

DETECÇÃO DE VÍRUS EM DIFERENTES CULTIVARES DE Videira para Vinho Cultivadas no Submédio do Vale do São Francisco

ADRIANA DA LUZ BARROS SANTANA¹; NATONIEL FRANKLIN DE MELO²; JACIARA
DE SOUZA BISPO³; LARISSA ROMERO LARANJEIRA⁴

INTRODUÇÃO

A videira (*Vitis* spp.) é uma frutífera cultivada em todo o mundo, estando entre as frutas de maior importância comercial em termos de valor econômico (REIS; REIS, 2016). A viticultura moderna para a produção de vinho expandiu-se ao longo dos anos, estimando-se o cultivo em mais de 3,6 milhões de hectares no mundo (OIV, 2016). Nos últimos anos a região do Submédio do Vale do São Francisco vem destacando-se como polo produtor de vinhos finos tropicais, com destaque para produção de vinhos jovens.

Por outro lado, um dos maiores problemas da viticultura moderna está relacionado ao fato de que as cultivares de *V. vinifera* L. utilizadas na produção são altamente sensíveis a diferentes pragas e doenças, sendo as doenças causadas por vírus bastante destrutivas, não existindo até o momento medidas curativas que possam ser utilizadas para controlar essas doenças. No Brasil as doenças mais importantes causadas por vírus e relatadas até o momento são: enrolamento da folha (“*Leafroll*”); malformação infecciosa ou doença dos entrenós curtos (“*Fanleaf disease*”); mancha das nervuras (“*Fleck disease*”); complexo do lenho rugoso (“*Rugose wood complex*”) e necrose das nervuras (“*Vein necrosis disease*”) (BARBOSA et al., 2016).

Já foram relatadas no mundo cerca de 60 espécies de vírus e agentes subvirais para a videira. No Brasil foram detectadas pelo menos 13 espécies de vírus, dois viróides e duas doenças, possivelmente causadas por vírus, que ainda não possuem agente causal identificado (BASSO et al. 2014). O teste ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) (CLARK e ADAMS, 1977) está entre os métodos mais indicados para detecção e identificação de vírus. É um método sorológico baseado na reação anticorpo-antígeno, em que o antígeno é reconhecido por um anticorpo (imunoglobulina) específico, formando o complexo anticorpo-antígeno, associado a propriedades colorimétricas, em que a reação é específica para cada vírus (ENGEL et al., 2010). O objetivo do

¹Universidade Federal do Vale do São Francisco. E-mail:

adriana.l.barrossanta@gmail.com ²Embrapa Semiárido. E-mail: natoniel.melo@embrapa.br

³Universidade do Estado da Bahia. E-mail: jaciara.bispo@ymail.com

⁴Universidade Estadual de Feira de Santana. E-mail: larissee_lorangeira@hotmail.com

presente trabalho foi avaliar a incidência de vírus em cultivares de videira para vinho cultivadas no Submédio do Vale do São Francisco.

MATERIAL E MÉTODOS

Em julho de 2017 foram coletadas estacas lenhosas de 21 cultivares de uvas de vinho, descritas a seguir: Alfrocheiro, Barbera, Carbenet Franc, Carmenère, Colombard, Dawn Seedless, IAC 0021-14 Madalena, IAC 138-22 (Máximo), Moscatel Branca, Moscatel de Hamburgo, Moscatel Grega, Moscatel Nazareno, Moscato Canelli, Moscatuel CG 102295, Muscat Noir, Muscat Saint Vallier, Petit Verdot, Rainha, Tinta Roriz, Syrah e Micheli Palieri.

Coletou-se de cinco a seis estacas por cultivar, cada estaca com cinco a seis gemas, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Semiárido localizado na Estação Experimental de Mandacaru em Juazeiro-BA. As estacas foram tratadas com solução à base de fungicida em conjunto com um inseticida, para promover a desinfestação do material vegetativo antes do plantio, que foi realizado em vasos plásticos contendo substrato composto de 25% de vermiculita, 50% de areia fina, e 25% de húmus.

Após o plantio, os vasos permaneceram em casa de vegetação, pertencente ao Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido em Petrolina-PE, sendo irrigados manualmente uma vez ao dia. Aos 90 dias após o plantio foram coletadas 6 folhas de cada genótipo (3 folhas basais consideradas folhas velhas e 3 folhas apicais consideradas folhas novas) juntamente com os pecíolos. As mesmas foram identificadas e colocadas em sacos plásticos sendo armazenadas em ultrafreezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, para conservação até a realização da extração das amostras.

As folhas foram cortadas com o auxílio de um bisturi, separando-se o limbo foliar das nervuras. Após os cortes, o material foi armazenado em sacos de papel, identificados como pecíolo velho (PV) (material correspondente às nervuras mais pecíolos retirados das folhas velhas) e limbo novo (LN) (material correspondente ao limbo foliar retirado das folhas novas) de acordo com o Protocolo do Kit Agritest para o ensaio de ELISA (Fonte: **KIT AGRITEST - PLANT HEALTH MANAGEMENT**). Ao final o material foi mantido em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a continuação do ensaio. Seguindo a ordem da sequência do Protocolo Agritest, 10 placas de microtitulação com 96 poços com fundo V estéreis (uma para cada vírus) foram separadas e identificadas de acordo com cada um dos 10 vírus testados (GVA, GVB, GFkV, GFLV, GLRaV-1 -2 -3 e V-7, ArMV, GCMV).

Seguiu-se o protocolo para o revestimento das placas, de acordo com a recomendação do fabricante para cada tipo ou grupo de vírus. Para leitura da absorbância utilizou-se um leitor de microplacas Multiskan Go (Thermo Scientific) com 405 nm de comprimento de onda. As amostras

com absorvância duas vezes maior que a média dos controles negativos foram consideradas como positivas para a presença do vírus.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram detectadas sete espécies virais em 12 das 21 cultivares de uva para vinho, representando 57,2% de infecção por vírus nas cultivares analisadas. Observou-se reação positiva para a presença de GVA nas cultivares IAC 138-22 (Máximo), Moscatel Branca, Moscatel Grega, Muscat Noir, Syrah, e Micheli Palieri; GVB na cultivar Barbera; GLRaV1 na cultivar Carmenere; GLRaV2 nas cultivares Alfrocheiro, Barbera, Carbenet Franc, Carmenere, Moscatuel CG 102295, Muscat Saint Vallier e Micheli Palieri; ArMV nas cultivares Alfrocheiro, Barbera, Carbenet Franc, Carmenere, Moscatuel CG 102295 e Muscat Saint Vallier; GFLV nas cultivares Alfrocheiro, Barbera, Carbenet Franc, Carmenere, Moscatuel CG 102295 e Muscat Saint Vallier) e GCMV na cultivar Carbenet Franc. Observou-se cinco infecções simples, que ocorrem quando apenas um vírus infecta a planta (41,7% do total de cultivares infectadas), e sete infecções mistas, que ocorrem quando dois ou mais vírus infectam a planta (58,3% do total de cultivares infectadas).

Em estudos anteriores realizados sobre a incidência de vírus no Submédio do Vale do São Francisco foram identificadas espécies como: *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine leafroll-associated virus 1, 2, 3 e 4* (GLRaVs -1,- 2,-3 e -4), *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine rupestris vein feathering virus* (GRVfV), *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *Grapevine virus B* (GVB) e *Grapevine fanleaf virus* (FAJARDO et al., 2002; CATARINO et al., 2015; SILVA et al., 2018). Os mesmos são considerados de grande importância na viticultura por afetarem o desenvolvimento das plantas infectadas, reduzindo seu vigor e, conseqüentemente, diminuindo a produção. No Brasil, a fim de garantir a identidade e a qualidade física e fitossanitária das mudas de videira produzidas e comercializadas, apenas nove (GVA, GVB, GFkV, GFLV, GLRaV-1 -2 -3 e V-7, ArMV) dos 10 vírus analisados no presente estudo, são exigidos pela legislação através da Portaria Nº 37, de 13 de fevereiro de 2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Portaria Nº 37 (D.O.U. de 14 de fevereiro de 2007). O ArMV é considerado Praga Quarentenária Ausente (A1) (Instrução Normativa Nº 41, de 1º de julho de 2008 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) e o GCMV não é exigido para obtenção de certificação de qualidade de mudas. O primeiro relato da presença do ArMV no Brasil é realizado no presente trabalho.

CONCLUSÕES

O teste ELISA foi eficiente na detecção de vírus em videira nas condições desse trabalho, sendo os vírus com maior incidência nas amostras analisadas o GLRaV-2, o GVA, o ArMV e o GFLV.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Vale do São Francisco por fornecer os meios necessários para a conclusão do Curso de mestrado; à Embrapa Semiárido por toda a estrutura, financiamento e suporte oferecidos; à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco pela concessão da bolsa (Processo Facepe IBPG-1474-5.01/16).

REFERÊNCIAS

BARBOSA, M. A. G. et al. Doenças da videira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.37, n.291, p.86-98m 2016.

BASSO, M.F. et al. Avanços e perspectivas no estudo das doenças virais e subvirais em videira com ênfase na realidade brasileira. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.22, p.160-207, 2014.

CATARINO, A. et al. Incidência de vírus em videiras no Nordeste brasileiro e caracterização molecular parcial de isolados virais locais. **Ciência Rural**, v. 45, n. 3, p. 379-385, 2015.

CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, 34: 475-483, 1977.

ENGEL, E. A. et al. A diagnostic oligonucleotide microarray for simultaneous detection of grapevine viruses. **Journal of virological methods**, v. 163, n. 2, p. 445–51, 2010.

FAJARDO, T. M. V. et al. Detecção de *Closterovirus* em videira e caracterização parcial de um isolado do *Grapevine leafroll-associated virus 3*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 58-64, 2002.

OIV. **World Vitiviniculture Situation**. OIV Statistical Report on World Vitiviniculture. 2016. Disponível em: <<http://www.oiv.int/public/medias/5029/world-vitiviniculture-situation-2016.pdf>> Acesso em: 10 dez. 2018.

REIS, L. P.; REIS, P. C. M. R. VIABILIDADE ECONÔMICA DO CULTIVO DE UVA IRRIGADA NO MUNICÍPIO DE PETROLINA, PE. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer – Goiânia, v. 13, n. 24. 2016.

SILVA, A. dos A.; FREITAS, DMS. Ajustes em protocolo de multiplex voltado à detecção de vírus de videira presentes no Submédio do Vale do São Francisco. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMIÁRIDO, 13., 2018, Petrolina. Anais... Petrolina: Embrapa Semiárido, 2018.