

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

UNICAMP

INSTITUTO DE BIOLOGIA

"VÍRUS DO ENROLAMENTO DA FOLHA DA VIDEIRA NO
BRASIL: CARACTERIZAÇÃO ATRAVÉS DE ESTUDOS
SEROLÓGICOS E DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA"

SANDRA MARIA MANSUR SCAGLIUSI

ORIENTADOR: PROF. DR. JORGE VEGA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas na área de Biologia
Vegetal.

CAMPINAS/SP

BRASIL

1995

7/10/95

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Sandra Maria Mansur Scagliusi
31/07/95
e aprovada pela Comissão Julgadora

UNIVERSIDADE: BC
CHAMADA: UNICAMP
Código: 33v
Número: 26489
Data: 667/96
Valor: R\$ 11,00
Data: 17/04/96
CPD: CMBDD

82540-7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

Sc33v

Scagliusi, Sandra Maria Mansur

Vírus do enrolamento da folha da videira no Brasil:
caracterização através de estudos seriológicos e de
microscopia eletrônica / Sandra Maria Mansur
Scagliusi. - Campinas, SP : [s.n.], 1995.

Orientador: Jorge Vega.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Vírus de plantas. 2. Microscopia eletrônica.
3. Sorologia. I. Vega, Jorge. II. Universidade Estadual
de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

À memória de meu pai, **VITO AUGUSTO SCAGLIUSI**,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. JORGE VEGA, pela imprescindível contribuição na minha formação profissional, pela segura orientação deste trabalho e pelos valiosos conhecimentos transmitidos com paciência, que com certeza marcarão profundamente minha formação científica.

Ao Dr. ÁLVARO SANTOS COSTA, Pesquisador Científico da Seção de Virologia e Servidor Emérito do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), pela excepcional contribuição junto à minha formação científica e pelas valiosas sugestões e críticas apresentadas na revisão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. AVELINO RODRIGUES DE OLIVEIRA, por apontar caminhos e pelo incentivo, durante todos estes anos, para conclusão deste trabalho.

Ao Dr. HUGO KUNIYUKI, pela atenção, apoio, ajuda na interpretação dos resultados e pelas correções e sugestões apresentadas na revisão deste trabalho.

Ao Dr. VALDIR ATSUSHI YUKI, pelas correções e sugestões apresentadas, e pela oportunidade que me possibilitou o desenvolvimento deste trabalho na Seção de Virologia do IAC.

À Prof. Dra. CLÁUDIA REGINA BAPTISTA HADDAD, pelas correções e sugestões apresentadas na revisão deste trabalho.

Ao INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS, e em especial à SEÇÃO DE VIROLOGIA, pelas facilidades que me possibilitaram a realização do curso de Pós-Graduação e deste trabalho.

Aos pesquisadores e funcionários da Seção de Virologia do IAC, pela contribuição durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação do Instituto de Biologia da UNICAMP, em especial à JOSÊNIA e ao CARLOS, pela atenção e auxílio nos trâmites burocráticos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos para realização do curso de Pós-Graduação.

Ao Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa (FAEP/UNICAMP), pela concessão da bolsa auxílio-ponte.

Aos meus irmãos, MARISA, SÍLVIA e VITOR, pelo apoio, incentivo e compreensão. Aos amigos, CÉLIA, FERNANDO, e em especial ao FAUSTO.

Todo o reconhecimento de modo incomparável à minha mãe, **LAILA MANSUR SCAGLIUSI**, pela presença constante, dedicação, estímulo, e compreensão nos momentos mais difíceis, sem a qual este trabalho não teria sido realizado.

E ao meu pai, **VITO AUGUSTO SCAGLIUSI**, que embora fisicamente ausente, estará sempre presente em todos os momentos de minha vida, dando-me proteção e forças para prosseguir.

CONTEÚDO

| | |
|---|----|
| 1. RESUMO | 1 |
| 2. INTRODUÇÃO | 3 |
| 3. REVISÃO DA LITERATURA | 5 |
| 3.1 ENROLAMENTO DA FOLHA DA Videira: SINTOMATOLOGIA | |
| 3.2 CITOPATOLOGIA | |
| 3.3 ETIOLOGIA | |
| 3.4 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA | |
| 3.5 DISTRIBUIÇÃO DO Vírus NA PLANTA | |
| 3.6 TRANSMISSÃO E DISSEMINAÇÃO NATURAL DO Vírus | |
| 3.7 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO Vírus | |
| 3.7.1 Métodos Biológicos de Diagnóstico | |
| 3.7.2 Serologia e Microscopia Eletrônica | |
| 3.7.3 Outras Técnicas de Detecção do Vírus | |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 21 |
| 5. RESULTADOS | 29 |
| 5.1 OBTENÇÃO DE TECIDO CALOSO | |
| 5.1.1 Formação e desenvolvimento | |
| 5.1.2 Efeito da Luminosidade e temperatura | |
| 5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA | |
| 5.2.1 Citopatologia do Tecido Caloso e de Folhas | |

5.2.2 Detecção do vírus em extratos de Tecido Caloso e de Folhas

5.2.3 Semipurificação

5.3 TESTES SEROLÓGICOS

5.3.1 Elisa

5.4 TRANSMISSÃO MECÂNICA

| | |
|-----------------------------------|----|
| 6. DISCUSSÃO | 48 |
| 7. CONCLUSÕES | 52 |
| 8. LITERATURA CITADA | 53 |

1. RESUMO

Este trabalho teve como objetivo contribuir a um melhor conhecimento da moléstia do Enrolamento da Folha da Videira (EFV) presente no Brasil, e em todos os países vitícolas.

Diversas evidências indicam a etiologia viral do EFV, entre elas a capacidade de transmissão por enxertia e a sensibilidade do patógeno à termoterapia. Além dessas características, diferentes partículas de vírus (alongadas e isométricas) têm sido isoladas de plantas de videira afetadas pelo EFV.

O método aceito para diagnosticar a moléstia, consiste na enxertia do material a ser testado em variedades indicadoras para o enrolamento da folha, porém a leitura confiável dos sintomas induzidos na planta indicadora é realizada num período de 2-3 anos após a enxertia.

Usando técnicas ligadas à serologia, pode-se melhorar as condições para o diagnóstico deste vírus, por testes mais rápidos que os de indexação por enxertia em variedades indicadoras.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, observou-se através de testes de microscopia eletrônica, uma maior concentração do vírus em tecido caloso de videira, obtido *in vitro*, em relação à concentração encontrada nas folhas e hastes da própria planta.

A fim de se obter dados que contribuíssem para um melhor conhecimento da moléstia do EFV presente no Brasil e facilitar as condições de diagnóstico, foram estudados os seguintes aspectos: 1) possibilidade do uso de tecido caloso obtido *in vitro* a partir de tecidos de videira com EFV, como modelo, para estudo e manutenção do vírus; 2) citopatologia do tecido caloso à nível de microscopia eletrônica; 3) avaliação da relação serológica existente entre as partículas virais do tipo closterovirus detectadas em calos de videira com enrolamento da folha através de testes de microscopia eletrônica de imunoadsorção utilizando anti-soros preparados para o Vírus do Enrolamento da Folha da Videira (VEFV) e para o Vírus da Tristeza dos Citros (VTC); 4) detecção de partículas virais do tipo closterovirus em amostras semipurificadas de folhas de videira em variedades

indicadoras (Pinot Noir e LN-33) e não-indicadora do EFV (Seibel 2) e 5) tentativas de transmissão mecânica do vírus do enrolamento da folha da videira para a hospedeira herbácea *Nicotiana benthamiana*.

Outro aspecto estudado neste trabalho se refere à perpetuação do vírus através da cultura *in vitro* ao longo de várias repicagens do calo. Condições diferentes de temperatura e luminosidade também foram avaliadas, visando estabelecer diferenças no desenvolvimento do calo e na concentração do vírus.

Os resultados deste estudo mostraram que o vírus detectado, associado ao EFV, se multiplica ativamente nas células do tecido caloso de videira.

A citopatologia observada nos calos de videira afetadas pelo EFV é característica de infecção por closterovirus.

O estudo das partículas virais associadas ao EFV pela técnica de tecido caloso *in vitro* mostrou-se útil devido à rapidez da formação do tecido caloso, diminuição do risco de contaminação das amostras, e especialmente pela baixa atividade de oxidases das células do calo. Para manutenção do vírus por períodos prolongados não se mostrou eficiente.

Com relação ao efeito da luminosidade e temperatura, não foram observadas diferenças significativas no desenvolvimento do calo e na concentração do vírus.

Os testes de transmissão mecânica para hospedeira herbácea *Nicotiana benthamiana* foram negativos.

A técnica de ISEM feita com materiais semipurificados de folhas, mostrou ser um teste adequado e rápido para o diagnóstico da doença, quando comparada com a indexação por enxertia em variedades indicadoras.

Os resultados das técnicas de ISEM, decoração e do teste de F(ab')₂ ELISA, mostraram que o isolado do VEFV estudado neste trabalho é predominantemente do tipo III. Os anti-soros preparados para os isolados tipos I e II somente reagiram nos testes de ISEM e decoração, indicando uma relação serológica muito fraca com o vírus estudado.

Pôde-se concluir que o EFV é uma doença complexa, onde parecem estar envolvidos vários componentes virais, sendo que um deles mostrou relação serológica com o VTC, como observado nos testes de ISEM com decoração.

2. INTRODUÇÃO

A videira (*Vitis* spp.) representa cultura de significativa importância dentro da produção agrícola do país, constituindo-se em uma atividade de considerável expressão social e econômica. No Brasil, o estado de São Paulo é o primeiro maior de uva para mesa e o segundo na produção de uva para vinho, totalizando uma área cultivada de 10.240 hectares e produção de 140.440 toneladas (SÃO PAULO, 1994). O estado do Rio Grande do Sul ocupou o primeiro lugar na produção de uva para vinho, produzindo cerca de 505.460 toneladas no ano de 1992 (IBRAF, 1993).

Como a maioria das espécies cultivadas que são multiplicadas vegetativamente, a videira perpetua patógenos que se acumulam durante as sucessivas propagações, causando grandes perdas à cultura e chegando a comprometer a sobrevivência destas plantas (BOVEY & MARTELLI, 1992).

O Enrolamento da Folha da Videira (EFV) é considerado como uma das mais importantes e disseminadas moléstias de vírus que ocorre em videira, devido às perdas induzidas pelo patógeno na produção vitícola e à alta frequência com que é encontrada.

Embora a etiologia do EFV não tenha sido totalmente esclarecida, diferentes partículas de vírus com morfologia alongada e isométrica, restritas aos tecidos floemáticos, têm sido isoladas de videiras afetadas pela doença.

A pesquisa visando o isolamento e a caracterização do agente causal do EFV, e o desenvolvimento das técnicas de diagnóstico são de fundamental importância para a viticultura mundial.

As doenças causadas por vírus em plantas perenes como a videira, são tradicionalmente diagnosticadas pelo método de enxertia: o material a ser testado é enxertado em variedades de videira indicadoras da doença. Quando se usa este método tradicional de diagnóstico, a leitura confiável dos sintomas nas videiras indicadoras, só pode ser realizada num período de 2-3 anos após a enxertia.

As técnicas modernas de diagnóstico de vírus fitopatogênicos, baseadas em métodos serológicos, apresentam alta sensibilidade e geralmente fornecem respostas mais rápidas

que os métodos biológicos tradicionais, baseados na enxertia de plantas indicadoras.

As partículas virais associadas ao EFV, são de difícil observação ao microscópio eletrônico, devido à interferência de compostos fenólicos que prejudicam a extração de nucleoproteínas. Por essa razão a planta de videira não é considerada adequada para o estudo destes vírus. A falta de uma hospedeira herbácea como planta-teste para reproduzir a doença e estudar o vírus, tem sido um problema para elucidar a etiologia do EFV.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, foi observado ao microscópio eletrônico, uma maior concentração de partículas virais do grupo closterovirus, em tecido caloso obtido *in vitro* a partir de hastes e brotos de videira com enrolamento da folha, em relação à concentração encontrada nas folhas e hastes da própria planta.

Estes resultados mostraram diferentes interpretações: 1) nas folhas e hastes de videira existem substâncias que interferem na detecção do vírus, como acontece com a oxidação de polifenóis pela ação da enzima polifenol oxidase originando os taninos. Em geral os extratos de folhas e hastes de videira sofrem um escurecimento muito mais rápido que sugere alta atividade das oxidases; e 2) os calos são formados a partir da proliferação de alguns tecidos, e não de todos os tecidos que compõem o explante original. Sendo os closterovirus, grupo de vírus limitado aos tecidos floemáticos, é possível que o calo seja formado preferencialmente a partir da proliferação desses tecidos, aumentando o conteúdo relativo de vírus, facilitando assim sua detecção.

Neste trabalho, foi estudada a detecção de partículas virais em videiras infectadas pelo VEFV, através da utilização de tecido caloso obtido *in vitro*, e a caracterização destas partículas virais através de estudos serológicos e de microscopia eletrônica.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ENROLAMENTO DA FOLHA DA VIDEIRA: SINTOMATOLOGIA

As primeiras descrições sobre a ocorrência da moléstia do Enrolamento da Folha da Videira (EFV) datam do século passado, mas a primeira indicação de que se tratava de origem viral foi feita por SCHEU em 1936 (apud GOHEEN & HEWITT, 1964), na Alemanha, quando foi demonstrada sua transmissão por enxertia.

A moléstia do EFV foi conhecida durante muito tempo por diferentes nomes como "rougeau", "flavescence" e "brunissure" na França, "Rollkrankheit" e "Blattrollkrankheit" na Alemanha e "accartocciamento fogliare" na Itália. Em 1946, na Califórnia, HARMON e SNYDER descreveram uma doença com sintomas de enrolamento foliar que levava à produção de bagas brancas em videiras da variedade 'Emperor', a qual normalmente produzia bagas vermelhas, denominado-a de "White Emperor disease".

Fazendo um estudo comparativo com videiras infectadas destas diferentes regiões, GOHEEN *et al.* (1958) descreveram que a alteração prematura na cor das folhas durante o outono, o enrolamento das folhas para baixo, o atraso na maturação dos frutos e a baixa concentração de açúcar durante o período de colheita eram comuns para todas estas doenças. Desta forma, eles concluíram que todos estes sintomas eram supostamente causados por um mesmo patógeno, e a doença passou então a ser identificada com o nome de Enrolamento da Folha da Videira ("Grapevine Leafroll Disease"), que corresponde ao nome original ("Rollkrankheit"), dado por SCHEU.

A sintomatologia apresentada pela planta, varia de acordo com as condições climáticas, época do ano e principalmente com a variedade. As plantas afetadas de variedades sensíveis, caracterizam-se por serem menores que as sadias.

Durante o período de maturação dos frutos, as folhas apresentam uma clorose prematura das margens e do parênquima internerval. Nesta época, os sintomas mais típicos são expressos nas folhas, facilmente identificados nas cultivares de *Vitis vinifera*, onde estas se apresentam enroladas para baixo, e a área internerval da lâmina foliar se torna avermelhada (Figura 1) ou amarelada, permanecendo verde a nervura principal,

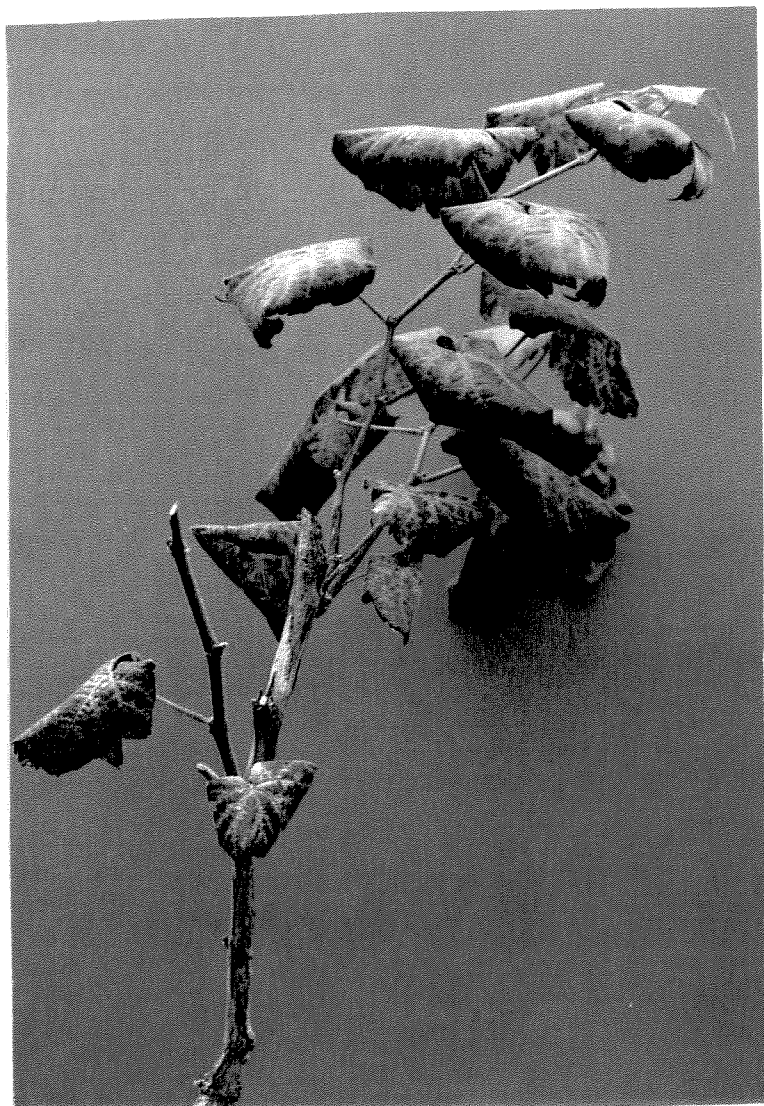


Figura 1 - Sintomas induzidos pelo vírus do enrolamento da folha da videira (EFV). Planta da variedade 'LN-33', mostrando enrolamento das folhas e avermelhamento das áreas internervais.

até o final do ciclo. Nas cultivares viníferas, tanto de uvas brancas como de uvas tintas, as folhas das plantas infectadas apresentam o limbo com aspecto rugoso, quebradiço e de consistência mais grossa do que nas folhas de plantas sadias (GOHEEN *et al.*, 1958, KUNIYUKI, 1978 e KUHN, 1989.)

Sintomas diferentes podem estar associados às diferenças entre estirpes ou isolados do vírus (CHAMBERLAIN *et al.*, 1970 e TAYLOR & WOODHAM, 1972). Neste sentido GUGERLI & BRUGGER (1990) mostraram que ocorria diferença na expressão dos sintomas na videira 'Gamay' quando infectada com diferentes isolados do vírus. Os sintomas relacionados com o isolado do vírus tipo I eram mais fracos e apareciam antes que os sintomas dos isolados tipos II e III. As nervuras primárias e secundárias das folhas desta mesma variedade, quando infectada com o isolado tipo II, se tornavam vermelhas, o que diferia dos sintomas típicos do enrolamento, no qual as nervuras permaneciam verdes.

A doença atrasa a maturação dos frutos. O sintoma mais comumente observado, principalmente nas variedades tintas é a maturação irregular e atrasada da uva, que pode não se completar em plantas muito afetadas (KUHN, 1989). Durante a época de colheita, os frutos de videiras infectadas apresentam um teor de açúcar inferior ao das plantas sadias, e a coloração dos frutos de variedades tintas e pretas é alterada, tornando-os pálidos. As plantas afetadas, possuem um menor número de cachos e estes são menores em tamanho e peso que os de plantas normais (GOHEEN & COOK, 1959; GOHEEN & HEWITT, 1964).

Vários trabalhos têm mostrado que a infecção pelo Vírus do Enrolamento da Folha da Videira (VEFV), reduz o teor de açúcar nos frutos durante a colheita (GOHEEN & COOK, 1959; OVER DE LINDEN & CHAMBERLAIN, 1970). Também foi observado que a concentração de pigmentos em vinhos obtidos de videiras infectadas foi reduzida pela metade quando comparada com a concentração de pigmentos de vinhos obtidos de videiras sadias (OVER DE LINDEN & CHAMBERLAIN, 1970).

3.2 CITOPATOLOGIA

HOEFERT & GIFFORD (1967) estudaram os efeitos anatômicos induzidos pelo vírus do enrolamento da folha e observaram degeneração do floema nos feixes vasculares das folhas, caules, raízes e pedicelo dos frutos de videiras infectadas. A degeneração do floema relacionada ao enrolamento da folha é típica de doenças causadas por vírus, associadas ao tecido floemático. Os efeitos degenerativos são o esmagamento e a obliteração dos elementos crivados e ocorrem juntamente com a maturação dos mesmos.

Estudos anatômicos, feitos por GOHEEN (1965), mostraram que a degeneração das células do floema resulta em um acúmulo de amido nas folhas de plantas infectadas, reduzindo o teor de açúcar dos frutos.

KIM *et al.* (1989) estudaram os efeitos citopáticos em secções ultrafinas, obtidas de folhas de videira infectadas pelo VEFV, e observaram mudanças estruturais nas mitocôndrias das células parenquimáticas do floema. Estas alterações incluíam a ocorrência de pequenas vesículas membranosas, juntamente com a degradação do estroma das mitocôndrias. A maioria destas vesículas estava preenchida por um material fibrilar, eletrodense, que se aglutinava no centro destas. O diâmetro destas vesículas variava em torno de 50-100 nm e estas eram envoltas por uma membrana única e simples que na maioria das vezes, era contínua com a membrana externa da mitocôndria. Em adição à mudança estrutural das mitocôndrias, também foi observada, neste mesmo trabalho, a presença de partículas do tipo closterovirus preenchendo totalmente as células parenquimáticas do floema.

A ocorrência de mitocôndrias vesiculadas em videiras com enrolamento foliar, já havia sido anteriormente descrita por CASTELLANO *et al.* (1983), mas neste caso as partículas de vírus associadas com estas vesículas eram isométricas. Além disso, as vesículas associadas com estas partículas eram envoltas por uma membrana dupla, originada de invaginações das membranas externa e interna da mitocôndria, diferente daquelas observadas por KIM *et al.* (1989), associadas a partículas do tipo closterovirus, que eram envoltas por uma membrana simples, aparentemente formada por invaginações da membrana externa da mitocôndria. FAORO *et al.* (1993) não conseguiram demonstrar

diferenças citopatológicas entre os isolados tipos I e III do VEFV.

Os efeitos citopáticos limitados às células floemáticas e às vesículas originadas de mitocôndrias modificadas, contendo material fibrilar eletrodense, são alterações bastante características das infecções causadas por closterovirus (LISTER & BAR-JOSEPH, 1981 e FRANCKI *et al.*, 1985).

3.3 ETIOLOGIA

A etiologia do EFV ainda não foi totalmente estabelecida, mas diferentes partículas virais têm sido descritas associadas à doença, entre elas partículas alongadas do tipo potyvirus (TANNE *et al.*, 1977) e closterovirus (NAMBA *et al.*, 1979) e partículas isométricas (CASTELLANO *et al.*, 1983). Entretanto, uma crescente quantidade de trabalhos mostra evidências da associação do EFV com os closterovirus, que parece ser a mais freqüente, como mostra a Tabela 1.

Alguns dos trabalhos da Tabela 1 merecem comentários adicionais. Por exemplo, VON DER BRELIE & NIENHAUS (1982) observaram partículas do tipo closterovirus nas células do floema de videiras infectadas pelo VEFV, entretanto não foi possível associá-las com a doença, pois a presença dessas partículas também foi observada em material sem sintomas.

No caso das partículas isométricas observadas por CASTELLANO *et al.* (1983), em videiras com enrolamento foliar, foi concluído posteriormente por BOSCIA *et al.* (1991), que estas estariam associadas com outra doença que ocorre em videira, conhecida como Mosaico das Nervuras da Videira ("Grapevine Fleck Disease"), diferente do EFV.

Os closterovirus, grupo de vírus restrito aos tecidos floemáticos, constituem-se de partículas de morfologia alongada, fina e muito flexuosa, sendo que o nome do grupo foi originado da palavra grega 'kloster' que significa filiforme (MATTHEWS, 1982). A partícula viral é composta por um único tipo de proteína. Os closterovirus possuem simetria helicoidal, sendo que a composição do ácido nucleico é formada de 5-6% de RNA, não segmentado e do tipo fita-simples. O comprimento médio da partícula varia de

1.250 à 2.000 nm, mas há membros do grupo possuindo um comprimento menor (600 nm). O diâmetro das partículas na maioria dos membros do grupo varia de 10-12 nm (FRANCKI *et al.*, 1985).

ZIMMERMANN *et al.* (1990a) e GUGERLI *et al.* (1991), fizeram a caracterização dos vírus associados ao EFV e observaram 4 tipos distintos, sendo que o tamanho do RNA dos GLRaV tipos I, II e IV era de 15,6 kb e do tipo III era de 20 kb. Estes mesmos autores mostraram que o comprimento médio das partículas dos tipos I, III e IV variava em torno de 2.000 nm e do tipo II era um pouco menor, chegando a 1.400 nm.

Não foram encontrados closterovirus em células do mesófilo em nenhum dos trabalhos acima mencionados.

Tabela 1. Partículas virais observadas em videiras infectadas pelo VEFV, por diferentes autores.

| Partícula | Tamanho (nm) | Técnica | Referência |
|----------------------------|---------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| alongada/ potyvirus | 13 x 790 | Purificação e Citopatologia | TANNE <i>et al.</i> , 1977. |
| alongada/ closterovirus | 11 x 1000 | "Leaf-dip" e Citopatologia | NAMBA <i>et al.</i> , 1979. |
| alongada/ closterovirus | 11 x 1100 | Citopatologia | FAORO <i>et al.</i> , 1981. |
| alongada/ closterovirus | 11 x 2000 | Citopatologia | VON DER BRELIE & NIENHAUS, 1982. |
| isométrica | 22-24 | Citopatologia | CASTELLANO <i>et al.</i> , 1983. |
| alongada/ closterovirus | 10 x 800 | "Leaf-dip" | CORBETT & WIID, 1985. |
| alongada/ closterovirus | 1800-2000 | Purificação | GUGERLI <i>et al.</i> , 1984. |
| alongada/ closterovirus | 800-825 | ISEM | MILNE <i>et al.</i> , 1984. |
| alongada/ closterovirus | ? x 1400 | "Leaf-dip" | MOSSOP <i>et al.</i> , 1985. |
| alongada/ closterovirus | 1800-1900 | Purificação e Citopatologia | ZEE <i>et al.</i> , 1987. |
| alongada/ closterovirus | 1800-2000 | Purificação | ZIMMERMANN <i>et al.</i> , 1988. |
| alongada/ closterovirus | 900-1000 | Purificação | BARBA <i>et al.</i> , 1989. |
| alongada/ closterovirus | 12 x ? | Citopatologia | KIM <i>et al.</i> , 1989. |
| alongada/ closterovirus | 1500-2000 | Purificação | HU <i>et al.</i> , 1990a. |
| alongada/ closterovirus | 2000-2200 | Purificação | ZIMMERMANN <i>et al.</i> , 1990a. |
| alongada/ closterovirus | 10-12 x ? | Citopatologia | FAORO <i>et al.</i> , 1991. |

3.4 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A ocorrência da moléstia do EFV tem sido descrita em todas as regiões vitícolas do mundo, demonstrando a alta disseminação da doença.

No Brasil, o EFV foi descrito primeiramente no estado de São Paulo por KUNIYUKI em 1972 e no Rio Grande do Sul por KUHN e SIQUEIRA (1974). Posteriormente foi comprovada por KUNIYUKI (1981) a ocorrência dessa virose em pelo menos quatro estados brasileiros (Goiás, Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina).

Recentemente GUGERLI *et al.* em 1990, mostraram que o isolado do vírus tipo I foi encontrado em cultivares de videira na maioria das regiões produtoras de vinho do Nordeste da Europa (Alemanha e Suíça). O isolado tipo III foi o mais comumente encontrado, predominando sobre toda a região do Mediterrâneo (França, Itália, Portugal, Espanha, Turquia e Iugoslávia). Este isolado III também foi o mais encontrado na América do Sul e Nordeste da África.

No Japão, a doença foi primeiramente reconhecida por TANAKA em 1976. Posteriormente, NAMBA *et al.* (1979), demonstraram pela primeira vez, a presença de partículas do tipo closterovirus no tecido floemático de videiras infectadas.

Na China, a ocorrência da doença foi descrita por LI *et al.* (1989), em cultivares de videira com sintomas típicos do EFV, mostrando a presença de partículas de closterovirus, as quais foram decoradas pelos anti-soros preparados para os isolados tipo I e II.

A doença também foi detectada por TANNE & NITZANY (1967) em Israel. Na Tunísia, foi observada a presença de 4 isolados diferentes do vírus em plantas de videiras com enrolamento da folha, mas o isolado tipo III foi o que mais predominou (AGRAN *et al.*, 1990). MOSSOP *et al.* em 1985, encontraram closterovirus em videiras afetadas pelo enrolamento da folha na Nova Zelândia. Plantas de videira com sintomas de enrolamento foliar também foram encontradas na Rússia (FELD & MILKUS, 1989) e na Tchecoslováquia (SUBIKOVA & VANEK, 1989).

3.5 DISTRIBUIÇÃO DO VÍRUS NA PLANTA

O conhecimento da distribuição do vírus na planta é de grande importância para facilitar o diagnóstico, podendo determinar qual a melhor época e qual o tecido mais adequado para uma detecção precisa da doença.

Diferentes partes de uma planta de videira, foram testadas pela técnica direta de ELISA por TELIZ *et al.* (1987), para detectar a presença do vírus nos diferentes órgãos. As partes testadas foram: raízes, folhas, flores, frutos, pedicelo de frutos, gavinhas e cascas de estacas em dormência. O isolado estudado neste experimento foi o tipo III, que foi primeiramente detectado nas flores e raízes 15 dias após a brotação das gemas. Nos frutos, o vírus foi detectado em todos os estágios, exceto quando tinham um diâmetro inferior à 2-4 mm. As folhas mostraram ser boa fonte de antígeno apenas após a floração. Depois desse período, o vírus pôde ser detectado tanto em folhas sem sintomas como em folhas que exibiam os sintomas típicos da doença, mas nunca em plantas saudáveis. Assim, três fases podem ser descritas: 1) no período desde a brotação das gemas até a floração, o vírus estava presente apenas nas flores e não foi detectado nas folhas 2) do final da floração até a formação dos frutos (25-75 dias após a brotação das gemas) o vírus foi detectado nas folhas mais expandidas (basais) e ausente nas terminais e 3) do estágio de maturação dos frutos até a colheita, o vírus foi detectado em todas as folhas, incluindo as terminais. Neste trabalho pôde-se concluir que a velocidade de movimentação do vírus na planta pode variar de acordo com o estágio de desenvolvimento da videira e que sua velocidade média de translocação na planta foi de 2 nós por dia.

3.6 TRANSMISSÃO E DISSEMINAÇÃO NATURAL DO VÍRUS

A videira é propagada vegetativamente através de estacas ou de gemas para enxertia. Devido a esta forma de propagação, a perpetuação da moléstia do EFV através da união de tecidos é a principal forma de disseminação da doença (GOHEEN *et al.*, 1959).

Tentativas de transmissão mecânica do vírus de videira para videira, tiveram resultados sempre negativos. Da mesma forma, os estudos feitos para determinar a transmissão do vírus através da semente também foram negativos (BOUBALS, 1969 e KUNIYUKI, 1978).

TANNE *et al.*(1974), usando inóculo de videira com EFV, conseguiram a transmissão mecânica de um potyvirus para *Nicotiana glutinosa*. Entretanto, estes resultados não foram confirmados por outros pesquisadores (NAMBA *et al.*, 1979).

A transmissão do VEFV por cuscuta (*Cuscuta campestris*) para plantas de videira sadias, foi obtida por WOODHAM & KRAKE (1983). Não houve transmissão por este método para plantas herbáceas.

Com relação à disseminação natural do vírus, a maioria das doenças causadas por vírus em videira se dispersa vagarosamente em condições naturais, devido a pouca eficiência do vetor. Embora a moléstia do EFV seja muito antiga, apenas recentemente foi descoberto um vetor natural da doença. Há evidências mostrando a transmissão deste vírus pela cochonilha *Planococcus ficus* Signoret de videiras infectadas pelo VEFV para plantas de videiras sadias na África do Sul (ENGELBRECHT & KASDORF, 1985).

A mesma espécie de cochonilha também foi utilizada na transmissão experimental do vírus para plantas de videira sadias, sendo que os sintomas típicos da doença apareceram 5 meses após a inoculação (ROSCIGLIONE & GUGERLI, 1989).

TANNE *et al.*(1989) conseguiram a transmissão experimental do vírus diretamente de videira para videira, utilizando uma outra cochonilha, *Pseudococcus longispinus* Targioni Tozzetti, e os sintomas apareceram nas plantas indicadoras 4 meses após a infestação pelas cochonilhas.

Em 1990, ENGELBRECHT & KASDORF utilizando a cochonilha *P.ficus* conseguiram a transmissão do isolado tipo III de plantas de videira com enrolamento, para plantas de videira sadias. Os isolados tipos I e II não foram transmitidos, embora estivessem presentes na planta doadora. A transmissão do isolado tipo III de videira para videira, pela cochonilha *P.ficus*, também foi obtida por GUGERLI *et al.*(1990).

Outra espécie de cochonilha, *Planococcus citri* Risso, foi descrita por AGRAN *et*

al.(1990), como vetora do VEFV. Neste trabalho a videira doadora do vírus estava infectada pelos isolados tipos I,II e III e por um outro isolado conhecido como GVA ("Grapevine Virus A"). Através de testes serológicos nas plantas receptoras do inóculo (*Nicotiana clevelandii*), mostrou-se que houve apenas a transmissão do GVA.

3.7 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO VÍRUS

3.7.1 MÉTODOS BIOLÓGICOS DE DIAGNÓSTICO

Os métodos biológicos de diagnóstico, ou seja, os baseados na utilização de plantas indicadoras, ainda são os mais usados para o diagnóstico da doença, através da observação dos sintomas típicos do EFV (GOHEEN, 1965).

A técnica tradicional para detectar o VEFV consiste na enxertia de uma gema dormente do material a ser testado em variedades de *Vitis vinifera* L. sensíveis ao EFV, sendo que as mais utilizadas para este procedimento são: 'Cabernet Franc', 'Pinot Noir', 'Mission', 'Gamay' e o híbrido 'LN-33'.

Os sintomas são observados nas plantas indicadoras durante um período de no mínimo dois anos, e as plantas que não desenvolveram os sintomas ao final deste período são consideradas livres da doença (GOHEEN, 1965).

Com o propósito de diminuir o tempo dos testes de diagnóstico, WALTER *et al.*(1990) desenvolveram um método chamado de enxertia verde, usado para detecção de doenças causadas por vírus em videiras. Utilizando esta técnica, os sintomas nas plantas indexadas apareceram antes do que usando o método tradicional de enxertia de gema dormente. Neste trabalho, a videira 'Pinot noir' mostrou sintomas de avermelhamento e enrolamento dos bordos foliares após 45 dias da enxertia.

Mas, a simplicidade da primeira técnica, a alta porcentagem dos pegamentos e a confiabilidade dos resultados, ainda fazem com que esta seja a mais utilizada no diagnóstico do EFV.

3.7.2 SEROLOGIA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Os métodos de diagnóstico mais utilizados para detecção de vírus vegetais atualmente têm fundamentos na serologia, ou seja, se baseiam na utilização de anticorpos específicos para o vírus que se deseja estudar.

O uso destas técnicas para o diagnóstico de vírus fitopatogênicos tornou-se freqüente devido à rapidez, especificidade e simplicidade das mesmas. A técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) descrita primeiramente por CLARK & ADAMS (1977), tem sido largamente utilizada, especialmente por permitir testar um grande número de amostras simultaneamente.

Entretanto, nos testes do tipo ELISA, é possível ocorrerem respostas positivas falsas, que no caso dos testes de microscopia eletrônica de imuno-adsorção ("ISEM" Immuno Sorbent Electron Microscopy) são evitadas pela observação direta do vírus. Como exemplo, nos trabalhos de MILNE *et al.* (1984), HU *et al.* (1990) e ZIMMERMANN *et al.* (1990a) foi utilizada esta técnica para caracterização serológica do VEFV. Por isso, a microscopia eletrônica além de contribuir na pesquisa de vírus para caracterização e identificação, também serve de apoio para a introdução de técnicas bioquímicas ou serológicas adequadas para um grande número de amostras.

Diferentes técnicas serológicas e modificações de testes do tipo ELISA, foram adotadas para detectar e caracterizar os vírus associados ao EFV (ZEE *et al.*, 1987; BOSCIA *et al.*, 1990; GUGERLI *et al.*, 1990 e HU *et al.*, 1990, ROWHANI, 1992).

GUGERLI *et al.* (1984) purificaram pela primeira vez partículas do tipo closterovirus, a partir de folhas de videira afetadas pela doença. A observação ao microscópio eletrônico permitiu identificarem 2 tipos de partículas com um comprimento máximo de 2200 nm (tipo I) e 1800 nm (tipo II).

A técnica de ISEM foi usada para detectar partículas do tipo closterovirus em tecido caloso de videira, obtido *in vitro*, utilizando anti-soro para o Vírus da Tristeza dos Citros (VTC), mostrando uma relação serológica com este outro closterovirus (OLIVEIRA *et al.*, 1988).

Através de estudos serológicos e da sintomatologia das plantas afetadas, os isolados de vírus associados ao EFV, foram separados em tipos diferentes. HU *et al.*(1990a) propõem então, para facilitar a identificação desses isolados, a denominação de Vírus associados ao Enrolamento da Folha da Videira, recebendo a sigla em inglês de GLRaV ("Grapevine Leafroll-associated Virus") tipos I, II, III e IV.

Trabalhos feitos em diferentes regiões vitícolas mostraram haver relação serológica entre os isolados estudados por estes autores (GUGERLI *et al.*, 1984, HU *et al.*, 1990 e WALTER & ZIMMERMANN, 1990) e os tipos já conhecidos, associados ao EFV como mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Relação serológica observada entre closterovirus obtidos de videiras com EFV, (WALTER & ZIMMERMANN, 1990).

| VÍRUS | ANTI-SOROS | | | | | | | | |
|-----------|-----------------------|----|-----|------------------|------|---------------------|---|---|---|
| | GUGERLI <i>et al.</i> | | | HU <i>et al.</i> | | WALTER & ZIMMERMANN | | | |
| | I | II | III | NY-1 | CA-4 | 1 | 2 | 3 | 5 |
| GLRaV-I | + | - | - | - | - | + | - | - | - |
| GLRaV-II | - | + | - | - | - | - | + | - | - |
| GLRaV-III | - | - | + | + | - | - | - | + | - |
| GLRaV-IV | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| GLRaV-V | - | - | - | - | - | - | - | - | + |

Além desses isolados identificados como tipos I ao V, outro closterovirus não relacionado serologicamente com os demais, denominado de GVA ("Grapevine Virus A"), tem sido associado ao EFV. Um trabalho demonstrando a presença do GVA em videira com enrolamento foliar, foi feito por FAORO *et al.* em 1991, utilizando a técnica de marcação com ouro coloidal em cortes ultrafinos de tecidos infectados. As plantas utilizadas para o experimento estavam infectadas com três isolados diferentes. Eles conseguiram a localização de células contendo o vírus, sendo possível diferenciar os isolados tipo-I, tipo-III e o GVA. A presença concomitante dos três vírus, permitiu uma determinação comparativa do diâmetro das partículas observadas, os quais resultaram em 12 nm para os isolados I e III e 10 nm para o GVA. Neste trabalho porém, não foi confirmado se as plantas estudadas, estavam unicamente afetadas pelo enrolamento da folha, ou se também eram portadoras de outra doença.

Em contraste com o trabalho anterior mostrando a associação do GVA com o EFV, muitos autores acreditam que o GVA está presente em plantas de videira que além de mostrarem sintomas do enrolamento foliar, também estão afetadas por uma outra doença, cuja etiologia ainda não foi esclarecida, denominada de "Complexo Rugoso da Videira". Como exemplo disso, o trabalho de GUGERLI *et al.* (1991) mostra a presença de duas estirpes distintas de GVA, obtidas de videiras infectadas apenas pelo complexo rugoso, eliminando a associação desses isolados com a doença do EFV.

Os trabalhos mais recentes vêm mostrando que a relação do GVA com o EFV está se distanciando, tornando-se mais evidente a associação dos isolados de closterovirus dos tipos I ao V com o enrolamento da folha e do GVA com o complexo rugoso da videira.

3.7.3 OUTRAS TÉCNICAS DE DETECÇÃO DO VÍRUS

Além das técnicas serológicas largamente aplicadas ao estudo do EFV, a técnica de RNA de dupla fita ("double strand RNA" ou dsRna) ultimamente tem sido bastante utilizada para caracterização e diagnóstico de viroses vegetais (VALVERDE, 1990). Esta técnica é especialmente indicada para detecção de vírus que são difíceis ou impossíveis de purificar. No caso do EFV, no qual mais de um único vírus pode estar envolvido na etiologia da doença, anti-soros específicos para diagnóstico serológico, podem dificultar a detecção do complexo viral.

Comparando diferentes tecidos para extração de ácido nucleico, REZAIAN *et al.*, (1991) demonstraram que a maior concentração de RNA de dupla fita estava presente nas camadas do floema e uma menor concentração nas folhas. O nível de RNA de dupla fita, encontrado em folhas maduras foi maior do que nas folhas jovens. Também foi observado que havia uma variação muito grande dos RNAs de dupla fita em diferentes variedades de videira e que estes não estavam presentes em plantas sadias e nem em plantas obtidas de sementes (seedlings). Estas observações indicam que os RNAs de dupla fita, detectados em plantas de videira afetadas pelo EFV, são formas replicativas do RNA viral e não são componentes naturais das células da planta.

No trabalho de BOSCIA *et al.*(1990) as técnicas de ELISA, ISEM e Western Blot foram testadas para comparar a eficiência dos diferentes métodos na detecção dos closterovirus associados ao EFV e usaram para isso dois tipos de tecido (folhas e tecido cortical de ramos em dormência) de diferentes espécies de videira (*Vitis vinifera*, *V. rupestris* e *V. riparia*). Eles concluíram que os testes de ELISA e Western Blot mostraram ser mais sensíveis que o de microscopia eletrônica de extratos purificados, e que nas folhas, o vírus foi somente detectado em duas das espécies testadas (*V. vinifera* e *V. riparia*). Mas quando foi usado o tecido cortical para os testes, o vírus foi rapidamente identificado em todas as espécies de *Vitis* usadas. Estes resultados indicam que além de haver diferenças na sensibilidade da técnica serológica adotada, o tecido escolhido para estudo também influencia o resultado.

Três métodos rápidos de detecção do vírus também foram comparados por HU *et al.*(1991): ELISA, dsRNA, e ISEM para avaliar a sensibilidade, especificidade e simplicidade no diagnóstico dos closterovirus associados ao EFV (GLRaV). Eles concluíram que o teste de ELISA é um dos mais sensíveis e mais simples, mas diferentes anti-soros são necessários para detectar diferentes tipos de GLRaV. Já, a técnica de dsRNA, pode detectar qualquer tipo de GLRaV, mas a complexidade da técnica faz com que ela não seja adequada para um grande número de amostras. O teste de ISEM também é sensível e rápido, mas assim como a técnica de ELISA, requer diferentes anti-soros para diferentes tipos de GLRaV. Foi sugerido que, as amostras que não mostrarem resultados conclusivos, quando testadas pela técnica de ELISA, deverão ser testadas pelas técnicas de ISEM ou dsRNA.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos desenvolvidos neste trabalho, sob condições de laboratório e de casa de vegetação, foram realizados na Seção de Virologia Fitotécnica do Instituto Agronômico de Campinas.

4.1 PLANTAS HOSPEDEIRAS E FONTE DE VÍRUS

Plantas de videira das variedades 'Pinot Noir', 'Seibel 2' e 'LN-33' determinadas como positivas para o EFV, através de indexação por enxertia e mantidas sob condições de casa de vegetação, foram usadas nos experimentos como fonte de vírus (gentilmente fornecidas para este estudo pelo pesquisador Dr. Hugo Kuniyuki).

Nos experimentos em que foram feitas comparações com o Vírus da Tristeza dos Citros (VTC), foi acrescentada uma planta de limão galego (*Citrus aurantifolia*), infectada pelo VTC e mantida sob condições de casa de vegetação (gentilmente fornecida pelo pesquisador Dr. Gerd W. Muller).

Para os testes de transmissão mecânica para hospedeira herbácea, foram usadas plantas de *Nicotiana benthamiana*.

4.2 CONTROLES SADIOS

Como controle sadio foram utilizadas plantas de videira das mesmas variedades, de mesma origem, mas submetidas à termoterapia e testadas negativamente para o EFV em plantas indicadoras (testes biológicos). Plantas obtidas a partir de sementes ("seedlings"), também foram usadas como controle sadio.

4.3 CULTURA *IN VITRO* DE TECIDO CALOSO

4.3.1 FORMAÇÃO E DESENVOLVIMENTO

O meio de cultura utilizado para formação de calo de videira, foi composto pelos sais de MURASHIGE & SKOOG (1962), MS (20.0 ml/l), Sacarose (30.0 g/l), Ágar (8.0 g/l), Inositol (0.1 g/l), Caseína (1.0 g/l) e acrescido dos hormônios Ácido Indolil-3-Acético (AIA 0.3 mg/l), Cinetina (0.3 mg/l) e Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D 1.0 mg/l). Este meio de cultura foi escolhido entre outros dois meios e adotado como padrão para formação de tecido caloso no laboratório de biotecnologia da Seção de Virologia do IAC. O pH foi ajustado para 5.7 e o meio envasado e autoclavado a 121 °C por vinte minutos.

Os tecidos utilizados como explantes para formação do calo (brotos e hastes) foram esterilizados superficialmente em uma solução de hipoclorito de sódio (0.4%), por 10 minutos. Após esse tratamento, foi feita uma rápida lavagem com água estéril. Em seguida, foram estabelecidos assepticamente no meio de cultura já autoclavado e mantidos em câmara de cultura escura a 25 °C, com transferências mensais para meio de cultura fresco. Cada cultura de calos foi mantida por aproximadamente seis meses, até os calos atingirem um diâmetro aproximado de 2 cm, adequado para poder dar início às atividades desenvolvidas com tecido caloso. Os explantes que oxidaram, foram descartados, e aqueles que iniciaram os calos, foram transferidos mensalmente para meio de cultura fresco.

Durante o período necessário para o desenvolvimento do calo, o tecido caloso restante, que não foi utilizado nos primeiros experimentos, foi repicado e transferido para um novo meio de cultura, para que este formasse novas células e continuasse seu desenvolvimento.

4.3.2 CONDIÇÕES DIFERENTES DE LUMINOSIDADE E TEMPERATURA

Os calos foram mantidos em diferentes condições de luminosidade e temperatura, visando esclarecer o efeito desses fatores no desenvolvimento do tecido caloso e na concentração do vírus. Dessa forma, uma parte da cultura foi mantida em ausência total de luz, em uma câmara escura com temperatura aproximada de 23°C e uma outra parte, sob fotoperíodo de 16 horas luz (1.000 lux) com temperatura aproximada de 27°C.

4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

4.4.1 CITOPATOLOGIA

Para o estudo da citopatologia ao nível de microscopia eletrônica, as amostras de tecido caloso e folhas de videira foram submetidas à fixação, segundo um procedimento padrão adotado no laboratório de microscopia eletrônica (VEGA *et al.*, 1981). Este procedimento consiste em:

1) Fixação numa mistura de glutaraldeído (2.5%), paraformaldeído (4%), cloreto de magnésio/cloreto de cálcio (0.05M), em tampão cacodilato de sódio (0.2 M/pH 7.0), acrescido de cisteína (0.2%), por 2-3 h a 4°C (KARNOVSKY, 1965).

2) Após a fixação, o material foi lavado durante 2 h (4°C) em tampão cacodilato de sódio (0.05M), acrescido de sacarose (3%) e a pós-fixação foi feita com tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1%, no mesmo tampão de lavagem, por um período de 16 h (4°C), substituindo a concentração da sacarose por 1.5%.

3) O material foi lavado com água destilada e em seguida, com tampão maleato de sódio (0.05M/pH 5.5), durante 2 h (4°C).

4) O contraste foi feito *in bloc* com acetato de uranila (2%), em tampão maleato de sódio (0.05M/pH 6.0), por um período de 5 h (4°C) e protegido da luz.

5) Após três lavagens com água destilada, o material foi submetido a uma rápida desidratação com dimetoxipropano por 4' e quatro trocas com acetona anidra de 15

minutos cada.

6) A inclusão foi feita em resina epoxi, segundo o método proposto por MOLLENHAUER (1964), utilizando uma mistura de Araldite 6005 e Epon 812.

Cortes semifinos para microscopia óptica e ultrafinos para microscopia eletrônica, foram feitos com navalhas de vidro em um ultramicrotomo Porter Blum MT-1. Os cortes semi-finos foram corados com azul de toluidine (0.5%) e observados ao microscópio óptico, para localizar regiões que continham células de tecido vascular.

As secções ultrafinas (cor de interferência prata ou dourada) montadas em telinhas de cobre de 100 mesh, previamente revestidas com película de Parlodium e reforçadas com uma leve deposição de carbono, foram contrastadas com citrato de chumbo (VENABLE e COGGESHALL, 1965) e observadas ao microscópio eletrônico modelo ZEISS EM 10 C.

4.4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE IMUNO-ADSORÇÃO

Os testes de microscopia eletrônica de imuno-adsorção ("Immuno Sorbent Electron Microscopy" - ISEM), foram realizados seguindo a metodologia proposta por DERRICK (1973), em telinhas de cobre de 300 mesh, com filme de Parlodium e carbono. As telinhas foram cobertas com anticorpos ("coating"), incubando-as em anti-soro diluído 1:1000 durante 45-60 minutos, em câmara úmida à temperatura ambiente. Após lavagem em tampão fosfato, as telinhas foram incubadas com os extratos de amostras de tecido caloso e de folhas, maceradas com tampão fosfato 0.06M/pH 7.3, em almofariz previamente resfriado, contendo diferentes aditivos para atuarem como anti-oxidantes ou inibirem a ação de polifenóis. Os aditivos usados foram: a) 1% de PEG 6.000 (Polietileno Glicol), b) 2.5% de PVP (Polivinil Pirrolidona) e c) 2.5% de Nicotina. A incubação das telinhas com os extratos para permitir a captura de partículas virais ("trapping") durou aproximadamente 14-16 horas a 4°C.

Foi utilizada também a técnica de cobertura de anticorpos ou decoração, que é complementar à técnica de ISEM, onde ocorre a reação dos anticorpos com a superfície das partículas virais já adsorvidas ao filme, formando uma cobertura visível ao microscópio eletrônico (Figura 2).

IMMUNOSORBENT ELECTRON MICROSCOPY (ISEM)

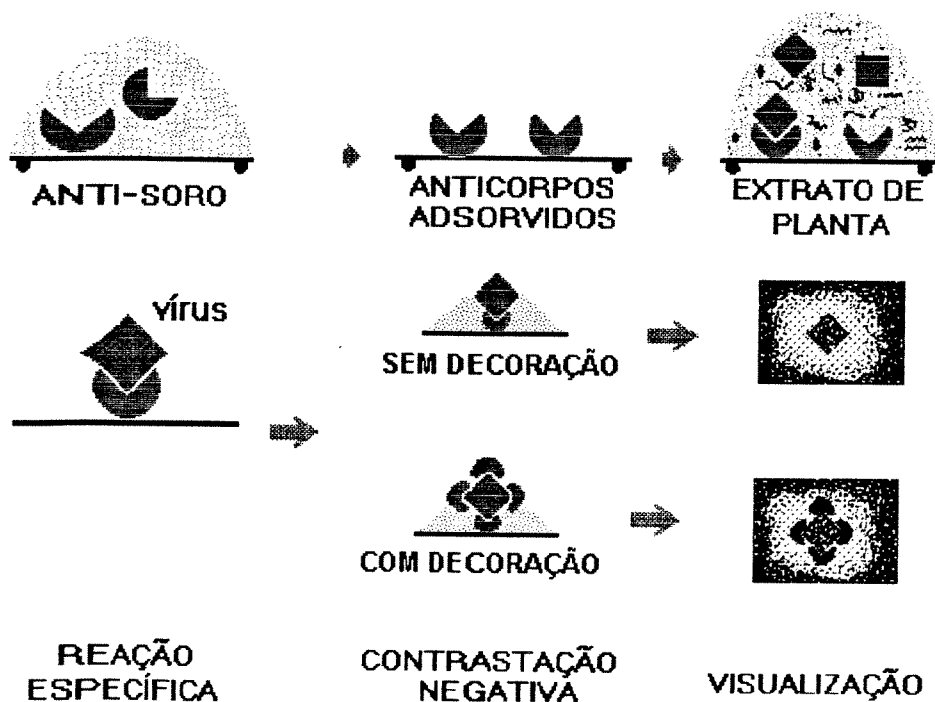


Figura 2. Sequência mostrando as diferentes etapas das técnicas de ISEM e de decoração.

Para técnica de decoração, as telinhas foram tratadas após a incubação nos extratos, com anti-soro diluído 1:100, durante aproximadamente 30 minutos à temperatura ambiente e posteriormente lavadas com tampão fosfato e água destilada.

Em todos os casos, as telinhas foram contrastadas com acetato de uranila 2%, diluído em água e observadas ao microscópio eletrônico.

O anti-soro contra o Vírus da Tristeza dos Citros (VTC), foi preparado na Seção de Virologia em 1969, e conservado a -20°C . Outros dois anti-soros preparados contra isolados comuns do VTC dos Estados Unidos, foram fornecidos na forma liofilizada pelo Dr. S.M. Garnsey (USDA, FLORIDA/USA). Além desses, três outros anti-soros foram gentilmente cedidos pelo Dr. P. Gugerli (NYON/SUIÇA), para os isolados do VEFV: GLRaV I (monoclonal), II e III (policlonais).

Para avaliar a especificidade da reação, também foram usados anti-soros para outros vírus: "Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (Capilovirus), "Soybean Mosaic Virus" (Potyvirus) e "Grapevine Fanleaf Virus" (Nepovirus), mantidos na Seção de Virologia do IAC. Como controle negativo, as telinhas foram sensibilizadas com soro normal de coelho diluído 1:1000 ou Albumina de Soro Bovino (BSA) a 0.1% em tampão fosfato.

4.4.3 SEMIPURIFICAÇÃO

Semipurificações das amostras com vírus, utilizando folhas e calos de videira, foram feitas seguindo a metodologia de GUGERLI (1987).

Para a obtenção de tecido caloso suficiente para semipurificação, foram necessárias sucessivas repicagens dos calos, até atingir tamanho adequado para dar início às atividades.

Para os testes de semipurificação a partir de folhas, utilizou-se as nervuras, já que o vírus é restrito aos tecidos floemáticos, das variedades 'Pinot Noir' e 'LN-33' (ambas indicadoras do EFV) e o híbrido 'Seibel 2' (não indicadora). Estas amostras foram testadas durante diferentes épocas do ano, quando apresentavam ou não os sintomas da doença.

As folhas (10 g) foram primeiramente trituradas com N₂ líquido, para facilitar a extração do vírus. Em seguida as amostras de folhas, já pulverizadas e de calos (10 g), foram maceradas separadamente em tampão de extração: TRIS-HCl 0.5 M pH 8.2, contendo 4% Polyclar (Polivinil Poli-Pirrolidona - PVPP), 0.5% Bentonite, 1% Triton X-100 e 0.2% de 2-Mercaptoethanol. Foi utilizado 5.0 ml de tampão de extração por grama de tecido.

As amostras foram filtradas com gaze e submetidas à centrifugação a 6.000 g, por 20 minutos. Posteriormente foi feita uma ultracentrifugação de 80.000 g em um colchão de 20% de sacarose, durante 120 minutos. O sobrenadante foi descartado e o "pellet" ressuspenso em 0.2 ml de 0.02 M TRIS/HCl, pH 6.0.

Em seguida as amostras foram contrastadas negativamente com PTA 1% (ácido fosfotúngstico) e também submetidas às técnicas de ISEM e decoreação, para posterior observação ao microscópio eletrônico.

4.5 TESTES SEROLÓGICOS

4.5.1 ELISA

Para o teste serológico de ELISA, foi usada uma variação desta técnica, chamada de $F(ab')_2$ ELISA, seguindo a metodologia de ROWHANI (1992), onde o antígeno (vírus) é ligado a um fragmento da imunoglobulina (IgG). Este antígeno posteriormente será ligado a uma IgG completa, que atuará como um segundo anticorpo. A detecção do vírus será feita então, por uma mistura (conjugado) de uma enzima (fosfatase alcalina) e proteína A, que tem afinidade pela fração Fc da imunoglobulina.

Placas de ELISA (Corning) foram cobertas com os fragmentos $(ab')_2$ dos anticorpos, preparados para os isolados II, III e IV do EFV, gentilmente cedidos pela Dra. Deborah Golino e pelo Dr. Adib Rowhani (University of California, DAVIS/USA). Os $F(ab')_2$ foram diluídos 1:1000 em tampão carbonato, pH 9.6 e incubados a 37°C, por 90 minutos. Em seguida, foi feito um bloqueio para inibir as reações inespecíficas, com 1% de leite em pó em tampão fosfato, pH 7.3, contendo 0.05% Tween 20 (PBST), durante 15 minutos à temperatura ambiente.

As amostras de videira usadas neste experimento estavam afetadas por diferentes isolados do VEFV, sendo a variedade 'LN-33' com o isolado de Moscatel Jundiá 930 e a variedade 'Seibel 2' com o isolado originado de Capão Bonito (CB). Estas amostras foram maceradas em tampão carbonato, pH 9.6, contendo 2% de PVP-40 (Polivinil Pirrolidona), e adicionadas à placa, usando dois pocinhos para cada amostra, e incubadas por 90 minutos a 37°C.

O segundo anticorpo (sonda) foi pré-adsorvido com extrato de videira sadia e combinado com o conjugado de Proteína A-Fosfatase Alcalina (SIGMA P-9650), durante 15 minutos. Este procedimento foi utilizado para eliminar reações inespecíficas, resultantes da reação de proteínas normais da planta. O complexo Proteína A-Fosfatase Alcalina-Anticorpo, foi adicionado à placa e incubado 90 minutos a 37°C.

Finalmente adicionou-se o substrato (p-nitrofenil fosfato) na concentração de 1.0 mg/ml em tampão dietanolamina 10%, pH 9.8.

Para todas as etapas, foram usados 100 microlitros em cada pocinho, e entre elas, foram aplicadas 3 lavagens com tampão PBST.

A absorbância a 405 nm foi registrada num leitor de placas de ELISA, EL-307 da Biotek Instruments, após 2-3 horas de incubação com o substrato à temperatura ambiente.

4.6 TRANSMISSÃO MECÂNICA

As preparações semipurificadas que mostraram uma concentração relativamente alta de partículas foram utilizadas para os testes de inoculação mecânica. Como planta receptora foi utilizada a hospedeira herbácea *Nicotiana benthamiana*, seguindo a metodologia de MONETTE *et al.* (1990). As plantas inoculadas foram testadas pelas técnicas de "leaf-dip" e ISEM, usando anti-soros para o VEFV, nos 10, 15, 22, 30 e 40 dias após a inoculação.

5. RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO DO TECIDO CALOSO

5.1.1 FORMAÇÃO E DESENVOLVIMENTO

Os brotos mostraram ser melhores explantes que as hastes, pois oxidavam menos, durante a indução de formação do calo. Entretanto, os calos de hastes e brotos, uma vez estabelecidos, cresceram de maneira similar (Figuras 3 e 4). Uma vantagem das hastes é que estavam sempre disponíveis para uma nova formação de tecido caloso, ao passo que para a obtenção de brotos, havia necessidade de podar freqüentemente as plantas a fim de estimular a brotação.

Após atingir o tamanho adequado (Figura 5), observou-se que as células do calo, mostraram ser boa fonte de vírus, tanto para detecção ao nível de citopatologia, como para caracterização do vírus nos testes de ISEM.

Os estudos de microscopia eletrônica realizados com tecido caloso de videiras infectadas pelo EFV, permitiram a observação de partículas do tipo closterovirus durante um período máximo de dois anos. Após este período, no qual ocorreram repicagens sucessivas do calo, não foi mais possível observar tais partículas nas amostras de tecido caloso.

5.1.2 EFEITO DA LUMINOSIDADE E TEMPERATURA

Não foram observadas diferenças significativas no desenvolvimento do calo e na concentração do vírus, quando foram utilizados tratamentos com luminosidade e temperatura diferentes.

A concentração do vírus foi determinada pelas técnicas de microscopia eletrônica (ISEM e decoração).

Observou-se apenas uma diferença na coloração dos calos entre os dois tratamentos, sendo que os mantidos no escuro, mostravam um aspecto mais transparente e não desenvolveram coloração avermelhada, resultante da presença de antocianina.

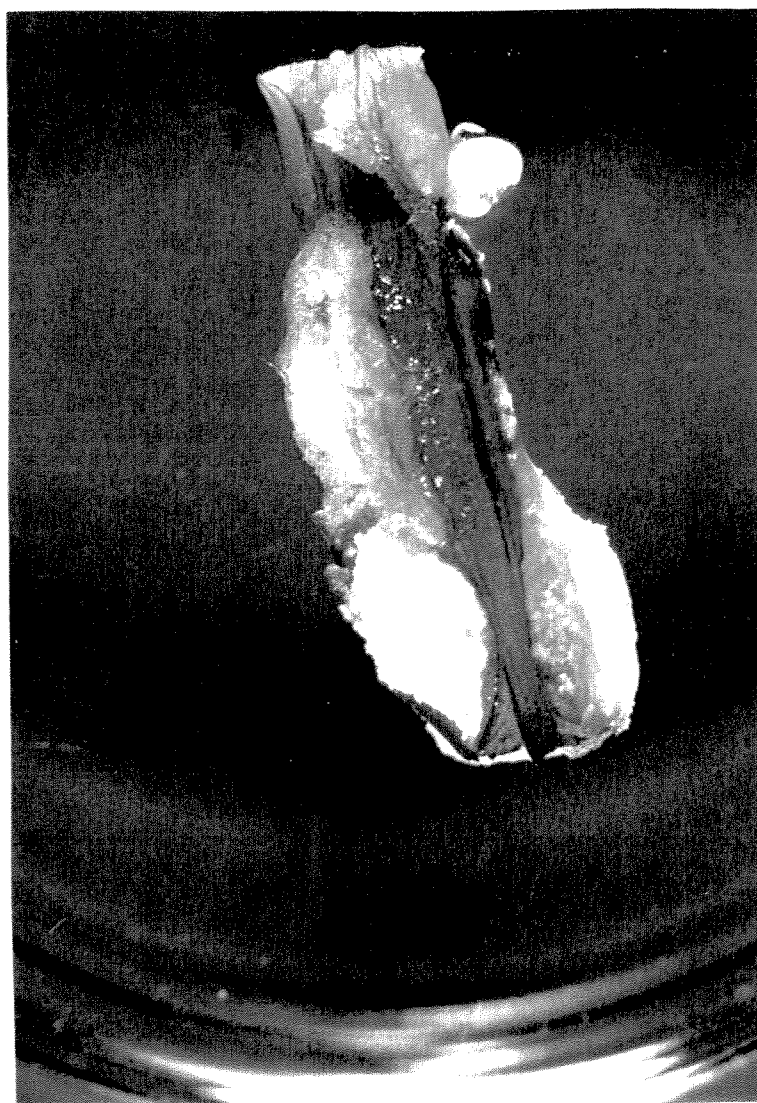


Figura 3. Início de formação de calo em explante de haste de videira ‘Seibel 2, infectada pelo VEFV.



Figura 4. Formação de tecido caloso *in vitro*, tendo como explante hastes de videira 'Pinot Noir', infectadas pelo VEFV. Observar a oxidação de um dos explantes.

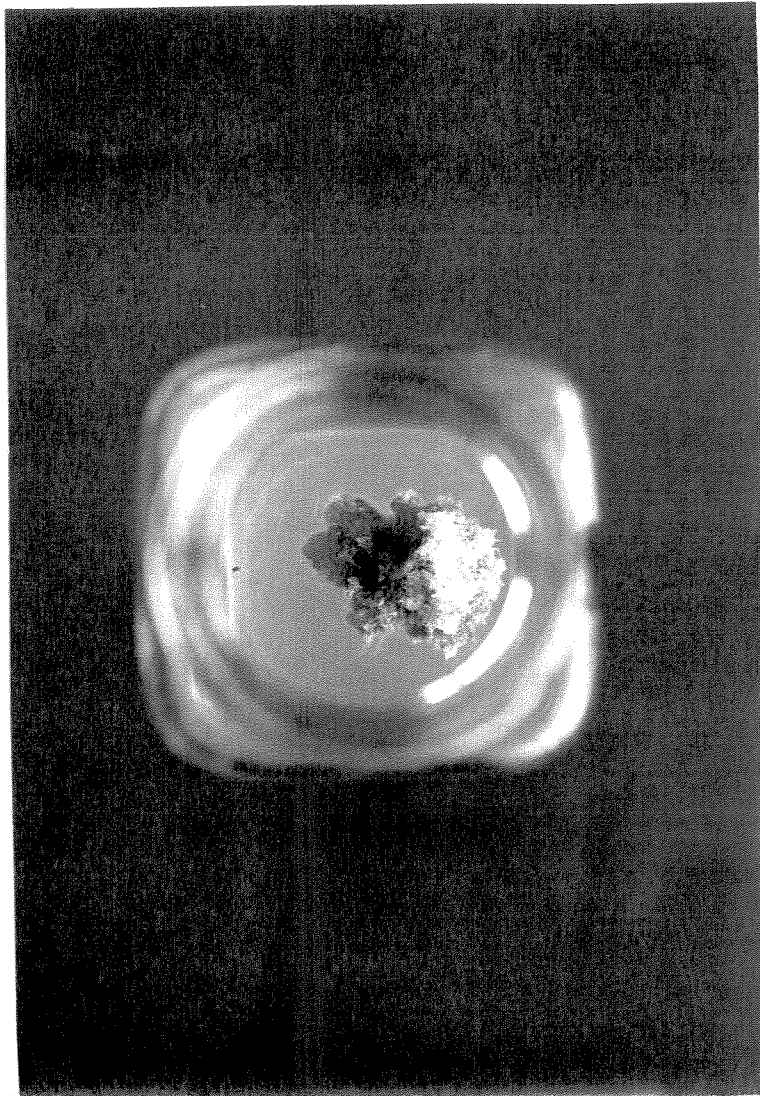


Figura 5. Tecido caloso obtido *in vitro*, com aproximadamente 6 meses de crescimento.

5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

5.2.1 CITOPATOLOGIA DO TECIDO CALOSO E DE FOLHAS

A maioria das células que constituem o tecido caloso são grandes, altamente vacuoladas e possuem pouquíssimo citoplasma, que se reduz a uma fina camada entre o vacúolo e a parede celular. Dentro da massa formada por estas células foram observados grupos de células pequenas, cujo citoplasma é bem mais abundante (Figura 6). Nestas células foi observado, em maior aumento, que parte do citoplasma era ocupada por grandes massas formadas por fibras flexuosas com 10-12 nm de diâmetro (Figura 7), cujo aspecto corresponde ao das partículas de closterovirus em cortes de tecido. Organelas celulares normais também foram observadas, incluídas nestas massas de partículas virais, tais como, mitocôndrias, gotículas de lipídios, ou material eletrodenso e vesículas em células em processo de degeneração (Figura 8). Dentro dessas massas virais, também foram observados grupos de vesículas, com tamanho variando entre 50 e 200 nm (Figura 9). Estas vesículas, formadas por uma unidade de membrana, continham material fibrilar muito fino (Figura 10) e no interior de alguns grupos, foram observadas vesículas contendo material granular eletrodenso (Figuras 9 e 10). Além dessas alterações, algumas células que estavam em processo de degenerescência, também apresentavam seu lúmen ocupado por acúmulos de material fibrilar, formando feixes, mostrando um aspecto menos flexuoso e estrutura tubular, com diâmetro aproximado de 7-10 nm, também formando massas semelhante às dos closterovirus (Figuras 11 e 12). As alterações acima descritas, não foram observadas em tecido caloso obtido de videiras sadias.

As células de folhas de videiras observadas, não mostraram alterações celulares típicas de infecção por closterovirus. Notou-se apenas a presença de material eletrodenso em algumas células parenquimáticas do floema (Figuras 13 e 14), o qual não foi observado em folhas de plantas sadias.

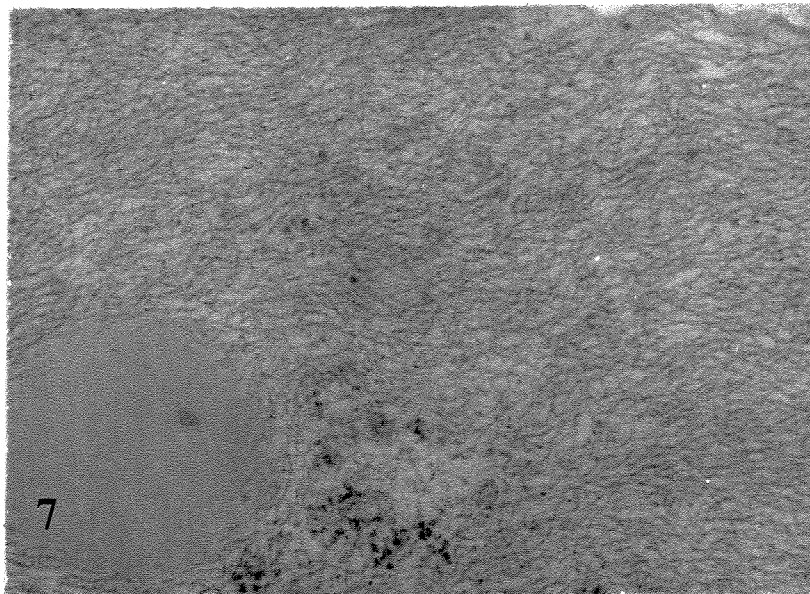
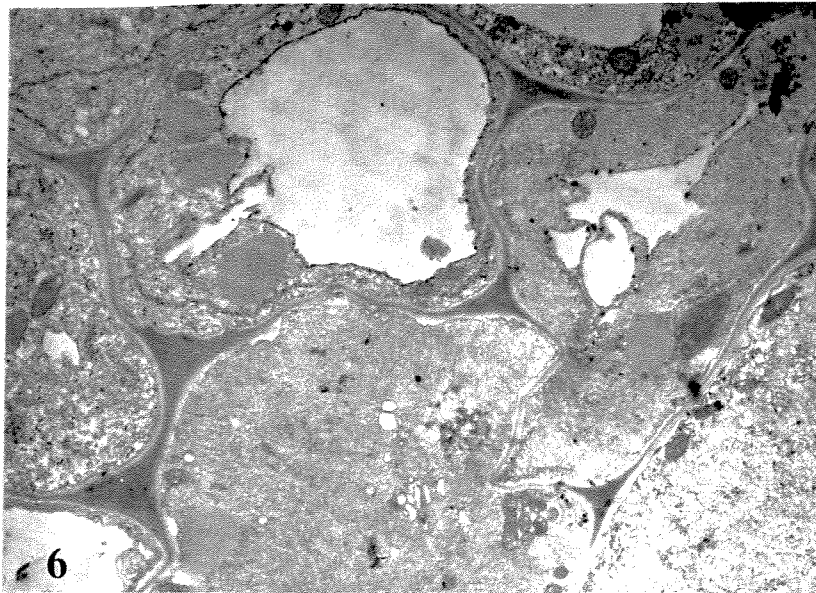


Figura 6. Grupo de células do tecido caloso que apresenta o citoplasma mais abundante, em comparação com células normalmente vacuoladas. Aumento: 5.300 X.

Figura 7. Detalhe em maior aumento mostrando que o conteúdo do citoplasma das células da figura 6 é formado por partículas virais do tipo closterovirus. Aumento: 55.000 X.

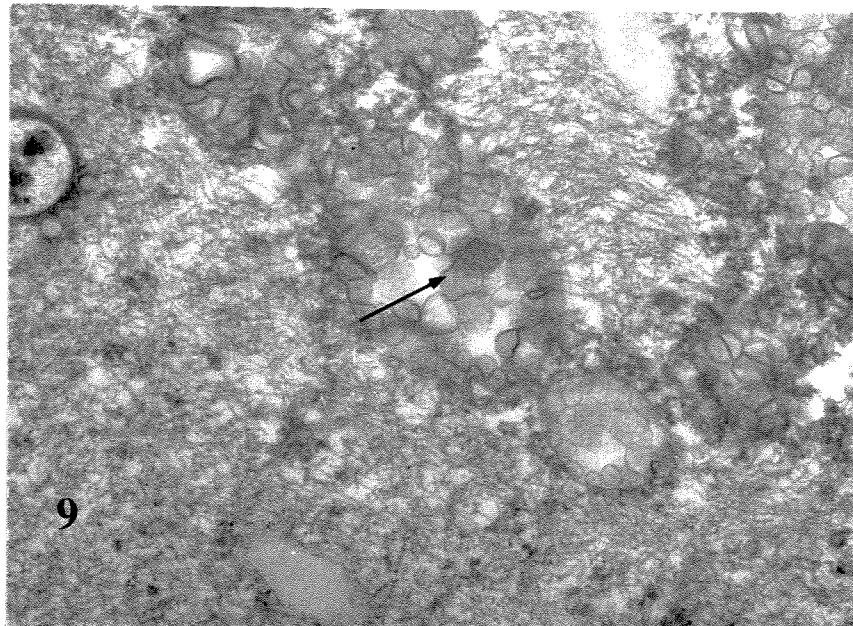
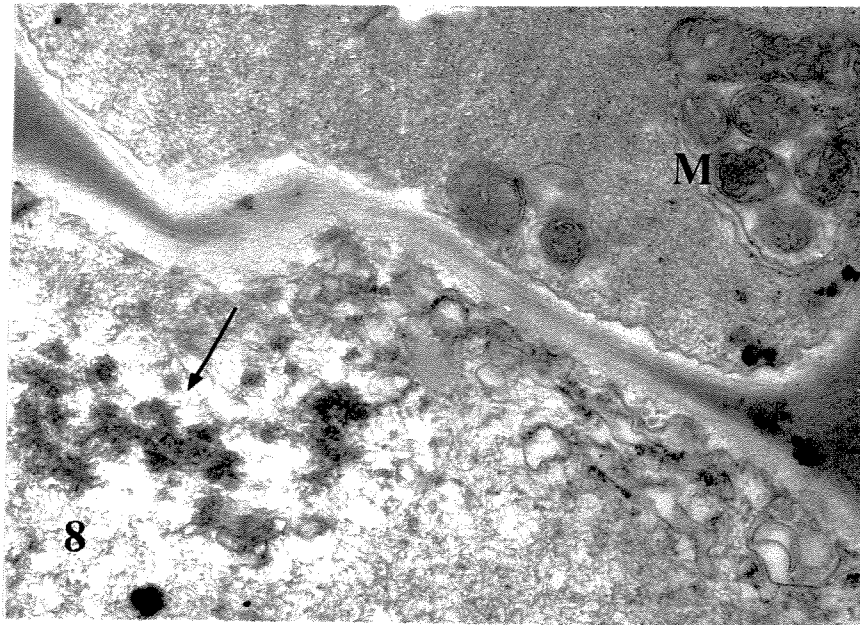


Figura 8. Células quase que totalmente ocupadas por partículas virais, mostrando mitocôndrias (M) aparentemente normais e material eletrodense (seta) incluídos na massa de vírus. Aumento: 25.000 X.

Figura 9. Grupos de vesículas mostrando em alguns casos material granular na parte central (seta), rodeados por massas de partículas virais. Aumento: 37.500 X.

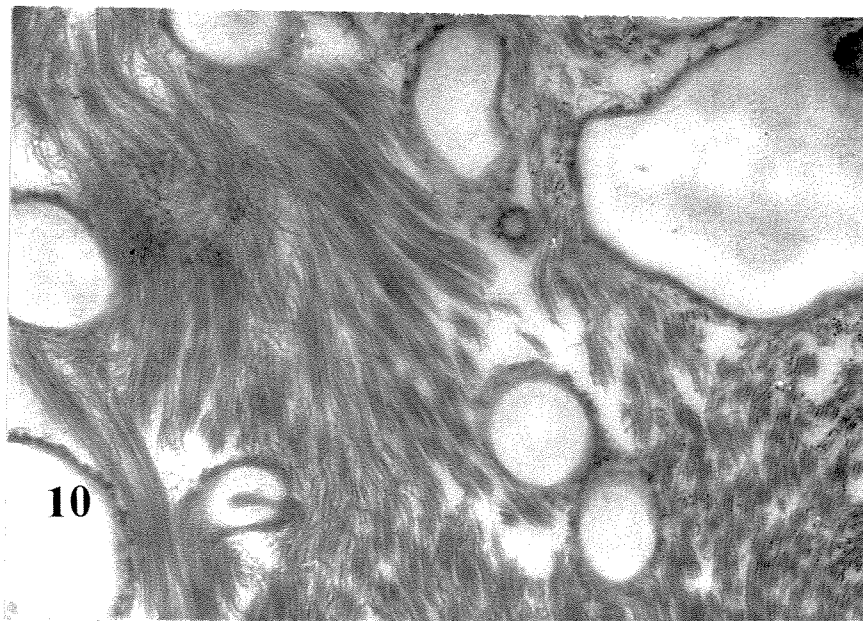


Figura 10. Grupo de partículas virais observadas em algumas células do tecido caloso. Aumento: 50.000 X.

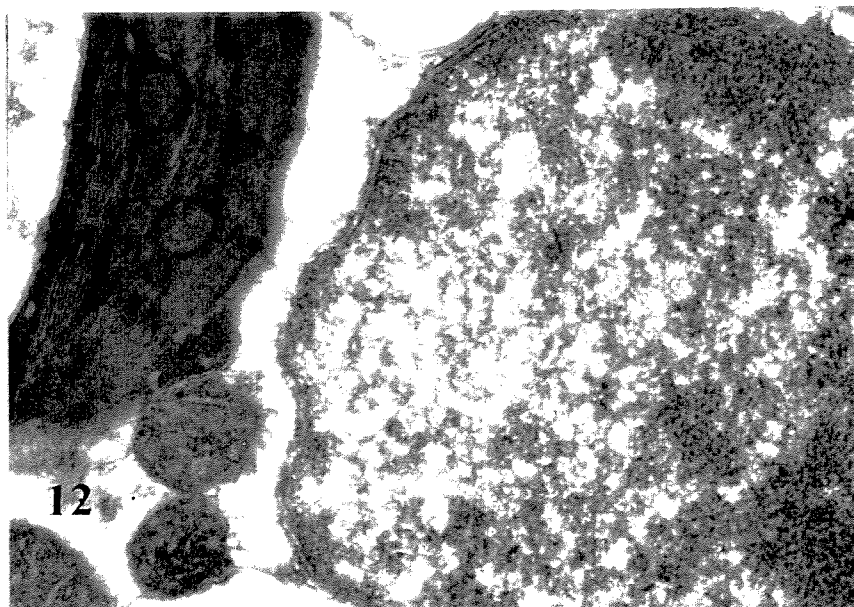
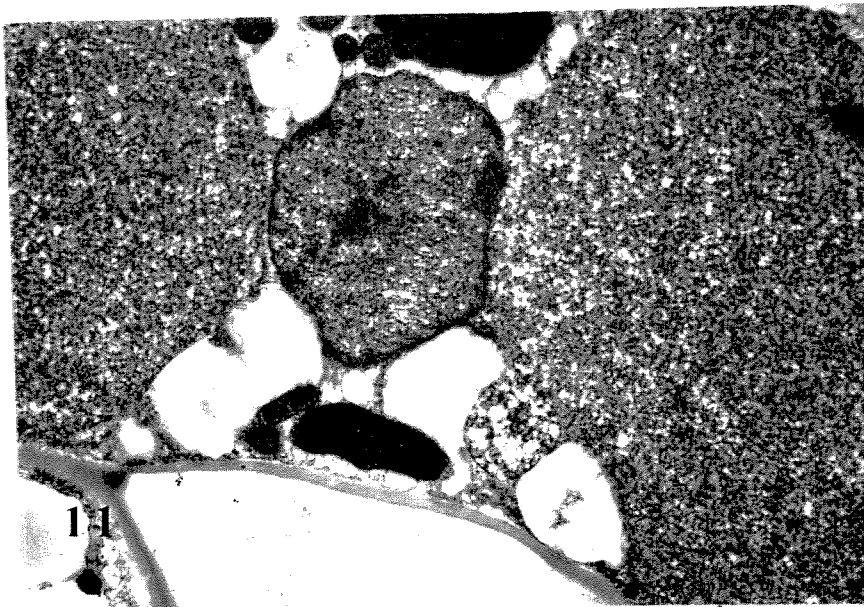


Figura 11. Células parenquimáticas do floema de folhas de videira com EFV, mostrando material fibrilar eletrodense. Aumento: 7.500 X.

Figura 12. Detalhe em maior aumento da figura anterior, mostrando o conteúdo das células parenquimáticas do floema. Aumento: 32.500 X.

5.2.2 DETECÇÃO DO VÍRUS EM EXTRATOS DE CALOS E DE FOLHAS

Quando se comparou os aditivos utilizados no tampão de extração, para detecção do vírus, observou-se que o PEG 6.000, 1%, foi o que proporcionou melhor resultado para a técnica de ISEM.

Nos extratos de tecido caloso, provenientes de planta com EFV, foram observadas partículas virais alongadas do tipo closterovirus, nos testes de ISEM, utilizando os anti-soros para os isolados do Vírus do Enrolamento da Folha da Videira I, II e III, e para o Vírus da Tristeza dos Citros (AS-VTC) do Brasil e dos Estados Unidos (Figuras 15 e 16).

Os testes de ISEM mostraram que o anti-soro preparado para o isolado III (AS-GLRaV-III), foi o mais eficiente para capturar partículas virais. Por sua vez, o anti-soro preparado contra o isolado I (AS-GLRaV-I monoclonal), foi o menos eficiente e o do tipo II (AS-GLRaV-II) foi intermediário e ligeiramente superior ao AS-VTC (Tabela 3).

Os testes foram negativos quando foram utilizados os anti-soros preparados para os vírus "Apple Chlorotic Leaf Spot Virus", "Soybean Mosaic Virus" e "Grapevine Fanleaf Virus", e quando utilizou-se para sensibilizar as telinhas Albumina de Soro Bovino (BSA) e soro normal de coelho.

As partículas virais observadas nesta técnica mostraram ser de dois tipos: partículas grandes com comprimento aproximado entre 1.300 e 2.000 nm, flexuosas e muito semelhantes com as partículas do VTC, e partículas menores ou fragmentos, que geralmente ocorrem em abundância, com comprimento que varia entre 200 e 400 nm (Figura 17). Nas amostras de *Citrus aurantifolia*, infectadas pelo VTC, também pôde-se observar a presença de tais partículas ou fragmentos menores, de diâmetro levemente reduzido que as partículas virais típicas (Figura 18). Estas estruturas são similares às observadas nos calos de videira com EFV. Também foi observada uma reação positiva, mas bastante fraca, em amostras de *C. aurantifolia* infectadas pelo VTC, com anti-soro

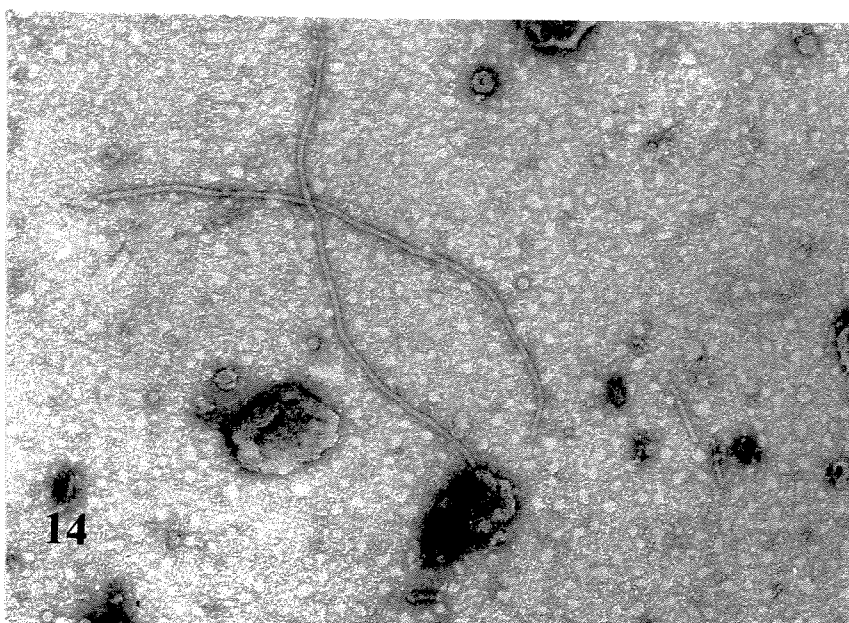
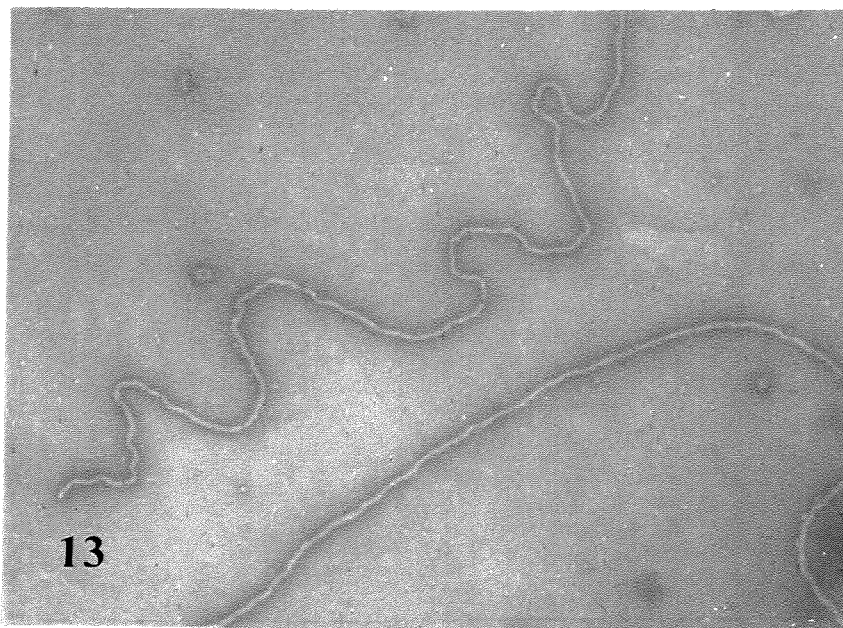


Figura 13. Micrografia eletrônica mostrando partículas do tipo closterovirus observada pela técnica de ISEM em calos de videira 'Seibel 2' com anti-soro GLRaV-III. Aumento: 42.500 X.

Figura 14. Micrografia eletrônica mostrando partícula do tipo closterovirus em calos de videira 'Seibel 2', observada pela técnica de ISEM com anti-soro para o VTC. Aumento: 40.000 X.

Tabela 3. Avaliação da intensidade da reação de captura de partículas por diversos anti-soros, nos testes de ISEM em extratos não purificados de calos e folhas de videira com VEFV.

| ANTI-SOROS | VARIEDADES | | | | | |
|------------|--------------|-------|------------|-------|---------|-------|
| | 'PINOT NOIR' | | 'SEIBEL 2' | | 'LN-33' | |
| | CALO | FOLHA | CALO | FOLHA | CALO | FOLHA |
| GLRaV-I | + | - | + | - | + | - |
| GLRaV-II | ++ | - | ++ | - | ++ | - |
| GLRaV-III | +++ | + | +++ | + | +++ | + |
| VTC(BR) | + | - | + | - | + | - |
| VTC(USA) | + | - | + | - | + | - |
| ACLSV | - | - | - | - | - | - |
| SMV | - | - | - | - | - | - |
| GFLV | - | - | - | - | - | - |
| SN | - | - | - | - | - | - |
| BSA | - | - | - | - | - | - |

- Partículas não detectadas

+ Partículas detectadas

+++ Grande número de partículas detectadas

para o VEFV, mostrando uma relação serológica entre estes vírus, conforme observado por VEGA *et al.*, 1989. Esta relação serológica observada nestas plantas cítricas, mesmo que distante, foi confirmada quando se comparou com o controle obtido de soro normal de coelho.

Quando foi utilizada a técnica de decoração, nas amostras de tecido caloso com VEFV, de todas as combinações usadas, o melhor resultado, claramente positivo, foi obtido quando se usou AS-GLRaV-III para capturar o vírus, e posteriormente usou-se o mesmo anti-soro para a decoração (Figura 17, Tabela 4). Nos experimentos de decoração com anti-soro para o isolado do VEFV tipo I e com AS-VTC, foi observado que uma reduzida fração do total de partículas adsorvidas estava decorada, mostrando a heterogeneidade das partículas virais associadas ao EFV. (Figura 18).

Tabela 4. Avaliação da intensidade de reação nos testes de decoração em extratos não-purificados de calos de videira com EFV.

| ANTI-SOROS | VARIEDADES | | |
|------------|--------------|------------|---------|
| | 'PINOT NOIR' | 'SEIBEL 2' | 'LN-33' |
| GLRaV-I | (+) | (+) | (+) |
| GLRaV-II | (+) | (+) | (+) |
| GLRaV-III | ++ | ++ | ++ |
| VTC(BR) | (+) | (+) | (+) |

++ Grande número de partículas decoradas

(+) decoração parcial (partículas decoradas e não decoradas)

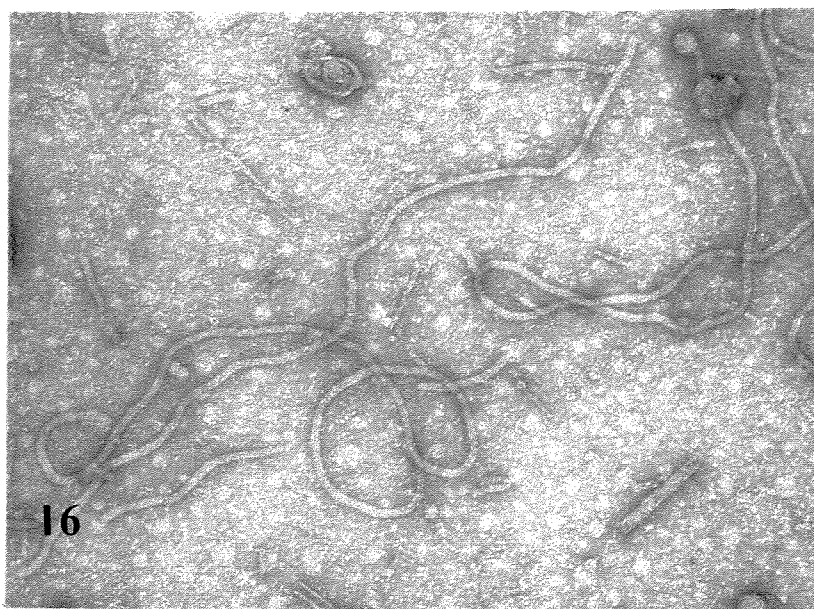
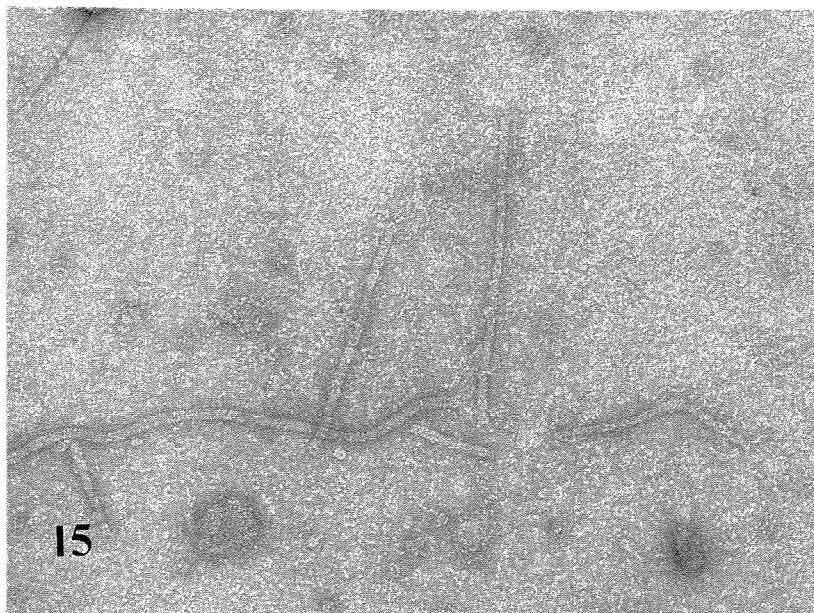


Figura 15. Micrografia eletrônica mostrando partículas virais inteiras e partículas menores ou fragmentos, em calos de videira 'Pinot Noir' com EFV, com anti-soro para o tipo II. Aumento: 84.000 X.

Figura 16. Closterovirus em amostra de *Citrus aurantifolia* infectada pelo VTC, utilizando anti-soro homólogo para a técnica de ISEM. Observar partículas inteiras e fragmentos menores. Aumento: 126.000 X.

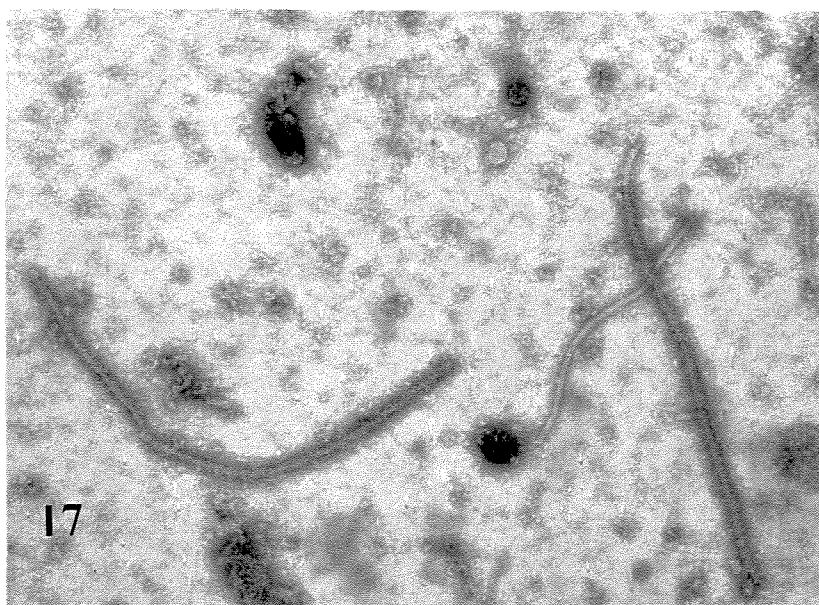


Figura 17. Micrografia eletrônica mostrando decoração na maioria das partículas adsorvidas, em calos de videira 'LN-33' com EFV. A captura de partículas e a decoração foi feita utilizando anti-soro GLRaV-III.

Aumento: 68.750 X.

Figura 18. Micrografia eletrônica mostrando decoração parcial de partículas, com AS-VTC, em calos de videira 'Seibel 2' com EFV.

Aumento: 33.250 X.

5.2.3 SEMIPURIFICAÇÃO

Quando se usou folhas de videira infectadas pelo VEFV, o número de partículas observadas mostrou-se superior quando comparado com amostras de folhas não purificadas. O processo de semipurificação destas amostras, permitiu a observação ao microscópio eletrônico de partículas virais, pelas técnicas de contraste negativo com PTA (1%) e por ISEM seguida de decoração.

Os resultados dos testes de ISEM e de decoração em amostras de folhas semipurificadas, mostraram maior número de partículas com o anti-soro preparado para o isolado tipo III, em relação aos tipos II, I e para o AS-VTC, conforme observado na Tabela 5.

A maior concentração de partículas virais foi observada quando as folhas foram coletadas no final de verão e outono, mostrando serem estas as melhores épocas para detecção do vírus. Outras semipurificações, feitas em períodos diferentes, com plantas infectadas pelo vírus, mas não exibindo os sintomas da doença, foram submetidas ao mesmo processo de semipurificação mas o número de partículas detectadas foi sensivelmente menor.

Os testes de semipurificação feitos com tecido caloso e avaliados pela técnica de ISEM, mostraram resultados positivos apenas quando se usou o anti-soro tipo III para captura de partículas. Neste caso, o número de partículas detectadas foi muito pequeno, não havendo a reação de decoração mesmo quando se utilizou anti-soro homólogo para esta técnica.

A observação de poucas partículas nestas amostras, provavelmente se deve ao fato de que, os calos utilizados para extração do vírus já haviam sido repicados várias vezes e a cultura já estava envelhecida.

Tabela 5. Avaliação da intensidade da reação de captura e decoração de partículas por diversos anti-soros, nos testes de ISEM em extratos semipurificados de folhas de videira com EFV.

| ANTI-SOROS | VARIEDADES | | | | | | | |
|------------|------------|--------|---------|--------|-----------|--------|-------------|--------|
| | ‘SEIBEL 2’ | | ‘LN-33’ | | ‘P. NOIR’ | | ‘P. NOIR’ * | |
| | CAPTURA | DECOR. | CAPTURA | DECOR. | CAPTURA | DECOR. | CAPTURA | DECOR. |
| GLRaV- I | + | - | + | - | + | - | - | - |
| GLRaV- II | + | (+) | + | (+) | + | (+) | - | - |
| GLRaV- III | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | ++ | + |
| VTC (BR) | - | - | - | - | - | - | - | - |

- Partículas não detectadas ou não decoradas

+ Partículas detectadas ou decoradas

+++ / ++ Grande número de partículas detectadas ou decoradas

(+) decoração parcial (partículas decoradas e não decoradas)

* Amostra de folhas de brotação nova, sem sintomas

5.3 TESTES SEROLÓGICOS

5.3.1 ELISA

Os testes de $F(ab')_2$ ELISA realizados com as amostras de 'LN-33' e 'Seibel 2' infectadas pelo VEFV, mostraram resultados claramente positivos com o anti-soro para o GLRaV tipo III. Com os anti-soros preparados para os isolados GLRaV II e IV, não foi verificada reação alguma, sendo os valores obtidos semelhantes aos das videiras sadias (Tabela 6).

A diferença observada entre os valores positivos das amostras de 'LN-33' e 'Seibel 2' pode ser explicada pela origem dos isolados do vírus, sendo que a variedade 'LN-33' estava infectada por um isolado originado de Moscatel Jundiaí/SP e a 'Seibel 2' por um isolado originado de Capão Bonito/SP. Além da origem dos isolados, a diferença observada pode também ser atribuída à diferença das hospedeiras.

Tabela 6. Absorbância a 405 nm obtida nos testes de $F(ab')_2$ ELISA, em amostras de folhas de videira das variedades 'LN-33' e 'Seibel 2'. Leitura feita após 2 horas de incubação no substrato.

| AMOSTRAS | ANTI-SOROS | | |
|--------------------|------------|-----------|----------|
| | GLRaV II | GLRaV III | GLRaV IV |
| 'LN-33' (EFV) | * 0.097 | 0.870 | 0.107 |
| 'LN-33' (SADIA) | 0.085 | 0.080 | 0.111 |
| 'SEIBEL 2' (EFV) | 0.105 | 1.512 | 0.085 |
| 'SEIBEL 2' (SADIA) | 0.075 | 0.078 | 0.105 |

* Médias de 2 repetições.

5.4 TRANSMISSÃO MECÂNICA

Tentativas de transmissão mecânica de amostras de videira semipurificadas, contendo o vírus, para a hospedeira herbácea *Nicotiana benthamiana*, foram negativas. Não houve manifestação de sintomas e foram negativos os testes utilizando tanto a técnica de "leaf-dip", como a técnica de ISEM, com anti-soros para o EFV.

6. DISCUSSÃO

A citopatologia observada nos calos de videira infectadas pelo VEFV, confirma a infecção por closterovirus, cuja concentração é alta em grupos de células do tecido caloso, embora distribuídos de maneira não homogênea.

As massas de partículas virais alongadas e flexuosas, adjacentes aos grupos de vesículas contendo material fibrilar, são características dos closterovirus (FRANCKI *et al.*, 1985). Em adição, tem sido demonstrado em muitos casos que, as vesículas induzidas por vírus são sítios de replicação de RNA viral (VAN KAMMEN, 1984) e ainda, são consideradas como um dos efeitos citopáticos mais seguros com relação à infecção viral (FRANCKI, 1987). As vesículas induzidas por vírus são formadas de várias organelas celulares, tais como, retículo endoplasmático, microcorpos, cloroplastos, núcleo, tonoplasto e mitocôndrias (FRANCKI *et al.*, 1985), e a origem destas vesículas, em muitos casos, mostra um alto grau de especificidade junto a um grupo taxonômico de vírus ou a um vírus em particular.

As vesículas induzidas pela maioria dos closterovirus têm uma morfologia característica, entretanto, a origem das mesmas ainda não foi totalmente estabelecida. Em videira tem sido descrita a formação de grupos de vesículas característicos, a partir da vesicularização de mitocôndrias modificadas (KIM *et al.*, 1989).

Nossos resultados não mostraram mitocôndrias em processo de vesicularização, mas o material fibrilar e eletrodense que aparece no interior de alguns grupos de vesículas pode corresponder ao resíduo do estroma mitocondrial, sugerindo ser uma fase posterior à vesicularização desta organela.

O outro material tubular fino e menos flexuoso, observado na figura 10, em células em degenerescência, não corresponde à proteína P que ocorre no floema, cujo diâmetro é maior (FRANCKI *et al.*, 1985), e provavelmente representa partículas de outro vírus presente nestas células.

Os testes comparativos de ISEM feitos com calos, com os anti-soros AS-GLRaV-I, II e III e para o Virus da Tristeza dos Citros (AS-VTC) indicam relação serológica entre

estes vírus (Tabela 3).

Os resultados dos testes de decoração (Tabela 4) mostram que a população de vírus adsorvidos é heterogênea, o que significa que além do vírus homólogo efetivamente decorado, são também adsorvidas partículas virais não decoradas. Esta decoração desigual, principalmente observada quando usados os anti-soros para os tipos I e II, indica que o agente etiológico do EFV, é um complexo de vários componentes virais. Provavelmente nos trabalhos com os isolados tipos I e II descritos na Europa, a decoração com anti-soros dos tipos I e II ocorre na maioria das partículas. Esta situação não ocorreu nos experimentos realizados neste trabalho.

A observação de algumas partículas ou pedaços de partículas virais decoradas com o AS-VTC mostra que algum componente do complexo viral do EFV está relacionado serologicamente com o VTC.

Cabe destacar aqui, que a relação serológica inversa também foi observada, ou seja, quando amostras de *Citrus aurantifolia* infectadas pelo VTC, foram tratadas com anti-soros para o EFV, conforme observado por VEGA *et al.*, 1989. A especificidade desta relação serológica foi confirmada quando se comparou com o controle, obtido de soro normal de coelho.

Em geral, a técnica de ISEM, que corresponde à captura de partículas virais com filme coberto ou sensibilizado por anticorpos ("trapping"), pode ser considerada uma técnica bastante sensível para detectar relações serológicas distantes, que em alguns casos não pode ser confirmada por outros métodos. Isto explicaria porque outros autores não têm detectado a relação com o VTC através da técnica DAS-ELISA de partículas semipurificadas (GUGERLI *et al.*, 1984 e ZEE *et al.*, 1987).

Os testes de F(ab')₂ ELISA, embora realizados apenas com folhas de videira e não com calos, utilizando os anti-soros preparados para os isolados II, III e IV, mostraram reação unicamente com o tipo III, sugerindo ser este o isolado do VEFV predominante nas amostras testadas. Neste caso, a não reação com os outros isolados pode ser explicada pela alta especificidade da fração do anticorpo usada para cobertura da placa de ELISA.

Além dos testes feitos com calos, as amostras de folhas semipurificadas, mostraram uma maior relação serológica com o AS-GLRaV-III (+++), como mostra a Tabela 5,

sendo que nestas amostras, nenhuma mostrou reação de decoração positiva para o AS-VTC.

O cont eudo de vírus nas folhas varia em função da época do ano: semipurificaç es feitas com folhas coletadas no final do verão ou no outono, quando os sintomas estão presentes nas folhas, apresentaram maior número de partículas. O mesmo teste feito em outras épocas do ano, em que não aparecem os sintomas, apresentou baixo número de partículas. Este fato está de acordo com o observado por TELIZ *et al.* (1987), que constatou uma maior concentração de vírus nas folhas basais, do que nas folhas apicais (tecidos jovens), sendo que logo no início do crescimento vegetativo, o vírus não foi detectado nestas folhas pela técnica de ELISA.

Com relação aos resultados dos testes de microscopia eletrônica mostrando uma maior facilidade na detecção do vírus em calos, provavelmente esta característica estaria associada   uma menor atividade polifenol-oxid sica do tecido caloso. Uma diferenç  claramente notável é que os extratos de tecido caloso sofrem um escurecimento muito menor e mais lento que os tecidos da videira, aparentemente por conter menor quantidade de taninos.

Outra possibilidade para explicar estes resultados é que, na formação do calo ocorra a proliferação de células de alguns tecidos mais do que de outros. As células do parênquima floemático, onde ocorre a infecção deste grupo de vírus, seriam especialmente favorecidas durante o início da formação do calo, aumentando assim a quantidade de células com vírus em relação aos demais tecidos.

Fazendo uma comparação com os resultados obtidos de tecido caloso, BARBA *et al.* (1989), trabalharam com plantas de videira infectadas pelo VEFV, micropropagadas *in vitro*, e observaram uma concentração de partículas virais 30 vezes maior quando comparada com plantas infectadas originadas do campo. A razão para esta alta concentração não é conhecida. GIBBS & HARRISON (1976) observaram que a replicação viral ocorre mais intensamente em plantas com maior vigor, e   provável que a concentração inicial de partículas virais seja razoavelmente alta, devido à alta taxa de células em divisão nos tecidos jovens, acompanhando a multiplicação destas células, aumentando assim o número de partículas virais.

As amostras de tecido caloso nas quais foram observadas partículas virais em grande quantidade, não mostraram ser eficientes para detecção do vírus, após 2 anos de repicagem, impedindo a manutenção do vírus por longos períodos através desta técnica. Este resultado presumivelmente se deve ao fato de que, a maioria das células do tecido caloso não é diferenciada, sendo que o número destas foi aumentando cada vez mais, durante as sucessivas repicagens, diminuindo o número das poucas células já diferenciadas observadas com vírus, durante o início da formação do tecido caloso.

Embora nossos resultados e de outros trabalhos sugerem a consistente associação de closterovirus com videiras afetadas pelo EFV, o significado etiológico destas partículas virais ainda deve ser determinado. Muitos fatores dificultam a determinação da etiologia desta doença, de uma forma conclusiva. Por exemplo, a dificuldade na transmissão mecânica do vírus, mesmo utilizando de amostras purificadas, para plantas de videira sadias. Estes resultados evidenciariam a associação da presença do vírus com o desenvolvimento dos sintomas, completando os Postulados de Koch. Além disso, a expressão dos sintomas da doença em plantas de videira indicadoras do EFV, demoram, ao menos 2 anos após a enxertia. Isto dificulta a seqüência dos experimentos, devido ao longo período de incubação. Além disso, a falta de uma hospedeira herbácea também dificulta a identificação e/ou caracterização do agente causal do EFV.

A detecção destas partículas de vírus em extratos de videiras afetadas pela doença, através de testes serológicos é de grande importância, pois permitiu determinar a presença do vírus, antes mesmo da planta desenvolver os sintomas da doença.

7. CONCLUSÕES

- 1) O vírus associado ao Enrolamento da Folha da Videira se multiplica ativamente nas células do tecido caloso de videira.
- 2) A citopatologia observada nos calos de videira infectadas pelo VEFV é característica da infecção por closterovirus.
- 3) O estudo do VEFV pela técnica de tecido caloso *in vitro* mostrou-se útil devido à rapidez de formação do tecido, diminuição do risco de contaminação das amostras e baixa oxidação. Porém para manutenção do vírus por períodos prolongados não se mostrou eficiente.
- 4) A técnica de ISEM em materiais semipurificados mostrou ser um teste adequado e rápido para o diagnóstico da doença, quando comparado com a indexação por enxertia em variedades indicadoras.
- 5) Os resultados deste trabalho indicam que o isolado do VEFV estudado é predominantemente do tipo III, como observado nos testes de F(ab')₂ ELISA, ISEM e decoração.
- 6) O EFV é uma doença complexa, onde parecem estar envolvidos vários componentes virais, sendo que um deles tem relação serológica com o VTC, como mostram os testes de ISEM e decoração.

8. LITERATURA CITADA

- AGRAN, M.K., DI TERLIZZI, B., BOSCIA, D., MINAFRA, A., SAVINO, V., MARTELLI, G.P. & ASKRI, F. 1990. Occurrence of grapevine virus A (GVA) and other closteroviruses in Tunisian grapevines affected by leafroll disease. Vitis 29:43-48.
- BARBA, M., CUPIDI, A. & FAGGIOLI, F. 1989. *In vitro* culture of grapevine infected by closterovirus type III. J. Phytopath. 126:225-230.
- BOSCIA, D., HU, J.S., GOLINO, D., & GONSALVES, D. 1990. Characterization of grapevine leafroll associated closterovirus (GLRaV) type II and comparison with GLRaV type III. Phytopath. 75:1323 (abstract).
- BOSCIA, D., SAVINO, V., ELICIO, V., JEBABI, S.D. & MARTELLI, G.P. 1990. Detection of closteroviruses in grapevine tissues. In: Proceedings of the 10th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus Diseases of the Grapevine (ICVG). Volos, Greece. Pages 52-57.
- BOSCIA, D., MARTELLI, G.P., SAVINO, V. & CASTELLANO, M.A. 1991. Identification of the agent of grapevine fleck disease. Vitis 30:97-105.
- BOUBALS, D. 1969. Observations sur la non-transmission par graine de deux viroses chez la vigne (*Vitis vinifera* L.). Ann. Amél. Plantes. 19:213-219.
- BOVEY, R., GARTEL, W., HEWITT, W.B., MARTELLI, G.P. & VUITENEZ, A. 1980. Virus and virus-like diseases of grapevines. S.Louis. Payot Lausanne. 181 p.

- BOVEY, R. & MARTELLI, G.P. 1992. In: Directory of Major Virus and Virus-Like Diseases of Grapevines. Bari, Italy. Mediterranean Fruit Improvement Council for the Study of Viruses and Virus Diseases of the Grapevine (ICVG). 111 p.
- CASTELLANO, M.A., MARTELLI, G.P. & SAVINO, V. 1983. Virus like particles and ultrastructural modification in phloem of leafroll affected grapevine. Vitis 22:23-39.
- CHAMBERLAIN, E.E., OVER DE LINDEN, A.J. & BERRY SMITH, F. 1970. Virus diseases of grapevines in New Zealand. N.Z. Journal Agric. Res. Wellington, 13:338-358.
- CLARK, M.F. & ADAMS, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34:475-483.
- CORBETT, M.D., & WIID, J. 1985. Closterovirus-like particles in extracts from diseased grapevines. Phytopath. Medit. 24:91-100.
- DERRICK, K.S. 1973. Quantitative assay for plant viruses using serologically specific electron microscopy. Virology 56:652-653.
- ENGELBRECHT, D.J. & KASDORF, G.G.F. 1985. Association of a closterovirus with grapevines indexing positive for grapevine leafroll disease and evidence for its natural spread in grapevine. Phytopath. Medit. 24:101-105.
- ENGELBRECHT, D.J. & KASDORF, G.G.F. 1990. Transmission of grapevine leafroll disease and associated closteroviruses by the vine mealybug *Planococcus ficus*. Phytophylac. 22:341-346.

- FAORO, F., TORNAGHI, R., FORTUSINI, A. & BELLI, G. 1981. Association of a possible closterovirus with grapevine leafroll in northern Italy. Riv. Patol. Veg. 17:183-189.
- FAORO, F., TORNAGHI, R. & BELLI, G. 1991. Localization of closteroviruses on grapevine thin sections and their identification by immunogold labelling. J. Phytopath. 133:297-306.
- FAORO, F., TORNAGHI, R. & GUGERLI, P. 1993. Cytopathology of grapevine leafroll-associated virus I (GLRaV-I). In: 11th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus Diseases of the Grapevine. Montreaux, Switzerland, 1993, Pages: 19-20.
- FELD, B.S. & MILKUS, B.N. 1989. Application of ELISA for the detection of leafroll virus in grapevines. In: Proc. 10th Conf. Czechoslovak Plant Virologists, Prague. p:68 (abstract).
- FRANCKI, R.I.B., MILNE, R.G. & HATTA, T. 1985. Closterovirus group. In: Atlas of Plant Viruses. Vol. II. CRC Press. Boca Raton, FL. Pages: 219-234.
- FRANCKI, R.I.B. 1987. Responses of plant cells to virus infection with special reference to the sites of RNA replication. In: UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. New Ser. 54:423-436.
- GIBBS, A. & HARRISON, B. 1976. Behavior of viruses in plants. In: Plant Virology: The Principles. Edward Arnold Press. London. Pages: 137-158.
- GOHEEN, A.C. 1965. Reaction of grapevines to leafroll virus. In: Proc. Int. Conf. on Virus and Vector on Perennial Hosts, with special reference to *Vitis*. Davis, Univ. California, Dept. Plant Pathol. Pages: 136-138.

- GOHEEN, A.C., HARMON, F.N. & WEINBERGER, J.H. 1958. Leafroll (white Emperor disease) of grapes in California. Phytopathology. St. Paul, 48:51-54.
- GOHEEN, A.C. & COOK, J.A. 1959. Leafroll (red leaf or rougeau) and its effects on vine growth, fruit quality and yields. Am. J. Enol. Vitic. 10:173-181.
- GOHEEN, A.C., HEWITT, W.B. & ALLEY, C.J. 1959. Studies of grape leafroll in California. Am. J. Enol. Vitic. 10:78-84.
- GOHEEN, A.C. & HEWITT, W.B. 1964. Diagnosis of leafroll of grapevines. Riv. Pat. Veg. Pavia, 4:427-442.
- GUGERLI, 1987. Grapevine leafroll disease: Rapid diagnosis by electron microscopy and serology. La Recherche Agronomique en Suisse 26:388-389.
- GUGERLI, P., BRUGGER, J.J. & BOVEY, R. 1984. L'enroulement de la vigne: mise en evidence de particules virales et développement d'une méthode immuno-enzymatique pour le diagnostic rapide. Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic. 16:299-304.
- GUGERLI, P. & BRUGGER, J. 1990. Les maladies de l'enroulement, du bois strié et de l'écorce liégeuse de la vigne. Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic. 22:35-36.
- GUGERLI, P., ROSCIGLIONE, B., BRUGGER, J., BONNARD, S. RAMEL, M.E. & TREMEA, F. 1991. Further characterization of grapevine leafroll disease. In: Proceedings of the 10th Meeting of ICVG, Volos, Greece, 1990. Pages: 59-60.
- HARMON, F.N. & SNYDER, E. 1946. Investigations on the occurrence, transmission, spread and effect of "white" fruit color in the Emperor grapes. In: Proc. Amer. Soc. Hortic. Sci. St. Joseph, 47:190-194.

- HOEFERT, L.L. & GIFFORD Jr., E.M. 1967. Grapevine leafroll virus: History and anatomic effects. Hilgardia 38, 11:402-426.
- HU, J.S., GONSALVES, D. & TELIZ, D. 1990a. Characterization of closterovirus-like particles associated with grapevine leafroll disease. J. Phytopath. 128:1-14.
- HU, J.S., GONSALVES, D., BOSCIA, D. & NAMBA, S. 1990b. Use of monoclonal antibodies to characterize grapevine leafroll associated closteroviruses. Phytopathology 80:920-925.
- HU, J.S., GONSALVES, D., BOSCIA, D., MAIXNER, M. & GOLINO, D. 1991. Comparison of rapid detection assays for grapevine leafroll disease associated closteroviruses. Vitis 30:87-95.
- Instituto Brasileiro de Frutas, IBRAF. São Paulo, 1993. Maiores Estados Produtores de Uva.
- KARNOVSKY, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. J. Cell Biology 27:137A.
- KIM, K.S., GONSALVES, D. TELIZ, D. & LEE, K.W. 1989. Ultrastructure and mitochondrial vesiculation associated with closteroviruslike particles in leafroll-diseased grapevines. Phytopathology 79:357-360.
- KUHN, G.B. & SIQUEIRA, O. 1974. Resultados preliminares na transmissão do enrolamento da folha (leafroll) da videira (*Vitis* spp.) no estado do Rio Grande do Sul. Resumo apresentado no VII Congresso Brasileiro de Fitopatologia.
- KUHN, G.B. 1989. Identificação, incidência e controle do vírus do enrolamento da folha da videira no estado do Rio Grande do Sul. Fitopatol. Brasil. 14:220-226.

- KUNIYUKI, H. 1972. Evidência preliminar de transmissão do enrolamento (vermelhão ou amarelo) da videira em São Paulo. Rev. Soc. Bras. Fitopatol. 5:165-166 (resumo).
- KUNIYUKI, H. 1978. Estudos sobre a virose enrolamento da folha da videira no estado de São Paulo. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo/ESALQ.
- LI, Z., MARTELLI, G.P. & PROTA, U. 1989. Virus and Virus-like diseases of the grapevine in the People's Republic of China, a preliminary report. In: Proc. 9th ICVG, Kiryat Anavim, Israel. Pages: 31-34.
- LISTER, R.M. & BAR-JOSEPH, M. 1981. Closteroviruses. In: Handbook of Plant Virus Infections. E. Kurstak, ed. Elsevier, North Holland Biomedical Press, NY. Pages: 809-844.
- MATTHEWS, R.E.F. 1982. Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Commitee on Taxonomy of Viruses. Intervirolgy 17:1.
- MILNE, R.G., CONTI, M., LESEMANN, D.E., STELLMACH, G., TANNE, E. & COHEN, J. 1984. Closterovirus-like particles of two types associated with diseased grapevines. J. Phytopath. 110:360-368.
- MOLLENHAUER, H.H. 1964. Plastic embedding mixtures for the use in electron microscopy. Stain Techonology 39:111-114.
- MONETTE, P.L. & JAMES, D. 1990. The use of *Nicotiana benthamiana* as an herbaceous receptor host for closteroviruses from leafroll-affected grapevines. Am. J. Enol. Vitic. 41:201-203.

- MOSSOP, D.W., ELLIOT, D.R. & RICHARDS, D.D. 1985. Association of closterovirus-like particles and high molecular weight double-strand RNA with grapevines affected by leafroll disease. N.Z.J. Agric. Res. 28:419-425.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- NAMBA, S., YAMASHITA, S. DOI, Y. & YANO, R. 1979. Grapevine leafroll virus, a possible member of closteroviruses. Ann. Phytopathol. Soc. Jap. 45:497-502.
- OLIVEIRA, A.R., VEGA, J., KUNIYUKI, H. BAPTISTA, C.R., MULLER, G.W. & COSTA, A.S. 1988. 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 13:133 (resumo).
- OVER DE LINDEN, A. J. & CHAMBERLAIN, E.E. 1970. Effect of grapevine leafroll disease on vine growth and fruit yield and quality. N.Z.J. Agric. Res. 13:689-698.
- REZAIAN, M.A., KRAKE, L.R., CUNYING, Q. & HAZZALIN, C.A. 1991. Detection of virus-associated dsRNA from leafroll infected grapevines. Journal Virological Methods 31:325-334.
- ROSCIGLIONE, B. & GUGERLI, P. 1989. Transmission of grapevine leafroll disease and an associated closterovirus to healthy grapevine by the mealybug *Planococcus ficus* Signoret. In: Proc. 9th ICVG, Kiryat Anavim, Israel. Pages: 67-69.
- ROWHANI, A. 1992. Use of F(ab')₂ antibody fragment in ELISA for detection of grapevine viruses. Am. J. Enol. Vitic. 43:38-40.

- SÃO PAULO, Secretaria da Agricultura, Instituto de Economia Agrícola, 1994. Informações Econômicas. São Paulo, 4:112.
- SUBIKOVA, V. & VANEK, G. 1989. Identification of grapevine leafroll virus and grapevine virus A in the Czechoslovakian vineyards. In: Proc. 10th Conf. Czechoslovak Plant Virologists, Prague. p:194.
- TANAKA, S. 1976. Indexing grapes in Japan for viruses. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 42:192-196.
- TANNE, E. & NITZANY, F.E. 1967. Virus diseases observed on grapevines in Israel. Phytopath. Medit. 6:113-114.
- TANNE, E., SELA, I. & HARPAZ, I. 1974. Transmission of grapevine leafroll virus to herbaceous plants. J. Phytopath. 80:176-180.
- TANNE, E., SELA, I. KLEIN, M. & HARPAZ, I. 1977. Purification and characterization of a virus associated with grapevine leafroll disease. Phytopathology 67:442-447.
- TANNE, E., BEN-DOV, Y. & RACCAH, B. 1989. Transmission of clostero-like particles associated with grapevine leafroll by mealybugs (Pseudococcidae) in Israel. In: Proc. 9th ICVG, Kiryat Anavim, Israel. Pages: 71-73.
- TAYLOR, R. H. & WOODHAN, R.C. 1972. Indexing grapevines for viruses in Australia. IV Conférence du Groupe International d'Etude des Virus et des Maladies à Virus de la Vigne, Colmar, France. Ann. Phytopathol. Paris, INRA Publ. 72:4, Pages: 85-87.

- TELIZ, D., TANNE, E., GONSALVES, D. & ZEE, F. 1987. Field serological detection of viral antigens associated with grapevine leafroll disease. Plant Disease 71:704-709.
- VALVERDE, R.A. 1990. Analysis of double-strand RNA for plant virus diagnosis. Plant Disease 74:255-258.
- VAN KAMMEN, A. 1984. Expression of functions encoded on genomic RNAs of multiparticulate plant viruses. In : Control of Virus Diseases. E. Kurstak, ed. Marcel Dekker Press, NY. pp 301.
- VEGA, J., ALMEIDA, A.M.R. & COSTA, A.S. 1981. Organismos tipo micoplasma associados ao superbrotamento do picão. Fitopat. Brasileira 6:29-33.
- VEGA, J., OLIVEIRA, A.R., KUNIYUKI, H., BAPTISTA, C.R. & COSTA, A.S. 1989. Evidência citopatológica de alta concentração de closterovirus em calos de videira com enrolamento da folha obtidos *in vitro*. Fitopatologia Brasileira 14:137 (resumo).
- VENABLE, J. & COGGESHALL, R. 1965. The use of a simple citrate stain in electron microscopy. J. Cell Biology 25:407-408.
- VON DER BRELIE, D. & NIENHAUS, F. 1982. Investigations on the etiology of grapevine leafroll disease. Z. Pflazenkr. Pflanzenschutz. 89:682-684.
- WALTER, B. & ZIMMERMANN, D. 1990a. Further characterization of closterovirus-like particles associated with the grapevine leafroll disease. In: Proceedings of the 10th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus Diseases of the Grapevine (ICVG). Volos, Greece. Pages 62-66.

- WALTER, B., BASS, P., LEGIN, R., MARTIN, C., VERNY, R., COLLAS, A. & VESSELE, G. 1990b. The use of a green-grafting technique for the detection of virus-like diseases of the grapevine. J. Phytopath. 128:137-145.
- WOODHAM, R.C. & KRAKE, L.R. 1983. Investigation on transmission of grapevine leafroll, yellow speckle and fleck diseases by dodder. J. Phytopath. 106:193-198.
- ZEE, F., GONSALVES, D., GOHEEN, A.C., KIM, K.S., POOL, R. & LEE, R.G. 1987. Cytopathology of leafroll-diseased grapevines and the purification and serology of associated closterovirus-like particles. Phytopathology 77:1427-1434.
- ZIMMERMANN, D., WALTER, B. & LE GALL, O. 1988. Purification de particules virales associées à l'enroulement de la vigne et mise au point d'un protocole ELISA permettant leur détection. Agronomie 8:731-741.
- ZIMMERMANN, D., BASS, P., LEGIN, R. & WALTER, B. 1990a. Characterization and serological detection of four closterovirus-like particles associated with leafroll disease on grapevine. J. Phytopath. 130:205-218.
- ZIMMERMANN, D., SOMMERMEYER, G., WALTER, B. & VAN REGENMORTEL, M.H.V. 1990b. Production and characterization of monoclonal antibodies specific to closterovirus-like particles associated with grapevine leafroll disease. J. Phytopath. 130:277-288.