

## ENSAIOS DE TRANSMISSÃO DE VÍRUS DE Videira POR COCHONILHAS

E. I. PEDROSO, O. A. SEQUEIRA, M. E. G. PINTO  
e V. SIMÕES

Departamento de Fitopatologia, E. A. N., Quinta do Marquês,  
2780 Oeiras

### RESUMO

A partir de videiras da casta Competição infectadas com o vírus A da videira (GVA), e com o vírus do tipo III associado ao enrolamento foliar da videira (GLRaV-III), obteve-se experimentalmente a transmissão de ambos os vírus, por cochonilhas da espécie *Planococcus citri* Risso, a plantas sãs das castas Pinot noir e Cabernet Sauvignon. A presença do GVA em Portugal foi observada pela primeira vez no decurso do presente trabalho. Estes resultados preliminares demonstram o papel importante das cochonilhas na dispersão das referidas viroses da videira no nosso País, devido à sua elevada eficácia de transmissão destes patogéneos.

### INTRODUÇÃO

A possibilidade de existirem espécies de cochonilhas transmissoras de vírus de videira encontra-se já referida há cerca de 30 anos por Dias (1962), que, trabalhando com a doença do enrolamento em Portugal conseguiu algumas transmissões.

Rosciglione *et al.* (1983), em Itália, foram os primeiros a mencionar a transmissão do vírus A da videira (grapevine virus A-GVA) a *Nicotiana clevelandii* Gray pelo *Planococcus longispinus* Targioni Tozzetti. Rosciglione e Castelhamo (1985) obtiveram resultados semelhantes, tendo acrescentado à lista de possíveis vectores as espécies *Planococcus ficus* Signoret e *Planococcus citri* Risso.

Engelbrecht e Kasdorf (1985), na África do Sul, realizaram a transmissão do mesmo vírus, de videira a *N. clevelandii* utilizando cochonilhas da espécie *P. ficus*.

Rosciglione e Gugerli (1986) num estudo realizado com videiras infectadas naturalmente com a doença do enrolamento foliar, após uma infestação por cochonilhas (*P. longispinus*), concluíram que este insecto provavelmente tinha transmitido não só o GVA mas também o vírus do tipo III associado ao enrolamento foliar da videira (GLRaV-III). Os mesmos autores realizaram posteriormente um estudo (Rosciglione e Gugerli, 1989) onde descreveram a transmissão do GLRaV-III de videira a videira por *P. ficus*.

O GLRaV-III é um dos vírus associados à doença do enrolamento foliar da videira mais difundidos nos vinhedos portugueses (Santos *et al.*, 1989; Simões *et al.*, 1989). A presença de populações de cochonilhas da espécie *Planococcus citri* Risso em vinhas onde se encontravam numerosas cepas com sintomas característicos de enrolamento foliar, levou-nos a procurar esclarecer a possibilidade destas cochonilhas estarem envolvidas na disseminação do GLRaV-III. Foram assim estabelecidos ensaios com aquela finalidade. Porque se verificou que as plantas utilizadas estavam infectadas também com o GVA, vírus cuja presença não tinha sido ainda observada em Portugal, testou-se também a sua transmissibilidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

Em Outubro de 1991 foram realizados ensaios de transmissão por cochonilhas do vírus do tipo III associado ao enrolamento foliar da videira, e do GVA.

Como fonte de inóculo utilizaram-se folhas de videira da casta Competição naturalmente infectadas no campo com o vírus do tipo III, e com o GVA, e isentas de vírus dos tipos I e II, conforme foi detectado através de ensaios imunoenzimáticos utilizando soros específicos (Bioreba, Suíça). As videiras foram enxertadas em 1968 em cavalos da variedade R99, plantados em 1966. Na altura da realização do ensaio verificou-se que, além de sintomas foliares de vermelhão e enrolamento (Fig. 1) os garfos tinham um diâmetro muito superior ao do cavalo, principalmente na zona de enxertia, e que os cavalos apresentavam profundas caneluras longitudinais (Fig. 2). Para as tentativas de transmissão utilizaram-se cochonilhas da espécie

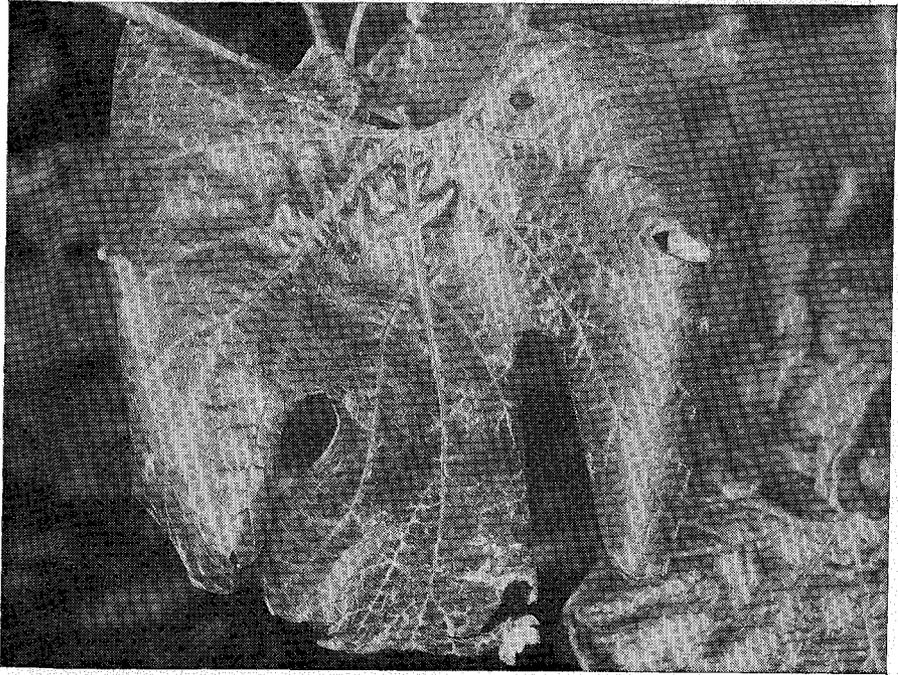


Fig. 1 — Folha de videira da casta *Competição* com sintomas de enrolamento para a página inferior e avermelhamento do limbo entre as nervuras.  
*Leaf of a grapevine of the variety *Competição* with downroll and reddening of the blade between the veins.*

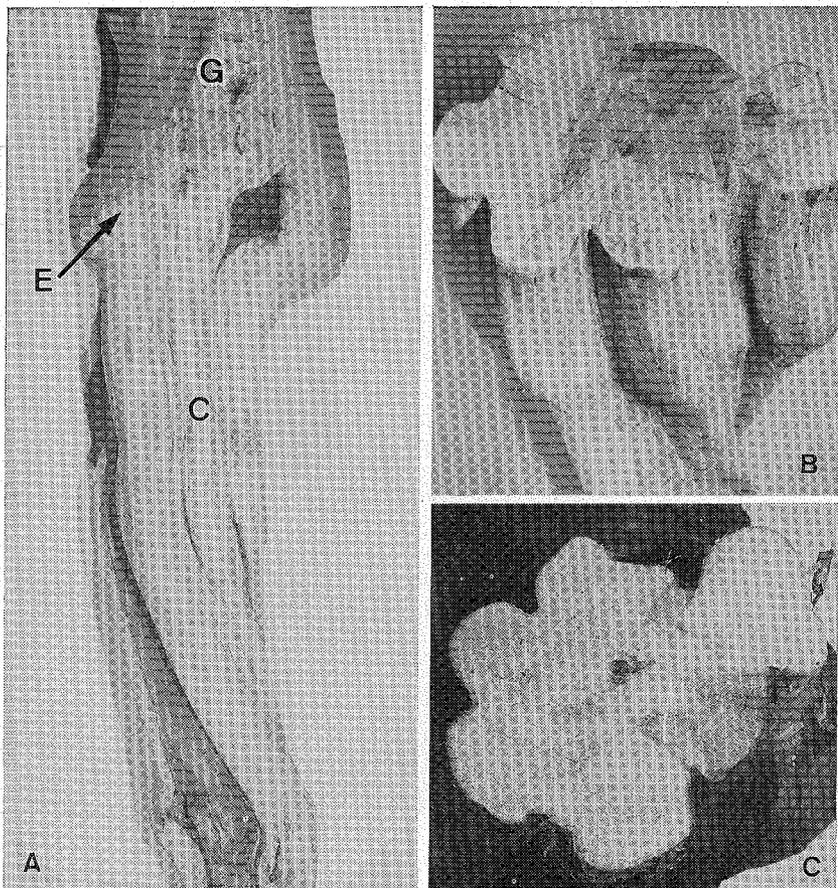


Fig. 2—A—Garfo (G) da casta *Competição* com um diâmetro muito superior ao do cavalo (R. 99), principalmente junto à zona de enxertia (E). O cavalo (c) apresenta profundas caneladuras longitudinais e rugosidades (pittings). B, C—Cortes transversais do cavalo.

*A—Graft (G) of the variety *Competição* with a much larger diameter than the rootstock (R. 99), mainly in the graft region (E). The rootstock (c) presents deep longitudinal groovings and pittings. B, C—Transversal sections of the rootstock.*

*P. citri*, que colonizavam naturalmente as referidas videiras (Fig. 3).

Como hospedeiros experimentais empregaram-se dois grupos de quatro plantas de videira respectivamente da casta Pinot noir e da casta Cabernet Sauvignon, obtidas na colecção de indicadores de viroses proveniente do «Établissement National Technique pour l'Amélioration de la Viticulture», França. Estas videiras foram mantidas em vaso, num compartimento de estufa do Departamento de Fitopatologia da Estação Agronómica Nacional. Instalaram-se na mesma altura plantas testemunha sãs das mesmas castas noutro compartimento.

Colheram-se, numa das videiras infectadas, folhas com fortes sintomas de vermelhão e de enrolamento, e infestadas com cochonilhas. Estas folhas foram em seguida colocadas sobre folhas de indicadores, em número de quatro por planta, e mantidas em observação.

Verificou-se que, ao fim de alguns dias, e à medida que as folhas infectadas dessecavam, as cochonilhas se deslocavam para as folhas dos indicadores, instalando-se em geral na página inferior destas, junto a uma nervura.

Em Outubro/Novembro de 1991, e após um mês de permanência das cochonilhas nas cepas, realizaram-se tratamentos insecticidas específicos, de forma a eliminar estes insectos das plantas hospedeiras.

Em Março de 1992, colheram-se pedaços de sarmentos do ano nas plantas hospedeiras e em plantas testemunha sãs, provenientes da mesma origem, e realizaram-se testes ELISA (Clark e Adams, 1977) com antissoros contra GLRaV-I, II, III e GVA.

A partir de Maio do mesmo ano iniciou-se a observação periódica, ao microscópico electrónico de transmissão, de extractos de pecíolos de folhas das videiras, realizando-se simultaneamente testes ELISA. Para executar a técnica de contraste negativo colocava-se, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, uma gota de extracto de tecido recém obtido por maceração, numa grelha de zinco de malha de 63  $\mu$ m coberta por Formvar, a que se adicionava uma gota de uma solução aquosa de acetato de uranilo a 1% ou de tungstato de metilamina a 2%. O excesso de líquido era retirado colocando um pedaço de papel de filtro sobre a margem da grelha. Seguida-

mente, as grelhas eram observadas ao microscópico electrónico Philips EM 300.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em Março de 1992, cerca de seis meses após o início dos estudos de transmissão de vírus de videira a videira por cochonilhas da espécie *P. citri*, realizaram-se testes ELISA com soros contra GLRaV-I, II, III e GVA. Verificou-se que todas as plantas de Pinot noir e de Cabernet Sauvignon utilizadas nos ensaios tinham sido infectadas com GLRaV-III e GVA, enquanto que as plantas testemunha continuavam isentas de vírus.

Em fins de Maio do mesmo ano eram já aparentes os sintomas de enrolamento foliar e vermelhão nas videiras infectadas experimentalmente. Nesta altura era já possível detectar a presença dos vírus pela técnica ELISA nos pecíolos das folhas.

No entanto, a observação ao microscópico electrónico de extractos foliares que então se realizou não conduziu à detecção de vírus. Só mais tarde, já em fins de Julho, se observaram partículas virais (Fig. 4), o que se atribuiu ao aumento de concentração de closterovírus que em geral se verifica nas videiras infectadas com estes patogéneos durante o Verão, nas nossas condições climáticas. Foram detectadas partículas em número reduzido, embora em algumas grelhas se encontrassem campos com duas e mais partículas (Fig. 4). Estes valores poderão indicar alta concentração, se tivermos em linha de conta que se trata de closterovírus de videira em extractos não purificados, e associados ao efeito de choque devido à infecção recente por cochonilhas. A escassez de partículas inteiras e não sobrepostas com a malha das grelhas, contribuiu também para dificultar a sua medição. Foi no entanto possível medir cerca de vinte partículas que tinham aproximadamente 1800-2000 nm de comprimento, o que está de acordo com os valores referidos por Gugerli (1990) para o vírus do tipo III associado ao enrolamento foliar da videira.

Recentemente, vários autores (Gugerli *et al.*, 1984; Zee *et al.*, 1987) têm apontado para a existência de uma associação significativa entre partículas de closterovírus e a doença do enrolamento foliar da videira. Estes vírus, aparentemente, pertencem a vários tipos diferentes. A designação de vírus asso-

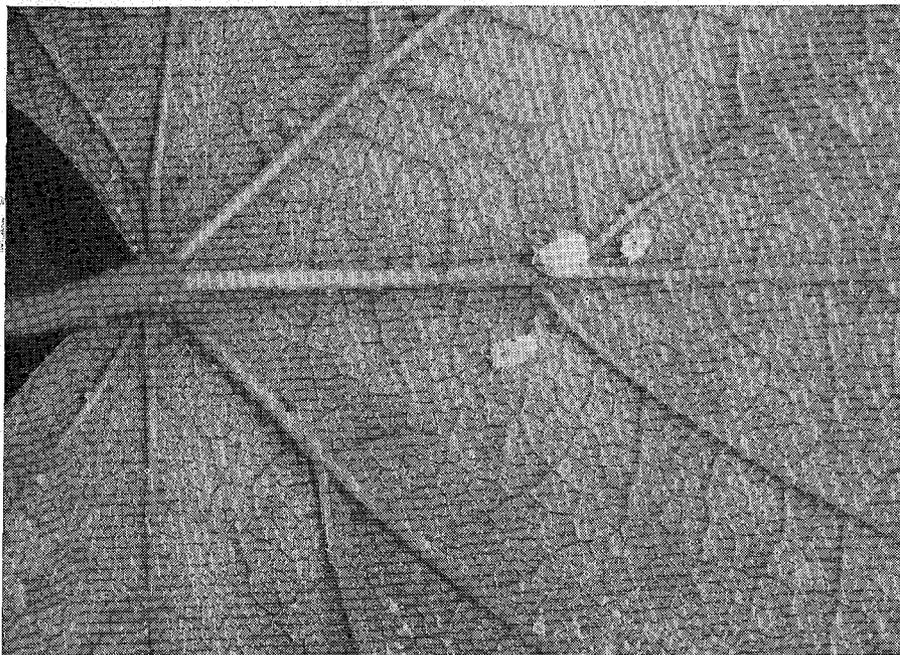


Fig. 3 — Cochonilhas da espécie *P. citri* em folha de videira da casta Pinot noir.

*P. citri* mealybugs colonizing a leaf of a Pinot noir grapevine.

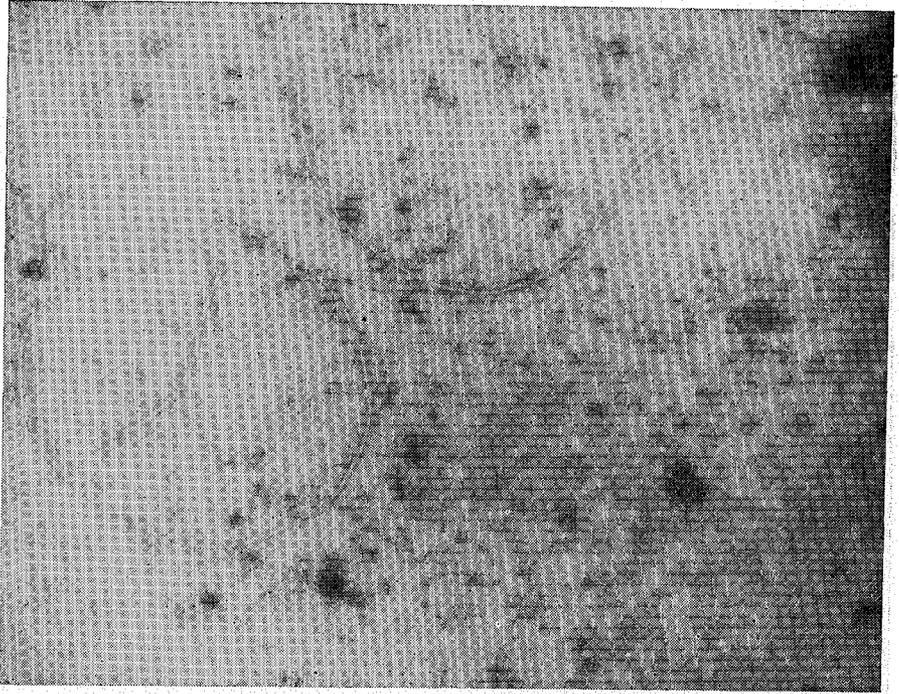


Fig. 4 — Partículas de closterovírus com cerca de 1800-2000 nm de comprimento em extracto de folha de videira da casta Pinot noir infectada experimentalmente por cochonilhas da espécie *P. citri* a partir duma cepa da casta Competição.  $\times 60\ 000$ .

*Closterovirus particles about 1800-2000 nm long in leaf extract of Pinot noir grapevine experimentally infected by P. citri mealybugs from a Competição variety grapevine.  $\times 60\ 000$ .*

ciados ao enrolamento foliar da videira (GLRaV) numerados de I a IV é, por este motivo, geralmente aceite.

O GLRaV-III infecta uma parte importante das vinhas em Portugal, tal como se tem constatado através de trabalhos realizados nos últimos anos no Departamento de Fitopatologia da Estação Agronómica Nacional (Santos *et al.*, 1989; Simões *et al.*, 1989; Pedroso *et al.*, 1991) e, com a coordenação deste organismo, em várias Universidades e Direcções Regionais de Agricultura.

No que respeita ao GVA, trata-se dum vírus com um comprimento de cerca de 800 nm, com uma concentração em tecidos de videira extremamente baixa (Conti *et al.*, 1980), o que dificulta muito a sua visualização. Não ficou esclarecida a identidade das partículas de menores dimensões detectadas nos extractos das plantas infectadas. Encontra-se actualmente em estudo a utilização da técnica de «decoração» diferencial das partículas dos dois tipos de closterovírus, utilizando os seus antissoros específicos, para o esclarecimento desta questão.

Conti *et al.* (1980) transmitiram mecanicamente um closterovírus de videira com lenho rugoso a *Nicotiana clevelandii*. Após purificação e caracterização do vírus, os referidos autores produziram um soro com o qual foi possível distinguir este vírus de vários outros closterovírus. O novo vírus foi então designado por «GSV-AV» (grapevine stem pitting associated virus, vírus associado ao lenho rugoso da videira). Mais tarde (Milne *et al.*, 1984), utilizando a técnica de microscopia electrónica de adsorção, observaram a presença de «GSP-AV» em várias, mas não em todas as videiras infectadas com enrolamento e «stem pitting». Devido à fraca correlação existente entre a presença de vírus e a manifestação de determinados sintomas, foi proposto um novo nome para o vírus: GVA (vírus A da videira). Este vírus foi detectado pela primeira vez no nosso País durante a realização do presente trabalho, com recurso à técnica ELISA. Anteriormente, tinham já sido efectuados estudos de detecção sintomatológica do lenho rugoso da videira (Sequeira e Mendonça, 1973). Verificou-se a grande dispersão desta anomalia nos vinhedos portugueses especialmente nos da Ilha da Madeira (Mendonça e Corte, 1980). Sucede porém que, embora o GVA seja detectado com frequência em videiras com sintomas de enrolamento, lenho rugoso e/ou casca eucortçada,

existem ainda poucos elementos para determinar a sua etiologia. O GVA apresenta uma concentração extremamente baixa e variável em videira e, além disso, a possibilidade de existirem estirpes diferentes deste vírus dificulta seriamente o seu estudo etiológico (Gugerli, 1990). Interessa esclarecer a distribuição e gravidade deste vírus no nosso País.

A transmissão por cochonilhas do vírus do tipo III associado ao enrolamento foliar da videira, e do GVA, por nós obtida, carece de estudo mais detalhado, que se encontra já em curso.

Urge no entanto chamar a atenção dos viticultores para este problema, salientando a importância que estes insectos podem ter, para além da sua acção como pragas, na disseminação destas doenças. A elevada eficácia de transmissão de clostero-vírus de videira demonstrada pelas cochonilhas estudadas no presente trabalho, aponta no sentido da necessidade dum cuidadoso controlo das suas populações nas vinhas.

#### AGRADECIMENTOS

Agradece-se à Secção de Viticultura da EAN (Eng.º Luís Carneiro) as facilidades concedidas na colheita de material nos campos de ensaio. Ao Eng.º Gonçalves Passos e à S.ª D.ª Isabel Passos ficamos gratos pelo trabalho fotográfico realizado.

#### RÉSUMÉ

##### **Essais de transmission de virus de la vigne par des cochenilles**

A partir de plants de vigne de la variété *Competição* infectées par le virus A (GVA), et par le virus associé à l'enroulement de la feuille du type III (GLRaV-III) on a effectué la transmission experimentalle des deux virus, par des cochenilles de l'espèce *Planococcus citri* Risso, a des plants de vigne saines des variétés Pinot noir et Cabernet Sauvignon. GVA est detecté pour la première fois au Portugal. Les resultats preliminaires montrent une haute efficacité de ce vecteur dans la transmission de GLRaV-III et GVA. Cela peut expliquer partiellement la haute dissemination de ces virus aux vignobles Portugais.

## SUMMARY

### Mealybug transmission tests of grapevine viruses

Grapevine virus A (GVA) and grapevine leafroll associated virus III (GLRaV-III) were transmitted experimentally by *Planococcus citri* Risso from infected grapevine Competição variety plants to Pinot noir and Cabernet Sauvignon healthy grapevines. GVA was detected for the first time in Portugal. Preliminary results show high efficiency of this vector in the transmission of GLRaV-III and GVA. This could in part explain the high dissemination of these virus in the Portuguese vineyards.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Clark, M. F. e A. N. Adams  
1977 Characteristics of the microplate method of enzymelinked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **34**: 475-483.
- Conti, M., R. G. Milne, E. Luisoni e G. Bocardo  
1980 A closterovirus from a stem-pitting-diseased grapevine. *Phytopathology* **70**: 394-399.
- Dias, H. F.  
1962 Comunicação pessoal. in Hewitt (1968).
- Engelbrecht, D. J. e G. G. F. Kasdorf  
1985 Association of a closterovirus with grapevine indexing positive for grapevine leafroll disease and evidence for its natural spread in grapevines. *Phytopath. Medit.* **24**: 101-105.
- Gugerli, P.  
1990 Grapevine closterovirus. *Proc. 10th ICVG meeting*, Volos, Greece. pp. 40-51.
- Gugerli, P., Brugger, J. J. e R. Bovey  
1984 L'enroulement de la vigne: mise en évidence de particules virales et développement d'une méthode immuno-enzymatique pour le diagnostic rapide. *Rev. suisse Vitic. Arboric. Hortic.* **16**: 299-304.
- Hewitt, W. B.  
1968 Viruses and virus diseases of the grapevine. *Rev. Appl. Mycol.* **47**: 433-455.
- Mendonça, A. e G. Corte  
1980 Notes on «legno rugoso» (rugose wood) of grapevine in Madeira islands. *Proceedings of the 7th meeting of the International Council for the Study of Viruses and Viruslike Diseases of the Grapevine. Niagara Falls, Canada.*
- Milne, R. G., M. Conti, D. E. Lesemann, G. Stellmach, E. Tanne e J. Cohen  
1984 Closterovirus-like particles of two types associated with diseased grapevines. *Phytopath. Z.* **110**: 360-368.

- Pedroso, E. I., O. A. Sequeira e J. C. Sequeira.  
1991 Virus-like particles and vesiculated bodies in leafroll and corky bark diseased grapevines. *Ciência Téc. Vitic.* **10**(1): 5-14.
- Rosciglione, B., M. A. Castellano, G. P. Martelli, V. Savino e G. Cannizaro  
1983 Mealybug transmission of grapevine virus A. *Vitis* **22**: 331-347.
- Rosciglione, B. e M. A. Castellano  
1985 Further evidence that mealybugs can transmit grapevine virus A (GVA) to herbaceous hosts. Proc. 8th meeting ICVG, Bari, Italy, 1984. *Phytopath. medit.* **24**: 1866-188.
- Rosciglione, B. e P. Gugerli  
1986 Maladies de l'enroulement et du bois strié de la vigne: analyse microscopique et sérologique. *Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, **18**: 207-211.
- 1989 Transmission of grapevine leafroll disease and an associated closterovirus to healthy grapevine by the mealbybug *Planococcus ficus* Signoret. Proc. 9th ICVG meeting, Kiryat Anavim, Israel, pp. 67-69.
- Santos, M. T., V. Geraledes Simões, S. Leitão, A. de T. Mendonça, A. P. Matos, A. R. Oliveira e O. A. Sequeira  
1989 Enrolamento da videira. I. Closterovirus em videira detectados por imunomicroscopia electrónica de adsorção (IMEA). 1.º Encontro de Fitopatologistas Portugueses. Oeiras, Portugal.
- Sequeira, O. A. de e A. de V. e Mendonça  
1973 Some abnormalities resembling legno riccio (rugose wood) on grapevine in Portugal. *Agronomia lusit.*, **34**(4): 299-304.
- Simões, V. Paulo, Geraledes M. E., A. de S. Mendonça, O. A. Sequeira e A. R. Oliveira  
1989 Enrolamento da videira. II. Incidência em Portugal de closterovirus do tipo GVLR I e GVLR III determinada pela técnica ELISA. 1.º Encontro de Fitopatologistas Portugueses. Oeiras, Portugal.
- Zee, F., A. Gohen Gonsalves, Kim K. S., R. Pool e R. F. Lee  
1987 Cytopathology of leafroll-diseased grapevines and the purification and serology of associated closteroviruslike particles. *Phytopathology* **77**: 1427-1434.