

IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA DO VÍRUS DO MOSAICO DAS NERVURAS DA Videira NO BRASIL*

HUGO KUNIYUKI^{1**}, JORGE A. M. REZENDE^{2**}, VALDIR A. YUKI^{1**} & JUAREZ A. BETTI¹

¹Centro de Fitossanidade/Virologia, Instituto Agrônomo, Cx. Postal 28, CEP 13020-902, Campinas, SP, e-mail: hkuniyuk@cec.iac.br; ²Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/USP, Cx. Postal 9, CEP 13418-900, Piracicaba, SP

(Aceito para publicação em 10/09/2002)

Autor para correspondência: Hugo Kuniyuki

KUNIYUKI, H., REZENDE, J.A.M., YUKI, V.A. & BETTI, J.A. Identificação sorológica do vírus do mosaico das nervuras da videira no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 27:635-638. 2002.

RESUMO

Em São Paulo, ocorrem quatro isolados do vírus que induz o mosaico das nervuras da videira (*Vitis* spp.), os quais são diferenciados pelos sintomas que provocam em algumas variedades. Para confirmar a identidade desse vírus e o relacionamento existente entre os quatro isolados, foram aplicados os testes DAS-ELISA e TAS-ELISA usando anti-soros comerciais contra o *Grapevine fleck virus* (GFkV). As fontes de antígeno foram tecidos de floema de ramos dormentes e de folhas jovens da brotação de primavera de videiras sabidamente infetadas. As reações nos testes imunoenzimáticos envolvendo os quatro isolados do vírus foram positivas para o anti-soro contra o GFkV. Os resultados foram também

positivos para amostras de 66 plantas infetadas de 26 variedades de videira procedentes de 11 regiões vitícolas de São Paulo e de 24 plantas de 12 variedades provenientes dos estados de Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Santa Catarina. Extratos de folhas novas e tenras apresentaram valores de absorvância mais consistentes do que extratos de ramos dormentes. Plantas não infetadas foram empregadas como controle negativo. Os resultados obtidos confirmaram que os quatro isolados virais possuem relacionamento sorológico com o GFkV, sugerindo que os mesmos pertencem ao complexo viral que causa o "grapevine fleck disease".

Palavras-chave adicionais: *Vitis* spp., *Grapevine fleck virus*.

ABSTRACT

Serological identification of the *Grapevine fleck virus* in Brazil

In the State of São Paulo, four different isolates of the virus that induces chlorotic translucent vein break in the minor veins of grapevines (*Vitis* spp.) were separated by their differential biological behaviour and tested for their relationship to *Grapevine fleck virus* (GFkV) by DAS-ELISA and TAS-ELISA with commercial antisera against GFkV. Young leaves from spring shoots and dormant cuttings were used for antigen extraction. All infected plants were previously indexed by graft-inoculation to 'Rupestris du Lot'. The four isolates gave positive

reactions to the GFkV antiserum. Positive ELISA reactions were observed in 66 samples of 26 varieties, from 11 grape-growing areas from the State of São Paulo as well as 24 samples, of 12 varieties, from five other states of Brazil. Healthy plants consistently gave negative results. Young leaves were better sources of antigen than cortical scrapings of dormant cuttings. The results showed that the four isolates have a serological relationship with the GFkV, suggesting that they belong to the viral complex that induce grapevine fleck disease.

A virose, caracterizada por sintomas de mosaico das nervuras em videira (*Vitis* spp.), ocorre de maneira generalizada nas regiões vitícolas do Brasil (Kuhn, 1992; Kuniyuki & Costa, 1987, 1995). Essa doença, com base nos sintomas causados em videira indicadora, tem sido considerada semelhante ao "grapevine fleck disease", virose já descrita em outros países (Hewitt *et al.*, 1972). Os sintomas característicos das duas doenças são evidenciados no porta-enxerto de videira 'Rupestris du Lot' ('St. George') pela presença de palidez das nervuras de terceira e quarta ordens, de um a três milímetros de comprimento, de folhas jovens e médias, durante a fase de brotação de primavera (Hewitt *et*

al., 1972; Kuhn, 1992; Kuniyuki & Costa, 1994).

O "grapevine fleck disease" é induzido por um vírus de partículas isométricas de ca. 30 nm de diâmetro, denominado *Grapevine fleck virus* (GFkV) (Boscia *et al.*, 1991), o qual é limitado ao floema e não é transmitido mecanicamente. Sua classificação taxonômica ainda não está definida, embora possua algumas características encontradas em espécies dos gêneros *Tymovirus* e *Marafivirus* (Martelli, 2000; Sabanadzovic *et al.*, 2000). O GFkV tem sido detectado por meio de métodos sorológicos e moleculares (Boscia *et al.*, 1991; Sabanadzovic *et al.*, 1996).

Em São Paulo, ocorrem quatro isolados do vírus do mosaico das nervuras da videira que, apesar de causarem os sintomas típicos de palidez das nervuras em 'Rupestris du Lot' (Figura 1A), são diferenciados pela sintomatologia

* Apoio financeiro PRONEX

** Bolsistas do CNPq

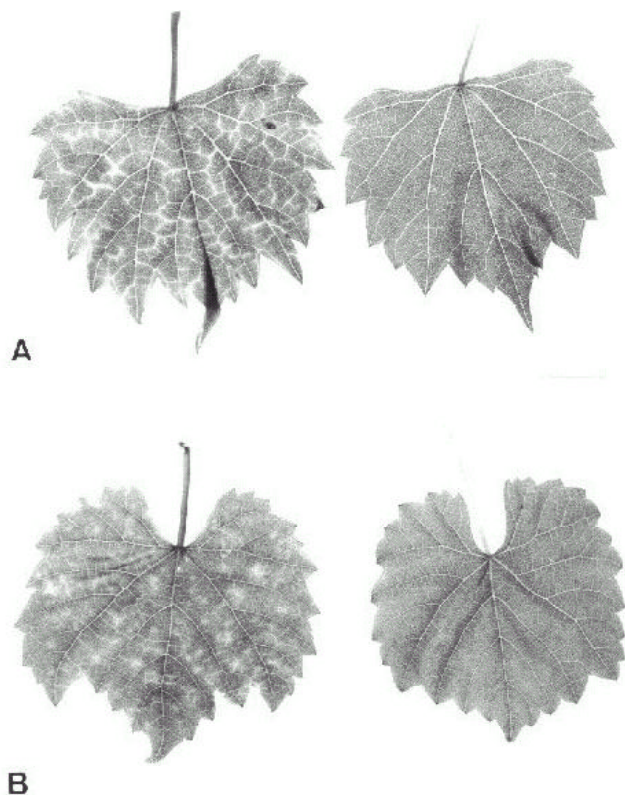


FIG. 1 - Sintomas de palidez das nervuras induzidos pelo isolado comum do vírus causador do mosaico das nervuras da videira (*Vitis* spp.). A - Folhas do porta-enxerto 'Rupestris du Lot' (à direita, folha de planta sadia). B - Folha do porta-enxerto 'Kober 5BB' (à direita, folha de planta sadia).

observada em outras variedades de videira ou pela intensidade dos sintomas. São eles: (a) isolado comum (C), assim denominado por ser o mais freqüente dentro dos vinhedos paulistas, causa sintomas evidentes no porta-enxerto Kober 5BB, mas não na variedade Kyoho (Figura 1B); (b) isolado Itália (I), obtido inicialmente de plantas assintomáticas da variedade Itália, também de ocorrência generalizada, não induz sintomas em 'Kober 5BB' e 'Kyoho'; (c) isolado obtido da variedade Kyoho (K), que provoca sintomas de palidez das nervuras em 'Kyoho', mas não em 'Kober 5BB' e (d) isolado fraco (F), obtido de uma planta sem sintomas de uva Itália, causa reações bastante fracas em 'Rupestris du Lot', tanto no número de manchas como na intensidade dos sintomas, quando comparadas com as induzidas pelo isolado Itália, mas não provoca alterações em 'Kober 5BB' e 'Kyoho' (Kuniyuki & Costa, 1994; 1995).

O vírus que induz o mosaico das nervuras causa infecção latente na maioria das variedades de videira de importância econômica no Brasil e em outros países. As perdas causadas pelo vírus ainda não foram relatadas, mas sabe-se que o patógeno reduz o vigor das plantas infetadas de algumas variedades de copa e de porta-enxerto, como também altera a intensidade da coloração dos frutos (Kuniyuki &

Costa, 1994).

Para confirmar a identidade dos quatro isolados virais ocorrentes nas videiras em São Paulo e o relacionamento existente entre esses isolados e o GFkV, foi aplicado o teste TAS-ELISA, utilizando-se anti-soro comercial contra o GFkV (Agritest, Bari-Valenzano, Italia) e empregando-se o procedimento desenvolvido por Boscica *et al.* (1995). Realizou-se, em menor escala, o DAS-ELISA, utilizando anti-soro contra o GFkV (Bioreba, Suíça) com o protocolo adotado por Ramel *et al.* (1993).

Os testes sorológicos foram efetuados, entre junho/1999 e outubro/2001, no Laboratório de Virologia Vegetal do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ/USP, Piracicaba, SP.

Todas as plantas usadas nos testes sorológicos foram, inicialmente, enxertadas na videira indicadora 'Rupestris du Lot', sendo mantidas em casa de vegetação ou em canteiros do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade, Setor de Virologia, do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Essas plantas infetadas, pertencentes a diferentes cultivares, eram procedentes de diversas áreas vitícolas do Estado de São Paulo, tais como Atibaia, Biritiba Mirim, Capão Bonito, Itupeva, Jales, Jundiaí, Pilar do Sul, São Miguel Arcanjo, São Roque, Tupi Paulista e Vinhedo.

As fontes de antígeno para o teste foram tecidos de folhas jovens, tenras e aclorofiladas da brotação de primavera e de tecidos obtidos mediante raspagem do câmbio, após retirada da casca, de ramos dormentes ou próximos da dormência.

Para o teste TAS-ELISA, placas de poliestireno (Corning ou Castor) foram submetidas a uma cobertura com 200 µl de anti-soro policlonal, diluído a 1:1.000 em tampão carbonato 0,05 M, pH 9,6 e incubadas a 37 °C durante 2 h. Após lavagem (três vezes com tampão PBST, pH 7,4, com intervalo de 3 min), as amostras, diluídas a 1:15 (p/v) em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 8,2, contendo NaCl a 0,8% (p/v), PVP 40.000 a 2% (p/v), PEG 6000 a 1% (p/v), NaN₃ a 0,02% (p/v) e Tween 20 a 0,05% (v/v), foram adicionadas aos poços (200 µl) das placas e incubadas por 2 h a 37 °C. Seguiram-se descarte, nova lavagem e adição de 200 µl de anti-soro monoclonal (1:1.000) em tampão conjugado, constituído de PBS-T, pH 7,4, contendo 2% de PVP 40.000 (p/v) e 0,2% de BSA (p/v), com incubação por 2 h a 37 °C. Após nova lavagem, adicionaram-se 200 µl do conjugado de anti-soro monoclonal com fosfatase alcalina, diluído 1:1000 em tampão conjugado. Após incubação por 2 h a 37 °C, seguida de lavagem, colocaram-se 200 µl de substrato (p-fosfato de nitrofenil, Sigma N-9389, 1 mg/ml em dietanolamina 10%, pH 9,8). Quando necessária, a reação foi paralizada pela adição de 50 µl de NaOH 3 M.

A absorbância a 405 nm foi registrada em um leitor de ELISA (Σ960, Metertech, Taiwan). Uma amostra foi considerada positiva quando o valor da absorbância foi três vezes superior ao valor da absorbância da amostra de planta sadia. Os valores foram obtidos, em média, de 1 a 3 h de

TABELA 1 - Valores médios de absorvância (A_{405}) obtidos por TAS-ELISA para amostras infetadas por quatro isolados do vírus do mosaico das nervuras da videira (*Vitis* spp.), testados com um anti-soro contra o *Grapevine fleck virus* (GFkV) (Agritest), em duas repetições por planta. São Paulo, 1999-2000

Variedade e procedência**	Isolado viral*	Absorvância	
		Folhas novas	Ramos dormentes
Isabel (SR)	C	0,877	0,330
Niagara Rosada (JD)	C	1,073	0,477
Seibel 2 (SR)	C	0,984	0,654
Red Globe (SMA)	I	0,768	0,376
Itália (IT)	I	1,170	0,732
Thompson Seedless (JD)	I	0,954	0,436
Kyoho (JD)	K	0,826	0,380
Kyoho (SMA)	K	0,973	0,496
Kyoho Rosado (SMA)	K	0,758	0,301
Italia (CB)	F	0,816	0,362
Rupestris du Lot (CP)	F	0,962	0,448
Controle positivo (Agritest)	GFkV	1,160	0,892
Controle negativo (Agritest)	Sadio	0,058	0,077
Niagara Rosada (CP)	Sadia	0,067	0,064
Itália (CP)	Sadia	0,053	0,063
Kyoho (CP)	Sadia	0,078	0,068
Isabel (CP)	Sadia	0,055	0,076
Seibel 2 (CP)	Sadia	0,062	0,059
Rupestris du Lot (CP)	Sadio	0,051	0,060

* Vírus do mosaico das nervuras da videira: C = isolado comum; I = isolado da variedade Itália; K = isolado da variedade Kyoho e F = isolado fraco.

** CB = Capão Bonito, CP = Campinas, IT = Itupeva, JD = Jundiá, SMA = São Miguel Arcanjo e SR = São Roque

incubação do substrato no escuro a temperatura ambiente.

O procedimento adotado para o DAS-ELISA foi o recomendado pela Bioreba. Alíquotas de 200 µl de anti-soro policlonal, diluído a 1:1.000 em tampão carbonato, foram colocadas nos poços das placas de poliestireno e incubadas a 30 °C durante 4 h. Após lavagem, amostras foram adicionadas aos poços (200 µl) e incubadas a 4-6 °C durante a noite. Depois de lavagem, colocaram-se 200 µl do anti-soro monoclonal conjugado com fosfatase alcalina, diluído a 1:1.000 em tampão de conjugado. Após incubação por 5 h a 30 °C, seguida de lavagem, adicionaram-se 200 µl de substrato (p-fosfato de nitrofenil, 1 mg/ml) diluído em dietanolamina a 10%, pH 9.8. A composição dos tampões, as lavagens e as demais operações para a execução do teste foram semelhantes aos adotados para o TAS-ELISA.

Na Tabela 1, encontram-se os resultados médios de absorvância, obtidos por TAS-ELISA, considerando amostras foliares e de ramos dormentes, separadamente, e envolvendo os quatro isolados virais.

No DAS-ELISA, as amostras constituídas por folhas jovens exibindo sintomas evidentes de mosaico das nervuras e por estacas dormentes de videiras coletadas em Julho de 2001, foram distribuídas em uma mesma placa adotando-se duas repetições. Todas as oito amostras, provenientes de duas

plantas infetadas por cada um dos quatro isolados, deram reações positivas, com os valores médios de absorvância para extratos foliares variando de 0,948 a 1,507, em comparação com os valores médios obtidos para amostras de plantas sadias (0,03). Os valores das absorvâncias para extratos de tecidos de floema de estacas dormentes variaram de 0,236 a 0,406.

Os resultados obtidos nos dois testes sorológicos confirmaram que o vírus que provoca o mosaico das nervuras em videiras em São Paulo possui relacionamento sorológico com o GFkV e que os quatro isolados, considerando as diferenças na sintomatologia exibida nas indicadoras, constituem-se, provavelmente, estirpes do mesmo vírus e um possível complexo do GFkV.

A ocorrência desses quatro isolados apresenta importância etiológica, contudo, somente por meio de estudos envolvendo técnicas moleculares, como o sequenciamento do genoma viral, as distinções genéticas dos vírus poderão ser evidenciadas. Isolados do GFkV com diferenças biológicas já foram relatados anteriormente em outros países, não tendo havido, no entanto, estudos com maiores informações de suas características (Hewitt *et al.*, 1972; Bovey, 1972; Triolo & Materazzi, 1987).

Diante das evidências de que os quatro isolados virais são sorologicamente relacionados com o GFkV, plantas procedentes de diferentes áreas vitícolas do estado de São Paulo foram posteriormente submetidas aos testes imunoenzimáticos. Os resultados foram positivos para todas as amostras. As variedades e o número de plantas testadas, entre parênteses, foram: Itália (5), Rubi (3), Benitaka (3), Brasil (3), Alphonse Lavallée (1), Moscatel de Hamburgo (2), Kyoho (3), Kyoho Rosado (2), Olimpia (1), Patricia (2), Patricia Branca (2), Seibel 2 (3), Isabel (3), Thompson Seedless (2), Piratininga (2), Red Globe (3), Flame Seedless (2), Centennial Seedless (2), Niagara Rosada (5), Niagara Branca (3), IAC 138-22 (2), IAC 116-31 (2), IAC 514-6 (Maria) (2), Don Mariano (2), Kober 5BB (3) e Rupestris du Lot (3).

As plantas de variedades procedentes de cinco estados brasileiros, previamente testadas por indexação biológica, também reagiram positivamente para o GFkV. Foram as seguintes: Folha de Figo (2) e Piratininga (1) de Minas Gerais; Flame Seedless (1) e Thompson Seedless (1) do Rio Grande do Norte; Itália (2) e Red Globe (2) de Pernambuco; Riesling (2) e IAC 116-31 (2) de Santa Catarina e Benitaka (3), Brasil (2), Italia (3), Rubi (2) e Kyoho Rosado (1) do Paraná.

Plantas consideradas livres do GFkV, pela indexação biológica mediante emprego de videira indicadora e por termoterapia, apresentaram resultados negativos em ELISA. As referidas plantas pertenceram às variedades Benitaka, Isabel, Itália, Kyoho, Niagara Branca, Niagara Rosada, Patricia, Rubi, Seibel 2, Kober 5BB e Rupestris du Lot.

Durante a execução dos testes de ELISA, foi verificado que os extratos de folhas novas, tenras e aclorofiladas da brotação de primavera, principalmente aquelas em início de desenvolvimento dos sintomas, apresentaram valores de absorvância mais consistentes do que os extratos de ramos dormentes ou próximos da dormência, sob condições

ambientais de São Paulo. Em diversas ocasiões, testes realizados com ramos dormentes necessitaram ser repetidos. Em outros países, testes envolvendo folhas novas e ramos dormentes apresentaram resultados similares para o mesmo teste imuno-enzimático empregado neste trabalho (Boscia *et al.*, 1995; Schieber *et al.*, 1997). Foi também observado que folhas novas e tenras de brotação vigorosa, originada posteriormente a fase de brotação de primavera constituíram-se em boas fontes de vírus, nos períodos de predomínio de temperatura amena.

Os resultados obtidos indicaram que a indexação biológica baseada na enxertia para a videira indicadora 'Rupestris du Lot' foi mais eficiente do que o ELISA, quando se empregaram extratos de ramos dormentes para a reação sorológica. Entretanto, o teste sorológico é de alto valor para as triagens de material de videira, desde que se usem amostras foliares adequadas, que só podem ser obtidas em período de crescimento inicial da videira. Para os testes de obtenção de clones sadios, considera-se ainda indispensável o emprego de videira indicadora.

AGRADECIMENTOS

Os autores expressam os seus agradecimentos ao Dr. Elliot W. Kitajima, do Dept. Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ, USP, Piracicaba, SP., pela revisão do manuscrito e sugestões apresentadas. Também agradecem ao José Edivaldo Buriolla (ESALQ), pelo apoio técnico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOSCIA, D., ELICIO, V., SAVINO, V. & MARTELLI, G.P. Production of monoclonal antibodies to grapevine fleck virus. *Plant Pathology* 44:160-163. 1995.
- BOSCIA, D., MARTELLI, G.P., SAVINO, V. & CASTELLANO, M.A. Identification of the agent of the grapevine fleck disease. *Vitis* 30:97-105. 1991.
- BOVEY, R. Un virus latent dans le Chasselas. In: Conférence du Groupe International d'Étude des Virus et des Maladies à Virus de la Vigne, 4. *Annales de Phytopathologie, Numéro hors série*, 1972. pp.31-34.
- KUHN, G.B. Manchas das nervuras da folha da videira (*Vitis* spp.), doença constatada no Rio Grande do Sul. *Fitopatologia Brasileira* 17:435-440. 1992.
- KUNIYUKI, H. & COSTA, A.S. Incidência de vírus da videira em São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 12:240-245. 1987.
- KUNIYUKI, H. & COSTA, A.S. Mosaico das nervuras, uma virose da videira em São Paulo. *Summa Phytopathologica* 20:152-157. 1994.
- KUNIYUKI, H. & COSTA, A.S. Ocorrência de mais um isolado do vírus do mosaico das nervuras da videira que não causa sintomas no porta-enxerto Kober 5BB. *Fitopatologia Brasileira* 20:618-622. 1995.
- 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, Numéro hors série*, 1972. pp.43-47.
- MARTELLI, G.P. Grapevine Virology Highlights 1997-2000. In: Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine, 13, Extended Abstracts. Adelaide, University of Adelaide, 2000. pp.1-5.
- RAMEL, M.E., SERRANT, P. & GUGERLI, P. Monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of grapevine fleck associated virus. In: International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine, 11. Extended Abstracts. Montreux, 1993. pp.161-163.
- SABANADZOVIC, S., SALDARELLI, P. & SAVINO, V. Molecular diagnosis of *Grapevine fleck virus*. *Vitis* 35:137-140. 1996.
- SABANADZOVIC, S., ABOU-GHANEM, N., SALDARELLI, P. & MARTELLI, G.P. *Grapevine fleck virus* as the type species of a possible new genus of plant viruses. In: International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine, 13. Extended Abstracts. Adelaide, 2000. p. 70.
- SCHIEBER, O., SEDDAS, A., BELIN, C. & WALTER, B. Monoclonal antibodies for detection, serological characterization and immunopurification of *Grapevine fleck virus*. *European Journal of Plant Pathology* 103:767-774. 1997.
- 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* 26:320-324. 1987.