da virose.

Ao longo dos vários anos de estudos sobre o mosaico das nervuras na Seção de Virologia do Instituto Agrônomo de Campinas, não foi notado um único caso que sugerisse transmissão do vírus por meio de vetor entre as plantas dias de Rupestris du Lot mantidas por 3, 5 ou até mais anos,

em meio a numerosas plantas infetadas desse mesmo porta-enxerto.

4.5.3. Tentativas de visualização de partículas semelhantes a vírus ao microscópio eletrônico

Preparações rápidas pelo método "leaf dip" e secções ultrafinas de folhas e brotos de Rupestris du Lot com sintomas do mosaico das nervuras, quando submetidas a observações ao microscópio eletrônico, não permitiram notar partículas virais, inclusões e nem alterações de natureza citopatológica. Esses exames foram feitos pelo especialista Jorge Vega, da Seção de Virologia do Instituto Agrônomo de Campinas.

4.5.4. Isolados do vírus do mosaico das nervuras

4.5.4.1. Isolados das variedades Kioho e Olimpia

Durante os estudos de transmissão do vírus por união de tecidos, foi verificado que plantas do porta-enxerto Kober 5BB não manifestaram os sintomas esperados da virose, quando enxertadas com material propagativo das variedades Kioho e Olimpia, embora estivessem infetadas. Esses resultados sugeriram a existência de 2 isolados diferentes do vírus do mosaico das nervuras. Testes comparativos foram feitos no sentido de verificar esse fato.

Primeiramente, foram executados experimentos de inoculação por união de tecidos para verificar a relação entre os vírus presentes nas variedades Kioho e Olimpia. Na Tabela 12 são encontrados os resultados obtidos da enxertia de 3 a 5 plantas sadias por variedade testada com brotos de 50 a 100 mm de comprimento por garfagem ou com gemas herbá-

Tabela 12. Inoculação por enxertia dos vírus do mosaico das nervuras de Kioho e Olimpia e recuperação para videira indicadora Rupestris du Lot.

Videiras testadas	Presença (+) ou ausência (-) de sintomas nas videiras inoculadas com os isolados abaixo(1)		Recuperação positiva (+) para videira indicadora	
	VMNK	VMNO	VMNK	VMNO
Kioho	+	+	+	+
Mission	-	-	+	+
Kioho (planta de semente)	+	+	+	+
Olimpia (planta de semente)	+	+	+	+
LN-33	-	-	+	+
Golia	+	+	+	+
Kober 5BB	-	-	+	+
Rupestris du Lot	+	+	+	+
Traviû	-	-	+	+

(1) VMNK = vírus do mosaico das nervuras de Kioho e VMNO = vírus do mosaico das nervuras de Olimpia.

ceas ou dormentes de videiras infetadas pelos 2 vírus. Mostram que todas as variedades de copa e de porta-enxerto inoculadas comportaram-se de modo igual para ambos os vírus.

Compararam-se a seguir o isolado presente na variedade Kioho e o isolado comum do vírus do mosaico das nervuras. Na Tabela 13 encontram-se os resultados da inoculação dos 2 isolados em plantas de 9 variedades de copa e de 10 porta-enxertos, através dos métodos de garfagem de brotos e da enxertia de gemas herbáceas ou dormentes. Foram empregadas 3 a 5 plantas por variedade e para cada isolado. Poucas diferenças foram detectadas. A variedade Kioho não mostrou sintomas, quando infetada pelo vírus do mosaico das nervuras de ocorrência comum. O cavalo Kober 5BB exibiu sintomas apenas para o isolado comum, enquanto o Golia e o Rupestris du Lot apresentaram sintomas quando infetados por ambos. A variedade Seyve Villard 5276 mostrou folhas cloróticas e palidez de algumas nervuras para o isolado comum; para o de Kioho, apresentou sintomas fracos de clorose foliar e de palidez de algumas poucas nervuras menores, mais fáceis de distinguir quando observada ao lado de plantas sadias. O porta-enxerto 5C mostrou palidez de algumas nervuras menores de algumas folhas novas, mas não foi visível em todas as brotações de primavera. Os resultados dos testes de recuperação, feitos em 1 ou 2 plantas por variedade, foram positivos em todos os casos.

Diante dos resultados obtidos, considerou-se a hipótese de que o isolado comum e de Kioho seriam estirpes de um mesmo vírus, sendo diferenciadas através da sintomatologia apresentada por plantas de Kioho e Kober 5BB. Para verificar essa possível relação de parentesco, testes foram efetuados, em que plantas de Kioho, Kober 5BB e Rupestris du Lot previamente infetadas pelos isolados comuns, de Kioho e de Olimpia, foram submetidas a superinoculação com cada um des-

Tabela 13. Inoculação por enxertia dos isolados comuns e de Kioho do vírus do mosaico das nervuras em variedades de copa e de porta-enxerto e recuperação para videira indicadora Rupestris du Lot.

Videiras testadas	Presença (+) ou ausência (-) de sintomas nas videiras inoculadas com os isolados abaixo (1)		Recuperação positiva (+) para videira indicadora	
	VMN	VMNK	VMN	VMNK
Copa				
Baco 22A	-	-	+	+
Cabernet Franc	-	-	+	+
Isabel	-	-	+	+
Itália	-	-	+	+
Kioho	-	+	+	+
Niagara Rosada	-	-	+	+
Pinot Noir	-	-	+	+
Seibel 2	-	-	+	+
Seyve Villard 5276	+	?	+	+
Porta-enxerto				
Golia	+	+	+	+
IAC 313	-	-	+	+
IAC 766	-	-	+	+
Kober 5BB	+	-	+	+
Rupestris du Lot	+	+	+	+
S04	-	-	+	+
Traviû	-	-	+	+
5C	? (2)	?	+	+
101-14	-	-	+	+
420A	-	-	+	+

(1) VMN = isolados comuns e VMNK = isolados de Kioho, do vírus do mosaico das nervuras.

(2) ? = sintomas fracos ou pouco definidos.

ses. Todas as inoculações foram feitas através de enxertia de gema, herbácea ou dormente. Os resultados obtidos depois de 3 a 4 anos de observações, algumas por mais de 6 anos, encontram-se na Tabela 14. Permitem observar que as plantas de Kober 5BB premunizadas com isolados comuns e superinoculadas com os de Kioho e de Olimpia continuaram a apresentar sintomas de palidez das nervuras ou então, não apresentaram sintomas. Em plantas de Kober 5BB premunizadas com os isolados de Kioho e de Olimpia e superinoculadas com os comuns, não foram observados sintomas aparentes. A variedade Kioho não exibiu sintomas que sugerissem interação entre os isolados. Todas as plantas de Rupestris du Lot apresentaram sintomas de palidez das nervuras. Testes de recuperação feitos em algumas plantas de Kober 5BB, inoculadas com os isolados de Kioho e de Olimpia e superinoculadas com os comuns, que não deram sintomas, permitiram observar palidez das nervuras em Rupestris du Lot.

4.5.4.2. Isolado fraco do vírus do mosaico das nervuras obtido de planta da variedade Itália

Em material propagativo de uma planta da variedade Itália de São Miguel Arcanjo (propriedade do sr. F. Hayashi), coletado em 1972, foi obtido um isolado do vírus do mosaico das nervuras que, ao ser inoculado na indicadora Rupestris du Lot, induziu sintomas fracos de palidez das nervuras menores. O número de manchas cloróticas por folha e o número de folhas com sintomas por planta da indicadora foi bem menor do que as induzidas pelos isolados comuns do mesmo vírus. Esse tipo de sintoma foi constante em Rupestris du Lot durante vários anos de observações. Não foram notados sintomas em plantas inoculadas de Golia e de Kober 5BB.

Plantas resultantes de estaca dessa uva Itá-

Tabela 14. Reações obtidas nos testes de proteção para verificar a relação entre os isolados comuns e os de Kioho e Olimpia do vírus do mosaico das nervuras.

Videiras inoculadas previamente com os isolados abaixo (1)	Número de plantas testadas com pegamento da enxertia, presença (+) ou ausência (-) de sintomas nas videiras inoculadas por enxertia de gema com os isolados desafiantes					
	VMN		VMNK		VMNO	
	Nº de plantas	Sintomas	Nº de plantas	Sintomas	Nº de plantas	Sintomas
Kioho/VMN	2	-	5	+	4	+
Kioho/VNMK	5	+	1	+	3	+
Kober 5BB	10	+	10	-	10	-
Kober 5BB/VMN	9	+	5	-/+ ⁽²⁾	5	-/+ ⁽³⁾
Kober 5BB/VNMK	21	-	13	-	9	-
Kober 5BB/VMNO	25	-	8	-	5	-
Rupestris du Lot	5	+	5	+	5	+
Rupestris du Lot/VMN	5	+	9	+	5	+
Rupestris du Lot/VNMK	10	+	4	+	6	+
Rupestris du Lot/VMNO	8	+	6	+	3	+

(1) Plantas das variedades Kioho, Kober 5BB e Rupestris du Lot previamente inoculadas com os isolados comuns (VMN), de Kioho (VNMK) e de Olimpia (VMNO) do vírus do mosaico das nervuras.

(2) Duas plantas não apresentaram sintomas perceptíveis.

(3) Uma planta não apresentou sintomas perceptíveis.

lia, mantidas em casa de vegetação, não permitiram notar diferenças em vigor, quando comparadas com plantas infetadas por isolados comuns.

Em um pequeno teste, em que foram empregadas 4 a 5 plantas por tratamento, não foram observadas mudanças na resposta à infecção quando os porta-enxertos Kober 5BB e Rupestris du Lot, previamente infetados pelos isolados fraco e comuns, foram superinoculados com cada um desses. As plantas dos 2 porta-enxertos, inicialmente infetadas pelos isolados comuns, continuaram a exibir sintomas de palidez das nervuras, depois de superinoculadas com o isolado fraco. Da mesma forma, as plantas de Rupestris du Lot infetadas pelo isolado fraco mostraram sintomas nítidos de palidez das nervuras, após terem sido superinoculadas com os isolados comuns. Nesse caso, as plantas infetadas de Rupestris du Lot apenas apresentaram sintomas de mesmo tipo. O porta-enxerto Kober 5BB, que não exibia sintomas da infecção de premunização pelo isolado fraco, apresentou sintomas nítidos de palidez das nervuras, quando superinoculado com os isolados comuns.

4.6. CONTROLE

Com base nos conhecimentos adquiridos até o presente, o vírus do mosaico das nervuras não apresenta evidências de transmissão por vetor dentro dos vinhedos do Estado de São Paulo. Diante disso e do fato de que a videira é planta perene de propagação vegetativa, considerou-se que o uso de clones sadios de variedades de copa e de porta-enxerto pode promover o controle da virose de modo bastante satisfatório. Dois métodos foram adotados para obtenção de clones livres do vírus do mosaico das nervuras: seleção de videiras sadias através de testes de indexação e limpeza de material propagativo através de medidas curativas.

4.6.1. Indexação

A seleção de plantas sadias através de testes de indexação é o primeiro recurso de que se lança mão, pois parte-se da hipótese de que ainda existem videiras livres de vírus nas condições de campo.

Resultados de testes empregando videiras indicadoras feitos para 44 variedades de copa permitiram encontrar plantas isentas do vírus do mosaico das nervuras pertencentes a 32 variedades, entre as quais Alphonse Lavallée, Cabernet Franc, Concord, IAC 871-13 (A Dona), Isabel, IAC 871-41 (Patricia), Niagara Branca, Niagara Rosada e Seibel 2. A grande maioria dessas videiras achava-se também infetada por outros vírus assinalados em São Paulo, sendo possível a seleção de plantas sadias de apenas 5 variedades: IAC 842-4 (Piratiníngua), IAC 514-6 (Maria), IAC 871-13 (A Dona), Isabel e SR 496-15 (Dr. Júlio). Com relação aos porta-enxertos, foram isolados clones livres do vírus do mosaico das nervuras e de outros registrados nos vinhedos paulistas de 12 variedades: Golia, IAC 313, IAC 572, IAC 766, Kober 5BB, Rupestris du Lot, S04, 5C, 99R, 101-14, 106-8 (Traviú) e 420A.

4.6.2. Medidas curativas

São adotadas quando torna-se muito difícil encontrar plantas sadias nas condições de campo, tornando indispensável a eliminação de vírus do material propagativo infetado.

As seguintes técnicas foram empregadas:

4.6.2.1. Termoterapia

Para as tentativas de limpeza de material pro

pagativo de videiras infetadas através de tratamento de calor, 2 métodos foram estudados: (a) tratamento de estacas dormentes e (b) tratamento de plantas em vegetação.

(a) Através do primeiro método, que se baseou na colocação de ramos dormentes dentro de estufa de ar quente a 38°C durante 33 dias, foram submetidas a tratamento estacas correspondentes a 51 gemas de IAC 138-22, 78 de Itália, 42 de Niagara Branca, 36 de Seibel 2 e 69 de Seyve Villard 5276. A porcentagem de obtenção de plantas através da enxertia das gemas sobreviventes foi em torno de 2,5%, tendo resultado apenas 1 planta de IAC 138-22, 3 de Itália e 3 de Seyve Villard 5276. Todas as plantas obtidas, indexadas em Rupestris du Lot, demonstraram estar ainda infetadas pelo vírus do mosaico das nervuras.

Não foi notada diferença entre as estacas com 1 gema ou com 2 ou mais e cobertas totalmente ou apenas nas extremidades com cera de abelha derretida com relação à manutenção da viabilidade das mesmas. Tratamentos mais prolongados resultaram em perda total da viabilidade das estacas.

(b) Adotando o método baseado na vegetação de videiras infetadas dentro de câmara a 36-38°C para propagação mediante enxertia de ápices dos brotos emitidos, foram conseguidos clones sadios de 9 variedades de copa, que se achavam infetadas pelo vírus do mosaico das nervuras, isoladamente ou em mistura com os vírus do enrolamento da folha, fendilhamento cortical ou ambos. As variedades foram as seguintes: Concord, IAC 138-22, IAC 457-11, Itália, Itália Rubi, Kioho, Perlona, Seibel 2 e Seyve Villard 5276.

De plantas das variedades Alphonse Lavallée e Seibel 7053, que se encontravam infetadas ao mesmo tempo pe-

los vírus do cascudo, enrolamento da folha, fendilhamento cortical e mosaico das nervuras, foi possível eliminar 3 deles, incluindo o mosaico das nervuras; contudo, a primeira permaneceu infectada pelo vírus do fendilhamento cortical e a segunda, pelo vírus do cascudo.

Foi observado, com base em plantas das variedades Itália, Itália Rubi e Seyve Villard 5276, que os resultados positivos de obtenção de material sadio foram principalmente conseguidos por enxertia de ápices de 10 mm coletados dos primeiros brotos emitidos, apicais ou axilares, durante o tratamento pelo calor, geralmente dentro do período aproximado de 60 a 90 dias. Por outro lado, notou-se que, das 6 plantas de Itália, 4 de Itália Rubi e 3 de Seyve Villard 5276, originadas de brotos surgidos depois de 150 a 200 dias de tratamento, apenas 1 planta de Itália Rubi encontrava-se livre do vírus do mosaico das nervuras.

Adotando a mesma técnica de tratamento pelo calor (60 a 90 dias a 38°C), de janeiro a março, e submetendo os ápices de cerca de 2 a 3 mm de comprimento a enraizamento in vitro, foram também conseguidos clones sadios das variedades IAC 138-22, IAC 457-11, IAC 514-6, Itália, Itália Rubi, Kioho, Seibel 2 e Seyve Villard 5276. Essas videiras encontravam-se infectadas pelo vírus do mosaico das nervuras, sós ou em combinação com os vírus do enrolamento da folha e fendilhamento cortical.

4.6.2.2. Microenxertia

Cerca de 50 segmentos de 0,5 a 0,7 mm contendo meristema de brotos vigorosos de plantas infectadas das variedades Itália e Seyve Villard 5276 foram colocados em porta-enxertos também em desenvolvimento ativo, mas não houve união dos tecidos. Em todos os casos, notou-se a ocorrência

sistemática de escurecimento dos tecidos do microenxerto, resultando em necrose e morte dos mesmos. Esse fenômeno manifestou-se com maior intensidade quando os ápices foram depositados em ramos jovens e suculentos de plantas de estaca; quando plantinhas de semente estioladas e mantidas *in vitro* foram empregadas como porta-enxertos, esse fenômeno ocorreu com menor intensidade e mais lentamente do que no primeiro caso, mas provocou a morte dos tecidos microenxertados com o passar do tempo.

5. DISCUSSÃO

As evidências obtidas através da sintomatologia em indicadoras comprovam que o vírus do mosaico das nervuras da videira, presente nos vinhedos do Estado de São Paulo, é idêntico ao da "grapevine fleck disease". Isso demonstra que o vírus causador foi introduzido em material propagativo infectado. Essa afirmativa também pode ser feita para as outras viroses já registradas no Brasil (KUNIYUKI, 1981), dada a semelhança sintomatológica com as existentes em outros países e dada a inexistência, até o presente, de moléstias da videira causadas por vírus autóctones no Brasil.

Nos levantamentos feitos, verificou-se que mais da metade da população das videiras cultivadas e mantidas no Estado de São Paulo encontra-se infectada pelo vírus, confirmando os resultados obtidos anteriormente (KUNIYUKI & COSTA, 1987). As variedades introduzidas apresentam porcentagem de infecção de 25 a 100%. Isso pode estar correlacionado com o nível de infecção do material propagativo introduzido. Assim, para as variedades com porcentagem de infecção de 100%, é possível que o material já tivesse vindo totalmente infectado. Muito provavelmente, isso deve ter ocorrido para as variedades Kioho e Olimpia; mas, neste caso, é fácil aceitar essa hipótese, uma vez que todas as suas plantas estão infectadas por isolados diferenciados que só têm sido encontrados nelas. Para as variedades que apresentam ní-

vel de infecção abaixo de 100%, é provável que o material introduzido estivesse livre do vírus do mosaico das nervuras ou menos infetado pelo vírus, somente atingindo as incidências de mostradas em decorrência das sucessivas propagações feitas durante muitos anos em São Paulo e no resto do país. São grandes as possibilidades de que o nível elevado de infecção de muitas variedades seja consequência de transmissão ocorrida no país através do emprego de porta-enxertos infetados. Isso é facilmente comprovado através de algumas variedades criadas no Instituto Agrônomo de Campinas que se tornaram 100% infetadas, devido à enxertia das plantas originais sadias, resultantes de semente, em porta-enxertos infetados, para sua multiplicação. Esse fato aconteceu no passado para as plantas de semente autofecundada ou cruzada nos trabalhos de melhoramento genético da videira no Instituto Agrônomo (SANTOS NETO, 1955). Isso mostra a importância de se proceder a multiplicação das plantas resultantes de hibridações em cavalos sadios, como é feita atualmente. A constatação de que a porcentagem de infecção de certas variedades plantadas em diferentes localidades do Estado apresentam variações significativas entre regiões também pode ser explicada perfeitamente como resultantes do nível de infecção do material propagativo de variedades de copa e de porta-enxerto que foi introduzido nos respectivos locais. No caso das variedades Itália Rubi e Kioho Rosada (atualmente conhecida por Iguaçu Red), resultantes de mutação somática de Itália e Kioho, o fato de estarem 100% infetadas pelo vírus pode ser facilmente explicado na base de que as plantas das quais se originaram os mutantes já estavam infetadas pelo vírus.

As plantas matrizes dos porta-enxertos revelaram estar menos infetadas do que as variedades de copa. Isso já era esperado, pois tais videiras geralmente não são enxertadas para suas propagações. Inicialmente, a porcentagem de infecção deve ter mostrado correlação com o nível de infec-

ção do material introduzido; mas, o atual nível apresentado por muitos porta-enxertos deve ter resultado principalmente da utilização de material propagativo proveniente das brotações espontâneas dos cavalos das combinações enxertadas ou das plantas que se desenvolveram após a morte da copa, para reposição ou ampliação do número dessas matrizes. Foi determinado que a incidência do vírus no material propagativo de importantes porta-enxertos utilizados pelos viticultores para ampliação ou substituição dos vinhedos mostrou ser mais elevada do que a do material de propagação das plantas matrizes desses cavalos. Tal fato é explicável, pois os agricultores, além de obterem estacas das plantas matrizes dos porta-enxertos de seu interesse, têm o costume de conseguir material de propagação de cavalos de sua própria plantação já estabelecida ou da de outros viticultores, da mesma região ou de outras localidades, seja de São Paulo ou de outros estados vitícolas do Brasil. A coleta é feita de maneira indiscriminada. Assim sendo, a incidência do vírus pode elevar-se significativamente, se isso é feito em regiões onde são cultivadas variedades bastante infetadas pelo vírus. Tal fato deve ter acontecido para explicar o resultado apresentado pelo porta-enxerto IAC 313, pois, enquanto as plantas matrizes mais antigas estão isentas do vírus, o material propagativo usado na viticultura comercial encontra-se infetado com incidência muito alta.

A incidência do vírus demonstra ser muito elevada nos vinhedos de outros estados brasileiros, muito provavelmente semelhante à encontrada em São Paulo. Como algumas das variedades de copa testadas foram comuns às áreas consideradas e como são costumeiras as trocas de material propagativo entre regiões, é muito provável que diversas variedades de copa e de porta-enxerto cultivadas no Brasil tenham a mesma origem. Assim sendo, não é de se estranhar que os vírus encontrados também sejam comuns a essas regiões vitíco-

las. Por outro lado, testes feitos em plantas de 3 variedades de copa (Cabernet Sauvignon, Merlot e Ruby Cabernet), resultantes de clones que haviam sido introduzidos no Rio Grande do Sul como livres dos vírus mais comuns da videira, confirmaram que elas se encontram sadias com relação ao vírus do mosaico das nervuras e aos outros detectáveis em videiras indicadoras.

Em São Paulo, não há risco de infecção das videiras sadias nas condições de campo, pois não existem evidências de disseminação do vírus através de vetor. Caso ocorresse, a possibilidade de se encontrar plantas sadias, principalmente das variedades mais antigas, seria mínima em locais onde a pressão de inóculo é muito alta. VUITTENEZ (1978), na França, ao comentar sobre o mesmo assunto, afirma que o mosaico das nervuras é uma virose de constatação recente, de tal modo que não existe ainda uma evidência definida sobre uma possível disseminação do vírus através de vetor. Segundo esse autor, a maioria dos atuais vinhedos franceses é constituída por videiras de origem duvidosa quanto à sanidade, portanto não adequada para estudos de disseminação do vírus; o incremento do uso de material propagativo sadio poderá facilitar essas investigações, submetendo as plantas a testes de indexação depois de vários anos de cultivo. Para as condições de São Paulo, essas considerações são também válidas e interessantes, principalmente em regiões onde a incidência do vírus é elevada, como São Roque e Mairinque. Com o estabelecimento de vinhedos sadios em larga escala, é possível que a disseminação por meio de vetor venha até a ser constatada. Contudo, com base nos conhecimentos adquiridos até o presente, é improvável que vetor eficiente seja encontrado nos vinhedos paulistas, pelo menos dos atuais isolados do vírus do mosaico das nervuras.

Como o vírus do mosaico das nervuras e alguns

outros que infetam a videira não têm vetor conhecido, surge a indagação de como a planta primeiramente adquiriu esse vírus. Nada é conhecido a esse respeito, mas pelo menos duas hipóteses podem ser formuladas para explicar o aparecimento desses patógenos na videira: (a) transmissão mecânica, por vetor ou por ligação de cuscuteira, de maneira ocasional, de certos vírus de outras espécies e (b) transmissão mecânica, por vetor ou por ligação de cuscuteira, de maneira ocasional, de variantes pertencentes a complexos de determinados vírus de outras espécies.

A introdução do vírus em videira por vetores apoia-se, dentro de certos limites, na detecção de diversos vírus com morfologia do grupo dos closterovirus em videira (GUGERLI et alii, 1984; MILNE et alii, 1984; CORBETT & WIID, 1985). Como muitos dos closterovirus conhecidos têm vetores que os disseminam na natureza (LISTER & BAR-JOSEPH, 1981), é possível que os encontrados em videira possam representar variantes de alguns desses, que no passado talvez distante, foram casualmente inoculados em videira por vetores e se perpetuaram através da propagação vegetativa. Muito provavelmente, a existência de partículas longas e flexíveis em videiras cultivadas em São Paulo, que apresentam relação serológica com o vírus da tristeza dos citros (OLIVEIRA et alii, 1988), pode constituir-se em um exemplo que se adapta a essa hipótese.

A cuscuteira comumente encontrada em cercas vivas sob condições de São Paulo não possibilitou a transmissão do vírus do mosaico das nervuras de videira infetada para a sadia. Contudo, WOODHAM & KRAKE (1983) conseguiram resultado positivo empregando *C. campestris*. Uma explicação para o resultado obtido no presente estudo pode ser apoiada na afirmativa de COSTA (1975) de que a espécie comum em São Paulo, ainda não determinada, é má transmissora de vírus, ao passo que outras espécies, como *C. americanum*, *C. californi-*

ca, *C. campestris* e *C. subinclusa* são melhores para a transmissão. Essas espécies não foram empregadas, pois não se dispunha de sementes ou de material propagativo durante a época da realização dos testes. No presente estudo, o objetivo era, depois de determinada a transmissibilidade do vírus através dessa maneira, testar inúmeras espécies herbáceas para encontrar aquelas capazes de mostrar sintomas. Isso seria de grande valia para os estudos de identificação do vírus e determinação do círculo de hospedeiras.

Na literatura especializada, existem relatos da observação de partículas isométricas de 23 a 30 nm de diâmetro em tecidos de floema de videiras infetadas pelo mosaico das nervuras (NAMBA et alii, 1979 e 1986; VERDEREVSKAJA et alii, 1983); há também relatos da não observação de partículas virais nos tecidos de videira infetada (CORBETT & WIID, 1985). Assim sendo, os resultados conhecidos até o presente demonstram que, de modo geral, ainda não existe uma correlação mais evidente entre partículas observadas e sintomas do mosaico das nervuras. Em São Paulo, os exames feitos ao microscópio eletrônico de preparações de plantas de *Rupestris* do Lot infetadas pelo vírus do mosaico das nervuras não permitiram observar partículas isométricas e nem alongadas. Mas a tendência é considerar que o vírus seja mesmo isométrico, pois caso contrário, já teria sido detectado, não só no Brasil como em outros países.

A perpetuação do vírus do mosaico das nervuras através de semente não foi verificada neste estudo. Esses resultados negativos concordam com os obtidos por HEVIN et alii (1973b); DOAZAN & BELLEGARDE (1977) e DOAZAN (1978), que testaram sementes obtidas tanto de fecundação livre como de cruzamentos entre plantas de variedades machos e fêmeas de *V. rupestris*. Testes feitos no presente trabalho indicaram que a redução de vigor ou a presença de anomalias foliares

em algumas plantas de semente não resultam de infecção virótica. Essas anomalias são interpretadas como decorrentes, principalmente da alta heterozigose apresentada por espécies de *Vitis* e já são conhecidas em outros países (HEVIN et alii, 1973b). A transmissão pela semente não ocorre na epidemiologia do vírus do mosaico das nervuras e a presença deste na planta não tem importância nos trabalhos de melhoramento genético da videira. Assim sendo, plantas infetadas podem ser empregadas nos trabalhos de hibridações.

No Brasil e em outros países, as perdas causadas pelo vírus do mosaico das nervuras não são conhecidas. Era difícil fazer essas determinações, uma vez que não havia clones sadios de variedades de importância econômica. Hoje, isso já é possível, devido à disponibilidade de material sadio, tanto de copa como de porta-enxerto.

Infecções mistas do vírus do mosaico das nervuras com outros vírus constatados em São Paulo são comuns em plantas de diversas variedades de copa e de porta-enxerto. Isso, contudo, não resulta em sinergismo ou outro tipo de interação entre os vírus, do ponto de vista da sintomatologia. Mas, algumas videiras, quando infetadas por 3 ou mesmo 4 vírus ao mesmo tempo, apresentam maior redução no vigor do que quando infetadas isoladamente. Nesses casos, é altamente provável que as plantas venham a mostrar perdas até significativas na produção.

Todas as variedades e espécies de videira estudadas comportaram-se como susceptíveis ao vírus do mosaico das nervuras. A grande maioria das videiras testadas não mostrou sintomas de palidez das nervuras decorrentes da infecção, embora o vírus fosse facilmente recuperado para indicadores. Esse resultado indica que o vírus pode infetar número bem maior de variedades e espécies de *Vitis*. Esse conhecimen

to amplia os já existentes, que, em sua maioria, se restringem às principais variedades comerciais de copa e a alguns porta-enxertos (VUITTENEZ, 1970; HEWITT et alii, 1972 e REFATTI & GRANATA, 1980). O fato de a maioria das videiras não mostrar sintomas reconhecíveis demonstra a facilidade com que o vírus é perpetuado através de material propagativo infetado e explica a razão da alta incidência do patógeno no Brasil.

A leitura dos testes diagnósticos do mosaico das nervuras é melhor feita nas folhas da brotação de primavera de plantas indicadoras colocadas para crescimento ao ar livre. A manutenção de indicadoras dentro de casa de vegetação é desfavorável para a manifestação de sintomas evidentes. Ainda não existe uma explicação comprovada para esse fato, mas é de se supor que os vidros das casas de vegetação atuem como filtros para certos comprimentos de onda de luz, interferindo no desenvolvimento da coloração verde das folhas de videira. É também possível que a temperatura, por ser mais alta dentro de casa de vegetação, contribua para a ocorrência desse fato.

A observação de que os sintomas em indicadoras mesmo fora de casa de vegetação não se tornam visíveis ou aparecem em poucas plantas durante períodos prolongados de muito calor pode ser atribuída ao efeito da temperatura elevada. Essa interpretação se deve ao fato de que, durante esse período, as folhas jovens logo tornam-se rígidas e amareladas, principalmente de plantas não bem estabelecidas em vasos ou mesmo, no solo. Não é fácil demonstrar experimentalmente esse fato, mas é provável que assim seja, pois os sintomas podem se manifestar em algumas plantas de crescimento vigoroso em fins de primavera ou no verão, quando sobreveem um período de temperatura amena. A mesma explicação pode ser dada para a não manifestação de sintomas em brotações ocorridas

fora de época normal da maioria das plantas. Possivelmente, o aparecimento de sintomas nítidos quando a brotação de primavera se processa dentro de período de temperatura amena se deve ao fato de as folhas permanecerem sob condição jovem por mais tempo, desde que a palidez das nervuras menores é característica de folhas novas e médias. O fato de os sintomas manifestarem-se com maior intensidade em plantas com crescimento vigoroso reforça essa hipótese.

Nenhum dos tratamentos testados foi capaz de induzir o aparecimento de sintomas fora de época normal, de maneira semelhante à que ocorre na brotação de primavera, mesmo o baseado na colocação de plantas em câmara a 20°C, embora isso possa ocorrer em indicadoras de crescimento vigoroso no verão, quando ocorre um período de temperatura amena. Contudo, o desenvolvimento de um método que possibilite executar os testes diagnósticos baseados nas observações de outras brotações além das de primavera seria de grande importância para a obtenção de resultados experimentais de maneira mais continuada durante o ano.

Nos vinhedos do Estado de São Paulo, já foram reconhecidos 3 isolados do vírus do mosaico das nervuras (comum, fraco e de Kioho e Olimpia), que são diferenciados através de reações nas videiras Golia, Kober 5BB e Rupestris du Lot. A existência de isolados diferentes quanto aos sintomas induzidos em plantas de Rupestris du Lot já é conhecida para o vírus do mosaico das nervuras em outros países (TRIOLO & MATERAZZI, 1987).

Não há dúvidas de que os isolados presentes em plantas das variedades Kioho e Olimpia cultivadas em São Paulo são os mesmos que ocorrem no Japão, pelos simples fato de essas videiras terem resultado de material propagativo introduzido desse país. Isso, contudo, não significa que eles são

semelhantes aos isolados do mosaico das nervuras associados à moléstia denominada "ajinashika", que existe nos vinhedos japoneses. Essa observação se baseia no fato de que não se dispõe de informações suficientes sobre o vírus causador dessa moléstia para que se possa correlacionar com os isolados que ocorrem no Brasil. Já o isolado fraco detectado em São Paulo é originário de uma planta da variedade Itália. Possivelmente, o seu aparecimento resultou de segregação havida a partir do complexo normal durante as propagações vegetativas feitas ao longo dos anos.

Nos testes de proteção feitos com os isolados de Kioho e Olimpia e com o isolado fraco, os resultados foram um tanto inesperados. Evidência de proteção foi verificada em plantas de Kober 5BB quando se usou como isolado protetor, o de Kioho e Olimpia e como desafiante, o isolado comum. Isso sugere que ambos os isolados pertencem a um mesmo complexo do vírus do mosaico das nervuras. Mas, ao contrário do esperado, não houve efeito de proteção, quando a premunização foi feita com o isolado fraco e a superinoculação, com os isolados comuns, tanto em Kober 5BB como em Rupastris du Lot. Esse fato, contudo, não implica que esses isolados não sejam relacionados; o isolado fraco apenas não tem valor protetivo. Segundo COSTA (1975), algumas das causas que podem levar à falha na proteção são as seguintes: (a) o primeiro vírus não é bastante sistêmico, permitindo o estabelecimento do segundo nas células não invadidas pelo primeiro; (b) o segundo tem capacidade de multiplicação muito maior do que o primeiro, vindo a sobrepujar a quantidade do primeiro, apesar da desvantagem inicial e (c) o segundo vírus pode ter maior capacidade de invasão dos tecidos meristemáticos, o que iria permitir a sua multiplicação nos tecidos não invadidos pelo primeiro, aumentando a sua vantagem nos tecidos desenvolvidos posteriormente e podendo mesmo levar à supressão do primeiro. Plantas de Kober 5BB infetadas por iso-

lados comuns continuaram a apresentar os sintomas, mesmo após terem sido superinoculadas com os isolados de Kioho e Olimpia, exceto em algumas, que cessaram de os apresentar. Isso indica a ocorrência do fenômeno da supressão, embora não tenha sido comprovado através de testes de recuperação do desafiante para indicadoras. Esse fenômeno é pouco frequente, mas já é conhecido para alguns vírus (BAWDEN & KASSANIS, 1945). Esses pesquisadores acharam que o fenômeno da supressão não é semelhante ao da proteção. No caso da videira, a proteção e a supressão resultam da interação entre os mesmos isolados, ou sejam, os comuns e os de Kioho e Olimpia. Esse fato sugere fortemente que, pelo menos no exemplo citado, ambos os fenômenos são relacionados. A ocorrência de supressão pode ser explicada na base de que os isolados de Kioho e Olimpia têm vantagem competitiva sobre os isolados comuns, de tal modo que eventualmente podem substituir estes últimos nos novos crescimentos das plantas infetadas. Com base nesses resultados, pode-se até postular que em todos os casos em que uma determinada sequência de eventos promovida pelo segundo vírus suprime o primeiro, deve haver proteção quando o segundo é usado como premunizante. Esse assunto é bastante interessante para melhor compreensão dos aspectos referentes à etiologia do vírus e portanto, merece ser investigado com maior profundidade; mas não representa grande importância do ponto de vista de controle, pois o vírus, por não ter vetor, pode ser eliminado mediante obtenção de material sadio.

A diagnose segura do mosaico das nervuras não pode ser feita mediante observação de sintomas de plantas infetadas, mas tem que repousar no uso de videiras indicadoras. Isso porque o vírus causa infecção latente na grande maioria das variedades de copa e de porta-enxerto de importância para a viticultura de São Paulo. O porta-enxerto Rupestris du Lot é o mais indicado para ser adotado como indicado-

ra do mosaico das nervuras em São Paulo. É capaz de reagir com sintomas distintos à infecção pelos isolados do vírus, demonstrando ser mais sensível do que os porta-enxertos Golia e Kober 5BB. Além disso, apresenta a vantagem de já ser indicadora do mosaico do Traviú (estirpe de "grapevine fanleaf") e do cascudo ("legno riccio" ou "grapevine stem pitting"), que ocorrem em São Paulo (KUNIIYUKI & MÜLLER, 1987) e de alguns outros vírus assinalados em diversos países (MARTELLI, 1986). Além disso, o porta-enxerto Rupestris du Lot é de fácil manuseio, pois apresenta porte ereto. Já o Kober 5BB, além de também ser indicadora dos isolados comuns, serve como diferencial nos estudos de identificação dos isolados de Kioho e Olimpia, pois não reage com sintomas visíveis à infecção por estes.

O controle do mosaico das nervuras pode ser feito de modo bastante eficiente através do emprego de material propagativo sadio de variedades de copa e de porta-enxerto, dada a inexistência de um vetor do vírus causador. Assim sendo, postula-se que o material propagativo, uma vez obtido sadio, pode ser assim mantido de maneira permanente.

Na limpeza de material propagativo de videira infetada através da termoterapia, o método baseado na propagação de ápices de 10 mm dos brotos de plantas mantidas a 38°C durante 60 a 90 dias tem dado bons resultados (KUNIIYUKI & BETTI, 1987 e KUNIIYUKI et alii, 1987). Mas foi verificado que a manutenção das plantas sob tratamento por períodos muito prolongados (150 a 200 dias) reduz as chances de obter material livre do vírus do mosaico das nervuras. Esse fato provavelmente resulta da seleção de isolados mais resistentes ao calor do complexo do vírus. O método baseado no tratamento de estacas dormentes é impraticável para a videira, pois, além da baixíssima porcentagem de obtenção de plantas,

a partir de gemas desses ramos tratados, não possibilita a inativação do vírus.

As tentativas de obtenção de material sadio através da microenxertia não puderam ser avaliadas, devido ao não pegamento dos enxertos. Possivelmente, isso resultou da oxidação dos tecidos do cavalo da videira utilizada. AYUSO & PEÑA-IGLESIAS (1978), que adotaram essa técnica com sucesso, não mencionam a ocorrência desse fenômeno; mas como empregaram entre-nós de ramos verdes enrijecidos e enraizados in vitro como porta-enxerto, é provável que a oxidação tenha se manifestado com menor intensidade, ao contrário dos ramos suculentos usados no presente trabalho.

A alternativa de se promover a importação de material propagativo sadio de variedades tradicionais é perfeitamente viável e até recomendável, se feito de países onde programas de certificação de videiras livres de vírus são desenvolvidos por instituições especializadas. Contudo, é indispensável que necessárias precauções sejam adotadas durante o processo de propagação de material introduzido como sadio. A importação resulta em considerável ganho de tempo, pois os testes de seleção por indexação e de limpeza, através de processos como a termoterapia, são bastante demorados. Essas operações apenas se justificam para as variedades de copa e de porta-enxerto de valor regional, cujos materiais propagativos sadios não são disponíveis em outros países.

Já existe disponibilidade de clones livres de vírus de variedades de copa e de porta-enxerto mais importantes para a viticultura de São Paulo e para outras regiões vitícolas do país. Assim sendo, as bases para o desenvolvimento de programa visando a substituição gradativa de plantações infetadas por vinhedos sadios foram estabelecidas em São Pau

lo, como os que existem em muitos países (BALDACCI et alii, 1972 e 1973; VALAT, 1972; DETH, 1973; BOVEY et alii, 1974 e 1974; MARTELLI et alii, 1978; GOHEEN, 1980; YAMAGUCHI, 1983; etc.).

6. CONCLUSÕES

- o vírus do mosaico das nervuras, que ocorre de maneira generalizada nos vinhedos do Estado de São Paulo, é idêntico ao causador da "grapevine fleck disease", presente na maioria dos países vitícolas;

- a perpetuação do vírus do mosaico das nervuras através de semente é negativa e não há evidência da existência de vetor nos vinhedos paulistas. A ocorrência do vírus decorre de sua perpetuação através da propagação vegetativa de plantas infetadas de variedades de copa e de porta-enxerto;

- os isolados de Kioho e Olimpia do vírus do mosaico das nervuras protegeram contra superinoculação com os comuns. Quando superinoculados em plantas infetadas por isolados comuns, induziram o fenômeno da supressão em algumas instâncias;

- é postulado que um vírus, capaz de causar supressão de um anteriormente estabelecido na planta, será capaz de proteger quando primeiramente inoculado;

- o mosaico das nervuras pode ser eficientemente controlado através do emprego de material propagativo sadio de variedades de copa e de porta-enxerto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL - 1986, Rio de Janeiro, 47: 282, 1987.

AYUSO, P. & PEÑA-IGLESIAS, A. Microinjerto de meristemas: una nueva y prometedora técnica para regenerar vides enfermas por virus. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE VIRUS Y VIROSIS DE LA VID, 6., Madrid, 1976. Anales. Madrid, INIA, 1978. p.319-23.

BALDACCI, E.; BELLI, G.; FORTUSINI, A. Il Centro di Selezione Viticola di Riccagioia. In: CONVEGNO DEL GRUPPO INTERNAZIONALE PER LO STUDIO DEI VIRUS E DELLE VIROSI DELLA VITE, 5., Salice Terme, 1973. Rivista di Patologia Vegetale, Pavia, 9 (suppl.): 295-303, 1973.

BALDACCI, E.; BELLI, G.; FORTUSINI, A.; OSLER, R. Selezione sanitaria della vite in Italia settentrionale: risultati e considerazioni. In: CONFÉRENCE DU GROUPE INTERNATIONAL D'ÉTUDE DES VIRUS ET DES MALADIES À VIRUS DE LA VIGNE, 4., Colmar, 1970. Annales de Phytopathologie, Paris, 72-4 (nº hors-série), 1972. p.13-6.

BARLASS, M.; SKENE, K.G.M.; WOODHAM, R.C.; KRAKE, L.R. Regeneration of virus-free grapevines using in vitro apical culture. Annals of Applied Biology, London, 101: 291-5, 1982.

- BASS, P.; VUITTENEZ, A.; LEGIN, R. Amélioration de la thermothérapie de la vigne par culture d'extrémités de pous-ses sur milieux nitritifs ou par greffage d'apex sur plan-tules de semis cultivées aseptiquement in vitro. In: CON-FERENCIA INTERNACIONAL SOBRE VIRUS Y VIROSIS DE LA VIDE, 6., Madrid, 1976. Anales. Madrid, INIA, 1978. p.325-32.
- BAWDEN, F.C. & KASSANIS, B. The suppression of one plant virus by another. The Annals of Applied Biology, Cambridge, 32(1): 52-7, 1945.
- BOUBALS, D. Importance économique des viroses de la vigne. Circonstances favorisant leur propagation. Lutte contre ces maladies. Bulletin de l'Office International de la Vigne et du Vin, 44(479): 5-39, 1971.
- BOVEY, R. Un virus latent dans le Chasselas. In: CONFÉREN-CE DU GROUPE INTERNATIONAL D'ÉTUDE DES VIRUS ET DES MALA-DIES À VIRUS DE LA VIGNE, 4., Colmar, 1970. Annales de Phytopathologie, Paris, 72-4 (n° hors-série), 1972a. p. 31-4.
- BOVEY, R. Therapeutic methods applied to the grapevine. In: INTERNATIONAL HORTICULTURE CONGRESS, 18., Tel-Aviv, 1970. Proceedings. Tel-Aviv, 1972b. Vol. 3. p.32-8.
- BOVEY, R.; BRUGGER, J.J.; SIMON, J.L.; JAQUINET, A. La sé-lection sanitaire de la vigne en Suisse romande. Revue Suisse de Viticulture, d'Arboriculture et d'Horticulture, Changins, 6: 77-83, 1974.
- BOVEY, R.; GARTEL, W.; HEWITT, W.B.; MARTELLI, G.P.; VUITTE-NEZ, A. Maladies à virus et affections similaires de la vigne. Atlas en couleurs des symptômes- Lausanne, Ed. Payot, 1980. 182p.

- BOVEY, R.; ROCHAIX, M.; SIMON, J.L. Résultats et perspectives d'avenir de la sélection sanitaire de la vigne. Revue Suisse de Viticulture, d'Arboriculture et d'Horticulture, Changins, 7: 161-6, 1975.
- CADMAN, C.F.; DIAS, H.F.; HARRISON, B.D. Sap-transmissible viruses associated with diseases of grapevine in Europe and North America. Nature, London, 187: 577-9, 1960.
- CORBETT, M.K. & WIID, J. Closterovirus-like particles in extracts from diseased grapevines. Phytopathologia, Mediterranea, Bologna, 24: 91-100, 1985.
- COSTA, A.S. Proteção. In: Virologia Vegetal. Curso de Pós-graduação em Fitopatologia, ESALQ/USP. Campinas, 1975. 15p.
- DETH, P.S. The New York State grape certification program. New York's Food Life Sciences Quarterly, Ithaca, 6 (4): 5, 1973.
- DIAS, H.F. Mechanical transmission of viruses to herbaceous hosts. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON VIRUS AND VECTOR ON PERENNIAL HOSTS, WITH SPECIAL REFERENCE TO *Vitis*, Davis, 1965. Proceedings. Davis, University of California, Department of Plant Pathology, 1965. p.235-47.
- DOAZAN, J.P. On the seed-transmission of some grapevine virus diseases. In: CONFERENCIA INTERNACIONAL SOBRE VIRUS Y VIROSIS DE LA VID, 6., Madrid, 1976. Anales. Madrid, INIA, 1978. p.83-5.
- DOAZAN, J.P. & BELLEGARDE, H. Essai de transmission par la graine de viroses de la vigne (court-noué, marbrure). Annales de Amélioration de Plantes, Paris, 27(2): 245 -53, 1977.

- ENGELBRECHT, D.J. & NEL, A.C. A graft-transmissible stem-grooving of grapevine in the western Cape Provincia (South Africa) resembling legno riccio. Phytophylactica, Pretoria, 3: 93-6, 1971.
- GOHEEN, A.C. Virus and viruslike diseases of grapes. Hort-Science, Alexandria, 12: 465-9, 1977.
- GOHEEN, A.C. The California clean grape stock program. California Agriculture, Berkeley, 34(7): 15-6, jul. 1980.
- GOHEEN, A.C. & LUHN, C.F. Heat inactivation of viruses in grapevines. In: CONVEGNO DEL GRUPPO INTERNAZIONALE PER LO STUDIO DEI VIRUS E DELLE VIROSI DELLA VITE, 5., Salice Terme, 1973. Rivista di Patologia Vegetale, Pavia, 9 (suppl.): 287-9, 1973.
- GOHEEN, A.C.; LUHN, C.F.; HEWITT, W.B. Inactivation of grapevine viruses *in vivo*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON VIRUS AND VECTOR ON PERENNIAL HOSTS, WITH SPECIAL REFERENCE TO *Vitis*, Davis, 1965. Proceedings. Davis, University of California, Department of Plant Pathology, 1965. p.255-65.
- GUGERLI, P.; BRUGGER, J.J.; BOVEY, R. L'enroulement de la vigne: mise en évidence de particules virales et développement d'une méthode immuno-enzymatique pour le diagnostic rapide. Revue Suisse de Viticulture, d'Arboriculture et d'Horticulture, Changins, 16(5): 299-304, 1984.
- GUIRADO, N.; MÜLLER, G.W.; BETTI, J.A.; PRATES, H.S. Manifestação rápida de sintomas foliares do vírus da sorose dos citros em ambiente refrigerado. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 11(2): 181, jun. 1986.

HEVIN, M.; LECLAIR, P.; RIVES, M. Green-grafting as quick and secure method for graft-indexing viruses in the grape vine. In: CONVEGNO DEL GRUPPO INTERNAZIONALE PER LO STUDIO DEI VIRUS E DELLE VIROSI DELLA VITE, 5., Salice Terme, 1973. Rivista di Patologia Vegetale, Pavia, 9 (suppl.): 277-8, 1973a.

HEVIN, M.; OTTENWAEELTER, M.M.; DOAZAN, J.P.; RIVES, M. Investigating the transmission of marbrure and fanleaf through the seed in the grapevine. In: CONVEGNO DEL GRUPPO INTERNAZIONALE PER LO STUDIO DEI VIRUS E DELLE VIROSI DELLA VITE, 5., Salice Terme, 1973. Rivista di Patologia Vegetale, Pavia, 9 (suppl.): 253-8, 1973b.

HEWITT, W.B. Viruses and virus diseases of the grapevine. Review of Applied Mycology, London, 47: 433-55, 1968.

HEWITT, W.B. On the origin and distribution of *Vitis* and the virus diseases of the grapevine. In: CONFERENCIA INTERNACIONAL SOBRE VIRUS Y VIROSIS DE LA VIDA, 6., Madrid, 1976. Anales. Madrid, INIA, 1978. p.3-5.

HEWITT, W.B.; GOHEEN, A.C.; CORY, L.; LUHN, C.F. Grapevine fleck disease, latent in many varieties, is transmitted by graft-inoculation. In: CONFÉRENCE DU GROUPE INTERNATIONAL D'ÉTUDE DES VIRUS ET DES MALADIES À VIRUS DE LA VIGNE, Colmar, 1970. Annales de Phytopathologie, Paris, 72-4 (nº hors-série), 1972. p.43-7.

HEWITT, W.B.; GOHEEN, A.C.; RASKI, D.J.; GOODING JR., G. V. Studies on virus diseases of the grapevine in California. Vitis, Landau (Pfalz), 3: 57-83, 1962.

HUGLIN, P.; GUILLOT, P.; VALAT, C.; VUITTENEZ, A. L'évaluation génétique et sanitaire du matériel clonal de la vigne. Bulletin de l'Office International de la Vigne et du Vin, Paris, 53(597): 857-82, 1980.

INFORMAÇÕES ECONÔMICAS 3/88, São Paulo, 18: 35-48, 1988.

KAHN, R.P.; WATERWORTH, H.E.; GILLASPIE JR., A.G.; FOSTER, J.A.; GOHEEN, A.C.; MONROE, R.L.; POVICH, W.L.; MOCK, R. G.; LUHN, C.F.; CALAVAN, E.C.; ROISTACHER, C.N. Detection of viruses or virus-like agents in vegetatively propagated plant importations under quarantine in the United States, 1968-1978. Plant Disease Reporter, Beltsville, 63: 775-9, 1979.

KRAKE, L.R. & WOODHAM, R.C. Grapevine summer mottle: a new graft-transmissible disease. Vitis, Landau (Pfalz): 17: 266-70, 1978.

KUNIYUKI, H. Ocorrência do mosaico das nervuras da videira (grapevine fleck disease) em São Paulo. Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, Campinas, 9: 39, 1976 (Resumo).

KUNIYUKI, H. Viroses da videira no Brasil. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 6(2): 300-1, jun. 1981.

KUNIYUKI, H. & BETTI, J.A. Obtenção de clones isentos de vírus de videira através da termoterapia em São Paulo. Summa Phytopathologica, Jaguariúna, 13(3/4): 173-84, jul/Dez. 1987.

KUNIYUKI, H. & COSTA, A.S. Incidência de vírus da videira em São Paulo. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 12(3): 240-5, set. 1987.

- KUNIYUKI, H. & MULLER, G.W. Diagnose do cascudo da videira em São Paulo. Summa Phytopathologica, Piracicaba, 13 (1/2): 26, jan./jun. 1987.
- KUNIYUKI, H.; MULLER, G.W.; BETTI, J.A. Eliminação de vírus em videira através da termoterapia associada a propagação de apíces caulinares por enraizamento *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9., Campinas, 22-27 nov. 1987. Resumos. p.71-2.
- LEGIN, R. Expérimentation pour étudier l'effect des principales viroses sur la végétation et la production de la vigne. In: CONFÉRENCE DU GROUPE INTERNATIONAL D'ÉTUDE DES VIRUS ET DES MALADIES À VIRUS DE LA VIGNE, 4., Colmar, 1970. Annales de Phytopathologie, Paris, 72-4 (nº hors-série), 1972. p.49-57.
- LEGIN, R. & VUITTENEZ, A. Comparaison des symptômes et transmission par greffage d'une mosaïque nervaire de *Vitis vinifera*, de la marbrure de *V. rupestris* et d'une affection nécrotique des nervures de l'hybride Rup.-Berl. 110R. In: CONVEGNO DEL GRUPPO INTERNAZIONALE PER LO STUDIO DEI VIRUS E DELLE VIROSI DELLA VITE, 5., Salice Terme, 1973. Rivista di Patologia Vegetale, Pavia, 9 (suppl.): 57-63, 1973.
- LISTER, R.M. & BAR-JOSEPH, M. Closterovirus. In: KURSTAK, ed., Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis. Elsevier, North-Holland Biomedical Press, 1981. Part IV, Cap. 24. p.809-44.
- MARTELLI, G.P. Virus and virus-like diseases of the grapevine in the Mediterranean area. FAO Plant Protection Bulletin, Roma, 34: 25-42, 1986.

MARTELLI, G.P.; SAVINO, V.; ROSCIGLIONE, B.; QUACQUARELLI, A.
Clonal and sanitary selection and production of virus disease-free grapes in Southern Italy. In: CONFERENCIA INTERNACIONAL SOBRE VIRUS Y VIROSIS DE LA VID, 6., Madrid, 1976. Anales. Madrid, INIA, 1978. p.151-66.

McGECHAN, J.K. Important virus diseases of grapevines in New South Wales. Agricultural Gazette of New South Wales, Rydalmere, 81: 349-52, 1970.

MILNE, R.G.; CONTI, M.; LESEMAN, D.E.; STELLMACH, G.; TANNER, E.; COHEN, J. Closterovirus-like particles of two types associated with diseased grapevines. Phytopathologische Zeitschrift, Berlin, 110: 360-8, 1984.

MINK, G.J. & PARSONS, J.L. Procedures for rapid detection of virus and viruslike diseases. Plant Disease Reporter, Beltsville, 61(7): 567-71, 1977.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 15: 473-97, 1962.

NAMBA, S.; IWANAMI, T.; YAMASHITA, S.; DOI, Y.; HATAMOTO, M. Three phloem-limited viruses of grapevine: direct fluorescent detection. In: PLANT VIRUS DISEASES OF HORTICULTURAL CROPS IN THE TROPICS AND SUBTROPICS, Taipei, 1986. Taipei, Food and Fertilizer Technology Center, 1986. p. 109-26. Apud Review of Plant Pathology, Farnham Royal, 66(5): 215, 1987. (Resumo).

NAMBA, S.; YAMASHITA, S.; DOI, Y.; YORA, K. A small spherical virus associated with the ajinashika disease of Koshu grapevine. Annals of the Phytopathological Society of Japan, Tokyo, 45(1): 70-3, Jan. 1979.

NEL, A.C. & ENGELBRECHT, D.J. Grapevine virus diseases in South Africa and the influence of latent viruses in the nursery. In: CONFÉRENCE DU GROUPE INTERNATIONAL D'ÉTUDE DES VIRUS ET DES MALADIES À VIRUS DE LA VIGNE, 4., Colmar, 1970. Annales de Phytopathologie, Paris, 72-4 (nº hors - série), 1972. p.67-74.

OJIMA, M.; RIGITANO, O.; CAMPO DALL'ORTO, F.A.; BARBOSA, W.; RIBEIRO, I.J.A.; TERRA, M.M.; AMARO, A.A.; BILLER, V. S. P.; BETTI, J.A.; KUNIYUKI, H.; MARTINS, F.P.; SCARANARI, H.; FAHL, J.I. Fruticultura de Clima Temperado no Estado de São Paulo: diagnóstico da situação econômica e cultural e atividades de pesquisa no Instituto Agrônomo de Campinas. Boletim Técnico. Campinas, Instituto Agrônomo, nº 89, 1984. 72p.

OLIVEIRA, A.R.; VEGA, J.; KUNIYUKI, H.; BAPTISTA, C.R.; MULLER, G.W.; COSTA, A.S. Detecção de vírus serologicamente idêntico ao da tristeza dos citros em calos de videira Seibel 2 com enrolamento da folha através de MEIAD. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 13(2): 133, jul. 1988. (Resumo).

OTTENWAEELTER, M.M.; HEVIN, M.; LECLAIR, P.; DOAZAN, J.P.; RIVES, M. Heat-therapy eliminates the ability to transmit the causal agent of "marbrure" in several *V. vinífera* clones and in *V. rupestris* du Lot (St. George). In: CONVEGNO DEL GRUPPO INTERNAZIONALE PER LO STUDIO DEI VIRUS E DELLE VIROSI DELLA VITE, 5., Salice Terme, 1973. Rivista di Patologia Vegetale, Pavia, 9 (suppl.): 281-5, 1973.

PEDROSO, E.I. Detecção e caracterização de agentes causais de viroses e doenças afins, no âmbito da seleção sanitária da videira em Portugal. Lisboa, 1987. 213p. (Doutorado - Instituto Superior de Agricultura/Universidade Técnica de Lisboa).

PEÑA-INGLESIAS, A. Consideraciones sobre la problemática de los virus de la vid. In: CONFERENCIA INTERNACIONAL SOBRE VIRUS Y VIROSIS DE LA VID, 6., Madrid, 1976. Anales. Madrid, INIA, 1978. p.IX-XLVII.

PEÑA-INGLESIAS, A. & AYUSO, P. Further research on the detection of grapevine viruses in Spain. In: CONVEGNO DEL GRUPPO INTERNAZIONALE PER LO STUDIO DEI VIRUS E DELLE VIROSI DELLA VITE, 5., Salice Terme, 1973. Rivista di Patologia Vegetale, Pavia, 9 (suppl.): 28-30, 1973.

PEREIRA, F.M. & MARTINS, F.P. Instruções para a cultura da videira. Boletim. Campinas, Instituto Agrônômico, nº 199, 1972. 48p.

PROGNÓSTICO 1987/88, São Paulo, 16: 18, 1987.

REFATTI, E. & GRANATA, G. Distribution of fleck disease in Sicily and reactions on some indicators to its agent. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUS AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE, 7., Niagara Falls, 1980. Proceedings. Niagara Falls, Agriculture Canada, 1980. p.35-9.

REFATTI, E.; GRANATA, G.; GRASSO, S. On small vein mosaic virus. In: CONFERENCIA INTERNACIONAL SOBRE VIRUS Y VIROSIS DE LA VID, 6., Madrid, 1976. Anales, Madrid, INIA, 1978. p.197-201.

RIVES, M. Séparation de la marbrure et du court-noué (panachure) chez la vigne par thermothérapie. In: CONFÉRENCE DU GROUPE INTERNATIONAL D'ÉTUDE DES VIRUS ET DES MALADIES À VIRUS DE LA VIGNE, 4., Colmar, 1970. Annales de Phytopathologie, Paris, 72-4 (nº hors-série), 1972. p.75-7.

SANTOS NETO, J.R.A. Melhoramento da videira. Bragantia, Campinas, 14: 237-58, 1955.

SANTOS NETO, J.R.A. A cultura da videira. O Agrônômico, Campinas, 21: 67-108, 1969.

SHTERENBERG, P.M.; MILKUS, B.N.; BEREZOVSKAYA, E.A. On the composition, distribuion and harmfulness of virus diseases of grapevine in Ukraina. In: CONVEGNO DEL GRUPPO INTERNAZIONALE PER LO STUDIO DEI VIRUS E DELLE VIROSI DELLA VITE, 5., Salice Terme, 1973. Rivista di Patologia Vegetale, Pavia, 9 (suppl.): 23-7, 1973.

TERAI, Y. & YANO, R. Ajinashika disease of the grapevine cultivar Koshu in Japan. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUS AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE, 7., Niagara Falls, 1980. Proceedings. Niagara Falls, Agriculture Canada, 1980. p.15-9.

TERAI, Y. & YANO, R. Effect of grapevine leafroll grapevine fleck viruses on sugar content of grapes. Bulletin of the Yamanashi Fruit Experiment Station, Manriki, 6: 95-9, 1985.

TRIOLO, E. & RESTA, E. The responses of the grapevine fleck agent to tetracycline-HCl antibiotic and Dienes' stain. Phytopathologia Mediterranea, Bologna, 24(1/2): 197-203, 1985.

TRIOLO, E. & MATERAZZI, A. La "maculatura infettiva" della vite: influenza di isolati diversi sull'attitudine alla propagazione vegetativa di *Vitis rupestris* "St. George". La Recherche Agronomique in Suisse, 26(3): 320-4, 1987.

- UYEMOTO, J.K.; MARTELLI, G.P.; WOODHAM, R.L.; GOHEEN, A.C.; DIAS, H.F. Grapevine (*Vitis*) virus and virus-like diseases. In: BARNETT, O.W. & TOLIN, S.A. Plant Virus Slide Series. Clemson, Clemson University, 1978. Set. n° 1. 29p.
- VALAT, C. Note concernant les travaux de sélection sanitaire conduits par l'Association Nationale Technique pour l'Amélioration de la Viticulture. In: CONFÉRENCE DU GROUPE INTERNATIONAL D'ÉTUDE DES VIRUS ET DES MALADIES À VIRUS DE LA VIGNE, 4., Colmar, 1970. Annales de Phytopathologie, Paris, 72-4 (n° hors - série), 1972. p.89-94.
- VALAT, G.; GRENNAN, S.; AURAN, G.; BONNET, A. Guérison de quelques maladies à virus de la vigne par thermothérapie de plantules cultivées *in vitro*. Vignes et Vins, Paris, 284: 19-22, 1979.
- VERDEREVSKAJA, T.D.; MARINESKU, V.G.; SEMTSCHIK, E.S. Aetiology and diagnosis of grapevine fleck. Arch. für Phytopathologie und Pflanzenschutz 19(4): 222-6, 1983. Apud Review of Plant Pathology, Farnham Royal, 63(6): 230, 1984. (Resumo)
- VUITTENEZ, A. Observations sur une mosaïque de la vigne, probablement indépendante du virus du court-noué. Annales de Épiphyties. "Études de Virologie", Paris, 17: 67-73, 1966.
- VUITTENEZ, A. Méthodes de diagnostic des viroses de la vigne. Bulletin de l'Office International de la Vigne et du Vin, Paris, 43(475): 926-43, 1970.

- VUITTENEZ, A. Méthodes of studying virus diseases of grapevines. In: CONVEGNO DEL GRUPPO INTERNAZIONALE PER LO STUDIO DEI VIRUS E DELLE VIROSI DELLA VITE, 5., Salice Terme, 1973. Rivista di Patologia Vegetale, Pavia, 9 (suppl.): 123-31, 1973.
- VUITTENEZ, A. Suspected virus diseases of the grapevine. In: CONFERENCIA INTERNACIONAL SOBRE VIRUS Y VIROSIS DE LA VID, 6., Madrid, 1976. Anales. Madrid, INIA, 1978. p.151-61.
- WATANABE, Y.; YAMASHITA, H.; IKAWA, Y. Quick detection of grapevine fleck by green-grafting. Research Bulletin of Plant Protection Service, Tokyo, 22: 101-3, 1986. Apud Review of Plant Pathology, Farnham Royal, 66(5): 215, 1987. (Resumo)
- WOODHAM, R.C. & KRAKE, L.R. Investigations on transmission of grapevine leafroll, yellow speckle and fleck diseases by dodder. Phytopathologische Zeitschrift, Berlin, 106: 193-8, 1983.
- WOODHAM, R.C.; TAYLOR, R.H.; KRAKE, L.R. Grapevine virus and virus-like diseases in Southern Australia. In: CONVEGNO DEL GRUPPO INTERNAZIONALE PER LO STUDIO DEI VIRUS E DELLE VIROSI DELLA VITE, 5., Salice Terme, 1973. Rivista di Patologia Vegetale, Pavia, 9 (suppl.): 17-22, 1973.
- YAMAGUCHI, A. Virus certification of fruit trees. in Japan. Japan Agricultural Research Quarterly, Tokyo, 17(3): 180-4, 1983.
- YUKI, V.A.; MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. Inativação do vírus da tristeza em estacas de limão tahiti, por termoterapia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRITICULTURA, 2., Viçosa-Belo Horizonte, 1973. Anais. Viçosa-Belo Horizonte, 1973. Vol. I. p.201-9.