

PAULA RADAELLI

**VARIABILIDADE GENÉTICA E DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS
SOROLÓGICAS E MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DE VÍRUS EM
VIDEIRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Fitopatologia.

**RECIFE
MARÇO, 2009**

**VARIABILIDADE GENÉTICA E DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS
SOROLÓGICAS E MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DE VÍRUS EM
VIDEIRA**

PAULA RADAELLI

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO

Prof. Dr. Gilvan Pio Ribeiro – Orientador

Dr. Thor Vinícius Martins Fajardo – Co-orientador

Dr. Giovanni P. Martelli – Co-orientador

**RECIFE – PE, BRASIL
MARÇO, 2009**

Ficha Catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central -UFRPE

R124v Radaelli, Paula
Variabilidade genética e desenvolvimento de ferramentas sorológicas e moleculares para identificação de vírus em videira / Paula Radaelli. -- 2009.
126 f. : il.

Orientador : Gilvan Pio Ribeiro
Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Agronomia.
Inclui bibliografia.

CDD 576. 648 3

1. Detecção
 2. Sorologia
 3. *Vitis* spp
 4. Fitovirus
- I. Ribeiro, Gilvan Pio.
 - II. Título

**VARIABILIDADE GENÉTICA E DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS
SOROLÓGICAS E MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DE VÍRUS EM
VIDEIRA**

PAULA RADAELLI

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em 09 de março de
2009

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Gilvan Pio Ribeiro
(UFRPE)

EXAMINADORES:

Dr^a Genira Pereira de Andrade
(UFRPE)

Dr^a Roseane Cavalcanti dos Santos
(Embrapa Algodão)

Prof^a Dr^a Ana Maria Benko Iseppon
(UFPE)

Prof. Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho
(UFRPE)

RECIFE – PE, BRASIL

MARÇO, 2009

“Atraio agora da Substância Universal, com irresistível poder e determinação, tudo aquilo que é meu por Direito Divino”.

Ao meu pai Paulo, minha mãe Helena e minha irmã Milena pela confiança, amor e principalmente pelo apoio para que meus sonhos se tornassem realidade

O F E R E Ç O

"A decisão de ter um filho é muito séria. É decidir ter, para sempre, o coração fora do corpo."
(Elizabeth Stone)

À minha filha Vitória pelo amor incondicional e por dar sentido a minha vida.

Te amo mais do que tudo no mundo!

D E D I C O

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, e a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pela oportunidade de realização do Curso de Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos no exterior;

Ao Prof. Dr. Gilvan Pio Ribeiro pela orientação, incentivo, amizade e oportunidades oferecidas durante todo o curso.

Ao Dr. Thor V. Martins Fajardo pela excelente co-orientação, confiança, disponibilidade e dedicação que possibilitou a realização dos trabalhos.

Ao Dr. Marcelo Eiras pelos valiosos conselhos e ensinamentos, as longas conversas e os momentos especiais que jamais serão esquecidos.

Ao Dr. Giovanni P. Martelli pela oportunidade, acolhida e excelente exemplo de profissional a ser seguido.

Ao Dr. Angelantonio Minafra pelos ensinamentos, amizade, pela paciência com a língua italiana e, acima de tudo, por demonstrar o verdadeiro significado da palavra humildade.

A toda minha família pelo apoio, incentivo e incansável disposição.

À minha irmã Milena Radaelli, agradeço por todo o apoio, amor e por tornar minha vida mais alegre.

À minha filha Vitória Gobbi Radaelli, que um dia compreenderá o esforço e o “abandono”. Minha eterna gratidão.

Em Recife agradeço

Ao Prof. Dr. Sami Jorge Michereff pela amizade dispensada durante todo o curso e auxílio prestado.

Ao Prof. Dr. Delson Laranjeira pela oportunidade da realização do curso.

Ao amigo e irmão Giltembergue Macedo Tavares pela sincera amizade e por tornar os momentos difíceis em grandes momentos alegres.

As amigas e colegas Genira Andrade, Valéria Costa, Zilderlânia Alves, Lílian Guimarães, Sandra Maranhão, Neilza Castro, Andréia Chaves, Albaneide Lopes e Fátima Pontes pela verdadeira amizade e apoio.

A todos os meus colegas do curso que de alguma forma colaboraram para minha formação.

À Darci, pelos auxílios prestados e disponibilidade.

Em Bento Gonçalves agradeço

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) – Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho (CNPUV), pela oportunidade de realização da pesquisa.

Ao pesquisador Dr. Osmar Nickel pelo incansável auxílio, amizade e incentivo à pesquisa.

Aos funcionários da Embrapa Uva e Vinho Marcos Vanni, Iraci Sinski, Daniela Dal Bosco e Ronaldo Regla por todo o auxílio prestado.

Ao amigo Dr. Geraldo Chavarria pelo incentivo constante à pesquisa, amizade e momentos alegres.

À amiga Carla Volz pela amizade e acolhida nos momentos difíceis.

A Bari, dove ho trascorso parte della mia tesi, dedico i miei sinceri ringraziamenti soprattutto:

AI CNR:

A Dottore Pasquale Saldarelli per tutto il sostegno ed l'amicizia.

Alla Dottoressa Maria Saponari per la sua disponibilità e gentilezza.

A Jocelyne Jawhar, una amica per tutta la vita, per la sua accoglienza e amicizia e per i momenti felici trascorsi insieme.

Ad Annalisa Giampetruzzi, Laura Cogotzi, Massimiliano Morelli, Raied abou Kuba'a, Giuliana Loconsole, Antonietta Campanale, Giovanna Bottalico, Orianna Potere, Mina Mondelli e Francesco Palmisano per il loro sostegno.

A la mia famiglia italiana Zullo-Miazzi:

Marco, Monica, Alessandro ed Irene, che mi hanno fatto sentire come se fossi a casa mia, e rimarranno per sempre nel mio cuore.

In particolare ad Alfredo Zullo, un amico speciale, che non dimenticherò mai.

SUMÁRIO

	Páginas
AGRADECIMENTOS.....	iv
SUMÁRIO.....	vii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO GERAL.....	01
1. A videira no Brasil e as doenças causadas por vírus.....	02
2. Principais famílias e gêneros de vírus que possuem espécies detectadas em videira.....	08
2.1. Família <i>Closteroviridae</i>.....	08
2.1.1. Gênero <i>Closterovirus</i>	09
2.1.1.1. <i>Grapevine leafroll-associated virus 2 (GLRaV-2)</i>	09
2.1.2. Gênero <i>Ampelovirus</i>	10
2.1.2.1. Espécies classificadas ou tentativamente classificadas como ampelovírus que infectam a videira.....	10
2.1.3. <i>Grapevine leafroll-associated virus 7 (GLRaV-7)</i>	13
2.2. Família <i>Comoviridae</i>.....	13
2.2.1. Gênero <i>Nepovirus</i>	13
2.2.1.1. <i>Grapevine fanleaf virus (GFLV)</i>	14
2.2.1.2. Outras espécies de <i>Nepovirus</i> que infectam videira.	16
2.3. Família <i>Flexiviridae</i>.....	17
2.3.1. Gênero <i>Foveavirus</i>	17
2.3.1.1. <i>Rupestris stem pitting-associated virus (RSPaV)</i>	18

2.3.2. Gênero <i>Vitivirus</i>	20
2.3.2.1 <i>Grapevine virus A</i> (GVA).....	20
2.3.2.2. <i>Grapevine virus B</i> (GVB).....	21
2.3.2.3. <i>Grapevine virus D</i> (GVD).....	23
2.3.2.4. <i>Grapevine virus E</i> (GVE).....	23
2.4. Família <i>Tymoviridae</i>.....	23
2.4.1. Gênero <i>Maculavirus</i>	24
2.4.1.1. <i>Grapevine fleck virus</i> (GFkV).....	24
2.5. Outros vírus detectados em videira.....	25
3. Métodos de diagnóstico de viroses de videira empregados na caracterização dos vírus.....	28
4. Referências Bibliográficas.....	31
CAPÍTULO II. Variabilidade do gene da proteína capsidial de três importantes espécies virais que infectam videiras no Brasil.....	41
Resumo.....	42
Abstract.....	43
Introdução	44
Material e Métodos.....	46
Resultados e Discussão.....	50
Conclusões.....	56
Agradecimentos	56
Referências	57
CAPÍTULO III. Production of polyclonal antisera using recombinant coat proteins of <i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i> and <i>Grapevine virus B</i>	67

Abstract.....	68
Resumo.....	69
Introduction.....	70
Material and Methods.....	73
Results and Discussion.....	76
Conclusions	79
Acknowledgements.....	80
References	80
CAPÍTULO IV. Uso de RT-PCR em tempo real (TaqMan®) para identificação e caracterização de vírus em videira.....	89
Resumo.....	90
Abstract.....	91
Introdução	93
Material e Métodos.....	96
Resultados e Discussão.....	98
Agradecimentos.....	102
Referências	102
CONCLUSÕES GERAIS	109

LISTA DE TABELAS

	Páginas
CAPÍTULO I	
Tabela 1. Vírus relatados em videira (<i>Vitis</i> spp.).....	5
Tabela 2. Viróides que infectam a videira (<i>Vitis</i> spp.).....	7
Tabela 3. RNAs satélites de vírus da videira (<i>Vitis</i> spp.).....	7
Tabela 4. Doenças com agentes ainda não caracterizados, consideradas de origem viral em videira (<i>Vitis</i> spp.).....	7
CAPÍTULO II	
Tabela 1. Relação dos isolados virais de RSPaV, GLRaV-2 e GFLV utilizados no trabalho, suas origens, incluindo dados das proteínas capsidiais obtidas.....	62
Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para as ampliações dos isolados virais de RSPaV, GLRaV-2 e GFLV, com sua orientação, sequência e fonte.....	63
Tabela 3. Identidade das seqüências (%) de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos dos genes da proteína capsidial dos diferentes isolados de RSPaV, GLRaV-2 e GFLV caracterizados.....	63
Tabela 4. Sequências de maior identidade (%) de aminoácidos deduzidos do gene da proteína capsidial entre os isolados de RSPaV, GLRaV-2 e GFLV, deste trabalho e isolados depositados no GenBank..	64
CAPÍTULO III	
Table 1. Absorbance values at 405 nm observed in a plate-trapped antigen-ELISA using grapevine (<i>Vitis</i> spp.) samples and antisera against GLRaV-2 and GVB fusion proteins, expressed in <i>Escherichia coli</i> cells.....	85
Table 2. Absorbance values at 405 nm observed in a plate-trapped antigen-ELISA using grapevine (<i>Vitis</i> spp.) samples (1:3 w/v), infected with six GLRaV-2 isolates and antisera against GLRaV-2, isolate L/I, fusion protein, expressed in <i>Escherichia coli</i> cells.....	85

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Relação dos isolados virais utilizados no trabalho, suas origens e os vírus detectados por RT-PCR TaqMan® no presente estudo.....	105
Tabela 2. Relação das sondas e dos oligonucleotídeos utilizados para as amplificações dos isolados virais por RT-PCR TaqMan®.....	105
Tabela 3. Isolados e/ou cultivar testados por multiplex RT-PCR (TaqMan®) para GLRaV-1 e GLRaV-3.....	106
Tabela 4. Hospedeiros testados para GLRaV-2 através de RT-PCR (TaqMan®).....	106
Tabela 5. Isolados e hospedeiros testados por multiplex RT-PCR (TaqMan®) para GVA, GVB e RSPaV.....	106

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I	Páginas
Figura 1. Sintomatologia de vírus em videira.....	27
CAPÍTULO II	
Figura 1. Dendrograma obtido através do alinhamento (Clustal X) das seqüências de nucleotídeos do gene da proteína capsial de isolados de RSPaV, GLRaV-2 e GFLV.....	65
Figura 2. Hibridizações “dot-blot” entre sondas não-radioativas marcadas com digoxigenina e RNA total extraído de videiras.....	66
CAPÍTULO III	
Figure 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, 12% (p/v), stained with Coomassie Blue.....	86
Figure 2. Western blot with commercial antisera against the six-histidin tag (anti-his C-terminal/AP Ab).....	87
Figure 3. Western blot with GVB and GLRaV-2 obtained antisera (1:250 v/v), third bleeding, against the fusion proteins expressed in <i>E. coli</i>	88

CAPÍTULO IV

Família *Closteroviridae*

Figura 1. Análise de RT-PCR TaqMan® com fluoróforo FAM para detecção de GLRaV-1, com as devidas curvas de amplificação (C_T)..... 107

Figura 2. Análise de RT-PCR TaqMan® com fluoróforo TET para detecção de GLRaV-3, com as devidas curvas de amplificação (C_T)..... 107

Figura 3. Análise de RT-PCR TaqMan® com fluoróforo Cy5 para detecção de GLRaV-2..... 107

Família *Flexiviridae*

Figura 4. Análise de RT-PCR TaqMan® com fluoróforo TET para detecção de GVA..... 108

Figura 5. Análise RT-PCR TaqMan® com fluoróforo Cy5 para detecção de GVB..... 108

Figura 6. Análise de RT-PCR TaqMan® com fluoróforo FAM para detecção de RSPaV..... 108

RESUMO

A videira (*Vitis* spp.), por ser propagada vegetativamente, facilita a disseminação de patógenos, como os vírus, favorecendo o aparecimento de doenças complexas, pelo acúmulo de diferentes espécies virais numa mesma planta. Entre as doenças que afetam a videira, as viroses são as mais difíceis de controlar, pois a disseminação e o acúmulo de vírus são favorecidos pelo transporte e emprego de material propagativo infectado. Devido a avançados estudos por meio da biologia molecular, evidências sugerem que alguns vírus em videira, como *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV), *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2) e *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) frequentemente apresentam muitas seqüências variáveis, bem como infecções mistas com outros vírus, dificultando a definição das propriedades biológicas das diferentes variantes deste vírus. Um dos objetivos do presente trabalho foi avaliar a variabilidade genética destes três importantes vírus da videira através da caracterização molecular do gene da proteína capsidial (CP). Foram amplificados fragmentos que compreendem os genes completos da CP de isolados de RSPaV, GLRaV-2 e de GFLV por RT-PCR, utilizando-se primers específicos para cada espécie viral, permitindo a separação em grupos dos isolados estudados por análise filogenética das seqüências obtidas. Os diferentes isolados das três espécies virais estudadas também foram detectados utilizando-se hibridização com sondas não radioativas, marcadas com digoxigenina, possibilitando identificar de forma inequívoca as amostras infectadas, independentemente dos isolados virais empregados para síntese das sondas. Os métodos de diagnóstico das viroses da videira podem ser divididos em três categorias. As duas tradicionais incluem os testes biológicos e o diagnóstico sorológico. Mais recentemente, desenvolveram-se os métodos de diagnóstico molecular, com os testes RT-PCR, IC-RT-PCR e RT-PCR em tempo real. Este último é o mais avançado para diagnose e quantificação de ácidos nucleicos, pois realiza amplificações de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, além de permitir a detecção de mais de um vírus em uma só reação. Devido às dificuldades em detectar vírus em videira, além do custo elevado dos métodos de diagnose, propôs-se a produção de antissoros

específicos contra isolados de GLRaV-2 e *Grapevine virus B* (GVB), desenvolvidos a partir da proteína capsidial expressa em *Escherichia coli*, e testar seu possível uso para a detecção destes dois vírus, em videiras infectadas. Os genes das CPs foram amplificados via RT-PCR, clonados, seqüenciados e posteriormente subclonados, onde os plasmídeos recombinantes foram empregados na transformação de *E. coli* e na expressão das proteínas capsidiais. Estas foram purificadas, suas identidades confirmadas em SDS-PAGE e “Western blot”, utilizadas para imunizar coelho. Os antissoros produzidos contra estas proteínas foram capazes de reconhecer as proteínas recombinantes correspondentes em “Western blot” e detectar GLRaV-2 e GVB em tecidos infectados de videiras pelo ELISA indireto, bem como discriminar videiras sadias e infectadas. Muitos vírus que infectam a videira ocorrem em concentrações abaixo do limite de detecção dos testes diagnósticos comumente utilizados. Com isso, um outro objetivo deste trabalho foi detectar importantes vírus dos gêneros *Closterovirus* (GLRaV-2) e *Ampelovirus* (*Grapevine leafroll-associated virus 1* - GLRaV-1 e *Grapevine leafroll-associated virus 3* - GLRaV-3), família *Closteroviridae*, bem como os vírus dos gêneros *Foveavirus* (RSPaV) e *Vitivirus* (*Grapevine virus A* (GVA) e GVB), família *Flexiviridae*, através de RT-PCR em tempo real (TaqMan®). Para ampelovírus, com primers degenerados e sondas específicas, foram detectados GLRaV-1 e GLRaV-3 nos isolados e /ou cultivares testados. Para closterovírus, com primers degenerados e sonda específica, detectou-se GLRaV-2 em todas as cultivares testadas e em *Nicotiana benthamiana*. Os membros da família *Flexiviridae* GVA, GVB e RSPaV foram detectados através de multiplex RT-PCR (TaqMan®), demonstrando-se assim, que a RT-PCR TaqMan® é um método de diagnóstico molecular rápido, quantitativo, confiável, sensível e capaz de detectar mais de um vírus na mesma reação.

ABSTRACT

The vegetative propagation of the grapevine (*Vitis* spp.) facilitates the dissemination of pathogens, such as viruses, favoring the appearance of complex diseases, by accumulation of different virus species in the same plant. Among the diseases that affect the grapevine, those caused by viruses are the most difficult to control because the dissemination and the accumulation of viruses are favored by the transport and use of infected propagative material. Due to advanced studies with molecular biology, evidences suggest that some grapevine viruses, as *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV), *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2) and *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) frequently present polymorphic sequences, as well as mixing infections with other viruses, making difficult to define the biological properties of the different virus variants. Therefore, one objective of this work was to evaluate the variability of these three important viruses of grapevine using the molecular characterization of the coat protein (CP) gene. Fragments comprising the complete CP genes of RSPaV, GLRaV-2 and of GFLV isolates were amplified by RT-PCR, using primers for specific regions of each viral species, allowing the separation of the isolate groups by phylogenetic analyses of the sequences. The isolates of each viral species here studied were additionally detected by non-radioactive probes with digoxigenin, allowing unambiguous identification of infected samples, independently of the isolate used as template for probe synthesis. The methods of diagnosis of the grapevine virus diseases can be divided in three categories. The two traditional ones include the biological tests and the serologic diagnosis. Recently, the molecular methods of diagnosis have been developed, comprising the tests RT-PCR, IC-RT-PCR and real time RT-PCR. This last one is the most advanced technique of diagnose and quantification of nucleic acids, accomplishing amplifications in precisely way and with higher reproducibility, allowing the detection of more than one virus in a single reaction. Considering the difficulties to detect virus in grapevine, and the high cost of the diagnosis methods it was considered the production of antisera against isolates of GLRaV-2 and *Grapevine virus B* (GVB), developed from CPs expressed in *Escherichia coli* and to test the possibility of using them

for detecting these two viruses in infected grapevines. The CP genes were amplified by RT-PCR, cloned, sequenced and later subcloned, where the recombinant plasmids were employed in the transformation of *E. coli* and in the expression of CPs. The proteins were purified, their identities confirmed by SDS-PAGE and Western blot and used for immunizing rabbit. The antisera produced against these proteins were capable to recognize corresponding recombinant proteins in Western blot and to detect GLRaV-2 and GVB in infected grapevines by indirect ELISA, as well as discriminating healthy and infected grapevines. Many viruses that infect grapevine occur in concentrations under the limit of detection of the diagnostic tests commonly used. Considering this fact, another objective of the present work was to detect important viruses of the genera *Closterovirus* (GLRaV-2) and *Ampelovirus* (*Grapevine leafroll-associated virus 1* - GLRaV-1 and *Grapevine leafroll-associated virus 3*-GLRaV-3), family *Closteroviridae*, as well as the viruses of the genera *Foveavirus* (RSPaV) and *Vitivirus* (*Grapevine virus A* (GVA) and the GVB), family *Flexiviridae*, by real time RT-PCR (TaqMan®). For ampelovirus, with degenerate primers and specific probes GLRaV-1 and GLRaV-3 were detected in isolates and/or cultivars tested. For *closterovirus* with degenerate primers and specific probes GLRaV-2 was detected in all cultivars tested and in *Nicotiana benthamiana*. The members of the family *Flexiviridae* GVA, GVB and RSPaV were detected by multiplex RT-PCR (TaqMan®), demonstrating that RT-PCR TaqMan® is a fast method for molecular diagnosis, quantitative, reliable, sensitive and applicable for detecting more than one virus in the same reaction.

CAPÍTULO I

Introdução Geral

1. A videira no Brasil e as doenças causadas por vírus

A videira pertence ao gênero *Vitis*, o qual é formado por 64 espécies da família *Vitaceae* ou *Ampelidaceae*, da ordem *Rhamnales*. Distribuídas em três centros de origem: Euroasiático, Asiático e Americano, a uva é uma das frutas mais antigas utilizadas na alimentação humana, cuja produção se espalha por todo o mundo. No Brasil, o cultivo da videira começou em 1535 na Capitania de São Vicente trazida pelos portugueses, tendo grande impulso com a imigração italiana nos Estados de São Paulo e da região Sul (CORREIA, 1984).

A produção de uvas no Brasil concentra-se principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste. Maior importância socioeconômica é observada nos estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Pernambuco, Bahia e Minas Gerais. Além disso, a viticultura tem se expandido para outras regiões como Mato Grosso do Sul, Goiás, Espírito Santo e Ceará, aumentando ainda mais sua importância (Mello, 2008).

A uva é cultivada principalmente com duas finalidades: produção de sucos e fermentados, e consumo “in natura”. As espécies de maior interesse econômico são agrupadas em videiras européias (*V. vinifera* L.) e americanas (*V. labrusca* L. e *V. bourquina* L.) (SOUSA, 1996).

Nos últimos anos, o Brasil tem demonstrado um bom desempenho na produção de uvas de mesa e de vinho com várias regiões produtoras. Porém, práticas culturais e a importação de novos materiais genéticos têm favorecido a ocorrência de doenças, ocasionando danos significativos à produtividade da videira na região. Dentre os patógenos encontrados em videiras, os vírus são de extrema importância devido aos danos que causam, por serem bastante

destrutivos, levando ao definhamento das plantas ao longo dos anos, a redução na produção e, conseqüentemente, a inviabilização econômica do parreiral. Portanto, é de fundamental importância o conhecimento dos principais fitopatógenos associados a esta cultura, principalmente os vírus, pois podem se encontrar de forma latente em videiras. Por não produzirem sintomas visualmente perceptíveis, podem passar despercebidos, sendo propagados indefinidamente, ocorrendo um alto grau de infecção nos materiais utilizados (FAJARDO et al., 2003a; MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006).

A videira, por ser propagada vegetativamente, facilita a disseminação destes patógenos, fato que favorece o aparecimento de doenças complexas, pelo acúmulo de diferentes vírus numa mesma planta. Muitas dessas doenças estão identificadas e caracterizadas, enquanto outras dependem ainda de estudos complementares para definir sua natureza etiológica. Algumas ocorrem de forma ocasional na videira, aparentemente sem expressão econômica. Outras, embora causem prejuízos econômicos importantes, estão restritas a determinadas regiões ou países, possivelmente condicionadas por certas características regionais, como o plantio de cultivares sensíveis ou devido a condições edafoclimáticas que favoreçam a ocorrência de vetores (FAJARDO et al., 2003a; MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006).

Nas regiões vitícolas brasileiras tradicionais, onde os vinhedos foram formados com material introduzido há muitos anos de outros países, principalmente do continente europeu, a presença de viroses é comum. Na época, pouca seleção sanitária era conduzida e, conseqüentemente, o material vegetativo infectado era facilmente distribuído entre regiões e países, especialmente os porta-enxertos, nos quais a infecção viral freqüentemente é

latente (FAJARDO et al., 2003a).

Como a maioria das cultivares de videira, em especial as uvas finas (*V. vinifera*), são suscetíveis às doenças virais, ainda hoje, há uma expressiva incidência desses patógenos nas regiões produtoras. A disseminação é facilitada, em grande parte, no momento da obtenção de porta-enxertos e garfos de produtoras para enxertia, pelo fato do material vegetativo ser originado de vinhedos mais antigos da região ou introduzido de outras regiões (FAJARDO et al., 2003a).

Até o presente, foram relatados em videira 53 vírus (Tabela 1), cinco viróides (Tabela 2), dois RNAs satélites (Tabela 3) e cinco doenças consideradas possíveis viroses (Tabela 4), cujos agentes não foram ainda identificados (MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006). No Brasil, dez destes vírus já foram relatados (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-5, GLRaV-6, GVA, GVB, RSPaV, GFkV, GFLV) (FAJARDO et al., 2003a). Entre os vírus mais importantes que afetam a videira destacam-se aqueles pertencentes às famílias *Closteroviridae*, *Comoviridae*, *Flexiviridae* e *Tymoviridae* (MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006).

Tabela 1. Vírus relatados em videira (*Vitis* spp.)

Família	Gênero	Espécie	Referência
<i>Bromoviridae</i>	<i>Alfavirus</i>	<i>Alfalfa mosaic virus</i> (AMV)	Fauquet et al., 2005 Martelli; Boudon-Padieu, 2006
	<i>Cucumovirus</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	Fauquet et al., 2005 Martelli; Boudon-Padieu, 2006
	<i>Ilarvirus</i>	<i>Grapevine line pattern virus</i> (GLPV)	Martelli; Boudon-Padieu, 2006
<i>Grapevine angular mosaic virus</i> (GAMoV)		Martelli; Boudon-Padieu, 2006	
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Tospovirus</i>	<i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV)	Fauquet et al., 2005 Martelli; Boudon-Padieu, 2006
<i>Closteroviridae</i>	<i>Closterovirus</i>	<i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i> (GLRaV-2) (=Grapevine rootstock stem lesion associated virus, GRSLaV)	Karasev, 2000 Martelli et al., 2002a
		<i>Ampelovirus</i>	<i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i> (GLRaV-1)
	Ampelovirus não classificados	<i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i> (GLRaV-3)	Ling et al., 1997 Martelli et al., 2002a
		<i>Grapevine leafroll-associated virus 5</i> (GLRaV-5)	Martelli et al., 2002a
		<i>Grapevine leafroll-associated virus 4</i> (GLRaV-4)	Martelli et al., 2002a Abou Ghanem-Sabanadzovic, 2006 Martelli; Boudon-Padieu, 2006
		<i>Grapevine leafroll-associated virus 6</i> (GLRaV-6)	
		<i>Grapevine leafroll-associated virus 8</i> (GLRaV-8)	
		<i>Grapevine leafroll-associated virus 9</i> (GLRaV-9)	
	<i>Closteroviridae</i> não classificado	<i>Grapevine leafroll-associated virus 7</i> (GLRaV-7)	Turturo et al., 2000 Alrwahneh et al., 2008
	<i>Comoviridae</i>	<i>Fabavirus</i>	<i>Broadbean wilt virus</i> (BBWV)
<i>Nepovirus</i> Subgrupo A		<i>Arabis mosaic virus</i> (ArMV)	Wetzel et al., 2001
		<i>Grapevine fanleaf virus</i> (GFLV)	Andret-Link et al., 2004
		<i>Raspberry ringspot virus</i> (RpRSV)	Martelli; Boudon-Padieu, 2006
		<i>Tobacco ringspot virus</i> (TRSV)	
Subgrupo B		<i>Artichoke Italian latent virus</i> (AILV)	Fauquet et al., 2005 Martelli; Boudon-Padieu, 2006
		<i>Grapevine chrome mosaic virus</i> (GCMV)	
		<i>Tomato black ring virus</i> (TBRV)	
Subgrupo C		<i>Blueberry leaf mottle virus</i> (BBLMV)	Fauquet et al., 2005 Martelli; Boudon-Padieu, 2006
		<i>Tomato ringspot virus</i> (ToRSV)	
		<i>Peach rosette mosaic virus</i> (PRMV)	
		<i>Cherry leafroll virus</i> (CLRV)	
		<i>Grapevine Tunisian ringspot virus</i> (GTRSV)	
<i>Nepovirus</i> não classificados		<i>Grapevine Bulgarian latent virus</i> (GBLV)	
		<i>Grapevine Anatolian ringspot virus</i> (GARSV)	Fauquet et al., 2005 Martelli; Boudon-Padieu, 2006
	<i>Grapevine deformation virus</i> (GDefV)		
<i>Flexiviridae</i>	<i>Foveavirus</i>	<i>Rupestris stem pitting-associated virus</i> (RSPaV) (=Grapevine rupestris stem pitting-associated virus, GRSPaV)	Adams et al., 2004 Martelli et al., 2007
	<i>Potexvirus</i>	<i>Potato virus X</i> (PVX)	Fauquet et al., 2005 Martelli; Boudon-Padieu, 2006

	<i>Trichovirus</i>	<i>Grapevine berry inner necrosis virus</i> (GINV)	Fauquet et al., 2005 Martelli; Boudon-Padieu, 2006
	<i>Vitivirus</i>	<i>Grapevine virus A</i> (GVA)	
		<i>Grapevine virus B</i> (GVB)	Martelli et al., 1997
		<i>Grapevine virus D</i> (GVD)	Adams et al., 2004
	<i>Vitivirus</i> não classificado	<i>Grapevine virus E</i> (GVE)	Nakaune et al., 2008
<i>Tombusviridae</i>	<i>Carmovirus</i>	<i>Carnation mottle virus</i> (CarMV)	Fauquet et al., 2005 Martelli; Boudon-Padieu, 2006
	<i>Necrovirus</i>	<i>Tobacco necrosis virus D</i> (TNV-D)	Fauquet et al., 2005 Martelli; Boudon-Padieu, 2006
	<i>Tombusvirus</i>	<i>Grapevine Algerian latent virus</i> (GALV)	Fauquet et al., 2005 Martelli; Boudon-Padieu, 2006
<i>Petunia asteroid mosaic virus</i> (PetAMV)		Fauquet et al., 2005 Martelli; Boudon-Padieu, 2006	
<i>Tymoviridae</i>	<i>Maculavirus</i>	<i>Grapevine fleck virus</i> (GFkV)	Fauquet et al., 2005 Martelli; Boudon-Padieu, 2006
	<i>Maculavirus</i> não classificado	<i>Grapevine redglobe virus</i> (GRGV)	Fauquet et al., 2005 Martelli; Boudon-Padieu, 2006
	<i>Marafivirus</i> não classificado	<i>Grapevine rupestris vein feathering virus</i> (GRVFV) <i>Grapevine asteroid mosaic-associated virus</i> (GAMaV)	Fauquet et al., 2005 Martelli; Boudon-Padieu, 2006
<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	Vírus semelhante a potyvírus não identificado, isolado no Japão de uma cultivar russa	Martelli; Boudon-Padieu, 2006
-----	<i>Idaeovirus</i>	<i>Raspberry bushy dwarf virus</i> (RBDV)	Fauquet et al., 2005 Martelli; Boudon-Padieu, 2006
-----	<i>Sadwavirus</i>	<i>Strawberry latent ringspot virus</i> (SLRV)	Fauquet et al., 2005 Martelli; Boudon-Padieu, 2006
-----	<i>Sobemovirus</i>	<i>Sowbane mosaic virus</i> (SoMV)	Fauquet et al., 2005 Martelli; Boudon-Padieu, 2006
-----	<i>Tobamovirus</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)	
-----		<i>Tomato mosaic virus</i> (ToMV)	
-----	-----	<i>Grapevine Ajinashika virus</i> (GAjV)	Martelli; Boudon-Padieu, 2006
-----	-----	<i>Grapevine stunt virus</i> (GSV)	
-----	-----	<i>Grapevine labile rod-shaped virus</i> (GLRSV)	

Tabela 2. Viróides que infectam a videira (*Vitis* spp.)

Família	Gênero	Espécie	Referência
<i>Pospiviroidae</i>	<i>Apscaviroid</i>	<i>Australian grapevine viroid</i> (AGVd)	Fauquet et al., 2005 Martelli ; Boudon-Padieu, 2006
		<i>Grapevine yellow speckle viroid 1</i> (GYSVd-1)	
		<i>Grapevine yellow speckle viroid 2</i> (GYSVd-2)	
	<i>Hostuviroid</i>	<i>Hop stunt viroid</i> (HSVd)	Eiras et al., 2006
	<i>Pospiviroid</i>	<i>Citrus exocortis viroid</i> (CEVd)	

Tabela 3. RNAs satélites de vírus da videira (*Vitis* spp.)

Família	Gênero	Espécie	Referência
-----	-----	<i>Grapevine Bulgarian latent virus satellite RNA</i> (RNA satélite, Subgrupo 1)	Fauquet et al., 2005 Martelli; Boudon-Padieu, 2006
-----	-----	<i>Grapevine fanleaf virus satellite RNA</i> (RNA satélite, Subgrupo 1)	Fauquet et al., 2005 Martelli; Boudon-Padieu, 2006

Tabela 4. Doenças com agentes ainda não caracterizados, consideradas de origem viral em videira (*Vitis* spp.)

Família	Gênero	Espécie	Referência
-----	-----	Grapevine enation (Enação da videira)	Fauquet et al., 2005 Martelli; Boudon-Padieu, 2006
-----	-----	Grapevine summer mottle (Mosqueado de verão da videira)	Fauquet et al., 2005 Martelli ; Boudon-Padieu, 2006
-----	-----	Grapevine vein mosaic (Mosaico das nervuras da videira) (doença possivelmente induzida por RSPaV)	Martelli; Boudon-Padieu, 2006
		Grapevine vein necrosis (Necrose das nervuras da videira)	Fauquet et al., 2005 Martelli; Boudon-Padieu, 2006
		LN 33 stem grooving (Acanaladura do lenho de LN 33)	Martelli; Boudon-Padieu, 2006

2. Principais famílias e gêneros de vírus que possuem espécies detectadas em videira

2.1. Família *Closteroviridae*

A família *Closteroviridae* compreende vírus de plantas com genoma de RNA de fita simples, partículas filamentosas e transmissão semi-persistente por insetos. Três gêneros são definidos nesta família: *Closterovirus*, *Ampelovirus* e *Crinivirus*, apresentando como vetores afídeos, cochonilhas e moscas-brancas, respectivamente. Para o último não há relato de vírus infectando videira (MARTELLI et al., 2002a, KARASEV, 2000).

Karasev (2000) propôs a classificação em gêneros da família *Closteroviridae*, definida primeiramente pelo tipo de inseto vetor e depois pelo número de RNAs genômicos, fundamentando assim os parâmetros para a criação de um novo gênero. Anteriormente a família era dividida em *Closterovirus* e *Crinivirus*, cuja principal diferenciação era a propriedade dos genomas monopartido ou bipartido, respectivamente. Em decorrência de novas informações moleculares e biológicas disponíveis, uma revisão taxonômica da família *Closteroviridae* foi realizada, sendo aprovada em 2002 pelo grupo de estudos do ICVG (*International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine*). Em particular, as espécies transmitidas por cochonilhas foram separadas do gênero *Closterovirus* e acomodadas em um novo gênero, nomeado *Ampelovirus* (MARTELLI et al., 2002a).

O enrolamento da folha da videira (*Grapevine leafroll-associated virus* – GLRaV) é atribuído a pelo menos nove espécies (GLRaV-1 a 9), sorologicamente distintas, da família *Closteroviridae*, as quais, individualmente

ou em mistura, estão associadas com a manifestação e variabilidade dos sintomas da doença. Com exceção do GLRaV-2 pertencente ao gênero *Closterovirus*, as demais estão incluídas, como espécies ou possíveis espécies, no gênero *Ampelovirus* (Tabela 1) (KARASEV, 2000; MARTELLI et al., 2002a, FAUQUET et al., 2005).

As espécies virais do enrolamento das folhas podem infectar muitas variedades e espécies de videira, sendo consideradas como patógenos restritos ao gênero *Vitis*.

2.1.1. Gênero *Closterovirus*

O gênero *Closterovirus* compreende diversas espécies que infectam plantas economicamente importantes, dentre elas a videira, sendo o *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2) o único representante a infectar esta cultura (KARASEV, 2000; MARTELLI et al., 2002a). A organização genômica do GLRaV-2 é praticamente idêntica à de outro *Closterovirus*, o *Beet yellows virus* (BYV), espécie-tipo deste gênero e similar ao *Citrus tristeza virus* (CTV), também um closterovírus. A similaridade foi confirmada por análise das proteínas geneticamente relevantes, possibilitando a classificação do GLRaV-2 como espécie definitiva do gênero *Closterovirus* (ABOU-GHANEM et al., 1998).

2.1.1.1. *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2)

O GLRaV-2 possui partículas alongadas e flexuosas, genoma monopartido de RNA de fita simples e senso positivo com 16.494 nucleotídeos e oito ORFs, sendo que a ORF6 expressa a proteína capsidial (22 kDa) (ABOU-GHANEM et al, 1998; MENG et al., 2005; BEUVE et al., 2007).

Sintomatologia

A manifestação do enrolamento da folha em *V. vinifera* caracteriza-se pelo declínio, enrolamento e descoloração nas folhas (Figura 1A) no final do período de crescimento, resultando na redução da produção e qualidade das bagas. Recentemente, o GLRaV-2 também foi encontrado em associação aos sintomas de incompatibilidade da enxertia e declínio em novos vinhedos (BERTAZZON; ANGELINI, 2004; MENG et al., 2005).

Transmissão

Os vírus pertencentes ao gênero *Closterovirus* são transmitidos por afídeos de forma semi-persistente, à exceção do GLRaV-2, para o qual não há um vetor conhecido. Porém, este vírus é transmissível mecanicamente para hospedeiras herbáceas, com espectro restrito a basicamente *Nicotiana* spp. (KARASEV, 2000; MARTELLI et al., 2002a).

2.1.2. Gênero *Ampelovirus*

A maior parte dos vírus associados ao enrolamento está classificada no gênero *Ampelovirus*, sendo o GLRaV-3 a espécie-tipo.

2.1.2.1. Espécies classificadas ou tentativamente classificadas como ampelovírus que infectam a videira

Até o momento, três espécies virais causadoras de enrolamento da folha em videira foram identificadas e classificadas no gênero *Ampelovirus*: *Grapevine leafroll-associated virus* -1, -3 e -5. Outras quatro espécies foram tentativamente classificadas como ampelovírus: *Grapevine leafroll-associated*

virus -4, -6, -8 e -9. Os ampelovírus possuem genomas monopartidos, com partículas flexuosas e filamentosas de 1.400-2.200 nm com genoma de ssRNA (fita simples) de 16,9-19,5 kb e peso molecular das subunidades da proteína capsidial (CP) de 35 a 39 kDa. (PEARSON; GOHEEN, 1998; FAZELI; REZAIAN, 2000; TURTURO et al., 2000; MARTELLI et al., 2002a; PROSSER et al., 2007; ALRWAHNIH et al., 2008).

No Brasil, a existência do GLRaV-1, GLRaV-2 e GLRaV-3 já foi demonstrada no Rio Grande do Sul (KUNHN et al., 1997) e em São Paulo (KUNIYUKI et al., 2002), havendo indicações de que o GLRaV-3 seja o mais prevalente nos vinhedos brasileiros (KUNIYUKI et al., 2002). Em São Paulo também foi detectado o GLRaV-5. Kuniyuki et al. (2006b) testaram amostras foliares de 96 plantas de 21 cultivares, indexadas positivamente para enrolamento da folha (GLRaV), mas somente 5 cultivares mostraram-se infectadas com o GLRaV-5. O GLRaV-6 já foi identificado no Brasil por Kuniyuki et al. (2003) em amostras de videiras cultivadas em quatro estados brasileiros (SP, PE, MG e RS). Esse vírus foi detectado com baixa incidência, exceto nas cultivares Cardinal (100%) e Red Globe (42,8%). Embora o número de amostras não tenha sido alto, os dados indicam que o vírus está geograficamente bem distribuído, ocorrendo em todas as regiões onde estas duas cultivares estão presentes.

Sintomatologia

Os sintomas variam com as condições climáticas, época do ano, estado nutricional da planta, espécie e estirpe do vírus, estágio fenológico da planta e com a cultivar. São facilmente reconhecidos em cultivares sensíveis, em

especial no fim do ciclo vegetativo, antes da queda das folhas, pelo enrolamento dos bordos das folhas para baixo, observado nas cultivares européias (*V. vinifera*) tintas e brancas, (Figura 1B) embora possa ocorrer infecção sem que as folhas se enrolem (KUHN, 1989; MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006). Estes sintomas aparecem sempre nas folhas da base dos ramos, evoluindo para as demais folhas, podendo provocar o completo definhamento das plantas. Naquelas muito afetadas, observa-se nos cachos maturação irregular e atrasada da uva. As videiras americanas (*V. labrusca*) e híbridas não mostram os sintomas característicos da virose e nos porta-enxertos a infecção é latente (FAJARDO et al., 2003a).

Transmissão

A transmissão dos vírus GLRaV-1 e GLRaV-3 ocorre através das cochonilhas algodonosas (*Planococcus ficus*, *P. citri*, *Pseudococcus longispinus*, *P. calceolariae*, *P. affinis* (Sin. *P. viburni*), *Heliococcus bohemicus* e *Phenacoccus aceris*) e pelas cochonilhas de carapaça (*Pulvinaria vitis* e *Parthenolecanium corni*) (SILVA et al., 1968; WOERNER, 1983; FOLDI; SORIA, 1989; KUNIYUKI et al., 2005). Já o GLRaV-5 e o GLRaV-9 são transmitidos por *Pseudococcus longispinus*. As cochonilhas têm sido relatadas como as principais responsáveis pela dispersão de vírus na cultura da videira em países como África do Sul, Argentina, Austrália, Chile, Espanha, Estados Unidos, Itália, Nova Zelândia, Portugal e Uruguai (CHARLES et al., 2006). No Brasil, a disseminação natural ainda não foi comprovada, mas a transmissibilidade do GLRaV-3 por *P. longispinus* já foi experimentalmente demonstrada (KUNIYUKI et al., 2005). Os outros vírus associados ao

enrolamento da folha (GLRaV-4, GLRaV-6 e GLRaV-8) não possuem vetor conhecido (MARTELLI et al., 2002a; MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006).

2.1.3. *Grapevine leafroll-associated virus 7 (GLRaV-7)*

O GLRaV-7 está classificado na família *Closteroviridae*, porém não em nível de gênero. Este vírus foi encontrado primeiramente na Albânia por Choueiri et al. (1996), porém sem manifestação de sintomas. Turturo et al. (2000) caracterizaram molecularmente isolados de GLRaV-7, confirmando tratar-se de uma nova espécie viral.

O GLRaV-7 tem uma ampla distribuição geográfica, tendo sido relatado em diversos países, como Armênia, Egito, Grécia, Hungria, Itália (TURTURO et al., 2000, AVGELIS; BOSCIA, 2001), Turquia (AKBAŞ et al., 2007) e na Palestina (ALKOWNI et al., 1997). Recentemente o GLRaV-7 foi detectado em vinhedos dos EUA (MORALES; MONIS, 2007).

2.2. Família *Comoviridae*

A família *Comoviridae* compreende três gêneros, mas somente dois apresentam espécies viriais que infectam a videira, *Fabavirus* e *Nepovirus*, sendo este último o mais importante (Tabela 1).

2.2.1. Gênero *Nepovirus*

Em comum, os membros dos gêneros da família *Comoviridae* apresentam genoma bipartido, encapsidado em partículas icosaédricas, com cada segmento do genoma codificando uma poliproteína. A transmissão por nematóide e a posse de genoma maior distingue os membros do gênero

Nepovirus dos demais da família. Com base nas propriedades físico-químicas dos membros, o gênero *Nepovirus* é dividido em três subgrupos (A, B e C) (ANDRET-LINK, 2004; MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006).

2.2.1.1. *Grapevine fanleaf virus (GFLV)*

O principal nepovírus que infecta videira é o *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), pertencente ao subgrupo A e agente da degenerescência (ANDRET-LINK et al., 2004; MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006). Possui partículas poliédricas de 30 nm de diâmetro, genoma bipartido de RNA fita simples, senso positivo, com uma molécula de 7.342 nt e a outra de 3.774 nt, encapsidadas separadamente, mas ambas necessárias para a infecção. A proteína capsial possui 54 kDa, sendo codificada pelo RNA 2 (MARTELLI; SAVINO, 1998; MURPHY et al., 1995).

A incidência do GFLV nas regiões vitícolas brasileiras aparentemente não é expressiva (KUNIYUKI; COSTA, 1987; KUHN, 1992; KUNIYUKI et al., 1994; FAJARDO et al., 2000). Entretanto, nos Estados Unidos e em muitos países europeus a doença é considerada uma das mais importantes pelos prejuízos econômicos que causa à viticultura. Acrescente-se ainda o fato de o GFLV ser transmitido por nematóides, parasitas radiculares de difícil eliminação dos solos. Os danos causados pela virose variam com a cultivar afetada e a estirpe do vírus (MARTELLI; SAVINO, 1998; KUNIYUKI et al., 1994).

Sintomatologia

As cultivares mais sensíveis sofrem um declínio progressivo, com queda acentuada da produção, perda de qualidade da uva, diminuição na pega da

enxertia e no enraizamento das mudas. A doença afeta de um modo geral todos os órgãos da videira. Nas folhas, os sintomas mais característicos são: deformações com distribuição anormal das nervuras; ângulo do pecíolo muito aberto ou fechado; assimetria foliar com dentes pontiagudos e redução do tamanho (Figura 1C). Além destes sintomas também é comum a ocorrência, nas folhas, de manchas translúcidas, de formas variadas, observadas normalmente na primavera. Nos ramos, os sintomas se caracterizam pela presença de entrenós curtos, bifurcação, achatamentos e nós duplos, proliferação de gemas, bem como brotação fraca e atrasada. Nos cachos notam-se bagas menores e em menor número, com atraso ou não ocorrência de maturação (Figura 1D) (PEARSON; GOHEEN, 1998; KUHN, 1992; KUHN; NICKEL, 1998; FAJARDO et al., 2000).

Transmissão

Os nematóides longidorídeos *Xiphinema index* e *X. italiae* são os vetores responsáveis pela transmissão planta a planta nos vinhedos, produzindo distribuição de plantas infectadas em reboleiras, que são típicas de vetores de pouca mobilidade (WELDEKIDAN et. al, 1992; TENENTE et al., 2002). Restos de raízes de plantas doentes, que permanecem no solo, são viáveis por alguns anos e servem de fonte de inóculo, em áreas infestadas por nematóides. O GFLV pode ser transmitido mecanicamente para hospedeiras herbáceas, como *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor* e *Gomphrena globosa* (MARTELLI; SAVINO, 1998; KUNYUKI et al., 1994).

2.2.1.2. Outras espécies de nepovírus que infectam videira

Outras espécies importantes do gênero *Nepovirus* infectam videiras, como *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Raspberry ringspot virus* (RpRSV) e *Tobacco ringspot virus* (TRSV) (Subgrupo A); *Artichoke Italian latent virus* (AILV), *Grapevine chrome mosaic virus* (GCMV) e *Tomato black ring virus* (TBRV) (Subgrupo B); *Blueberry leaf mottle virus* (BBLMV), *Peach rosette mosaic virus* (PRMV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV), *Cherry leafroll virus* (CLRV) (Subgrupo C) além de outros *Nepovirus* não classificados, como *Grapevine deformation virus* (GDefV), *Grapevine Tunisian ringspot virus* (GTRSV) e *Grapevine Bulgarian latent virus* (GBLV) (Tabela 1). (IPACH et al., 2003; MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006). Ressalta-se que no Brasil não há relato desses vírus em videira.

ArMV ocorre, freqüentemente, em infecções mistas com GFLV na Itália, Alemanha e França, sendo transmitido pelo nematóide *X. diversicaudatum*. O AILV é transmitido pelo nematóide *Longidorus apulus* em algumas espécies vegetais, entretanto em videira isto ainda não foi constatado. Este vírus possui distribuição e importância econômica limitadas (SUTIC et al., 1999, WETZEL et al., 2001; MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006).

Os vírus BBLMV, TRSV, PRMV e ToRSV, separadamente ou em combinação, estão envolvidos na etiologia do declínio e da degenerescência da videira na América do Norte. Todas estas viroses, com exceção do BBLMV, provavelmente introduzido da Europa, são endêmicas na América do Norte e nativos na região. A transmissão ocorre por nematóides longidorídeos, exceto o BBLMV, que não possui vetor conhecido, porém em mirtilo (*Vaccinium* spp.) é

transmitido por pólen (SUTIC et al., 1999; MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006).

2.3. Família *Flexiviridae*

A família *Flexiviridae* é assim nomeada devido a partículas virais flexuosas de seus membros e inclui os gêneros *Allexivirus*, *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Foveavirus*, *Potexvirus*, *Trichovirus*, *Vitivirus*, *Mandarivirus* e outro gênero proposto, o *Citrivirus*. Em comum, possuem partículas virais filamentosas, de 12–13 nm de diâmetro, com genoma monopartido, RNA de fita simples e senso positivo. As principais espécies que infectam videira na família *Flexiviridae* estão classificadas nos gêneros *Foveavirus* e *Vitivirus* (ADAMS et al., 2004; MARTELLI et al., 2007), entretanto, há relatos de vírus que infectam videiras em dois outros gêneros, como *Trichovirus* e *Potexvirus* (Tabela 1).

A definição dos gêneros e espécies da família *Flexiviridae* é feita através de análises filogenéticas das seqüências da proteína capsidial. Em geral, espécies distintas apresentam identidade menor que 72% e 80% de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos, respectivamente (ADAMS et al., 2004).

2.3.1. Gênero *Foveavirus*

O gênero *Foveavirus* compreende duas espécies economicamente importantes, o *Apple stem pitting virus* (ASPV) que infecta macieira e pereira (RADAELLI et al., 2006) e o *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV) que infecta videira (MARTELLI; JELKMANN, 1998).

2.3.1.1. *Rupestris stem pitting-associated virus (RSPaV)*

O RSPaV foi identificado e caracterizado como o agente causal das caneluras do tronco de *Rupestris* (MARTELLI; JELKMANN, 2000). Este vírus possui partículas alongadas e flexuosas com cerca de 800 x 12 nm e genoma monopartido de RNA de fita simples e senso positivo com 8.726 nucleotídeos e proteína capsidial de 28 kDa (MENG et al., 1998; ZHANG et al., 1998; MINAFRA et al., 2000).

A videira é a única hospedeira natural do RSPaV conhecida. Evidências sugerem que o RSPaV é um vírus que apresenta muitas seqüências variáveis, sendo que infecções mistas com outros vírus são comumente detectadas em videira, o que dificulta a definição das propriedades biológicas das diferentes variantes (MENG et al. 1999, MENG et a., 2005).

Sintomatologia

O RSPaV é o mais freqüente e importante componente do lenho rugoso da videira na Itália (CREDI, 1997), assim como provavelmente também ocorre no restante dos países vitícolas (MENG et al., 1998, 1999). Zhang et al. (1998) mencionam que a ampla distribuição de RSPaV em videiras no mundo pode ser parcialmente atribuída à fraca expressão de sintomas do vírus em muitas cultivares, à descoberta relativamente recente desta doença e ao período de até dois anos que a indicadora lenhosa necessita para o término da indexação biológica. Verifica-se lento declínio no crescimento de videiras infectadas com as caneluras do tronco, além de efeitos negativos em relação à qualidade dos frutos e à produção (CREDI, 1997).

Os sintomas típicos de RSPaV incluem caneluras no lenho das plantas

infectadas (Figura 1 E). Estas variam em número, comprimento e largura, dependendo da sensibilidade da cultivar afetada e da estirpe do vírus. As plantas doentes, em geral, apresentam diminuição do vigor e há retardamento na brotação das gemas de uma a duas semanas. A casca do tronco é mais grossa e de aspecto corticento. Em algumas combinações enxerto/porta-enxerto, os sintomas podem se limitar a um dos componentes, quando o outro é tolerante. Muitas cultivares de produtoras viníferas e americanas são altamente suscetíveis. As caneluras podem ser observadas também nas raízes, especialmente em cultivares muito suscetíveis, como o porta-enxerto *Rupestris* du Lot. Também pode ocorrer na região da enxertia uma diferença de diâmetro entre o enxerto e o porta-enxerto. As folhas das cultivares tintas podem apresentar avermelhamento em plantas muito afetadas em função da formação anormal dos vasos condutores na região afetada. A morte de plantas pode ocorrer entre 6 e 10 anos de idade, e até mais cedo, quando porta-enxerto e enxerto são sensíveis. Em algumas cultivares a doença pode permanecer em estado latente (MINAFRA; HADIDI, 1994; MARTELLI et al., 1997; FAJARDO et al., 2003a).

Transmissão

A videira é a única hospedeira natural do RSPaV. O vírus não é transmitido mecanicamente e não tem vetor conhecido, porém é encontrado em grãos de pólen e nas sementes (ROWANI et al., 2000). A transmissão do RSPaV ocorre através da enxertia utilizando-se gemas infectadas, enquanto a dispersão do vírus se dá por meio de material propagativo infectado (MARTELLI; JELKMANN, 2000).

2.3.2. Gênero *Vitivirus*

O gênero *Vitivirus* inclui três espécies que infectam videiras: *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB) e *Grapevine virus D* (GVD) (MARTELLI et al., 1997). Recentemente, Nakaune et al. (2008) caracterizaram um novo *Vitivirus* que infecta videira no Japão, denominado *Grapevine virus E* (GVE). Devido a informações sorológicas e moleculares, o *Grapevine virus C* foi, recentemente excluído do gênero *Vitivirus*, pois estava erroneamente classificado neste gênero (MASRI, 2006).

2.3.2.1. *Grapevine virus A* (GVA)

O GVA é a espécie-tipo do gênero *Vitivirus*, possuindo partículas alongadas com cerca de 800 nm de comprimento e genoma monopartido de RNA de fita simples com aproximadamente 7.400 nucleotídeos. A proteína capsidial possui 22 kDa de peso molecular (MINAFRA; HADIDI, 1994; MINAFRA et al., 1994; MARTELLI et al., 1997; FAJARDO et al., 2003b).

Sintomatologia

Em cultivares sensíveis, a exemplo do porta-enxerto Kobber 5BB, acanaladuras são observadas sob a casca do tronco da videira na superfície do lenho (Figura 1 E) e correspondem ao local onde a casca penetra no tronco prejudicando a formação dos vasos condutores da seiva. As folhas das cultivares tintas podem apresentar avermelhamento em função da formação anormal dos vasos condutores (KUNIYUKI, 2001).

Transmissão

O GVA é transmissível, com dificuldade, para hospedeiras herbáceas, a exemplo de *Nicotiana* spp. A disseminação a longa distância do vírus ocorre pelo material vegetativo infectado e a transmissão através de enxertia. Demonstrou-se que GVA pode ser transmitido entre videiras ou para hospedeiras herbáceas pelas cochonilhas *H. bohemicus*, *P. longispinus*, *P. viburni* (Sin. *P. affinis*), *P. citri*, *P. ficus*, *Pseudococcus comstocki*, *Neopulvinaria innumerabilis* e *Parthenolecanium corni* (ROSCIGLIONE et al., 1983; LA NOTTE et al., 1997; REGENMORTEL et al., 2000).

2.3.2.2. Grapevine virus B (GVB)

O vírus B da videira (GVB) é o vírus causador do intumescimento dos ramos da videira, e juntamente com os vírus GVA, RSPaV e da acanaladura do lenho de LN33, são responsáveis pelo complexo rugoso da videira. Seu genoma com, aproximadamente, 7.600 nucleotídeos é monopartido, apresentando RNA de fita simples e senso positivo. A partícula viral tem cerca de 800 nm de comprimento e a proteína capsidial possui 23 kDa de peso molecular (BOSCIA et al., 1993; SALDARELLI et al., 1996; NICKEL et al., 2002).

Sintomatologia

As principais características são fendilhamento no córtex, avermelhamento das folhas de variedades tintas de *V. vinifera*, redução no vigor e produção escassa ou nula dependendo da variedade (KUNIYUKI; COSTA, 1987; KUHN, 1992). Nas cultivares americanas (*V. labrusca*), como a

Isabel, Niágara Rosada e Niágara Branca, os sintomas são facilmente observados e se caracterizam pelo intumescimento dos entrenós do ramo do ano (Figura 1F), com fendilhamento longitudinal do tecido afetado, inclusive no pecíolo das folhas próximas às regiões afetadas dos ramos. O tecido da região intumescida pode se apresentar com aspecto corticento (Figura 1G). Em algumas cultivares viníferas e híbridas pode ser observado avermelhamento intenso nas folhas, em cultivares tintas, ou amarelamento e enrolamento dos bordos foliares, em cultivares brancas. Esta coloração anormal abrange toda a área foliar, inclusive os tecidos ao longo das nervuras e, em viníferas, está associada ao complexo rugoso da videira do qual o intumescimento dos ramos é um dos componentes. Pode ocorrer também o engrossamento na região da enxertia (mudas de 1 a 3 anos). O tecido, quando maduro, adquire aspecto corticento e apresenta fendilhamentos longitudinais. Até o momento a única hospedeira natural conhecida para o vírus é a videira (KUHN, 1992; BOSCIA et al., 1993; MINAFRA; HADIDI, 1994; SALDARELLI et al., 1996).

Transmissão

O vírus é disseminado pelo material vegetativo, através da multiplicação por estacas ou gemas, sendo transmitido pela enxertia. A disseminação natural do intumescimento dos ramos foi observada em vinhedos e, posteriormente, foi realizada a transmissão experimental do GVB através de cochonilhas da família *Pseudococcidae*: *P. ficus*, *P. citri*, *P. longispinus* e *P. viburni* (Sin. *P. affinis*). Embora com dificuldade, o GVB é transmissível pela via mecânica para hospedeiras herbáceas, a maioria *Nicotiana* spp., assim como o GVA (BOSCIA et al., 1993; KUNIYUKI et al., 2006a; MARTELLI et al., 2007).

2.3.2.3. Grapevine virus D (GVD)

O GVD foi detectado em videira apresentando sintomas do complexo do lenho rugoso, mas seu papel na etiologia da doença é desconhecido. Sorologicamente distante de GVA e GVB, o GVD apresenta genoma monopartido de RNA com, aproximadamente, 7600 nucleotídeos, similar a outros membros do gênero *Vitivirus*. A partícula viral tem cerca de 825 nm de comprimento, enquanto a proteína capsidial possui massa molecular de 17,6 kDa (ABOU-GHANEM et al., 1997).

2.3.2.4. Grapevine virus E (GVE)

Análise filogenética baseada na seqüência de aminoácidos da proteína capsidial mostrou que dois isolados japoneses, denominados TvAQ7 e TvP15, são diferentes de outros vitivírus, como o GVA, GVB e GVD. Em adição, confirmou-se que estes isolados são transmitidos para videiras pela cochonilha *P. comstocki*. Assim sendo, uma nova espécie foi criada no gênero *Vitivirus*, denominado *Grapevine virus E* (GVE) (NAKAUNE et al. 2008).

2.4. Família Tymoviridae

A família *Tymoviridae* compreende os gêneros *Tymovirus*, *Marafivirus* e *Maculavirus* (Tabela 1). Estes gêneros de vírus de plantas têm em comum: morfologia, organização genômica, propriedades físico-químicas das partículas e genoma monopartido de RNA de fita simples. A análise filogenética da proteína capsidial (CP) e da polimerase (RdRp) mostraram que os três gêneros são relacionados. No gênero *Tymovirus* não há espécies que infectam videira. O principal vírus que infecta videira dentro da família *Tymoviridae* é o

Grapevine fleck virus (GFkV), pertencente ao gênero *Maculavirus* (MARTELLI et al., 2002b).

1.4.1. Gênero *Maculavirus*

Maculavirus é um gênero de vírus de plantas que apresenta como espécie-tipo o GFkV e uma segunda espécie tentativa, o Grapevine redglobe virus (GRGV). São vírus limitados ao floema, não transmitidos mecanicamente, sem vetor conhecido e possuem partículas isométricas com 30 nm de diâmetro. (MARTELLI et al., 2002b; MARTELLI et al., 2002c).

2.4.1.1. *Grapevine fleck virus* (GFkV)

O GFkV é o agente causal das manchas das nervuras da videira. Possui partículas isométricas, com 30 nm de diâmetro, genoma monopartido de RNA fita simples, de 7,5 kb. A proteína capsidial apresenta peso molecular de 28 kDa (SABANADZOVIC et al., 1996).

Sintomatologia

Os sintomas característicos da doença aparecem nas folhas novas e intermediárias do porta-enxerto Rupestris 'St. George', como manchas translúcidas, sem forma definida que acompanham as nervuras, em especial as de 3ª e 4ª ordem. Estas manchas aparecem distribuídas em parte ou em toda a lâmina foliar, podendo ocorrer em grande número ou estar reduzidas a poucas manchas (Figura 1H). Também é comum a ocorrência do seio peciolar excessivamente aberto, assimetria com distorção e deformação das folhas. As plantas muito afetadas são menos desenvolvidas e podem apresentar as folhas

com os bordos voltados para cima. O porta-enxerto Kober 5BB mostra os sintomas da doença, com intensidade menor. Nas demais cultivares comerciais o vírus ocorre de forma latente, ou seja, não mostra sintomas aparentes (MARTELLI et al., 2002b; FAJARDO et al., 2003a).

Transmissão

O vírus é capaz de infectar um grande número de variedades e espécies do gênero *Vitis*, sendo facilmente transmitido por união de tecidos, mas não através de sementes, nem transmitido mecanicamente, além de não possuir vetor conhecido (MARTELLI et al., 2002c).

2.5. Outros vírus detectados em videira

Embora os vírus de maior importância já tenham sido constatados, existem outros, ainda não assinalados no Brasil, os quais causam prejuízos nos locais onde foram identificados. Alguns vírus, como: *Strawberry latent ringspot virus* (SLRV), *Grapevine Akinashika virus* (GAjV) e *Alfafa mosaic virus* (AMV) foram relatados em outros países, embora com menor importância quando comparados com outros vírus que infectam videira.

O SLRSV já foi relatado na Alemanha, Itália, Turquia e Portugal. O vírus, pertencente ao gênero *Sadwavirus* (Tabela 1), possui partículas isométricas, com 30 nm de diâmetro, genoma biparticulado, RNA fita simples e senso positivo. O vírus é transmitido por *X. diversicaudatum* e provoca sintomas similares aos causados pelo GFLV (FAUQUET et al., 2005).

O GAjV caracteriza-se por provocar grande redução no teor de açúcar das bagas. Relatado somente no Japão, o vírus apresenta partículas

isométricas com 25 nm de diâmetro. Limitado ao floema, não é transmitido mecanicamente, sendo restrito a *V. vinifera* cv. Koshu (TERAI, 1990).

O AMV é a espécie-tipo do gênero *Alfamovirus* e caracteriza-se por causar descoloração amarela nas folhas. O vírus é transmitido mecanicamente para hospedeiras herbáceas e por afídeos de forma não persistente (MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006).

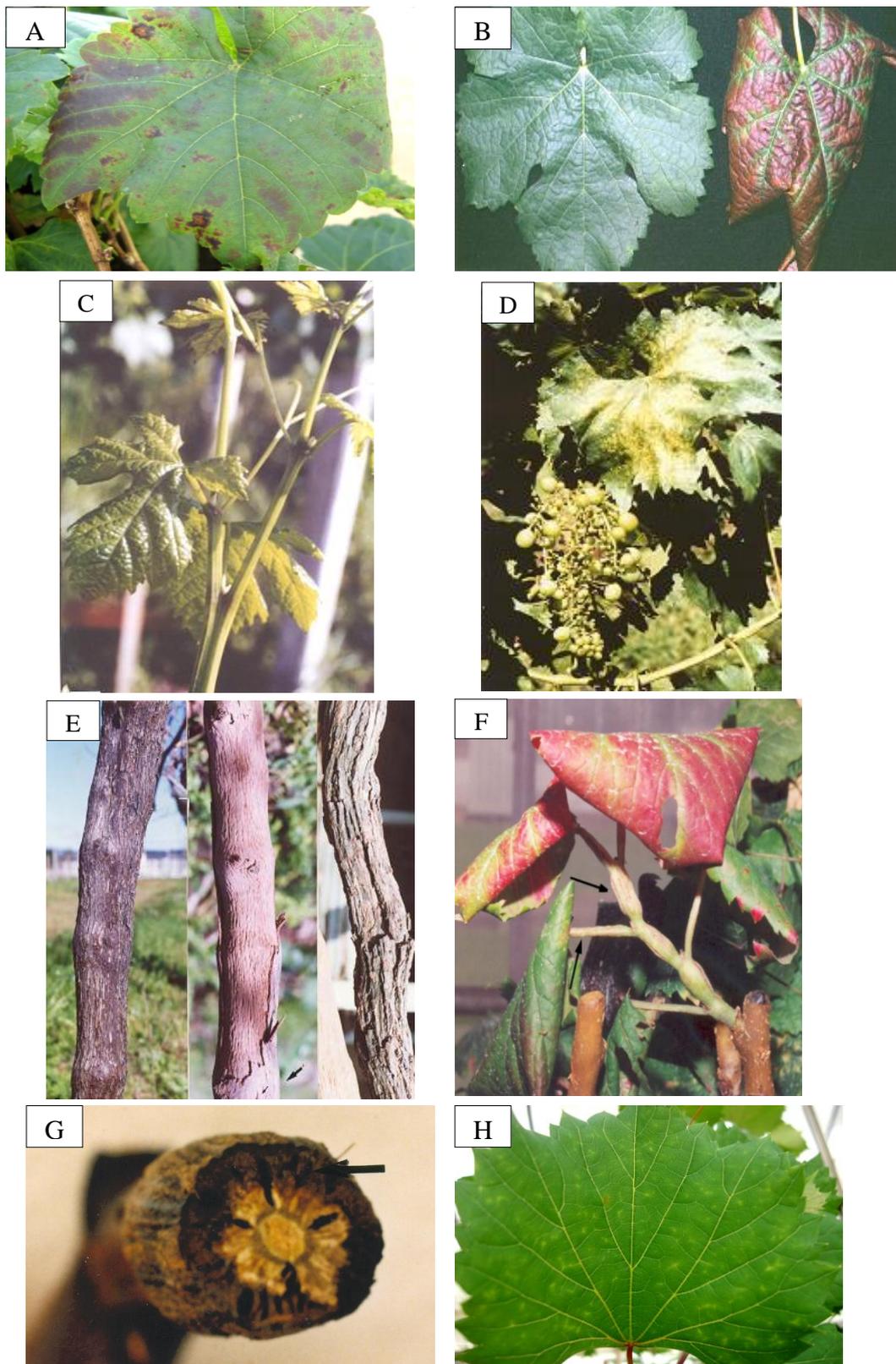


Figura 1. **A)** Enrolamento da folha da videira na cv. Cabernet Franc. **B)** Enrolamento da folha em vinífera branca; folha sadia (esquerda) e infectada (direita). **C)** Degenescência da videira exibindo bifurcação, achatamento e entre-nós curtos. **D)** Má formação de cachos em virtude de infecção pela Degenescência-da-videira. **E)** Videiras com caneluras-do-tronco/acanaladuras do lenho com diferentes severidades. **F)** Intumescimento-dos-ramos em LN33. **G)** Corte transversal do tronco exibindo intumescimento. **H)** Manchas cloróticas em Rupestris du Lot. (Fotos: Gilmar Kuhn).

3. Métodos de diagnóstico de viroses de videira empregados na caracterização dos vírus

Em videiras, infecções múltiplas envolvendo diversos vírus são comuns, o que torna o diagnóstico baseado em sintomas de campo praticamente impossível. Muitas cultivares não apresentam sintomas evidentes, seja porque a infecção é latente ou pela influência de fatores como a reação varietal e a idade da planta. Outros fatores podem induzir sintomas semelhantes aos causados por vírus, como carência ou excesso de nutrientes e ataque de outros patógenos ou pragas. Deste modo, as técnicas de diagnóstico são ferramentas valiosas para a identificação de infecções virais (KUHN; FAJARDO, 2004).

Dentre as técnicas de diagnose incluem-se os testes biológicos, sorológico e mais recentemente desenvolveram-se os métodos de diagnóstico molecular.

A sorologia é um importante complemento do método biológico e em muitas situações representa ótima alternativa. O teste imunoenzimático "ELISA", especialmente o tipo direto de duplo sanduíche é um dos mais difundidos para o diagnóstico de vírus de plantas. Outros tipos de testes de ELISA e variantes indiretos, que trabalham com anticorpos produzidos em espécies diferentes de animais ("anti-anticorpo"), podem aumentar a sensibilidade da detecção de estirpes de um mesmo vírus distantemente relacionadas, ou incrementar a capacidade de diferenciação de estirpes próximas de um mesmo vírus. "Dot-ELISA" assemelha-se a ELISA indireta diferindo somente pela ligação do antígeno a uma membrana de nitrocelulose e

a visualização da reação é feita pelo produto, insolúvel e de cor púrpura, da reação enzimática (ALMEIDA; LIMA, 2001).

Os métodos biológicos e imunoenzimáticos têm importância fundamental em programas para produzir, manter e propagar material básico livre de vírus. Entretanto, na indexação biológica e nos testes de "ELISA" ocorrem algumas limitações. A amostra deve ser escolhida e coletada adequadamente, considerando-se o estágio de desenvolvimento da planta e os tecidos em que o vírus ocorre com maior concentração. Muitos vírus ocorrem em concentrações baixas, às vezes abaixo do limite de detecção. Há relatos de variação na reação de plantas indicadoras, segundo as condições ambientais. Finalmente o tempo necessário à expressão de sintomas em indicadoras pode chegar a mais de dois anos o que torna o teste oneroso (KUHN; FAJARDO, 2004).

Na hibridação molecular são utilizadas membranas e sondas com seqüência de nucleotídeos complementares aos agentes procurados, para detecção de DNA (Southern blot) e RNA (Northern blot). Essas sondas podem ser comerciais, obtidas via síntese de cDNA (DNA complementar) ou, ainda, pela marcação de DNA viral obtido pela reação de PCR. Ultimamente aumenta, em face do grande aumento da sensibilidade dos marcadores não-radioativos, a preferência da marcação de sondas com "etiquetas frias", como a marcação com digoxigenina, sensível e que apresenta crescente popularidade (FAJARDO et al., 2003a).

Conhecendo-se pelo menos parte da seqüência do agente viral de interesse é possível o diagnóstico via PCR do agente de interesse e, visualização do DNA amplificado através de eletroforese. A IC-PCR (PCR com

imunocaptura) se utiliza à captura de antígenos existentes na amostra, com anticorpos específicos, previamente a PCR (ALMEIDA; LIMA, 2001).

Diversas técnicas têm sido implementadas para a detecção e a diferenciação de isolados virais. Embora estas técnicas possam detectar baixo título viral, elas não são quantitativas. Ultimamente, uma inovação tecnológica resultante da PCR, denominada de PCR em tempo real, vem ganhando espaço como técnica empregada para diagnóstico, por apresentar capacidade de gerar resultados quantitativos. Essa técnica permite o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida, em relação a PCR (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Além disso, na PCR em tempo real não se requer o uso de gel de agarose (onde a discriminação é baseada apenas no tamanho do fragmento de DNA amplificado), na PCR “clássica” os resultados não são quantificados (expressos em números) e a visualização é feita através do tingimento do DNA com brometo de etídeo, podendo ocorrer contaminações. Na PCR em tempo real as amplificações podem ser monitoradas em tempo real, os ciclos são mais rápidos, não é influenciada por amplificação não-específica (em decorrência da sonda empregada) e pode requerer até 1000x menos DNA que a PCR “clássica” na amplificação (3 picogramas = 1 genoma) (HOLLAND et al., 1991; HEID et al, 1996; NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

4. Referências Bibliográficas

ABOU-GHANEM, N., SALDARELLI, P., MINAFRA, A., BUZKAN, N., CASTELLANO, M.A., MARTELLI, G.P. Properties of grapevine virus D, a novel putative *Trichovirus*. **Journal of Plant Pathology**, v.78, p.15-25, 1997.

ABOU-GHANEM, N.; SABANADZOVIC, S.; MINAFRA, A.; SALDARELLI, P.; MARTELLI, G.P. Some properties of *Grapevine leafroll-associated virus 2* and molecular organization of the 3' region of the viral genome. **Journal of Plant Pathology**, v.80, p.37-46, 1998.

ADAMS, M.J.; ANTONIW, J.F.; BAR-JOSEPH, M.; BRUNT, A.A.; CANDRESSE, T.; FOSTER, G.D.; MARTELLI, G.P.; MILNE, R.G.; FAUQUET, C.M. The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. **Archives of Virology**, v.149, p.1045–1060, 2004.

AKBAŞ, B.; KUNTER, B.; ILHAN, D. Occurrence and Distribution of *Grapevine Leafroll associated Viruses 1, 2, 3 and 7* in Turkey. **Journal of Phytopathology**, v.155, p.122-124, 2007.

ALKOWNI, R.; CASTELLANO, M.A.; DIGIARO, M.; BOTTALICO, G.; MARTELLI, G.P. A survey of grapevine virus diseases in Palestine. In: **Extended Abstracts 12th Meeting ICVG**, Lisbon, Portugal, p.111–112. 1997.

ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A.A. Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 186p.

ALRWAHNIH, M.; OSMAN, F.; ROWHANI, A. Molecular Characterization of Californian Isolates of Grapevine Leafroll-Associated Viruses 7 (GLRaV-7) and Development of Detection Methods. **Proceedings of the 2nd Annual National Viticulture Research Conference**, University of California, Davis. p.1-2, 2008.

ANDRET-LINK, P.; LAPORTE, C.; VALAT, L.; RITZENTHALER, C.; DEMANGEAT, G.; VIGNE, E.; LAVAL, V.; PFEIFFER, P.; STUSSI-GARAUD, C.; FUCHS, M. *Grapevine fanleaf virus*: still a major threat to the grapevine industry. **Journal of Plant Pathology**, v.86, p.183-1952, 2004.

AVGELIS, A.; BOSCIA D. Grapevine leafroll associated closterovirus 7 in Greece. **Phytopathology Mediterranean**, v.40, p.289-292, 2001.

BERTAZZON, N.; ANGELINI, E. Advances in the detection of *Grapevine leafroll-associated virus 2* variants. **Journal of Plant Pathology**, v.86, p.283-290, 2004.

BEUVE, M.; SEMPÉ, L.; LEMAIRE, O. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detecting *Grapevine leafroll-associated virus 2* variants in grapevine. **Journal of Virological Methods**, v.141, p.117-124, 2007.

BOSCIA, D.; SAVINO, V.; MINAFRA, A.; NAMBA. S.; ELICIO, V.; CASTELLANO, M.A.; GONSALVES, D.; MARTELLI, G.P. Properties of a filamentous virus isolated from grapevines affected by corky bark. **Archives of Virology**, v.130, p.109-120, 1993.

CHARLES, J.G.; COHEN, D.; WALKER, J.T.S.; FORGIE, S.A.; BELL, V.A.; BREEN, K. C. A Review of Grapevine Leafroll associated Virus type 3 (GLRaV-3) for the New Zealand wine industry. **HortResearch Client Report**, Havelock North, n.18447, 2006. 83p.

CORREIA, M.P. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Ministério da Agricultura, Brasília, 1984. 4324p.

CREDI, R. Characterization of grapevine rugose wood disease sources from Italy. **Plant Disease**, v. 82, p. 1288-1292, 1997.

EIRAS, M., TARGON, M.L.P.N., FAJARDO, T.V.M., FLORES, R.; KITAJIMA, E.W. *Citrus exocortis viroid* and *Hop stunt viroid* doubly infecting grapevines in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.440-446, 2006.

FAJARDO, T.V.M.; KUHN, G.B.; EIRAS, M.; NICKEL, O. Caracterização parcial de um isolado do "*Grapevine fanleaf virus*". **Fitopatologia Brasileira**, **Fitopatologia Brasileira**, v.25, n.3, p.505-511, 2000.

FAJARDO, T.V.M.; KUHN, G.B.; NICKEL, O. Doenças virais. In: FAJARDO, T.V.M. (Ed.). **Uva para processamento - Fitossanidade**. Série Frutas do Brasil 35. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p.45-62, 2003a.

FAJARDO, T.V.M.; NICKEL, O.; EIRAS, M.; KUHN, G.B. Detecção e caracterização do gene da proteína capsidial de um isolado de *Grapevine virus A*. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.521-527, 2003b.

FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERGER U., BALL, A.L. (Eds.) **Virus Taxonomy**, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic Press, London. 2005.1269 pp.

FAZELI, F.C., REZAIAN, M.A. Nucleotide sequence and organization of ten open reading frames of the grapevine leafroll-associated virus 1 genome and identification of three subgenomic RNAs. **Journal of General Virology**, v.81, p.605–615, 2000.

FOLDI, I.; SORIA, S.J. Les cochonilles nuisibles a la vigne em Amérique du Sud (Homoptera: Coccoidea). **Annales de la Societè Entomologique de France**, Paris, v.24, n.25, p.411-430, 1989.

IPACH, U.; KLING, L.; LESEMANN, D. First record of cherry leaf roll virus on grapevine in Germany, **Proceedings of the Extended Abstracts 14th Meeting of ICVG**, Locorotondo, Italy, p.17–18, 2003.

KARASEV, A.V. Genetic diversity and evolution of closteroviruses. **Annual Review Phytopathology**, v.38, p.293–324, 2000.

KUHN, G.B. Identificação, incidência e controle do vírus do enrolamento da folha da videira no Estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v.14, n.3/4, p.220-226, 1989.

KUHN, G.B. Principais vírus e doenças consideradas de origem viral que ocorrem nos vinhedos do Rio Grande do Sul. **Circular Técnica**, v. 16. Bento Gonçalves. CNPUV. 1992. 27p.

KUHN, G.B.; FAJARDO, T.V.M. Doenças causadas por vírus. In: NACHTIGAL, J.C.; CAMARGO, U.A.; CONCEIÇÃO, M.A.F. (Eds.) Uvas sem sementes - cultivares BRS Morena, BRS Clara e BRS Linda. Sistemas de produção 01. pp. 67-76. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004 (Sistemas de Produção).

KUHN, G.B.; NICKEL, O. Viroses e sua importância na viticultura brasileira. **Informe Agropecuário**, v.19, p.85-91, 1998.

KUNIYUKI, H. *Vitivirus* - Biological aspects. **Virus Reviews & Research**, v.33, 2001 (Abstract).

KUNIYUKI, H.; COSTA, A.S. Incidência de vírus da videira em São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, p.240-245, 1987.

KUNIYUKI, H.; GASPAR, J.O.; REZENDE, J.A.M. Ocorrência do *Grapevine leafroll-associated virus 6* em vinhedos do Brasil. **Summa Phytopathologica**, v.29, p.288-289, 2003.

KUNIYUKI, H.; GIORIA, R.; REZENDE, J.A.M.; WILLINK, M.C.G.; NOVO, J.P.S.; YUKI, V.A. Transmissão experimental do *Grapevine virus B* pela cochonilha *Pseudococcus longispinus* Targioni-Tozzetti (Hemiptera: Pseudococcidae). **Summa Phytopathologica**, v.32, n.2, p.151-155, 2006a.

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

KUNIYUKI, H.; REZENDE, J.A.M.; WILLINK, M.C.G.; NOVO, J.P.S.; YUKI, V.A. Transmissão do “*Grapevine leafroll-associated*” vírus 3 pela cochonilha *Pseudococcus longispinus* Targioni-Tozetti (Hemiptera: Pseudococcidae). **Summa Phytopathologica**, v.31, p.65-68, 2005.

KUNIYUKI, H.; REZENDE, J.A.M.; GASPAR, J.O.; YUKI, V.A. Detecção do *Grapevine leafroll-associated virus 5* por ELISA no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v.32, supl., p.9-98, 2006b.

KUNIYUKI, H.; VEGA, J.; MARTINS, F.P.; COSTA, A.S. Mosaico da videira Traviú, uma doença causada pelo vírus da folha em leque em São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p.224-230, 1994.

LA NOTTE, P.; BUZKAN, N.; CHOUEIRI, E.; MINAFRA, A.; MARTELLI, G.P. Acquisition and transmission of *Grapevine virus A* by the mealybug *Pseudococcus longispinus*. **Journal of Plant Pathology**, v.79, p.79-85, 1997.

LING, K.S.; ZHU, H.Y.; ALVIZO, H.; HU, J.S.; DRONG, R.F.; SLIGHTOM, J.L.; GONSALVES, D. The coat protein gene of grapevine leafroll associated closterovirus-3: cloning, nucleotide sequencing and expression in transgenic plants. **Archives of Virology**, v.142, p.1101-1116, 1997.

MARTELLI, G.P.; ADAMS, M.J.; KREUZE, J.F.; DOLJA, V.V. Family Flexiviridae: a case study in virion and genome plasticity. **Annual Review Phytopathology**, v.45, p.73–100, 2007.

MARTELLI, G.P.; AGRANOVSKY, A.A.; BAR-JOSEPH, M.; BOSCIA, D.; CANDRESSE, T.; COUTTS, R.H.A.; DOLJA, V.V.; FALK, B.W.; GONSALVES, D.; JELKMANN, W.; KARASEV, A.V.; MINAFRA, A.; NAMBA, S.; VETTEN,

H.J.; WISLER, G.C.; YOSHIKAWA, N. The family *Closteroviridae* revised. **Archives of Virology**, v.147, p.2039-2044, 2002a.

MARTELLI, G.P.; BOUDON-PADIEU, E. (Eds.) Directory of infectious diseases of grapevines and viruses and virus-like diseases of the grapevine: bibliographic report 1998-2004. CIHEAM-IAMB. **Options Méditerranéennes**, Série B, n.55. 2006. 194p.

MARTELLI, G.P.; JELKMANN, W. *Foveavirus*, a new plant virus genus. **Archives of Virology**, v.143, p.1245–1249, 1998.

MARTELLI, G.P.; JELKMANN, W. Genus *Foveavirus*. In: Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M. Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R.; Wickner, R.B. (Eds.). **Virus Taxonomy - Classification and Nomenclature of Viruses**. San Diego. Academic Press. 2000. pp. 985-989.

MARTELLI, G.P.; MINAFRA, A.; SALDARELLI, P. *Vitivirus*, a new genus of plant viruses. **Archives of Virology**, v.142, p.1929-1932, 1997.

MARTELLI, G.P.; SABANADZOVIC, S.; GHANEM-SABANADZOVIC, N.A.; EDWARDS, M.C.; DREHER, T. The family *Tymoviridae*. **Archives of Virology**, v.147, p.1837-1846. 2002b.

MARTELLI, G.P.; SABANADZOVIC, S.; GHANEM-SABANADZOVIC, N.A.; SALDARELLI, P. *Maculavirus*, a new genus of plant virus. **Archives of Virology**, v.147, p.1847-1853, 2002c.

MARTELLI, G.P.; SAVINO, V. Fanleaf degeneration. In: Pearson, R.C.; Goheen, A.C. (Eds). **Compendium of grape diseases**. St. Paul. APS Press. 4th ed. 1998. pp. 48-49.

MASRI, S.; RAST, H.; JOHNSON, R.; MONETTE P. GVC and GLRaV-2 are serologically related and appear to be the same virus, **Vitis**, v.45, p.93-96, 2006.

MELLO, L.M.R. de. Vitivinicultura brasileira: Panorama 2007. EMBRAPA Uva Vinho: Artigos Técnicos. 2008.

MENG, B.; PANG, S.Z.; FORSLINE, P.L.; McFERSON, J.R.; GONSALVES, D. Nucleotide sequence and genome structure of *Grapevine rupestris stem pitting associated virus-1* reveal similarities to *Apple stem pitting virus*. **Journal of General Virology**, v.79, p. 2059-2069, 1998.

MENG, B.; JOHNSON, R.; PERESSINI, S.; FORSLINE, P.L.; GONSALVES, D. *Rupestris stem pitting associated virus-1* is consistently detected in grapevines that are infected with rupestris stem pitting. **European Journal of Plant Pathology**, v.105, p.191-199, 1999.

MENG, B.; LIN, C.; GOSZCZYNSKI, D.E.; GONSALVES, D. Genome sequences and structures of two biologically distinct strains of *Grapevine leafroll-associated virus 2* and sequence analysis. **Virus Genes**, v.31, p.31-41, 2005.

MINAFRA, A.; HADIDI, A. Sensitive detection of *Grapevine virus A, B*, or leafroll-associated III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification. **Journal of Virological Methods**, v.47, p.175-188, 1994.

MINAFRA, A.; SALDARELLI, P.; GRIECO, F.; MARTELLI, G.P. Nucleotide sequence of the 3' terminal region of the RNA of two filamentous grapevine viruses. **Archives of Virology**, v.137, p.249-261, 1994.

MINAFRA, A.; CASATI, P.; ELICIO, V.; ROWHANI, A.; SALDARELLI, P.; SAVINO, V.; MARTELLI, G.P. Serological detection of *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) by a polyclonal antiserum to recombinant virus coat protein. **Vitis**, v.39, p.115-118, 2000.

MORALES, R.Z.; MONIS, J. First Detection of *Grapevine leafroll associated virus-7* in California Vineyards. **Plant Disease**, v.91, p.465, 2007.

MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A.; SUMMERS, M.D. (Eds.). Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixty Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**. Springer-Verlag/Wien. 1995. 586p.

NAKAUNE, R., INOUE, K., NASU, H., KAKOGAWA, K., NITTA, H., IMADA, J., NAKANO, M. Detection of viruses associated with rugose wood in Japanese grapevines and analysis of genomic variability of *Rupestris stem pitting-associated virus*. **Journal of General Plant Pathology**, v.74, p.156–163, 2008.

NICKEL, O.; FAJARDO, T.V.M.; ARAGÃO, F.J.L.; CHAGAS, C.M.; KUHN G.B. Detection and coat protein gene characterization of an isolate of *Grapevine virus B* from corky bark-affected grapevines in Southern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.279-284, 2002.

PEARSON, R.C.; GOHEEN, A.C. (Eds.). **Compendium of grape diseases**. St. Paul. APS Press. 4th ed. 1998. 93p.

PROSSER, S.W.; GOSZCZYNSKI, D.E.; MENG, B. Molecular analysis of double-stranded RNAs reveals complex infection of grapevines with multiple viruses. **Virus Research**, v.124, p.151–159, 2007.

RADAELLI, P.; NICKEL, O.; SCHONS, J.; ARAGÃO, F.J.L.; FAJARDO, T.V.M. Diagnóstico biológico e molecular e análise da seqüência de nucleotídeos do gene da proteína capsial de um isolado do *Apple stem pitting virus*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.51-56, 2006.

REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; McGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. (Eds.). Genus *Vitivirus*. **Virus**

Taxonomy - Classification and Nomenclature of Viruses. San Diego. Academic Press. 2000. pp. 960-964.

ROSCIGLIONE, B.; CASTELLANO, M.A.; MARTELLI, G.P.; SAVINO, V.; CANNIZZARO, G. Mealybug transmission of *Grapevine virus A*. **Vitis**, v.22, p.331-347, 1983.

ROWANI, A.; ZHANG, Y.P.; CHIN, J.; MINAFRA, A.; GOLINO, D.A.; UYEMOTO, J.K. *Grapevine rupestris stem pitting associated virus*: population diversity, titer in the host and possible transmission vector. In: **Proceedings of the Extended Abstracts 13th ICVG**, Adelaide, Australia. p. 37. 2002.

SABANADZOVIC, S.; SALDARELLI, P.; SAVINO, V. Molecular diagnosis of *Grapevine fleck virus*. **Vitis**, v.35, p.137-140, 1996.

SALDARELLI, P.; MINAFRA, A.; MARTELLI, G.P. The nucleotide sequence and genomic organization of grapevine virus B. **Journal of General Virology**, v.77, p.2645-2652, 1996.

SILVA, A.G.A.; GONÇALVES, C.R.; GALVÃO, D.M.; GONÇALVES, A.J.L.; GOMES, J.; SILVA, M. do N.; SIMONI, L. de. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil: seus parasitas e predadores**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1968. 622p.

SOUSA, J.S.I. Uvas para o Brasil. Piracicaba: FEALQ. 368p. 1996.

SUTIC, D.D.; FORD, R.E.; TOSIC, M.T. **Handbook of Plant Virus Diseases**, 1999, 584p.

TERAI, Y. Ajinashika disease: A combined effect of grapevine leafroll and grapevine fleck viruses on sugar content in the Japanese grape cultivar Koshu. **Proceedings of the Extended Abstracts 10th ICVG**, Volos, Greece, p.67-70. 1990.

TENENTE, R. C. V.; ABRANTES, I. M. O.; TENENTE, G. C. M. V. Nematóide – O Gênero *Xiphinema*. In: LUZ, W.C. (ed).; FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M.; PICININI (ed. ass.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Rio Grande do Sul, Brasil, v.10, p.111-153, 2002.

TURTURO, C.; ROTT, M.E.; MINAFRA, A.; SALDARELLI, P.; JELKMANN, W.; MARTELLI, G.P. Partial molecular characterization and RT-PCR detection of grapevine leafroll associated virus 7. **Extended Abstracts 13th Meeting ICVG**, Adelaide, Australia, p.17-18. 2000.

WELDEKIDAN, T.; EVANS, T.A.; CARROLL, R.B.; MULROONEY, R.P. Etiology of soybean severe stunt and some properties of the causal virus. **Plant Disease**. v.76, n.7, p.747-750, 1992.

WETZEL, T.; MEUNIER, L.; JAEGER, U.; REUSTLE, G.M.; KRCZAL, G. Complete nucleotide sequences of the RNAS 2 of German isolates of Grapevine fanleaf and Arabis mosaic nepoviruses. **Virus Research**, v.75, p.139-145, 2001.

WOERNER, R.P. **Estudo sistematico dos Pseudococcideos (Hom., Pseudococcidae) no Rio Grande do Sul, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Biociências - Zoologia) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 1983.

ZHANG, Y.P.; UYEMOTO, J.K.; GOLINO, D.A.; ROWHANI, A. Nucleotide sequence and RT-PCR detection of a virus associated with Grapevine rupestris stem-pitting disease. **Phytopathology**, v.88, p.1231-1237, 1998.

CAPÍTULO II

Variabilidade do gene da proteína capsidial de três importantes
espécies virais que infectam videiras no Brasil

1 **Variabilidade do gene da proteína capsidial de três importantes espécies**
2 **virais que infectam videiras no Brasil**

3 Paula Radaelli⁽¹⁾, Thor Vinícius Martins Fajardo⁽²⁾, Osmar Nickel⁽²⁾, Marcelo
4 Eiras⁽³⁾ e Gilvan Pio-Ribeiro⁽¹⁾

5 ⁽¹⁾Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia,
6 Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900 Recife, PE,
7 Brasil. E-mail: paularadaelli@hotmail.com, gilvan@depa.ufrpe.br ⁽²⁾Embrapa
8 Uva e Vinho, Caixa Postal 130, CEP 95700-000 Bento Gonçalves, RS, Brasil.
9 E-mail: thor@cnpuv.embrapa.br, nickel@cnpuv.embrapa.br ⁽³⁾Instituto
10 Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, Av.
11 Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002 São Paulo, SP, Brasil. E-mail:
12 eiras@biologico.sp.gov.br.

13
14 **Resumo** - O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade de três
15 importantes vírus (*Rupestris stem pitting-associated virus* - RSPaV, *Grapevine*
16 *leafroll-associated virus 2* - GLRaV-2 e *Grapevine fanleaf virus* - GFLV) que
17 infectam videiras no Brasil, através da caracterização molecular do gene da
18 proteína capsidial (CP). Foram amplificados fragmentos que compreendem os
19 genes completos da CP de nove isolados de RSPaV (780 pb), seis isolados de
20 GLRaV-2 (597 pb) e três isolados de GFLV (1515 pb) por RT-PCR, utilizando-
21 se oligonucleotídeos específicos para cada espécie viral. Os DNAs
22 amplificados foram clonados e seqüenciados. Os isolados de RSPaV foram
23 reunidos em quatro grupos por análise filogenética das seqüências obtidas com
24 valores de identidade de nucleotídeos (nt) que variaram de 81 a 99%. Para
25 GLRaV-2, dois grupos foram definidos a partir das seqüências de nt, com

1 valores de identidade que variaram de 88 a 99% e, para GFLV, foram definidos
2 dois grupos, com valores de identidade de nt que variaram de 89 a 98%. Os
3 diferentes isolados das três espécies virais estudadas também foram
4 detectados utilizando-se hibridização com sondas não radioativas, marcadas
5 com digoxigenina, possibilitando identificar de forma inequívoca as amostras
6 infectadas, independentemente dos isolados virais empregados para síntese
7 das sondas.

8 Termos para indexação: RSPaV, GLRaV-2, GFLV, RT-PCR, Vitis, hibridização.

9

10 **Coat protein gene variability of three important viral species infecting** 11 **grapevines in Brazil**

12 **Abstract** - The purpose of this study was to evaluate the variability of three
13 important viruses (*Rupestris stem pitting-associated virus* - RSPaV, *Grapevine*
14 *leafroll-associated virus 2* - GLRaV-2 and *Grapevine fanleaf virus* - GFLV) that
15 infect grapevines in Brazil, using molecular characterization of the coat protein
16 (CP) gene. DNA fragments were amplified comprising the complete CP genes
17 of nine isolates of RSPaV (780 bp), six isolates of GLRaV-2 (597 bp) and three
18 isolates of GFLV (1515 bp) by RT-PCR, using specific primers for each viral
19 species. The amplified DNAs were cloned and sequenced. RSPaV isolates
20 were clustered into four groups by phylogenetic analysis of the nucleotide (nt)
21 sequences of the CP gene, showing identity values ranging from 81 to 99%. For
22 GLRaV-2, two groups were defined from the nt sequences, with identity values
23 ranging from 88 to 99% and for GFLV, two groups were defined with identity
24 values ranging from 89 to 98%. The isolates of each viral species studied here
25 were additionally detected by non-radioactive probes with digoxigenin, allowing

1 unambiguous identification of infected samples, independently of the isolate
2 used as template for probe synthesis.

3 Index terms: RSPaV, GLRaV-2, GFLV, RT-PCR, *Vitis*, hybridization.

4

5 **Introdução**

6 Dentre as doenças virais da videira (*Vitis* spp.) que ocorrem no Brasil, as
7 caneluras do tronco, o enrolamento da folha e a degenerescência apresentam-
8 se como as de maior relevância, devido a expressiva incidência e aos danos
9 que causam (Fajardo et al., 2003).

10 "Rupestris stem pitting - RSP", conhecida por "caneluras do tronco de
11 Rupestris" no Rio Grande do Sul, faz parte do complexo viral do "lenho rugoso
12 da videira" e caracteriza-se por induzir alterações no lenho das videiras, com
13 reflexos negativos na qualidade dos frutos e na produção (Martelli, 1993; Credi,
14 1997). O *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV), família *Flexiviridae*,
15 gênero *Foveavirus*, agente causal das caneluras do tronco de Rupestris, possui
16 partículas alongadas e flexuosas com cerca de 800 x 12 nm, CP de 28 kDa e
17 genoma de RNA de fita simples e senso positivo com 8.726 nucleotídeos,
18 organizado em cinco ORFs. A ORF5 (nucleotídeos 7.770 a 8.549) codifica o
19 gene da CP (Meng et al., 1998; Zhang et al., 1998; Fauquet et al., 2005).

20 Evidências sugerem que o RSPaV apresenta muitas seqüências
21 variáveis, sendo que infecções mistas com outros vírus são comumente
22 detectadas em videira, o que dificulta a definição das propriedades biológicas
23 das diferentes variantes deste vírus (Meng et al. 1999, Meng et al., 2005a).
24 Recentemente, Nakaune et al. (2008) enfatizaram a diversidade viral associada
25 ao lenho rugoso, destacando a importância de estudos de variabilidade

1 genética por meio de análises de seqüência de isolados de RSPaV.

2 O enrolamento da folha da videira (*Grapevine leafroll-associated virus*,
3 GLRaV) é mundialmente uma das mais importantes doenças virais da cultura,
4 causando, em *V. vinifera* L., declínio, enrolamento e alteração de cor das
5 folhas, com reduções da produção e da qualidade das bagas. Especificamente
6 o GLRaV-2 também está associado aos sintomas de incompatibilidade da
7 enxertia e de declínio em vinhedos jovens (Abou Ghanem-Sabanadzovic et al.,
8 2000; Martelli et al., 2002; Bertazzon & Angelini, 2004; Meng et al., 2005b). O
9 GLRaV-2, família *Closteroviridae*, gênero *Closteovirus*, possui partículas
10 alongadas e flexuosas, genoma de RNA de fita simples e senso positivo com
11 16.494 nucleotídeos e oito ORFs, sendo que a ORF6 codifica a CP (22 kDa)
12 (Abou-Ghanem et al., 1998; Meng et al., 2005b; Beuve et al., 2007).

13 Embora diversos isolados de GLRaV-2 tenham sido identificados, em
14 diferentes genótipos de videira e também muitas variantes biológicas deste
15 vírus, ainda há carência de trabalhos de caracterização molecular mais
16 abrangentes, o que limita a definição de oligonucleotídeos mais apropriados ao
17 diagnóstico (Beuve et al., 2007). Os dois primeiros isolados seqüenciados de
18 GLRaV-2, das cultivares Pinot Noir e Semillon, foram obtidos nos EUA (Abou-
19 Ghanem et al., 1998) e apresentaram grande variabilidade em relação a outros
20 isolados deste vírus.

21 A degenerescência da videira, causada pelo *Grapevine fanleaf virus*
22 (GFLV) ocorre em praticamente todos os países vitícolas causando danos
23 consideráveis (Pearson & Goheen, 1988), sendo que no Brasil a incidência
24 desta doença é restrita, se comparada às duas viroses anteriormente
25 mencionadas (Kuniyuki et al., 1994). O GFLV, família *Comoviridae*, gênero

1 *Nepovirus*, é biparticulado, com partículas isométricas de 30 nm de diâmetro,
2 genoma composto por dois RNAs, de fita simples e senso positivo, sendo a CP
3 de 54 kDa codificada pelo RNA 2 (Pearson & Goheen, 1988). A transmissão
4 das três espécies virais estudadas ocorre através da enxertia utilizando-se
5 gemas infectadas, enquanto a dispersão das viroses se dá por meio de
6 material propagativo infectado, sendo que apenas o GFLV apresenta
7 transmissão por vetores (nematóides) (Pearson & Goheen, 1988).

8 Normalmente, a alta variabilidade genética de espécies virais tem
9 conduzido a dificuldades para gerar ferramentas moleculares universais de
10 detecção e identificação. Já se demonstrou que a indexação por RT-PCR de
11 videiras infectadas, com determinado isolado viral, utilizando-se
12 oligonucleotídeos específicos para outro isolado, pode resultar em falso-
13 negativo (Bertazzon & Angelini, 2004). Tais resultados servem para ressaltar a
14 importância do estudo da variabilidade viral, visando-se à implementação de
15 técnicas mais sensíveis e precisas para a detecção, a exemplo do uso da
16 hibridização molecular e da RT-PCR.

17 O objetivo deste trabalho foi estudar a variabilidade de três importantes
18 espécies virais (RSPaV, GLRaV-2 e GFLV) que ocorrem em videiras no Brasil,
19 por meio da caracterização molecular do gene da CP.

20

21

Material e Métodos

22 **Isolados virais.** Os nove isolados virais de RSPaV foram obtidos de
23 diferentes videiras mantidas em casa de vegetação na Embrapa Uva e Vinho,
24 Bento Gonçalves (RS), sendo que os isolados CF195 e CF195-2 são
25 provenientes da mesma planta. Os seis isolados de GLRaV-2 e dois de GFLV

1 (RUP e IAC) foram obtidos de plantas cedidas pelo Dr. Hugo Kuniyuki (IAC-
2 Campinas, SP), sendo o terceiro isolado de GFLV (RS) obtido de material
3 mantido na Embrapa Uva e Vinho. A relação completa de todos os isolados
4 utilizados neste trabalho encontra-se na Tabela 1, sendo possível que as
5 plantas-fonte dos isolados estudados estivessem infectadas com outras
6 espécies virais que infectam a videira, porém isto não foi considerado neste
7 trabalho.

8 **Extração de RNA total.** A extração de RNA total, a partir de 100 mg de
9 fragmentos de lenho ou de nervuras e pecíolos de folhas maduras de videiras,
10 infectadas com RSPaV ou GLRaV-2 e folhas de brotações novas para GFLV,
11 foi realizada utilizando-se o kit "RNeasy Plant Mini" (Qiagen), triturando-se o
12 tecido vegetal em nitrogênio líquido, seguindo as instruções do fabricante, ou
13 pelo método de adsorção em sílica (Rott & Jelkmann, 2001).

14 **Síntese do cDNA e RT-PCR.** Procedeu-se à síntese do cDNA viral e às
15 reações de PCR conforme descrito por Fajardo et al. (2000). Os
16 oligonucleotídeos empregados na RT-PCR encontram-se descritos na Tabela
17 2. Para as amplificações do gene completo da CP do GFLV foram utilizados
18 dois pares de oligonucleotídeos com sobreposição parcial de seqüências de
19 nucleotídeos nos fragmentos amplificados (Tabela 2). As reações de PCR
20 foram submetidas a 35 ciclos de amplificação, compostos de desnaturação
21 (94°C/50 s), pareamento (50°C/50 s) e extensão (72°C/1 min). Os produtos das
22 amplificações foram analisados em géis de agarose 1,2%, preparado em
23 tampão TBE, pH 8,0. Os fragmentos de DNA de tamanho esperado foram
24 eluídos utilizando-se o kit "Perfectprep Gel Cleanup" (Eppendorf), de acordo
25 com as especificações do fabricante.

1 **Clonagem, seleção de clones recombinantes e análise das**
2 **seqüências.** Os fragmentos de DNA eluídos foram ligados aos vetores pGEM-
3 T Easy (Promega) para RSPaV e GFLV e pCR 2.1 (Invitrogen) para GLRaV-2,
4 de acordo com as instruções dos fabricantes. As reações de ligação foram
5 utilizadas na transformação, por choque térmico, de células competentes de
6 *Escherichia coli* DH5 α ou TOP10. O DNA plasmidial das colônias bacterianas
7 transformadas foi extraído utilizando-se o kit “Flexi Prep” (Amersham
8 Biosciences) e a confirmação da presença dos fragmentos correspondentes ao
9 gene da CP viral, nos plasmídeos recombinantes, foi realizada por digestão
10 com a enzima de restrição *EcoRI*. Procedeu-se ao seqüenciamento automático
11 de nucleotídeos a partir dos plasmídeos recombinantes, resultando na
12 obtenção das seqüências completas dos genes da CP dos isolados virais
13 estudados.

14 As seqüências obtidas de nucleotídeos (nt) e de aminoácidos deduzidos
15 (aa) foram comparadas entre si e também com as seqüências existentes no
16 banco de dados do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), utilizando-se o programa
17 BLAST do "National Center for Biotechnology Information - NCBI". Foram
18 elaborados dendrogramas, utilizando-se o software TreeView 1.6.6, obtido
19 através do alinhamento (Clustal X) das seqüências de nucleotídeos do gene da
20 CP dos isolados virais de RSPaV, GLRaV-2 e GFLV.

21 **Hibridização.** Na síntese da sonda utilizou-se o kit “DIG DNA Labeling”
22 (Roche), seguindo-se as recomendações do fabricante e, usando-se, como
23 molde para a marcação com digoxigenina, o gene da CP de cada vírus, obtido
24 pela digestão dos plasmídeos recombinantes com *EcoRI* ou pela amplificação
25 do gene da CP, presentes nestes plasmídeos. Para RSPaV foram produzidas

1 três sondas a partir da marcação do gene da CP dos isolados CF210, MG e
2 MH; para GLRaV-2 utilizaram-se duas sondas marcadas dos isolados M/C e
3 L/I; e para GLFV foi marcado o gene da CP do isolado RS. Como controle
4 positivo foi usado DNA correspondente ao gene da CP dos vírus detectados e,
5 como controle negativo, RNA total extraído de videiras comprovadamente
6 sadias.

7 Para a hibridização “dot-blot”, os RNAs totais (10 μ L para o controle
8 positivo e 40 μ L para os demais) foram aplicados em membrana de náilon
9 (Roche) com auxílio do aparelho “Bio-dot” (BioRad) e fixados à membrana
10 durante 2 h a 80°C. A pré-hibridização foi conduzida a 68 °C por 2 h em
11 solução-padrão contendo SDS 0,02%, reagente bloqueador 1% (Roche), SSC
12 5X (SSC 1X = citrato de sódio 0,03 M pH 7,0, NaCl 0,3 M) e N-lauroylsarcosina
13 0,1%. Em seguida, procedeu-se às hibridizações a 68 °C por 15 h com as
14 respectivas sondas para a detecção de cada vírus, previamente desnaturadas
15 (15 min a 95 °C) e diluídas em solução de pré-hibridização. Seguiram-se as
16 lavagens com SSC 2X contendo SDS 0,1% (2x por 5 min/temperatura
17 ambiente), SSC 0,1X com SDS 0,1% (2x por 15 min/68 °C) e com tampão
18 maléico (ácido maléico 0,1 M, NaCl 0,15M, pH 7,5) contendo Tween-20 a 0,3%
19 (1x por 10 min/temperatura ambiente).

20 As membranas foram bloqueadas por uma hora à temperatura ambiente
21 em tampão maléico com reagente bloqueador a 1% (Roche). À solução
22 bloqueadora, foi acrescido anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase
23 alcalina (Roche), incubando-se por 30 min à temperatura ambiente. Duas
24 lavagens foram realizadas com tampão maléico acrescido de Tween-20 a 0,3%
25 por 15 min e uma lavagem com tampão Tris-HCl 0,1M pH 9,5, NaCl 0,1M por 5

1 min. A revelação foi realizada com a adição de substrato quimioluminescente
2 CDP-Star, (Roche) sob a membrana e posterior exposição da mesma a um
3 filme de raio X por 20 min.

4

5

Resultados e Discussão

6 **RSPaV.** Nas reações de RT-PCR foram utilizados os oligonucleotídeos
7 RSPaV-V1/ RSPaV-C1, desenhados neste trabalho, com base no acesso
8 NC_001948 de RSPaV (GenBank), possibilitando a amplificação do gene
9 completo da CP do RSPaV, com 780 pb (nt 7.771 ao 8.550 do acesso
10 NC_001948) e 259 aminoácidos deduzidos a partir de todos os isolados
11 estudados de RSPaV, conforme listado na Tabela 1. Através da análise da
12 identidade de nucleotídeos dos nove isolados de RSPaV (Tabela 3), pôde-se
13 verificar a formação de quatro agrupamentos distintos, à semelhança de outros
14 trabalhos (Lima et al. 2006; Meng et al., 2006; Nolasco et al., 2006; Nakaune et
15 al. 2008). Os seis isolados CF208, CF210, MG, MH, 420A e CF195-2 do grupo
16 I (Figura 1A) apresentam identidade de nucleotídeos, entre si, de 97 a 99%
17 (Tabela 3). Os grupos II, III e IV contêm, respectivamente, os isolados CF207,
18 PN e CF195 (Figura 1A).

19 O grupo I apresentou identidade de nucleotídeos de cerca de 95-96%,
20 92-93% e 81%, respectivamente, com os grupos II, III e IV. Por sua vez, o
21 grupo II apresentou 92% de identidade com o grupo III e 84% com o grupo IV.
22 Por último, o grupo III apresentou, aproximadamente, 81% de identidade de
23 nucleotídeos com o grupo IV (Tabela 3).

24 Nolasco et al. (2006), em Portugal, agruparam os isolados de RSPaV
25 estudados em quatro grupos (1, 2a, 2b e 3), com base no gene da CP,

1 concluindo que os isolados apresentaram grande variabilidade, sendo a
2 identidade mínima de nucleotídeos encontrada de 81%. Meng et al. (2006), nos
3 Estados Unidos, através da análise de parte do gene da CP de 24 isolados de
4 RSPaV, dividiram tais isolados em quatro grupos (I, II, III e IV), relatando existir
5 variabilidade entre eles. A análise filogenética do gene da CP de 65 isolados
6 japoneses de RSPaV por Nakaune et al. (2008) separou os isolados em quatro
7 grupos (1, 2a, 2b e 3), demonstrando que este vírus apresenta expressiva
8 variabilidade. Os isolados pertencentes ao grupo 3 foram aqueles que
9 apresentaram maior divergência, com identidade de nucleotídeos de 87,4%
10 quando comparados com outros isolados, evidenciando assim, variabilidade
11 genética. Destaca-se que os agrupamentos definidos nestes trabalhos não são
12 baseados em critérios únicos e pré-definidos, como nomenclatura e
13 porcentagem de identidade. No presente trabalho verificou-se a existência de
14 variabilidade entre os isolados de RSPaV estudados (Tabela 3), confirmando
15 resultados semelhantes àqueles dos trabalhos anteriormente mencionados.

16 Em relação aos valores de identidade de aminoácidos deduzidos dos
17 isolados de RSPaV estudados, também foram definidos quatro agrupamentos,
18 formados pelos mesmos isolados da definição baseada na identidade de
19 nucleotídeos. O grupo I apresentou identidade de aminoácidos deduzidos,
20 entre seus membros de 94 a 99%, e de cerca de 95-98%, 92-94% e 89-91%,
21 respectivamente, com os grupos II, III e IV. Por sua vez, o grupo II apresentou
22 cerca de 93% de identidade com os grupos III e IV e, por último, o grupo III
23 apresentou 88% de identidade com o grupo IV (Tabela 3).

24 Observou-se elevada porcentagem de identidade de aminoácidos
25 deduzidos entre todos os isolados de RSPaV deste estudo e isolados de

1 RSPaV depositados em banco de dados (Tabela 4), inclusive em relação
2 àqueles mais divergentes (CF207 - grupo II, PN - grupo III e CF195 - grupo IV),
3 os quais constituíram agrupamentos de membros únicos. Todos os isolados do
4 grupo I apresentaram maior identidade de aminoácidos deduzidos com os
5 mesmos isolados estrangeiros, B10-3, E156 e outro não nomeado, proveniente
6 dos EUA (Tabela 4).

7 **GLRaV-2.** Amplificou-se, para todos os seis isolados, um fragmento de
8 DNA que compreende o gene completo da CP do GLRaV-2, com 597
9 nucleotídeos e 198 aminoácidos deduzidos, situados entre os nucleotídeos
10 14579 e 15175 do acesso NC_007448. Pelo estudo de comparação de
11 seqüências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos, pôde-se verificar a
12 formação de dois agrupamentos distintos. O grupo I compreende os isolados
13 L/I, SE e IT (Figura 1B) e apresenta identidade de nucleotídeos de,
14 aproximadamente, 98-99% entre seus membros (Tabela 3). O grupo II é
15 formado pelos isolados M/C, MH e RI (Figura 1B) e apresenta identidade de
16 nucleotídeos, entre seus membros, de 98%. A identidade de nucleotídeos entre
17 os isolados dos dois grupos é de 87-89% (Tabela 3).

18 Em relação aos aminoácidos deduzidos dos isolados de GLRaV-2
19 também foram definidos dois agrupamentos, formados pelos mesmos isolados
20 definidos pela identidade de nucleotídeos. Os grupos I e II apresentaram cerca
21 de 97-99% e 90-95% de identidade de aminoácidos deduzidos,
22 respectivamente, dentre e entre os membros do grupo (Tabela 3).

23 Observou-se elevada porcentagem de identidade de aminoácidos
24 deduzidos entre todos os isolados de GLRaV-2 estudados e isolados desta
25 mesma espécie viral depositados em banco de dados (Tabela 4). Os membros

1 do grupo II de GLRaV-2 apresentaram identidades de aminoácidos deduzidos
2 que variam de 94 a 96% com um mesmo isolado italiano (H4) (Tabela 4),
3 demonstrando não pertencer a outra espécie viral. Abou Ghanem-
4 Sabanadzovic et al. (2000) descreveram que o isolado H4 compreende uma
5 variante biológica do GLRaV-2, distinto de outros isolados mecanicamente
6 transmitidos do mesmo vírus, devido a diferenças nas reações da hospedeira
7 herbácea e pequenas diferenças na seqüência do gene da CP. Ao contrário de
8 outro isolado de GLRaV-2, Semillon (Sem), o isolado H4 induziu lesões locais
9 necróticas em *Nicotiana clevelandii*, além de infecção sistêmica e, em *N.*
10 *occidentalis*, induziu sintomas mais severos. O isolado H4 diferiu em,
11 aproximadamente, 12% na seqüência de nucleotídeos do gene da CP em
12 relação a dois isolados de GLRaV-2: Semillon e Pinot Noir (Abou Ghanem-
13 Sabanadzovic et al., 2000). Destaca-se que o isolado Pinot Noir (PN), dos
14 EUA, apresentou maior identidade de aminoácidos deduzidos com os isolados
15 de GLRaV-2 do grupo I (Tabela 4).

16 Meng et al. (2005b) mostraram que um isolado americano (“94/979”)
17 apresentou 99% de identidade de nucleotídeos com os isolados PN e Sem,
18 sugerindo que esses três isolados são idênticos e formariam um grupo. O
19 segundo isolado (“93/955”), caracterizado por estes autores, diferiu em 7,4% de
20 nucleotídeos quando comparado ao isolado “PN” e 11,1% com o isolado “H4”
21 e, formaria assim, outro grupo. Informações a respeito da variabilidade de
22 GLRaV-2, como as geradas neste trabalho e em outros (Abou Ghanem-
23 Sabanadzovic et al., 2000; Meng et al., 2005b) possibilitam um aprofundamento
24 no conhecimento desta espécie viral, o que pode resultar no desenvolvimento e
25 na implementação de técnicas diagnósticas mais sensíveis e específicas,

1 direcionadas a isolados específicos, grupos de isolados ou para toda espécie
2 viral.

3 **GFLV.** Foram amplificados dois fragmentos de DNA, para cada um dos
4 três isolados, com sobreposição entre eles de 20 nucleotídeos, resultando na
5 seqüência completa do gene da CP (1515 nucleotídeos e 504 aminoácidos
6 deduzidos). O gene da CP está situado na extremidade 3' do RNA 2, entre os
7 nucleotídeos 2.048 e 3.559 do acesso NC_003623. Na comparação das
8 seqüências obtidas, de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos, observou-se
9 a formação de dois agrupamentos distintos (Tabela 3, Figura 1C). O grupo I é
10 formado pelo isolado IAC e o grupo II pelos isolados RS e RUP, que
11 apresentam, entre si, cerca de 98 e 99% de identidade de nucleotídeos e
12 aminoácidos deduzidos, respectivamente (Tabela 3). A identidade de
13 nucleotídeos e aminoácidos deduzidos verificada entre os membros dos dois
14 grupos foi de 89-90% e de 94-95%, respectivamente (Tabela 3).

15 Observou-se alta porcentagem de identidade de aminoácidos deduzidos
16 entre todos os isolados de GFLV estudados e isolados da mesma espécie viral
17 depositados em banco de dados (Tabela 4). Destaca-se que os dois isolados
18 do grupo II (RUP e RS) apresentaram maior identidade com um mesmo isolado
19 italiano (SG1) (Tabela 4), demonstrando assim, pertencerem a espécie GFLV.

20 Pourrahim et al. (2007) conduziram estudo de variabilidade de cinco
21 isolados iranianos de GFLV, que apresentaram, entre si, 98,7 a 100% de
22 identidade de nucleotídeos. Entretanto, na comparação com outros isolados de
23 GFLV, a identidade variou de 83,7 a 87,5% (este último valor resultante da
24 comparação com o isolado italiano SG1. Estes autores agruparam os isolados
25 iranianos separadamente de isolados de outras origens geográficas.

1 Pompe-Novak et al. (2007) estudaram a diversidade genética presente no
2 RNA2 de nove isolados de GFLV da Eslovênia. As seqüências destes isolados
3 e outros sete (francês, alemão e cinco eslovenos), resultaram na definição de
4 três diferentes grupos, com valores de identidade de 87-91% de nucleotídeos e
5 93-96% de aminoácidos deduzidos. Um dos isolados estudados por estes
6 autores (Vo154) apresentou maior identidade com o isolado IAC (grupo I)
7 (Tabela 4).

8 **Hibridização.** Nos testes de hibridização “dot-blot” foram utilizadas
9 sondas com seqüências de nucleotídeos complementares, em reações
10 homólogas e heterólogas (entre isolados diferentes), visando-se à detecção
11 das três espécies virais estudadas. Foi possível detectar todos os isolados
12 virais caracterizados, com evidente contraste das reações entre amostras
13 infectadas e sadias (Figura 2). As três sondas para RSPaV, sintetizadas pela
14 marcação dos isolados CF210, MG e MH (todos do grupo I), resultaram na
15 hibridização de todos os nove isolados de RSPaV (Figura 2.I). Isto comprova a
16 eficiência da hibridização, conduzida em condição de baixa estringência,
17 permitindo a detecção, mesmo daqueles isolados de RSPaV, que
18 apresentaram baixa porcentagem de identidade (cerca de 81% de identidade
19 de nucleotídeos com os demais), a exemplo do isolado CF195 (Tabela 3,
20 Figura 2.I).

21 Para GLRaV-2 duas sondas foram marcadas a partir dos isolados L/I
22 (grupo I) e M/C (grupo II), o que resultou na detecção de todos os seis isolados
23 de GLRaV-2 caracterizados (Figura 2.II), independente dos valores de
24 identidade verificados entre os isolados ou do grupo no qual o isolado foi
25 enquadrado (Figura 1B). Por último, resultado semelhante foi verificado em

1 relação ao GFLV. A sonda foi obtida pela marcação do isolado RS (grupo II) e
2 permitiu a detecção dos três isolados caracterizados, incluindo o isolado IAC
3 (grupo I) (Figura 2.III).

4 Percebe-se pelos resultados obtidos que a hibridização com sonda não-
5 radioativa pode viabilizar a detecção de vírus em videira em um grande número
6 de amostras de modo eficiente e sensível, tanto em reações homólogas como
7 heterólogas. Essa versatilidade e sensibilidade das sondas não-radioativas
8 foram demonstradas também por Santana et al. (2007) para a detecção de
9 begomovírus em tomateiros e por Moreira et al. (2005), para a detecção do
10 *Grapevine virus A* (GVA) e do *Grapevine virus B* (GVB) em videiras.

11

12

Conclusões

13 1. A caracterização molecular baseada no gene da CP, revelou existir
14 variabilidade genética suficiente para distinguir isolados de RSPaV, GLRaV-2 e
15 GFLV, permitindo a definição de grupos distintos entre os isolados.

16 2. A definição da variabilidade existente entre isolados locais de três
17 espécies virais potencialmente permite a definição e posterior implementação
18 de métodos de diagnóstico mais precisos e sensíveis.

19 3. Em função das sondas geradas neste trabalho, é possível utilizá-las
20 como ferramentas a indexação de plantas em programas de limpeza clonal.

21

22

Agradecimentos

23 Ao Dr. Hugo Kuniyuki (IAC, Campinas) pelo envio das amostras
24 infectadas com GLRaV-2 e dos isolados de GFLV caracterizados e ao Marcos

1 Fernando Vanni (Embrapa Uva e Vinho) pelo apoio laboratorial. Ao CNPq pela
2 concessão da bolsa de estudos à primeira autora.

3

4

Referências

5 ABOU-GHANEM, N.; SABANADZOVIC, S.; MINAFRA, A.; SALDARELLI, P.;
6 MARTELLI, G.P. Some properties of *Grapevine leafroll-associated virus 2* and
7 molecular organization of the 3' region of the viral genome. **Journal of Plant**
8 **Pathology**, v.80, p.37-46, 1998.

9 ABOU GHANEM-SABANADZOVIC, N.; SABANADZOVIC, S.; CASTELLANO,
10 M.A.; BOSCIA, D.; MARTELLI, G.P. Properties of a new isolate of *Grapevine*
11 *leafroll-associated virus 2*. **Vitis**, v.39, p.119-121, 2000.

12 BERTAZZON, N.; ANGELINI, E. Advances in the detection of *Grapevine*
13 *leafroll-associated virus 2* variants. **Journal of Plant Pathology**, v.86, p.283-
14 290, 2004.

15 BEUVE, M.; SEMPÉ, L.; LEMAIRE, O. A sensitive one-step real-time RT-PCR
16 method for detecting *Grapevine leafroll-associated virus 2* variants in grapevine.
17 **Journal of Virological Methods**, v.141, p.117-124, 2007.

18 BRANDT, S.; IBL, M. HIMMLER, G. Coat protein gene sequence of an Austrian
19 isolate of *Grapevine fanleaf virus*. **Archives of Virology**, v.140, p.157-164,
20 1995.

21 CREDI, R. Characterization of grapevine rugose wood disease sources from
22 Italy. **Plant Disease**, v.82, p.1288-1292, 1997.

23 FAJARDO, T.V.M.; KUHN, G.B.; EIRAS, M.; NICKEL, O. Caracterização parcial
24 de um isolado do *Grapevine fanleaf virus*. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.505-

1 511, 2000.

2 FAJARDO, T.V.M.; KUHN, G.B.; NICKEL, O. Doenças virais. In: FAJARDO,
3 T.V.M. (Ed.). **Uva para processamento: fitossanidade**. Brasília: Embrapa
4 Informação Tecnológica, 2003. p.45-62. (Embrapa Informação Tecnológica.
5 Frutas do Brasil, 35).

6 FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER U.; BALL,
7 A.L. (Ed.). **Virus Taxonomy**, Eighth Report of the International Committee on
8 Taxonomy of Viruses. London: Elsevier/Academic Press, 2005.1162p.

9 KUNIYUKI, H.; VEGA, J.; MARTINS, F.P.; COSTA, A.S. Mosaico da videira
10 Traviú, uma doença causada pelo vírus da folha em leque em São Paulo.
11 **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p. 224-230, 1994.

12 LIMA, M.F.; ALKOWNI, R.; UYEMOTO, J.K.; GOLINO, D.; OSMAN, F.;
13 ROWHANI, A. Molecular analysis of a California strain of *Rupestris stem pitting-*
14 *associated virus* isolated from declining Syrah grapevines. **Archives of**
15 **Virology**, v.151, p.1889-1894, 2006.

16 MARTELLI, G.P. Rugose wood complex. In: MARTELLI, G.P. (Ed.). Graft-
17 transmissible disease of grapevines - Handbook for detection and diagnosis.
18 Rome: FAO, 1993. p.45-53.

19 MARTELLI, G.P.; AGRANOVSKY, A.A.; BAR-JOSEPH, M.; BOSCIA, D.;
20 CANDRESSE, T.; COUTTS, R.H.A.; DOLJA, V.V.; FALK, B.W.; GONSALVES,
21 D.; JELKMANN, W.; KARASEV, A.V.; MINAFRA, A.; NAMBA, S.; VETTEN,
22 H.J.; WISLER, G.C.; YOSHIKAWA, N. The family *Closteroviridae* revised.
23 **Archives of Virology**, v.147, p.2039-2044, 2002.

24 MENG, B.; PANG, S.Z.; FORSLINE, P.L.; McFERSON, J.R.; GONSALVES, D.

1 Nucleotide sequence and genome structure of *Grapevine rupestris stem pitting*
2 *associated virus-1* reveal similarities to *Apple stem pitting virus*. **Journal of**
3 **General Virology**, v.79, p.2059-2069, 1998.

4 MENG, B.; JOHNSON, R.; PERESSINI, S.; FORSLINE, P.L.; GONSALVES, D.
5 *Rupestris stem pitting associated virus-1* is consistently detected in grapevines
6 that are infected with rupestris stem pitting. **European Journal of Plant**
7 **Pathology**, v.105, p.191-199, 1999.

8 MENG, B.; LIN, C.; WANG, W.; GOSZCZYNSKI, D.; GONSALVES, D.
9 Complete genome sequences of two new variants of *Grapevine rupestris stem*
10 *pitting-associated virus* and comparative analyses. **Journal of General**
11 **Virology**, v.86, p.1555-1560, 2005a.

12 MENG, B.; LIN, C.; GOSZCZYNSKI, D.E.; GONSALVES, D. Genome
13 sequences and structures of two biologically distinct strains of *Grapevine*
14 *leafroll-associated virus 2* and sequence analysis. **Virus Genes**, v.31, p.31-41,
15 2005b.

16 MENG, B.; REBELO, A.R.; FISHER, H. Genetic diversity analyses of *Grapevine*
17 *rupestris stem pitting-associated virus* reveal distinct population structures in
18 scion versus rootstock varieties. **Journal of General Virology**, v.87, p.1725-
19 1733, 2006.

20 MOREIRA, A.E.; GASPAR, O.J.; KUNIYUKI, H. Detecção do *Grapevine virus A*
21 e *Grapevine virus B* por hibridização “dot-blot” com sondas moleculares não
22 radioativas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p.538-542, 2005.

23 NAKAUNE, R.; INOUE, K.; NASU, H.; KAKOGAWA, K.; NITTA, H.; IMADA, J.;
24 NAKANO, M. Detection of viruses associated with rugose wood in Japanese

1 grapevines and analysis of genomic variability of *Rupestris stem pitting-*
2 *associated virus*. **Journal of General Plant Pathology**, v.74, p.156–163, 2008.

3 NOLASCO, G.; SANTOS, C.; PETROVIC, N.; SANTOS, M.T.; CORTEZ, I.;
4 FONSECA, F.; BOBEN, J.; NAZARÉ PEREIRA, A.M.; SEQUEIRA, O. *Rupestris*
5 *stem pitting-associated virus* isolates are composed by mixtures of genomic
6 variants which share a highly conserved coat protein. **Archives of Virology**,
7 v.151, p.83-96, 2006.

8 PEARSON, R.C.; GOHEEN, A.C. (Ed.). **Compendium of grape diseases**. St.
9 Paul: APS Press, 1988. 93p.

10 POMPE-NOVAK, M.; GUTIERREZ-AGUIRRE, I.; VOJVODA, J.; BIAS, M.;
11 TOMAZIC, I.; VIGNE, E.; FUCHS, M.; RAVNIKAR, M.; PETROVIC, N. Genetic
12 variability within RNA2 of *Grapevine fanleaf virus*. **European Journal of Plant**
13 **Pathology**, v.117, p.307-312, 2007.

14 POURRAHIM, R.; FARZADFAR, S.H.; GOLNARAGHI, A. R.;
15 AHOONMANESH, A. Partial molecular characterization of some *Grapevine*
16 *fanleaf virus* isolates from North-east of Iran. **Journal of Phytopathology**,
17 v.155, p.754-757, 2007.

18 ROTT, M.E.; JELKMANN, W. Characterization and detection of several
19 filamentous viruses of cherry: Adaptation of an alternative cloning method
20 (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol. **European**
21 **Journal of Plant Pathology**, v.107, p.411-420, 2001.

22 ROWHANI, A.; CHAY, C.; GOLINO, D.A.; FALK, B.W. Development of a
23 polymerase chain reaction technique for the detection of *Grapevine fanleaf virus*
24 in grapevine tissue. **Phytopathology**, v.83, p.749-753, 1993.

- 1 SANTANA, F.M.; KAZUKO, A.; INOUE-NAGATA, A.K.; NAGATA, T.; RIBEIRO,
2 S.G.; ÁVILA, A.C.; GIORDANO, L.B. Detecção de um begomovírus em
3 amostras foliares de tomateiro com sondas não radioativas. **Ciência Rural**,
4 v.37, p.269-272, 2007.
- 5 VIGNE, E.; KOMAR, V.; FUCHS, M. Field safety assessment of recombination
6 in transgenic grapevines expressing the coat protein gene of *Grapevine fanleaf*
7 *virus*. **Transgenic Research**, v.13, p.165-179, 2004.
- 8 ZHANG, Y.P.; UYEMOTO, J.K.; GOLINO, D.A.; ROWHANI, A. Nucleotide
9 sequence and RT-PCR detection of a virus associated with Grapevine rupestris
10 stem-pitting disease. **Phytopathology**, v.88, p.1231-1237, 1998.

Tabela 1. Relação dos isolados virais de RSPaV, GLRaV-2 e GFLV utilizados no trabalho, suas origens, incluindo dados das proteínas capsidiais obtidas

Vírus	Isolado	Cultivar	Procedência	nucleotídeos do gene da CP (pb)	Código no GenBank
RSPaV	CF195	Cabernet Franc	campo experimental, Bento Gonçalves, RS	780	EF636803
RSPaV	CF207	Cabernet Franc	campo experimental, Bento Gonçalves, RS	780	EF636804
RSPaV	MG	Moscato Giallo	quarentena, Bento Gonçalves, RS	780	EF690380
RSPaV	PN	Pinot Nero	quarentena, Bento Gonçalves, RS	780	EF690381
RSPaV	MH	Moscato de Hamburgo	quarentena, Bento Gonçalves, RS	780	EF690382
RSPaV	CF208	Cabernet Franc	campo experimental, Bento Gonçalves, RS	780	EF690383
RSPaV	CF210	Cabernet Franc	campo experimental, Bento Gonçalves, RS	780	EF690384
RSPaV	420A	420A	programa limpeza clonal, Bento Gonçalves, RS	780	EU040204
RSPaV	CF195-2	Cabernet Franc	campo experimental, Bento Gonçalves, RS	780	EU204913
GLRaV-2	M/C	Mission/Concord	São Roque, SP	597	EU053125
GLRaV-2	L/I	LN33/Isabel	São Roque, SP	597	EU053126
GLRaV-2	SE	Seibel	São Roque, SP	597	EU204909
GLRaV-2	IT	Itália	Capão Bonito, SP	597	EU204910
GLRaV-2	MH	Moscatel de Hamburgo	Jundiaí, SP	597	EU204911
GLRaV-2	RI	Riesling	Videira, SC	597	EU204912
GFLV	RS	Prosecco Tondo	coleção cultivares, Bento Gonçalves, RS	1515	EU038294
GFLV	RUP	Rupestris du Lot/Maria (IAC 514-6)	Janaúba, MG	1515	EU258680
GFLV	IAC	IAC 766/106-8 (Riparia do Traviú)	Jundiaí, SP	1515	EU258681

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para as amplificações dos isolados virais de RSPaV, GLRaV-2 e GFLV, com sua orientação, sequência e fonte.

Vírus	oligonucleotídeo	Seqüência 5' - 3'	Orientação	Fragmento amplificado (pb)	Referência
RSPaV	RSPaV-V1	ATGGCAAGTCAAATT GGGAAAC	senso	780	este trabalho
RSPaV	RSPaV-C1	TCATTCATGTGTAAC ATTTGAA	antisenso		
GLRaV-2	GLR2CP1	ATGGAGTTGATGTCC GAC	senso	597	Abou Ghanem- Sabanadzovic et al. (2000)
GLRaV-2	GLR2CP2	TACATAACTTCCCTT CTACC	antisenso		
GFLV	5-CP-GFLV	CTTCCTCAACTTGAG GCTG	senso	549 (5' terminal CP)	Brandt et al. (1995)
GFLV	GFLV(c)	CCAAAGTTGGTTTCC CAAGA	antisenso		Rowhani et al. (1993)
GFLV	GFLV-int-cp-v1	CTTGGGAAACCAACT TTGG	senso		este trabalho
GFLV	EV00N1-GFLVr	CACATATATACTT GGGTCTTTTAA	antisenso	1067 (meio e 3' terminal CP)	Vigne et al. (2004)

Tabela 3. Identidade das seqüências (%) de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) dos genes da proteína capsidial dos diferentes isolados de RSPaV, GLRaV-2 e GFLV caracterizados*

Nome isolado	CF195	CF207	CF208	CF210	PN	MG	MH	420A	CF195-2	M/C	L/I	SE	IT	MH	RI	RS	RUP	IAC
CF195	—	92,6	89,5	90,3	88,0	91,5	90,3	91,5	89,5									
CF207	84,3	—	95,3	95,3	93,0	98,0	96,9	98,0	95,7									
CF208	81,1	95,7	—	96,9	93,8	96,5	95,3	96,5	94,9									
CF210	81,4	96,0	98,7	—	93,8	96,5	95,3	96,5	94,9									
PN	81,6	92,0	93,7	93,9	—	94,2	93,4	94,2	92,2									
MG	81,5	96,4	98,3	98,3	93,5	—	98,0	99,2	96,9									
MH	81,5	96,2	97,8	97,9	93,4	98,4	—	98,0	95,7									
420A	81,5	96,4	98,3	98,3	93,5	99,7	98,4	—	96,9									
CF195-2	81,5	95,6	97,3	97,5	92,9	97,6	97,5	97,6	—									
M/C										—	93,4	95,4	94,9	97,4	98,4			
L/I										89,2	—	97,9	97,4	90,9	92,4			
SE										89,4	98,8	—	99,4	92,9	94,4			
IT										89,1	98,4	99,6	—	92,4	93,9			
MH										98,1	87,4	88,2	88,2	—	97,9			
RI										98,3	88,1	88,9	88,9	98,4	—			
RS																—	99,2	94,8
RUP																	—	95,2
IAC																		—

* Códigos dos acessos dos isolados depositados no GenBank relacionados na Tabela 1.

Tabela 4. Sequências de maior identidade (%) de aminoácidos deduzidos do gene da proteína capsidial entre os isolados de RSPaV, GLRaV-2 e GFLV, deste trabalho e isolados depositados no GenBank.

Isolado caracterizado	Isolado estrangeiro				
	Vírus	Nome isolado	Código GenBank	identidade de aa deduzidos (%)	País*
CF195	RSPaV	PDG2	ABC94870	98,0	Itália
CF207	RSPaV	VER84 SH	ABC94878	98,8	Itália
CF208	RSPaV	B10-3	AAAY16211	97,2	Portugal
CF210	RSPaV	B10-3	AAAY16211	97,2	Portugal
PN	RSPaV	M31-35	AAAY16203	95,3	Portugal
MG	RSPaV	B10-3	AAAY16211	99,2	Portugal
		E156	AAAY16207		
		-	AAC62913		
MH	RSPaV	B10-3	AAAY16211	98,0	Portugal
		E156	AAAY16207		
		-	AAC62913		
420A	RSPaV	B10-3	AAAY16211	99,2	Portugal
		E156	AAAY16207		
		-	AAC62913		
CF195-2	RSPaV	B10-3	AAAY16211	96,9	Portugal
		E156	AAAY16207		
		-	AAC62913		
M/C	GLRaV-2	H4	AAU44344	96,4	Itália
		-	CCA74566		
		SL10	ABI84368		
L/I	GLRaV-2	Pinot Noir	AAC40861	99,4	China
		Shandong	AAW29975		
		-	CCA74566		
SE	GLRaV-2	H4	AAU44344	93,9	Itália
		H4	AAU44344		
		H4	AAU44344		
IT	GLRaV-2	-	CCA74566	99,4	Itália
MH	GLRaV-2	H4	AAU44344	93,9	Itália
RI	GLRaV-2	H4	AAU44344	94,9	Itália
RS	GFLV	SG1	ABC96663	96,6	Itália
RUP	GFLV	SG1	ABC96663	96,8	Itália
IAC	GFLV	Vo154	ABI63932	96,4	Eslovênia
		A6e	AAR28078		

*País de submissão do acesso no GenBank; (-) isolado não nomeado.

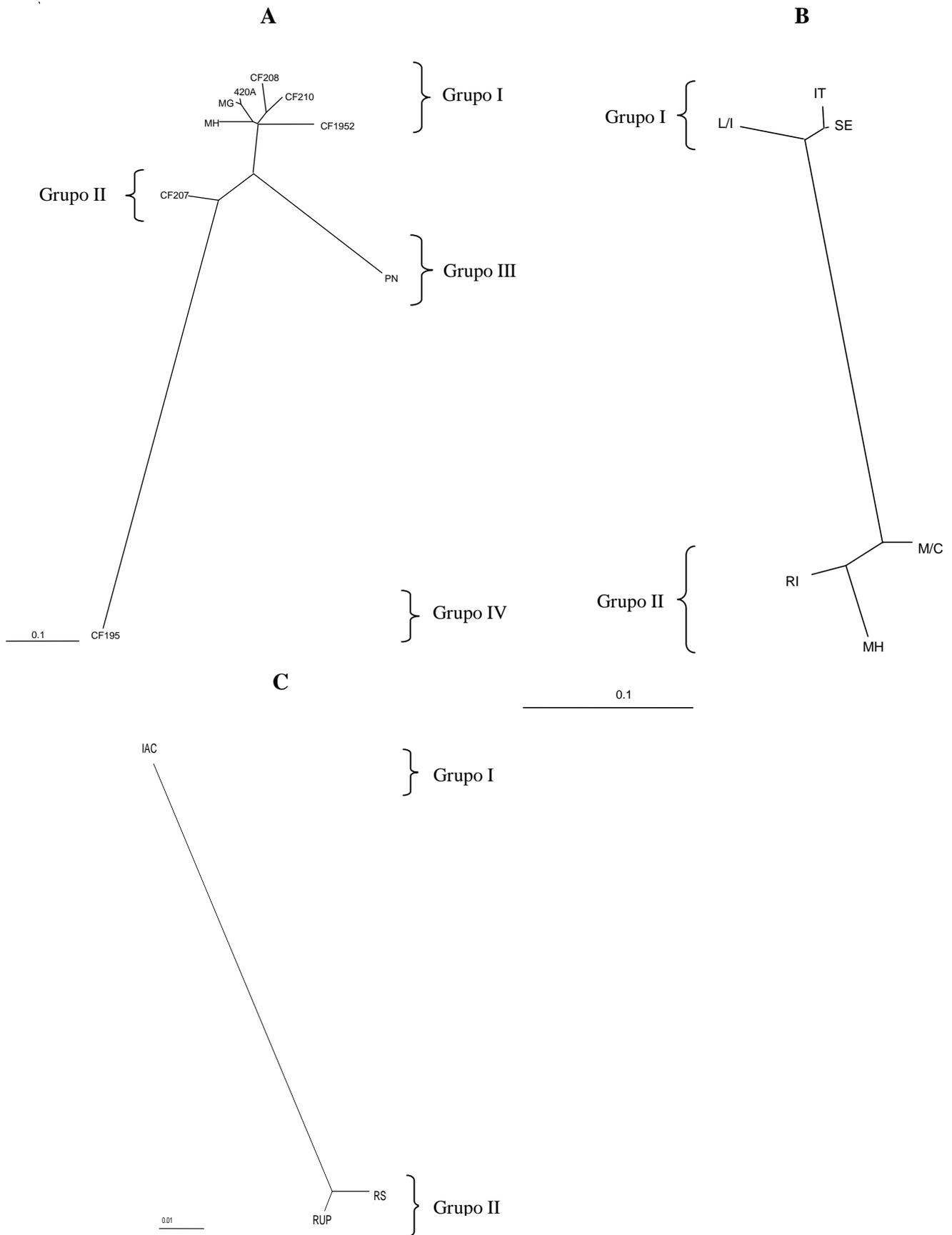


Figura 1. Dendrograma obtido através do alinhamento (Clustal X) das seqüências de nucleotídeos do gene da proteína capsial de isolados de (A) RSPaV, (B) GLRaV-2 e (C) GFLV; com a demarcação dos distintos agrupamentos. A barra significa a substituição de nucleotídeos por posição.

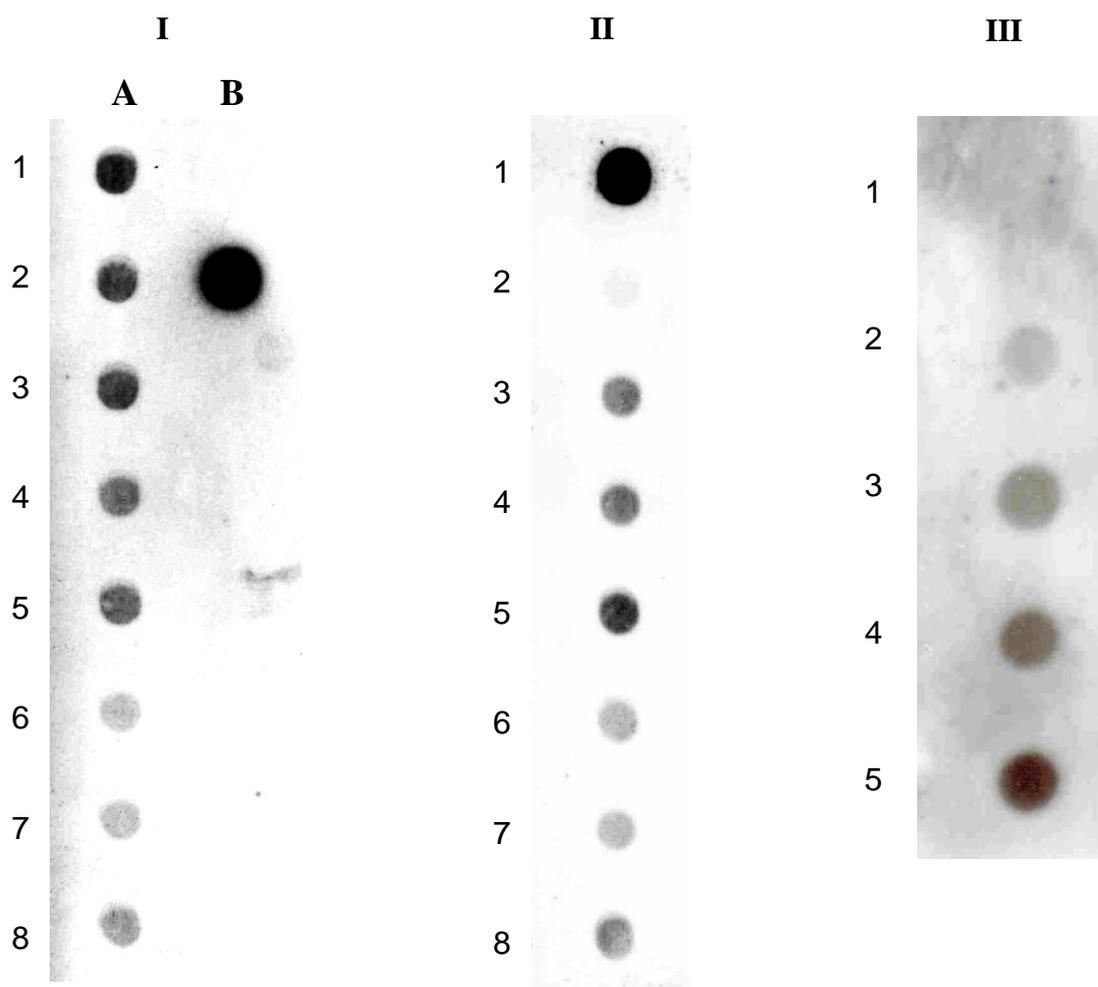


Figura 2. Hibridizações “dot-blot” entre sondas não-radioativas marcadas com digoxigenina e RNA total extraído de videiras. (I) Sonda para RSPaV, isolado CF210; amostras infectadas com os isolados 420A (1A), infecção dupla CF195 e CF195-2 (2A), CF207 (3A), CF208 (4A), CF210 (5A), PN (6A), MG (7A), MH (8A); controle negativo (1B), controle positivo (2B). (II) Sonda para GLRaV-2, isolado L/I; controle positivo (1); controle negativo (2); amostras infectadas com os isolados L/I (3), M/C (4), SE (5), IT (6), RI (7) e MH (8). (III) Sonda para o GFLV, isolado RS; amostra sadia (1), amostras infectadas com os isolados IAC (2), RUP (3) e RS (4), controle positivo (5).

CAPÍTULO III

Production of polyclonal antisera using recombinant coat proteins of *Grapevine leafroll-associated virus 2* and *Grapevine virus B*

1 detect GLRaV-2 and GVB-infected grapevine in plant tissues, by indirect ELISA,
2 discriminating healthy and infected grapevines with absorbances (A_{405}) of
3 0.08/1.15 and 0.12/1.30, respectively. Expressing CP genes can yield high
4 amounts of viral protein with high antigenicity, and GLRaV-2 and GVB antisera
5 obtained in this study can allow reliable virus disease diagnosis.

6 Index terms: GLRaV-2, GVB, recombinant protein, indirect ELISA, Western blot.

7

8 **Produção de anti-soros policlonais para as proteínas capsidiais**
9 **recombinantes de *Grapevine leafroll-associated virus 2* e *Grapevine***
10 ***virus B***

11 Resumo – O objetivo deste trabalho foi produzir e caracterizar anti-soros
12 específicos contra isolados brasileiros de GLRaV-2 e GVB, desenvolvidos a
13 partir da proteína capsidial expressada em *Escherichia coli*, e testar seu
14 possível uso para a detecção destes dois vírus em videiras infectadas. Os
15 genes da proteína capsidial (CP) foram amplificados via RT-PCR, clonados e
16 seqüenciados. Foram, subseqüentemente, subclonados e os plasmídeos
17 recombinantes foram empregados na transformação de *E. coli* e na expressão
18 das proteínas capsidiais. As proteínas capsidiais recombinantes foram
19 purificadas, suas identidades foram confirmadas em SDS-PAGE e “Western
20 blot” sendo utilizadas para imunizar coelhos. Os anti-soros produzidos contra
21 estas proteínas foram capazes de reconhecer as proteínas recombinantes
22 correspondentes em “Western blot” e detectar GLRaV-2 e GVB em tecidos
23 infectados de videiras pelo ELISA indireto, e discriminar videiras sadias e
24 infectadas, com absorbâncias (A_{405}) de 0,08/1,15 e 0,12/1,30, respectivamente
25 A expressão dos genes CP pode produzir grandes quantidades de proteínas

1 virais, com elevada antigenicidade. Os anti-soros de GLRaV-2 e GVB obtidos
2 neste trabalho possibilitam uma diagnose confiável desses vírus.

3 Termos para indexação: GLRaV-2, GVB, proteína recombinante, ELISA
4 indireto, Western blot.

5

6

Introduction

7 Among grapevine (*Vitis* spp.) viral diseases that occur in Brazil, grapevine
8 leafroll and corky bark stand out due to their economic relevance (Fajardo et al.,
9 2003).

10 *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2; genus *Closterovirus*,
11 family *Closteroviridae*) has a positive-sense, single-stranded RNA genome of
12 16,494 nucleotides, with eight open reading frames (ORFs), of which ORF6
13 encodes the coat protein (ca. 22 kDa) (Abou-Ghanem et al., 1998; Meng et al.,
14 2005; Beuve et al., 2007). Detection of GLRaV-2 has been previously reported
15 in Brazil (Kuniyuki et al., 2002).

16 Infection with grapevine leafroll causes, in *Vitis vinifera* L., downward
17 curling and discoloration of leaves, towards the end of the growing season, and
18 results in reduction of yield and quality of grape berries. Additionally, GLRaV-2
19 is also involved in the aetiology of disorders known as graft-incompatibility,
20 young vine decline and rootstock stem lesion (Abou Ghanem-Sabanadzovic et
21 al., 2000; Bertazzon & Angelini, 2004; Beuve et al., 2007). Elimination of
22 GLRaV-2 had beneficial impact with a marked increase in fresh fruit yield
23 (22%), cumulative weight growth (21%), and sugar concentration of fruit juice
24 (9%) (Komar et al., 2007).

25 Corky bark, a component of grapevine rugose wood complex, is caused by

1 *Grapevine virus B* (GVB; genus *Vitivirus*, family *Flexiviridae*) (Martelli et al.,
2 2007), which possesses a positive single-stranded RNA genome of 7,599
3 nucleotides, with five ORFs, of which ORF 4 encodes the coat protein (23 kDa)
4 (Boscia et al., 1993; Minafra et al., 1994; Saldarelli et al., 1996). GVB has been
5 reported earlier in Brazil (Kuniyuki & Costa, 1982; Kuhn, 1992; Nickel et al.,
6 2002).

7 Corky bark causes yield decreases, incomplete ripening of grapes and
8 progressive decline and death of plants (Kuhn, 1992). Some cultivars and
9 rootstocks are symptomless carriers or exhibit only mild symptoms, while others
10 suffer rapid decline. Typical swelling and longitudinal bark cracks of young
11 branches, early drying of branches occur in *V. labrusca* cultivars. Elimination of
12 GVB had also a beneficial impact, with an increase in vigor (35%) and
13 production (16%) (Komar et al., 2007). There is experimental proof of controlled
14 transmission of GVB by several species of pseudococcid mealybugs (Boscia et
15 al., 1993).

16 Antisera and several variants of enzyme-linked immunosorbent assay
17 (ELISA) (Clark, 1981; Koenig, 1981; Barbara & Clark, 1982) are widely used
18 tools for the routine detection of grapevine viruses (Kuniyuki et al., 2002;
19 Fajardo et al., 2003). However, the production of high-quality virus-specific
20 antisera to GLRaV-2 and GVB, suitable for their large scale detection and
21 based on virus purification procedures, faces substantial drawbacks, including
22 complex virus infections, low yields of virus particles, presence of inhibitory
23 compounds, such as polyphenols, tannins and polysaccharides, narrow range
24 and poor mechanical transmission to herbaceous hosts, contamination of antigens
25 with host proteins (Goszczyński et al., 1997; Uyemoto et al., 1997; Xu et al.,

1 2006; Beuve et al., 2007; Fajardo et al., 2007; Ling et al., 2007) and, especially
2 in the case of GVB, low immunogenicity (Boscia et al., 1993).

3 The production of virus-specific antisera using recombinant proteins from
4 cloned virus genes expressed in *Escherichia coli*, that can overcome the
5 mentioned difficulties, has been applied to produce a number of polyclonal
6 antisera against coat protein (CP) of several grapevines viruses (Ling et al.,
7 2000, 2007; Minafra et al., 2000; Xu et al., 2006; Fajardo et al., 2007) and non-
8 structural proteins (Saldarelli & Minafra, 2000). Expressed CP genes can yield
9 high amounts of viral protein with adequate antigenicity, thereby bypassing the
10 already mentioned drawbacks of viral antigen purification from infected tissue
11 as well as contamination of antigens with plant proteins (Uyemoto et al., 1997;
12 Ling et al., 2007).

13 The large number of nowadays available nucleotide sequences of GLRaV-
14 2 (Meng et al., 2005) and GVB (Saldarelli et al., 1996; Nickel et al., 2002),
15 associated with the last development of molecular biology techniques, have
16 turned expressing viral genes into an extremely powerful strategy for the
17 production of antibodies against plant viruses. Despite the development of
18 nucleotide sequence based detection methods, ELISA remains highly relevant
19 for large scale identification of grapevine virus (Fajardo et al., 2003). Thus, the
20 availability of GLRaV-2 and GVB antisera with adequate sensitivity and
21 specificity will allow reliable virus disease diagnosis in grapevines from
22 vineyards and indexing materials from virus-free clone production programs.

23 The objective of this study was to produce and characterize specific
24 antisera against Brazilian isolates of GLRaV-2 and GVB, developed from CPs
25 expressed in *E. coli*, and to test the possible use of the raised antisera for the

1 detection of these two viruses in diseased grapevines.

2

3

Material and Methods

4 Where not stated otherwise, procedures were performed according to
5 Sambrook & Russel (2001). The coat protein (CP) gene of GLRaV-2, isolate L/I,
6 from grapevine cv. LN33 (Couderc 1613 x Thompson Seedless) /Isabel,
7 collected in São Paulo, Brazil, was amplified by RT-PCR with the
8 oligonucleotides GLR2CP1 (5'ATGGAGTTGATGTCCGAC3', viral sense) and
9 GLR2CP2 (5'TACATAACTTCCCTTCTACC3', complementary sense) (Abou
10 Ghanem-Sabanadzovic et al., 2000; Bertazzon & Angelini, 2004), ligated into
11 the pCR2.1 vector (Invitrogen), cloned in *E. coli* Top10 cells and sequenced
12 ([GenBank access number EU053126](#)).

13 The CP gene of GVB, isolate BR1, from grapevines indexed on the
14 indicator LN33, collected in Rio Grande do Sul, Brazil, was amplified by RT-
15 PCR with the oligonucleotides GVB6445 (5'ATGGAAAATATATCCCGGATGG3',
16 viral sense) and GVB7038 (5'ACTCGTCAGACAACTCTATATC3', complementary
17 sense) (Saldarelli et al., 1996), ligated into the pGEM-T Easy vector (Promega),
18 cloned in *E. coli* JM109 cells and sequenced ([GenBank access number](#)
19 [AF438410](#)) (Nickel et al., 2002).

20 One recombinant clone, containing the CP (rCP) gene of each GLRaV-2
21 (GLRaV-2cp, 597 bp) and GVB (GVBcp, 594 bp), was cultured for 8 hours at
22 37°C in LB medium with 100 µg mL⁻¹ ampicilin (LB/ampicilin), and the plasmid
23 DNA was purified using the Flexi Prep kit (Amersham Biosciences), according
24 to the manufacturer's instructions. The GLRaV-2cp and GVBcp genes were
25 removed from the cloning plasmids, by digestion with *EcoRI*, and ligated to the

1 expression vectors pRSET-A and pRSET-C (Invitrogen), respectively,
2 previously digested with the same enzyme.

3 To confirm the correct orientation of the inserts (CP) into pRSET-A and -C,
4 the obtained recombinant plasmids were sequenced, PCRs were performed
5 using T7 forward primer placed in pRSET-C and complementary sense primer
6 (GVB7038) or plasmids were digested with the restriction enzyme (*Pst*I), with an
7 unique restriction site present both in vector pRSET-A and in the CP gene of
8 GLRaV-2.

9 For in vitro expression, the constructs pRSET-A/GLRaV-2cp and pRSET-
10 C/GVBcp were transferred to *E. coli* strain BL21:DE3 by heat shock and one
11 colony of each clone was cultivated at 37°C in 200 mL LB/ampicilin, until an
12 OD₆₀₀ of approximately 0.5, when expression was induced by addition of
13 isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) to a final concentration of 2 mM.
14 Six hours post-induction, the bacterial cells were collected by centrifugation
15 (5,000 *g*/10 min) and stored at -80 °C. Total protein extracts were obtained by
16 resuspension in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH
17 8.0), lysozyme treatment and sonication, as described by Noueir et al. (1994).
18 The CP extract, resuspended in 1 mL of 100 mM NaHCO₃, pH 9.0, plus 0.5%
19 SDS (w/v), was purified by affinity chromatography in Ni-NTA columns (Qiagen),
20 according to the manufacturer's instructions. GLRaV-2cp and GVBcp
21 expressions were evaluated by 4%/12% discontinuous polyacrylamide gel
22 electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot, using commercial antisera
23 against the CPs of GLRaV-2 (Sanofi-Pasteur) or GVB (Agritest), respectively,
24 and antibodies against the six histidine tag (anti-his C-terminal/AP Ab)
25 (Invitrogen). The protein quantification was done comparing one aliquot of

1 GLRaV-2 or GVB expressed CP with serial dilution aliquots of BSA (0.25, 0.5,
2 1.0, 1.4, 2.0 and 2.5 mg BSA/mL) in SDS-PAGE, since Bradford reagent was
3 incompatible with the SDS concentration present in recombinant protein
4 solutions.

5 After dialysis in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, plus 0.425% NaCl (w/v),
6 180, 250, 400, 500 and 670 μ g of the in vitro-expressed denatured protein, it
7 were injected intramuscularly into the hind legs of a white, New Zealand rabbit,
8 approximately 35 days old, at weekly intervals. One rabbit was used for each
9 expressed CP. The first injection was performed with complete Freund's
10 adjuvant (1:1 v/v), and the four remaining injections with incomplete Freund's
11 adjuvant (1:1 v/v). Beginning one week after the last injection, seven weekly
12 bleedings were carried out (25-30 ml/bleeding/animal). Blood samples were
13 allowed to coagulate for 1 h, at 37 °C, and 30 min, at 4°C, and then centrifuged
14 at 3,000 g/10 min. The antisera were aliquoted and stored at -20 °C.

15 Western blot tests were performed to confirm the effective production and
16 specificity of antibodies against GLRaV-2 and GVB expressed CPs. Aliquots (2
17 μ l) of these proteins were eletrophoresed in 12% SDS-PAGE gels, and
18 transferred onto a nitrocellulose membrane using a wet blotter (BioRad). The
19 membrane was blocked (2% w/v powdered milk), incubated with crude GLRaV-
20 2 and GVB antisera (1:250 v/v), washed, incubated with goat-anti-rabbit
21 antibodies-AP conjugate (Sigma), and revealed with NBT/BCIP as substrate.

22 Purification of the globuline fraction (IgG) from the antisera was carried out
23 by ion exchange chromatography in a DEAE-Sephacel resin (Sigma)
24 equilibrated with 25 mM sodium acetate buffer, pH 5.2, diluting the antisera 1:10
25 (v/v) in distilled water. An equal volume of saturated ammonium sulphate was

1 used to precipitate proteins in antisera. The suspension was centrifuged at
2 3,000 g/10 min, the pellet was resuspended in 2 mL of half-strength PBS and
3 dialysed for 12 h at 4 °C in the same buffer. Globuline fractions were quantified
4 at 280 nm and stored at -20 °C.

5 Plate-trapped antigen-ELISA (PTA-ELISA), a type of indirect ELISA (Clark,
6 1981), using purified IgG produced against rCP of GLRaV-2 and GVB (at 4
7 µg/µL) and general conjugate (at 1:1000 v/v) (goat-anti-rabbit antibodies-
8 alkaline phosphatase conjugate, Sigma), was performed to evaluate the
9 specificity and sensitivity of the obtained antisera against GLRaV-2 and GVB to
10 detect these viruses in grapevines previously tested positive for these viruses.
11 The samples, consisting of leaf veins and petioles of six GLRaV-2-infected
12 grapevines and six GVB-infected grapevines, were powdered in the presence of
13 liquid nitrogen and diluted 1:3 (w/v) in coating buffer (50 mM sodium carbonate,
14 pH 9.6). Samples were considered infected when absorbance at 405 nm was at
15 least twice the average value of the healthy controls.

16

17

Results and Discussion

18 Expressions of the GLRaV-2cp and GVBcp were induced four times each
19 in 200 mL cultures, resulting in 0.750, 3.125, 0.750 and 0.875 mg CP of
20 GLRaV-2 (a total of 5.5 mg) and 0.750, 1.625, 0.875 and 1.250 mg CP of GVB
21 (a total of 4.5 mg). Compared to other results (Ling et al., 2000, 2007; Fajardo
22 et al., 2007), on fusion protein expressions, the average protein yields obtained
23 in this study (6.875 and 5.625 µg mL⁻¹ culture medium, of GLRaV-2cp and
24 GVBcp, respectively) are in the range of similar studies and adequate for the
25 required schedule of rabbit immunizations.

1 In SDS-PAGE gels, the presence of bands with a molecular mass
2 corresponding to approximately 25 and 26 kDa (expected values for the
3 GLRaV-2 and GVB fusion proteins, respectively) was observed (Figure 1). Of
4 these values, ca. 22 and 23 kDa, correspond to the CPs of GLRaV-2 and GVB,
5 respectively, increased by approximately 3 kDa of six histidine fused to the N-
6 terminal of these proteins (6 His-tag). The band corresponding to the fusion
7 protein was absent in the sample transformed with the empty vector.

8 The identities of the expressed proteins were confirmed by Western blot,
9 using commercial antisera against the CPs of GLRaV-2 or GVB, and antibodies
10 against the 6 His-tag (Figure 2).

11 Testing the produced antisera for the detection of expressed GLRaV-2
12 and GVB CPs by Western blot revealed that they reacted strongly and
13 specifically to the homologous immunogens (Figure 3), demonstrating the
14 effectiveness of the immunization procedure as well as the immunogenicity of
15 the fusion protein.

16 The purified IgGs were obtained in concentrations of 1,396 and 2,010
17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for GLRaV-2 and GVB, respectively. Their excellent recognition of
18 GLRaV-2 and GVB in infected grapevines was confirmed by PTA-ELISA (Table
19 1). Neither of both antisera showed relevant absorbance with healthy samples,
20 demonstrating high sensitivity and specificity (Tables 1 and 2). Considering
21 absorbance value range, obtained as a result of routine indexing tests
22 performed in our lab, the performance of GLRaV-2 and GVB produced antisera
23 was similar to that obtained with commercial antibodies. PTA-ELISA was
24 chosen to check the antisera because of its low cost, reliability and practicability
25 as a large scale virus diagnostic method (Ling et al., 2000). Also indirect ELISA

1 variants have been shown to yield a broader specificity in heterologous
2 reactions and to be reliably sensitive, thus being more suitable for large scale
3 analyses (Koenig, 1981; Barbara & Clark, 1982).

4 Differences observed in the nucleotide or amino acids sequences of the
5 CP gene may have an effect on all protein functions, including the serological
6 relationship. Therefore, the CP gene variability should be considered, since
7 some epitopes of the coat protein are the basis for antibody recognition by
8 ELISA. It was demonstrated that GLRaV-2 and GVB Brazilian isolates show 94-
9 98% and 82% nucleotide identities, respectively, with foreign isolates from
10 different geographic origins (Nickel et al., 2002). Thus, it is reasonable to
11 assume that antisera produced in this study could not recognize all foreign
12 isolates or strains, and vice versa, highlighting the importance of antisera
13 production against local isolates.

14 GLRaV-2 occurs in nature as a number of biological and molecular
15 variants, grouped into distinct strains, based on their CP gene sequences, such
16 as PN (= Sem, 94/970), 93/955, H4, RG, Alfie and BD (Bertazzon & Angelini,
17 2004; Meng et al., 2005). A similar observation has been made with GVB (Shi
18 et al., 2004). Despite this fact, the antisera against GLRaV-2, isolate L/I,
19 produced in this study reacted positively to several GLRaV-2 isolates, including
20 five GLRaV-2 isolates (Table 2) that showed among them 87-99% and 90-99%
21 of nucleotide and deduced amino acids identities, respectively, in the coat
22 protein gene, according to nucleotide sequences at GenBank
23 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Similar results were obtained, using the produced
24 antiserum against GVB, isolate BR1, to detect the virus in other GVB-infected
25 grapevines, but, in this case, the variability of GVB isolates was not molecularly

1 characterized as GLRaV-2. These results show that the produced antisera
2 reliably detected several molecularly different isolates of GLRaV-2 (Table 2) as
3 well as GVB, in six different infected grapevine accesses of unknown origin.

4 The variable viral titer, in GLRaV-2-infected grapevine plants, was
5 demonstrated in two indirect ELISA tests, spaced one and a half month from
6 each other. In the first test, the absorbance value of GLRaV-2-infected
7 grapevine cv. Riesling was 1.15 and in the second one it was 0.42, considering
8 precisely the same experimental conditions (Tables 1 and 2). The titer
9 fluctuation is well known of many grapevine viruses and determines when, how
10 and where the analysed sample must be collected to perform serological tests
11 (Fajardo et al., 2003).

12 The present results confirm previous reports stating the suitability of
13 antisera obtained against recombinant CPs for detection of viruses by
14 serological tests (Xu et al., 2006; Ling et al., 2007), including indirect ELISA.

15

16

Conclusions

17 1. Antigens of GLRaV-2 and GVB can be conveniently obtained by gene
18 expression in bacteria.

19 2. Expressing CP genes can yield high amounts of viral protein with high
20 antigenicity, and bypass the drawbacks of viral antigen purification from infected
21 tissue as well as contamination of antigens with plant proteins.

22 3. The GLRaV-2 and GVB antisera, produced against two specific isolates, are
23 able to detect a range of distinct isolates of these viruses by indirect ELISA.

1 4. The availability of GLRaV-2 and GVB antisera with high sensitivity and
2 specificity, such as those obtained in this study, can allow reliable virus disease
3 diagnosis.

4 **Acknowledgements**

5 To Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
6 (CNPq) for financing the project, Marcos F. Vanni for technical support and Dr.
7 Hugo Kuniyuki (IAC, Campinas, SP) for supplying the GLRaV-2 isolates.

9 **References**

10
11 ABOU GHANEM-SABANADZOVIC, N.; SABANADZOVIC, S.; CASTELLANO,
12 M.A.; BOSCIA, D.; MARTELLI, G.P. Properties of a new isolate of *Grapevine*
13 *leafroll-associated virus 2*. **Vitis**, v.39, p.119-121, 2000.

14 ABOU-GHANEM, N.; SABANADZOVIC, S.; MINAFRA, A.; SALDARELLI, P.;
15 MARTELLI, G.P. Some properties of *Grapevine leafroll-associated virus 2* and
16 molecular organization of the 3' region of the viral genome. **Journal of Plant**
17 **Pathology**, v.80, p.37-46, 1998.

18 BARBARA, D.J.; CLARK, M.F. A simple indirect ELISA using F(ab')₂ fragments
19 of immunoglobulin. **Journal of General Virology** v.58, p.315-322, 1982.

20 BERTAZZON, N.; ANGELINI, E. Advances in the detection of *Grapevine*
21 *leafroll-associated virus 2* variants. **Journal of Plant Pathology**, v.86, p.283-
22 290, 2004.

23 BEUVE, M.; SEMPÉ, L.; LEMAIRE, O. A sensitive one-step real-time RT-PCR
24 method for detecting *Grapevine leafroll-associated virus 2* variants in grapevine.

1 **Journal of Virological Methods**, v.141, p.117-124, 2007.

2 BOSCIA, D.; SAVINO, V.; MINAFRA, A.; NAMBA, S.; ELICIO, V.;

3 CASTELLANO, M.A.; GONSALVES, D.; MARTELLI, G.P. Properties of a

4 filamentous virus isolated from grapevines affected by corky bark. **Archives of**

5 **Virology**, v.130, p.109-120, 1993.

6 CLARK, M.F. Immunosorbent assays in plant pathology. **Annual Review of**

7 **Phytopathology**, v.19, p.83-106, 1981.

8 FAJARDO, T.V.M.; BARROS, D.R.; NICKEL, O.; KUHN, G.B.; ZERBINI, F.M.

9 Expression of *Grapevine leafroll-associated virus 3* coat protein gene in

10 *Escherichia coli* and production of polyclonal antibodies. **Fitopatologia**

11 **Brasileira**, v.32, p.496-500, 2007.

12 FAJARDO, T.V.M.; KUHN, G.B.; NICKEL, O. Doenças virais. In: FAJARDO,

13 T.V.M. (Ed.). **Uva para processamento: fitossanidade**. Brasília: Embrapa

14 Informação Tecnológica, 2003. p.45-62. (Embrapa Informação Tecnológica.

15 Frutas do Brasil, 35).

16 GOSZCZYNSKI, D.E.; KASDORF, G.G.F.; PIETERSEN, G. Production and use

17 of an antiserum to grapevine virus B capsid protein purified from SDS-

18 polyacrylamide gels. **Vitis**, v.36, p.191-194, 1997.

19 KOENIG, R. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant

20 viruses. **Journal of General Virology** v.55, p.53-62, 1981.

21 KOMAR, V.; EMMANUELLE, V.; DEMANGEAT, G.; FUCHS, M. Beneficial

22 effect of selective virus elimination on the performance of *Vitis vinifera* cv.

23 Chardonnay. **American Journal of Enology and Viticulture** v.58, p.202-210,

24 2007.

1 KUHN, G.B. Intumescimento dos ramos da videira (“corky bark”), doença
2 constatada no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v.17, p.399-406,
3 1992.

4 KUNIYUKI, H.; COSTA, A.S. Estudos sobre a virose fendilhamento cortical da
5 videira em São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.7, p.71-78, 1982.

6 KUNIYUKI, H.; REZENDE, J.A.M.; SCAGLIUSI, S.M.M.; VEGA, J.; YUKI, V.A.
7 Incidência de *Grapevine leafroll-associated virus 1, 2 e 3* em vinhedos do
8 Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v.28, p.311-314, 2002.

9 LING, K.S.; ZHU, H.Y.; JIANG, Z.Y.; GONSALVES, D. Effective application of
10 DAS-ELISA for detection of grapevine leafroll associated closterovirus-3 using a
11 polyclonal antiserum developed from recombinant coat protein. **European**
12 **Journal of Plant Pathology**, v.106, p.301-309, 2000.

13 LING, K.S.; ZHU, H.Y.; PETROVIC, N.; GONSALVES, D. Serological detection
14 of *Grapevine leafroll virus 2* using an antiserum developed against the
15 recombinant coat protein. **Journal of Phytopathology**, v.155, p.65-69, 2007.

16 MARTELLI, G.P.; ADAMS, M.J.; KREUZE, J.F.; DOLJA, V.V. Family
17 *Flexiviridae*: a case study in virion and genome plasticity. **Annual Review of**
18 **Phytopathology**, v.45, p.73-100, 2007.

19 MENG, B.; LIN, C.; GOSZCZYNSKI, D.E.; GONSALVES, D. Genome
20 sequences and structures of two biologically distinct strains of *Grapevine*
21 *leafroll-associated virus 2* and sequence analysis. **Virus Genes**, v.31, p.31-41,
22 2005.

23 MINAFRA, A.; CASATI, P.; ELICIO, V.; ROWHANI, A.; SALDARELLI, P.;
24 SAVINO, V.; MARTELLI, G.P. Serological detection of *Grapevine rupestris stem*

1 *pitting-associated virus* (GRSPaV) by a polyclonal antiserum to recombinant
2 virus coat protein. **Vitis**, v.39, p.115-118, 2000.

3 MINAFRA, A.; SALDARELLI, P.; GRIECO, F.; MARTELLI, G.P. Nucleotide
4 sequence of the 3' terminal region of the RNA of two filamentous grapevine
5 viruses. **Archives of Virology**, v.137, p.249-261, 1994.

6 NICKEL, O.; FAJARDO, T.V.M.; ARAGÃO, F.J.L.; CHAGAS, C.M.; KUHN, G.B.
7 Detection and coat protein gene characterization of an isolate of *Grapevine virus*
8 *B* from corky bark-affected grapevines in Southern Brazil. **Fitopatologia**
9 **Brasileira**, v.27, p.279-284, 2002.

10 NOUEIRY, A.O.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Two proteins of a plant
11 DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. **Cell**, v.76, p.925-
12 932, 1994.

13 SALDARELLI, P.; MINAFRA, A. Immunodetection of the 20 kDa protein
14 encoded by ORF 2 of *Grapevine virus B*. **Journal of Plant Pathology** v.82,
15 p.157-158, 2000.

16 SALDARELLI, P.; MINAFRA, A.; MARTELLI, G.P. The nucleotide sequence
17 and genomic organization of grapevine virus B. **Journal of General Virology**,
18 v.77, p.2645-2652, 1996.

19 SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed.
20 New York: CSHL Press, 2001. 999p.

21 SHI, B.J.; HABILI, N.; GAFNY, R.; SYMONS, R.H. Extensive variation of
22 sequence within isolates of *Grapevine virus B*[†]. **Virus Genes**, v.29, p.279-285,
23 2004.

- 1 UYEMOTO, J.K.; KRAG, C.R.; ROWHANI, A. An improved purification
2 procedure for grapevine leafroll associated viruses. **American Journal of**
3 **Enology and Viticulture**, v.48, p.521-524, 1997.
- 4 XU, Z.Y.; HONG, N.; XING, B.; WANG, G.P. Partial molecular characterization
5 of a chinese isolate of *Grapevine leafroll-associated virus 2* and production of
6 antisera to recombinant viral proteins. **Journal of Plant Pathology**, v.88, p.89-
7 94, 2006.

Table 1. Absorbance values at 405 nm observed in a plate-trapped antigen-ELISA using grapevine (*Vitis* spp.) samples and antisera against GLRaV-2 and GVB fusion proteins, expressed in *Escherichia coli* cells. Conditions: IgG at 4 µg/mL and conjugate at 1:1000 (v/v).

Samples	Absorbance at 405 nm	
	GLRaV-2 (Time to reading 1 h 55 min)	GVB (Time to reading 55 min)
Healthy grapevine [cv. Rupestris du Lot (1:3 w/v) or Agritest extract]	0.08	0.12
GLRaV-2-infected grapevine cv. Riesling (SC 1545) (1:3 w/v)	1.15	—
GVB-infected grapevine cv. LN33 (1:3 w/v)	—	1.30
GVB-infected grapevine (Agritest grapevine extract)	—	1.10

Table 2. Absorbance values at 405 nm observed in a plate-trapped antigen-ELISA using grapevine (*Vitis* spp.) samples (1:3 w/v), infected with six GLRaV-2 isolates and antisera against GLRaV-2, isolate L/I, fusion protein, expressed in *Escherichia coli* cells. Conditions: IgG at 4 µg/mL and conjugate at 1:1000 (v/v).

Samples	Isolate	Collected in	Absorbance at 405 nm
			GLRaV-2 (Time to reading 1 h 55 min)
Healthy grapevine cv. Rupestris du Lot	-	Bento Gonçalves, RS	0.15
GLRaV-2-infected grapevine cv. Mission/Concord (08.2710) ⁽¹⁾ (EU053125) ⁽²⁾	M/C	São Roque, SP	0.75
GLRaV-2-infected grapevine cv. LN33/Isabel (17.960) (EU053126)	L/I	São Roque, SP	0.96
GLRaV-2-infected grapevine cv. Seibel 2 (CB 73-11) (EU204909)	SE	São Roque, SP	0.57
GLRaV-2-infected grapevine cv. Itália (CB 1115) (EU204910)	IT	Capão Bonito, SP	1.13
GLRaV-2-infected grapevine cv. Moscatel de Hamburgo (JD 1451) (EU204911)	MH	Jundiaí, SP	0.64
GLRaV-2 infected grapevine cv. Riesling (SC 1545) (EU204912)	RI	Videira, SC	0.42

⁽¹⁾Annotated code of grapevine in plant collection of IAC, Campinas, SP.

⁽²⁾GLRaV-2 nucleotide access code at GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

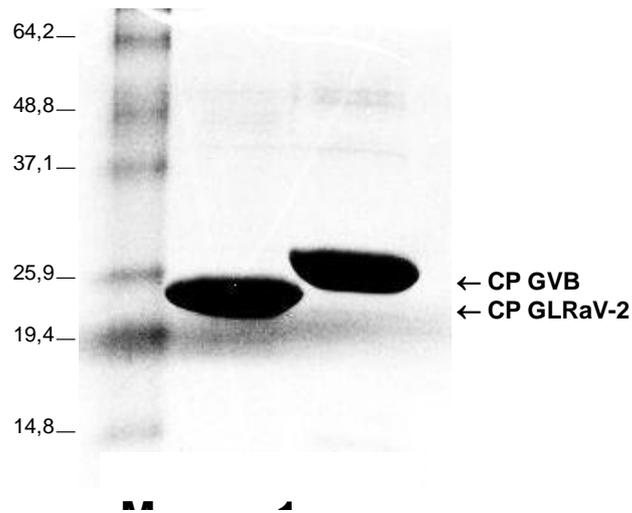


Figure 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, 12% (p/v), stained with Coomassie Blue. Lanes 1 and 2, aliquots (10 μ L) of fractions of total protein extracts from *Escherichia coli* transformed with the constructs pRSET-A/GLRaV-2cp and pRSET-C/GVBcp, respectively, collected from Ni-NTA-column. M, molecular mass markers (kDa). Arrows on the right indicate the position of the fusion proteins.

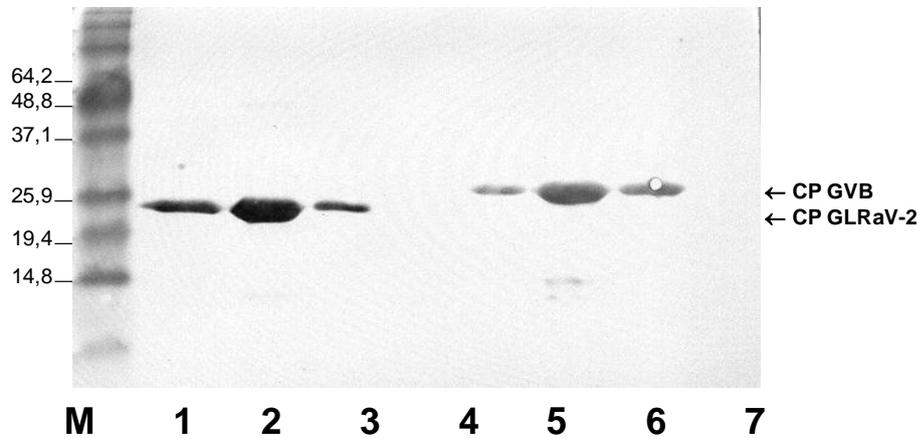


Figure 2. Western blot with commercial antisera against the six-histidin tag (anti-his C-terminal/AP Ab) (Invitrogen, 1:2000 v/v). Lanes 1 to 3, aliquots (5 μ L) of sequential fractions of total protein extracts from *Escherichia coli* transformed with the construct pRSET-A/GLRaV-2cp; Lanes 5 to 7, pRSET-C/GVBcp, collected from Ni-NTA-column and Lanes 4 and 8, aliquots (5 μ L) of the control extracts containing the empty expression vector pRSET-C (negative controls). M, molecular mass markers (kDa). Arrows on the right indicate the position of the fusion proteins.

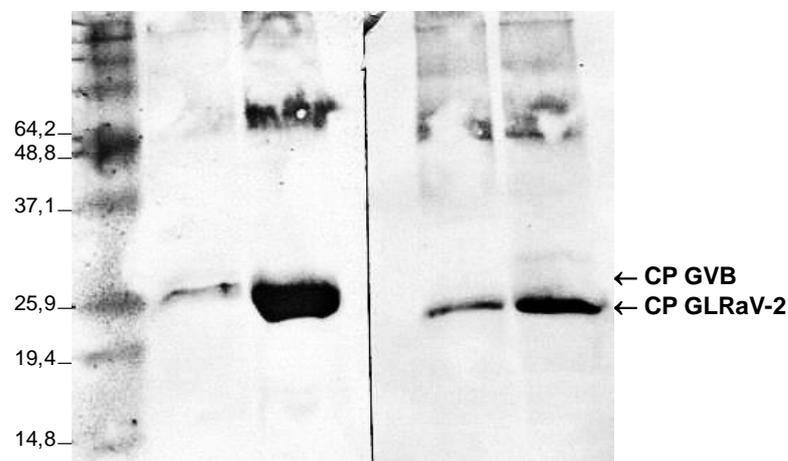


Figure 3. Western blot with GVB (lanes 1 and 2) and GLRaV-2 (lanes 3 and 4) obtained antisera (1:250 v/v), third bleeding, against the fusion proteins expressed in *E. coli*. Lanes 1 and 2, aliquots (2 μ L) of purified GVB CP from different expressions and aliquots of total protein collected from Ni-NTA-column and Lanes 3 and 4, purified GLRaV-2 CP from different expressions and aliquots of total protein collected from Ni-NTA-column. M, molecular mass markers (kDa). The arrow on the right indicates the GVB and GLRaV-2 fusion proteins.

CAPÍTULO IV

Uso de RT-PCR em tempo real (TaqMan®) para detecção de
vírus em videira

1 **Uso de RT-PCR em tempo real (TaqMan®) para detecção de vírus em**
2 **videira**

3 Paula Radaelli⁽¹⁾, Giovanni Paolo Martelli⁽²⁾, Angelantonio Minafra⁽²⁾, Maria
4 Saponari⁽²⁾, Pasquale Saldarelli⁽²⁾, Gilvan Pio-Ribeiro⁽¹⁾ e Thor Vinícius
5 Martins Fajardo⁽³⁾

6
7 ⁽¹⁾Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia,
8 Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900 Recife, PE,
9 Brasil. E-mail: paularadaelli@hotmail.com, gilvan@depa.ufrpe.br ⁽²⁾

10 Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata, Università
11 degli Studi di Bari e Istituto di Virologia Vegetale del CNR, Sezione di Bari,
12 Itália. E-mail: a.minafra@ba.ivv.cnr.it ⁽³⁾Embrapa Uva e Vinho, Caixa Postal
13 130, CEP 95700-000 Bento Gonçalves, RS, Brasil. E-mail:
14 thor@cnpuv.embrapa.br

15
16 **Resumo** – Diversas técnicas têm sido utilizadas para detecção de vírus em
17 videira, dentre elas a RT-PCR em tempo real. A sensibilidade desta técnica
18 supera os entraves advindos do baixo título viral, verificado com frequência em
19 relação aos vírus que infectam a videira, muitos dos quais ocorrem em
20 concentrações abaixo do limite de detecção dos testes diagnósticos
21 comumente utilizados. Com isso, o objetivo desse trabalho foi a otimização de
22 protocolos visando detectar importantes vírus dos gêneros *Closterovirus*
23 (*Grapevine leafroll-associated virus 2* – GLRaV-2) e *Ampelovirus* (*Grapevine*
24 *leafroll-associated virus 1*- GLRaV-1 e *Grapevine leafroll-associated virus 3* -
25 GLRaV-3), família *Closteroviridae*, bem como os vírus dos gêneros *Foveavirus*

1 (*Rupestris stem pitting-associated virus* - RSPaV) e *Vitivirus* (*Grapevine virus A*
2 (*GVA*) e *Grapevine virus B* (*GVB*), família *Flexiviridae*, através de RT-PCR em
3 tempo real (TaqMan®). Para ampelovírus, com oligonucleotídeos degenerados
4 e sondas específicas, foram detectados GLRaV-1 e GLRaV-3 nos isolados e
5 /ou cultivares testados. Para closterovírus, com oligonucleotídeos degenerados
6 e sonda específica, detectou-se GLRaV-2 em todas as cultivares testadas e em
7 *Nicotiana benthamiana*, esta apresentando maior concentração do vírus
8 quando comparado com videiras infectadas. Em *Flexiviridae*, na primeira
9 reação de multiplex RT-PCR (TaqMan®), com a adição de sondas específicas,
10 oligonucleotídeos degenerados e cDNA para os vírus GVA, GVB e RSPaV,
11 observou-se uma maior concentração de vírus quando comparados com a
12 segunda reação de multiplex, onde a curva de amplificação foi mais baixa,
13 embora tenha ocorrido reação. Com os resultados foi possível demonstrar que
14 a RT-PCR TaqMan® é um método de diagnóstico molecular rápido,
15 quantitativo, confiável, sensível e capaz de detectar diversos vírus na mesma
16 reação através da multiplex RT-PCR.

17

18 Termos para indexação: *Flexiviridae*, *Closteroviridae*, PCR em tempo real,
19 multiplex RT-PCR, quantificação.

20

21 **Real Time RT-PCR (TaqMan®) assays for the detection of grapevine**
22 **virus**

23 **Abstract** – Several techniques have been used for detecting virus in grapevine,
24 among them the real time PCR assay. The sensitivity of this technique
25 surpasses obstacles as low viral title, often verified in viruses that infect the

1 grapevine, many of them occurring in concentrations under the limit of detection
2 of the commonly used diagnostic tests. The aim of this work was to detect
3 important viruses of genera *Closterovirus* (*Grapevine leafroll-associated virus* -
4 GLRaV-2) and genera *Ampelovirus* (*Grapevine leafroll-associated virus 1* -
5 GLRaV-1 and *Grapevine leafroll-associated virus 3* - GLRaV-3), family
6 *Closteroviridae*, as well as the viruses of the genera *Foveavirus* (*Rupestris stem*
7 *pitting-associated virus* - RSPaV) and *Vitivirus* (*Grapevine virus A* (GVA) and
8 the *Grapevine virus B* (GVB), family *Flexiviridae*, through real time RT-PCR
9 (TaqMan®). For *Ampelovirus*, with degenerated primers and specific probes,
10 were detected GLRaV-1 and GLRaV-3 among isolates and/or cultivar tested.
11 For *Closterovirus*, with degenerated primers and specific probe, GLRaV-2 was
12 detected in all cultivars tested and in *Nicotiana benthamiana*, which presented
13 higher virus concentration when compared with infected grapevines. In
14 *Flexiviridae*, in the first reaction of multiplex RT-PCR (TaqMan®), with the
15 addition of specific probes, degenerated primers and cDNA for viruses GVA,
16 GVB and RSPaV, a higher virus concentration was observed when compared
17 with the second reaction of multiplex, where the amplification curve was lower,
18 even though the amplification reaction has occurred. This report showed that
19 RT-PCR TaqMan® is a method of fast molecular diagnosis, quantitative,
20 reliable, sensitive and applicable for detecting several viruses in the same
21 reaction by multiplex RT-PCR.

22

23 Index terms: *Flexiviridae*, *Closteroviridae*, real time RT-PCR, multiplex RT-PCR,
24 quantification.

25

1 **Introdução**

2 A propagação vegetativa da videira (*Vitis* spp.) facilita a disseminação de
3 patógenos, como os vírus, favorecendo o aparecimento de doenças
4 complexas, pelo acúmulo de diferentes vírus numa mesma planta. As viroses
5 são as doenças mais difíceis de controlar entre as que afetam a videira, pois a
6 disseminação e o acúmulo de vírus são favorecidos pelo transporte e emprego
7 de material propagativo infectado, além da ocorrência de vetores nos parreirais.
8 Em consequência, infecções múltiplas são freqüentes, dificultando o
9 diagnóstico das viroses (Kuhn, 1992; Fajardo et al., 2003).

10 Até o presente, foram relatados 53 vírus que infectam a videira em
11 diferentes países vitícolas do mundo (Martelli & Boudon-Padieu, 2006). Entre os
12 vírus mais importantes destacam-se aqueles pertencentes às famílias
13 *Closteroviridae*, *Comoviridae*, *Flexiviridae* e *Tymoviridae*.

14 A família *Closteroviridae* compreende dois gêneros que possuem vírus
15 importantes que infectam a videira. No gênero *Closterovirus*, está incluído
16 somente o *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2) e o gênero
17 *Ampelovirus* é composto pelos demais vírus associados ao enrolamento da
18 folha da videira, dentre eles o *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1)
19 e o *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3). Caracterizam-se por
20 apresentarem genoma de RNA fita simples, partículas filamentosas e
21 transmissão semi-persistente por afídeos (*Closterovirus*) e cochonilhas
22 (*Ampelovirus*). O enrolamento da folha é considerado umas das mais
23 importantes doenças na maioria das regiões vitícolas do mundo, devido a alta
24 incidência e às constantes perdas que ocasiona à produção. Em cultivares
25 sensíveis, os sintomas são facilmente reconhecidos, em especial no fim do

1 ciclo vegetativo, pelo enrolamento dos bordos da folha para baixo, observado
2 nas cultivares européias (*V. vinifera* L.) tintas e brancas (Kuhn, 1989; Martelli &
3 Boudon-Padieu, 2006).

4 Espécies da família *Flexiviridae*, possuem, em comum, partículas virais
5 filamentosas, de 12–13 nm de diâmetro, monoparticulados, RNA fita simples e
6 senso positivo. As principais espécies que infectam videira na família
7 *Flexiviridae* estão classificadas nos gêneros *Foveavirus* e *Vitivirus* (Adams et
8 al., 2004; Martelli et al., 2007). O gênero *Foveavirus* compreende somente uma
9 espécie economicamente importante que infecta videira, o *Rupestris stem*
10 *pitting-associated virus* (RSPaV) (Martelli & Jelkmann, 1998). O gênero *Vitivirus*
11 inclui quatro espécies que infectam videiras: *Grapevine virus A* (GVA),
12 *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine virus D* (GVD) e *Grapevine virus E* (GVE)
13 (Martelli et al., 1997; Nakaune et al., 2008). O RSPaV é o mais freqüente e
14 importante componente do lenho rugoso da videira na Itália (Credi, 1997),
15 assim como provavelmente também ocorre no restante dos países vitícolas.
16 Juntamente com o GVA e o GVB, estes formam o complexo do lenho rugoso,
17 doença caracterizada por anomalias no lenho, como intumescimento, caneluras
18 e fendilhamento cortical.

19 Diversas técnicas têm sido implementadas para detecção e
20 diferenciação de isolados virais, como RT-PCR, imunocaptura (IC)-RT-PCR e
21 multiplex RT-PCR. Embora estas técnicas possam detectar baixo título viral,
22 elas não são quantitativas (Saponari et al., 2008). Ultimamente, uma inovação
23 tecnológica resultante da PCR, denominada de PCR em tempo real, vem
24 ganhando espaço nos diagnósticos, por apresentar capacidade de gerar
25 resultados quantitativos. Essa técnica permite o acompanhamento da reação e

1 a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida, em relação a
2 PCR convencional (Novais & Pires-Alves, 2004).

3 A PCR em tempo real realiza a quantificação dos ácidos nucleicos de
4 maneira precisa e com maior reprodutibilidade, pois determina valores durante
5 a fase exponencial da reação. O ponto que detecta o ciclo no qual a reação
6 atinge o limiar da fase exponencial é denominado de “Cycle Threshold” (C_T).
7 Este ponto permite a quantificação exata e reproduzível com base na
8 fluorescência (Novais & Pires-Alves, 2004). A emissão dos compostos
9 fluorescentes (SYBR® Green ou TaqMan®) gera um sinal que aumenta na
10 proporção direta da quantidade de produto da PCR. Sendo assim, os valores
11 da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade
12 de produto amplificado (Novais & Pires-Alves, 2004; Saponari et al., 2008).

13 A sonda TaqMan® é utilizada para detectar seqüências específicas nos
14 fragmentos de DNA amplificados na PCR. Os produtos da reação são
15 detectados pela fluorescência gerada após a atividade exonucleásica 5' → 3' da
16 *Taq* DNA polimerase. Durante a reação, a sonda hibridiza com a seqüência da
17 fita simples de DNA complementar alvo para a amplificação, ocorrendo
18 aumento da fluorescência (Heid et al, 1996). A reação com a TaqMan é
19 considerada um método sensível para determinar a presença ou ausência de
20 seqüências específicas (Holland et al., 1991).

21 O objetivo deste estudo foi detectar vírus dos gêneros *Closterovirus*
22 (GLRaV-2), *Ampelovirus* (GLRaV-1 e GLRaV-3), *Foveavirus* (RSPaV) e
23 *Vitivirus* (GVA e GVB) através de RT-PCR em tempo real TaqMan®.

24
25

1 **Material e Métodos**

2 **Isolados virais.** Os isolados virais foram obtidos do campo experimental do
3 “Istituto Agronomico Mediterraneo” – Valenzano, Itália, de diferentes
4 procedências e videiras mantidas em casas de vegetação da Università Degli
5 Studi di Bari – Bari, Itália. Duas plantas herbáceas (*Nicotiana occidentalis* e *N.*
6 *benthamiana*) também foram utilizadas, previamente inoculadas com GVB e
7 GLRaV-2, respectivamente (Tabela 1). Como controle negativo utilizou-se
8 videira sadia proveniente de cultura de tecidos.

9 **Extração de RNA total.** A extração de RNA total, a partir de 100 mg de
10 fragmentos de folhas de videiras e herbáceas infectadas com RSPaV, GVA,
11 GVB, GLRaV-1, GLRaV-2 ou GLRaV-3, foi realizada utilizando-se o kit
12 "RNeasy Plant Mini" (Qiagen), triturando-se o tecido vegetal em tampão de
13 extração, seguindo as instruções do fabricante.

14 **Síntese de cDNA.** A reação de síntese de cDNA constituiu-se, para todas as
15 amostras, de: 7 µl de RNA total, 21 µl de água e 2 µl de oligonucleotídeo
16 randômico (10 µM). A mistura foi incubada por 3 minutos a 95 °C e 5 minutos
17 no gelo. Posteriormente, foram acrescentados 4,7 µl de água, 10 µl de tampão
18 da enzima MMLV 5X, 2 µl de DTT (0,1 M), 2,5 µl de dNTPs (2,5 mM) e 0,8 µl
19 de transcriptase reversa MMLV (200 U/µl), totalizando 50 µl. A mistura foi
20 incubada a 42 °C por uma hora e a 70 °C por 10 minutos.

21 **Desenho das Sondas TaqMan® e dos oligonucleotídeos.** Para o desenho
22 das sondas TaqMan® utilizou-se o programa Primer Express 3.0 (Applied
23 Biosystems) de acordo com alinhamentos múltiplos das regiões mais
24 conservadas da Replicase e HSP70, dos gêneros *Closterovirus* (GLRaV-2) e
25 *Ampelovirus* (GLRaV-1 e GLRaV-3); *Foveavirus* (RSPaV) e *Vitivirus* (GVA e

1 GVB), respectivamente (Tabela 2). Utilizou-se primeiramente os programas
2 ClustalX e GeneDoc para alinhamentos múltiplos. Os oligonucleotídeos
3 degenerados foram desenhados a partir das sequências mais conservadas das
4 regiões da HSP70 e Replicase das famílias *Closteroviridae* e *Flexiviridae*,
5 respectivamente (Tabela 2).

6 **PCR em tempo real.** Para as reações de PCR foram preparadas para cada
7 amostra 12,5 µL da seguinte mistura: 1,25 µl de tampão da enzima 10 X, 0,75
8 µl de MgCl₂ (1,5 mM), 0,5 µl de dNTPs (2,5 mM), 0,15 µl de Taq DNA
9 Polimerase (5 U/µl), 1,5 µl de cada oligonucleotídeo degenerado (10 µM), 0,5
10 µl de sonda TaqMan® específica para cada vírus, 1,5 µL de cDNA, sendo o
11 volume final completado com água esterilizada. As reações foram colocadas
12 em placas para PCR e levadas ao termociclador (iQ5 Real-Time PCR Detection
13 System - Biorad) por 5 minutos a 95 °C, seguidos de 40 ciclos a 95 °C por 30
14 segundos e 50 °C por 1 minuto.

15 Em multiplex RT-PCR para *Closteroviridae*, adicionou-se às mesmas
16 quantidades de reagentes mencionados, porém com as sondas LR1 e LR3, os
17 oligonucleotídeos CLI up e CLI dwn e adição de dois cDNAs (GLRaV-1 e
18 GLRaV-3) na mesma reação (Tabela 3). O mesmo foi feito para *Flexiviridae*,
19 com as sondas GVA, GVB e RSPaV, os oligonucleotídeos Kat up e Kat dwn e
20 um mix de cDNA para os três vírus mencionados (Tabela 5).

21 Após o monitoramento da PCR em tempo real, utilizou-se um software
22 (Biorad) para aquisição dos dados e análise final da reação. O arquivo gerado
23 foi analisado com base nos fluoróforos específico para cada vírus, em um
24 comprimento de onda específico. Os sistemas de detecção da PCR em tempo

1 real utilizam estas moléculas que proporcionam o acompanhamento da reação
2 ao longo dos ciclos.

3 **Resultados e Discussão**

4 **Família *Closteroviridae***

5 Nas reações de multiplex RT-PCR TaqMan® foram utilizados os
6 oligonucleotídeos degenerados para GLRaV-1 e GLRaV-3 em conjunto com as
7 sondas específicas para cada vírus, ambos desenhados para este trabalho,
8 possibilitando a curva de amplificação (C_T) (Figuras 1 e 2). Para detecção de
9 GLRaV-1, na análise com o fluoróforo FAM, pode-se observar a curva de
10 amplificação nos isolados específicos com GLRaV-1 (23,5 e 26,5) como
11 também em conjunto com o GLRaV-3 (25,6 e 27,8) (Figura 1, Tabela 3). Para o
12 GLRaV-3, analisado com o fluoróforo TET, demonstrou-se a curva de
13 amplificação nos isolados específicos (28,3 e 29,5) e em conjunto com GLRaV-
14 1 somente em uma reação (27,3) (Figura 2, Tabela 3). Na segunda reação de
15 multiplex não houve amplificação (N/A) quando analisado em conjunto com
16 GLRaV-1. Não houve reação nas análises com fluoróforos não específicos para
17 cada vírus, demonstrando a especificidade do teste, como também não houve
18 reação com os controles negativos em ambas as análises (Figuras 1 e 2;
19 Tabela 3).

20 Para detecção de GLRaV-2 (fluoróforo Cy5), pode-se observar a curva
21 de amplificação nos isolados testados, que variou de 26,7 a 29,49 (Figura 3;
22 Tabela 4). Em *N. benthamiana*, previamente inoculada com GLRaV-2,
23 observou-se alta concentração de vírus, resultando em uma C_T de 20,04
24 (Figura 3; Tabela 4). Na cultivar Semillon não foi detectado GLRaV-2, o que já

1 era esperado, devido ao fato desta cultivar apresentar sintomas decorrentes de
2 GVB (Figura 3; Tabela 4).

3 Osman et al. (2007) realizaram ensaios com RT-PCR em tempo real
4 (TaqMan®) desenvolvidos para a detecção específica dos vírus associados ao
5 enrolamento da folha da videira 1-5 e 9 (GLRaV-1-5 e -9). No experimento
6 foram avaliados uma vasta gama de isolados com ampla distribuição
7 geográfica, incluindo África do Sul, Europa, Austrália, Ásia, América Latina e os
8 Estados Unidos. Para o desenho das sondas TaqMan® e dos
9 oligonucleotídeos, as seqüências foram alinhadas acima das regiões mais
10 conservadas dos isolados geograficamente distintos, visando as regiões com
11 seqüência com 100% de identidade. Os experimentos com RT-PCR TaqMan®
12 em tempos real foram comparados a RT-PCR convencionais para a detecção
13 dos vírus usando o RNA total purificado, bem como extrato bruto de planta. Os
14 dados mostraram que quando usaram o RNA total extraído pelo método
15 Qiagen RNeasy mais isolados foram detectados em comparação com o extrato
16 bruto de planta. Demonstraram ainda a alta especificidade e sensibilidade do
17 teste quando comparado com a PCR convencional para testar diferentes
18 isolados destes vírus que usam o RNA ou o extrato de tecido bruto.

19 **Família *Flexiviridae***

20 Nas reações de multiplex RT-PCR TaqMan® foram utilizados os
21 oligonucleotídeos degenerados para GVA, GVB e RSPaV, em conjunto com as
22 sondas específicas para cada vírus, ambos desenhados para este trabalho. Na
23 primeira reação, com a adição de um mix de cDNA para os três vírus,
24 observou-se uma maior concentração de vírus nas plantas quando comparada
25 com a segunda reação, para todos os vírus e todos os fluoróforos analisados,

1 onde a curva de amplificação foi mais baixa, embora tenha ocorrido reação
2 (Figuras 4, 5 e 6; Tabela 5).

3 Para detecção de GVA, com o fluoróforo TET, observou-se uma C_T de
4 19,32 na primeira reação de multiplex RT-PCR TaqMan® e 22, 71 na segunda
5 reação (Figura 4), e não houve reação com os outros fluoróforos (Tabela 5).
6 Com isso pode-se afirmar a presença de GVA em ambos os isolados (AA5 e
7 AA8) demonstrando que a PCR em tempo real é uma ótima ferramenta para
8 detecção e quantificação de vírus em plantas.

9 Para detecção de GVB, com o fluoróforo Cy5, observou-se C_T de 16,66
10 na primeira multiplex RT-PCR TaqMan®, demonstrando alta concentração de
11 vírus na planta, devido ao fato desta ser uma herbácea, onde já se sabe que as
12 concentrações de vírus são mais elevadas quando comparadas com plantas
13 lenhosas (Figura 5, Tabela 5). Na segunda multiplex RT-PCR TaqMan®, pode-
14 se observar C_T de 27,00, porém a curva de amplificação é muito baixa (Figura
15 5), podendo o vírus estar presente, mas em baixa concentração na planta, pois
16 há diferença de amplificação quando comparado com videira sadia (Figura 5).

17 Para detecção de RSPaV, com o fluoróforo FAM, demonstrou-se C_T de
18 24,99 na primeira reação de multiplex RT-PCR TaqMan® e 26,01 na segunda
19 reação (Tabela 5, Figura 6), confirmando a presença do vírus em ambos os
20 isolados e com concentrações diferentes (Figura 6).

21 Osman & Rowhani (2008) utilizaram a RT-PCR em tempo real
22 (TaqMan®) para detecção dos vírus associados ao Complexo Rugoso da
23 videira. Os vírus detectados foram RSPaV (*Foveavirus*), GVA, GVB e GVD
24 (*Vitivirus*). Para o desenho das sondas e dos oligonucleotídeos foram feitos
25 alinhamentos múltiplos da região conservada da proteína capsidial de vários

1 isolados de cada vírus. Comparações foram feitas entre RT-PCR convencional
2 e RT-PCR TaqMan® para a detecção destes vírus usando diluições em série
3 de RNA purificado e de extrato preparados de folhas. Os resultados mostraram
4 que RT-PCR TaqMan® é mais sensível e pode-se detectar vírus mesmo em
5 diluições mais elevadas para o RNA purificado e o extrato quando comparados
6 a RT-PCR convencional.

7 Um grande número de variedades de videiras infectadas com os
8 diferentes vírus e de origens geográficas diversas foram usados como fontes
9 de vírus para a avaliação de RT-PCR e de RT-PCR TaqMan®. Estas plantas
10 foram contaminadas com RSPaV, GVA e GVB ou uma combinação de mais de
11 uma (dados não mostrados). As plantas não foram previamente testadas para
12 GVD. Nos testes das amostras com RSPaV, os autores compararam os
13 resultados de RT-PCR TaqMan® com RT-PCR convencional usando os
14 oligonucleotídeos 48F/49R e revelaram que RT-PCR TaqMan® pode detectar
15 mais isolados do vírus (85% em RT-PCR TaqMan® comparado a 80% em RT-
16 PCR). Resultados similares foram obtidos para o GVA (72% e 62%), GVB (74%
17 e 40%), e GVD (40% e 20%) quando testados por RT-PCR TaqMan® e RT-
18 PCR, respectivamente.

19 Em resumo, RT-PCR TaqMan® é um método de diagnóstico molecular
20 rápido, quantitativo, confiável, muito sensível, fácil de executar e aplicável para
21 testar um grande número de amostras, bem como detectar diversos vírus na
22 mesma reação através da multiplex RT-PCR.

23 Com isso, pode-se afirmar que a PCR em tempo real é uma ótima
24 ferramenta para detecção e quantificação de vírus em videira.

25
26

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche à primeira autora. Ao “Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata e Istituto di Virologia Vegetale del CNR” pelo suporte de pesquisa.

Referências

Adams MJ, Antoniw JF, Bar-Joseph M, Brunt AA, Candresse T, Foster GD, Martelli GP, Milne RG, Fauquet CM (2004) The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology* 149:1045–1060.

Credi R (1997) Characterization of grapevine rugose wood disease sources from Italy. *Plant Disease* 82:1288-1292.

Fajardo TVM, Kuhn GB, Nickel O (2003) Doenças virais. In: Fajardo, T.V.M. (Ed.). *Uva para processamento - Fitossanidade. Série Frutas do Brasil 35*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. pp.45-62.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6 (10):986-994.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 88:7276-7280.

Kokkinos CD, Clark CA (2006) Real-Time PCR Assays for Detection and Quantification of Sweetpotato Viruses. *Plant Disease* 90:783-788.

1 Kuhn G B (1989) Identificação, incidência e controle do vírus do enrolamento
2 da folha da videira no Estado do Rio Grande do Sul. *Fitopatologia Brasileira*
3 14:220-226.
4

5 Kuhn GB (1992) Principais vírus e doenças consideradas de origem viral que
6 ocorrem nos vinhedos do Rio Grande do Sul. Circular Técnica 16. Bento
7 Gonçalves. CNPUV.
8

9 Martelli GP, Adams MJ, Kreuze JF, Dolja VV (2007) Family Flexiviridae: a case
10 study in virion and genome plasticity. *Annual Review Phytopathology* 45:73–
11 100.
12

13 Martelli GP, Boudon-Padieu E. (Eds.) (2006) Directory of infectious diseases of
14 grapevines and viruses and virus-like diseases of the grapevine: bibliographic
15 report 1998-2004. CIHEAM-IAMB. *Options Méditerranéennes*, n55.
16

17 Martelli GP, Jelkmann, W (1998) *Foveavirus*, a new plant virus genus. *Archives*
18 *of Virology* 143:1245–1249.
19 Martelli GP, Minafra A, Saldarelli P (1997) *Vitivirus*, a new genus of plant
20 viruses. *Archives of Virology* 142:1929-1932.
21

22 Nakaune R, Inoue K, Nasu H, Kakogawa K, Nitta H, Imada J, Nakano M (2008)
23 Detection of viruses associated with rugose wood in Japanese grapevines and
24 analysis of genomic variability of *Rupestris stem pitting-associated virus*.
25 *Journal of General Plant Pathology* 74:156–163.
26

27 Novais C M, Pires-Alves, M (2004) PCR em tempo real. *Biotecnologia Ciência e*
28 *Desenvolvimento* 33:10-13.
29

30 Osman F, Leutenegger C, Golino D, Rowhani A (2007) Real-time RT-PCR
31 (TaqMan®) assays for the detection of *Grapevine Leafroll associated viruses* 1–
32 5 and 9. *Journal of Virological Methods* 141:22–29.
33

- 1 Osman F, Rowhani A (2008) Real-time RT-PCR (TaqMan®) assays for the
- 2 detection of viruses associated with Rugose wood complex of grapevine.
- 3 Journal of Virological Methods 154:69–75.
- 4
- 5 Saponari M, Manjunath K, Yokomi RK (2008) Quantitative detection of *Citrus*
- 6 *tristeza virus* in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR
- 7 (TaqMan). Journal of Virological Methods 147:43-53.

Tabela 1. Relação dos isolados virais utilizados no trabalho, suas origens e os vírus detectados por RT-PCR TaqMan® no presente estudo

Isolado ou hospedeiro	Procedência	Vírus detectados por PCR em tempo real					
		GVA	GVB	RSPaV	GLRaV-1	GLRaV-2	GLRaV-3
H8	Hungria			+			
H29	Hungria						+
H17	Hungria						+
AA5	Albânia	+					
AA8	Albânia	+					
MP13	Itália		+				
SY	Itália			+			
Greco	Itália				+		
GC2	Grécia				+		
Semillon	Itália						-
Cardinal	Itália						+
Matilde	Itália						+
Red Globe	Itália						+
<i>Nicotiana occidentalis</i>	Casa de vegetação, Bari-Itália		+				
<i>N. benthamiana</i>	Casa de vegetação, Bari-Itália						+

Tabela 2. Relação das sondas e dos oligonucleotídeos utilizados para as amplificações dos isolados virais por RT-PCR TaqMan®

.Vírus	Sondas	Seqüência 5'- 3'	Fragmento (bp)	Localização
GLRaV-1	LR1-TAQ	[6FAM] YGAATTCTCCGTTCCGTTCCWACGCAG		HSP70
GLRaV-2	LR2-TAQ	[CY5] CSGCGTACATCCCSACKTAYCTCTAYCTYT	560	HSP70
GLRaV-3	LR3MGB	[TET] CTTTTCMCCATCTGGG		HSP70
GVA	GVA MGB	[TET] TGGCCBGAGGATWT		Replicase
GVB	GVBtqp	[CY5] AACTGATCTTGACAAATGGTGTA	330	Replicase
RSPaV	RSP-TAQ	[6FAM] CAACATGCTGTTCTGGTTCGCTTTGC		Replicase
Família	oligonucleotídeos degenerados	Seqüência 5'- 3'		Localização
<i>Closteroviridae</i>	CLI up	GGITTIGAITTYGGIACIAC	560	HSP70
	CLI dwn	RTCIAAIGTICCCICCCRAA		HSP70
<i>Flexiviridae</i>	Kat up	WGCIARGCIGGICARAC	330	Replicase
	Kat dwn	RMYTCICCSWRAAICKCAT		Replicase

Tabela 3. Isolados e/ou cultivar testados por multiplex RT-PCR (TaqMan®) para GLRaV-1 e GLRaV-3

Amostra	Isolado ou hospedeiro	Conteúdo	Vírus	Fluoróforo	C _T
A	Planta sadia	C-	-	FAM	N/A*
B	Greco	C+	GLRaV-1	FAM	23,5
C	GC2	C+	GLRaV-1	FAM	26,5
D	Greco+H29	C+	GLRaV-1 e 3	FAM	25,6
E	GC2+H17	C+	GLRaV-1 e 3	FAM	27,8
F	H29	C+	GLRaV-3	FAM	N/A
G	H17	C+	GLRaV-3	FAM	N/A
H	-	Água	-	TET	N/A
A	Planta sadia	C-	-	TET	N/A
B	Greco	C+	GLRaV-1	TET	N/A
C	GC2	C+	GLRaV-1	TET	N/A
D	Greco+H29	C+	GLRaV-1 e 3	TET	27,3
E	GC2+H17	C+	GLRaV-1 e 3	TET	N/A
F	H29	C+	GLRaV-3	TET	28,3
G	H17	C+	GLRaV-3	TET	29,5
H	-	Água	-	TET	N/A

* N/A: não amplificou

Tabela 4. Hospedeiros testados para GLRaV-2 através de RT-PCR (TaqMan®)

Amostra	Hospedeiro	Conteúdo	Vírus	Fluoróforo	C _T
A	Planta sadia	C-	-	Cy5	N/A
B	Cardinal	C+	GLRaV-2	Cy5	29,49
C	Matilde	C+	GLRaV-2	Cy5	29,41
D	Red Globe	C+	GLRaV-2	Cy5	26,70
E	Semillon	C+	GVB	Cy5	N/A
F	<i>N. benthamiana</i>	C+	GLRaV-2	Cy5	20,04
G	-	Água	-	Cy5	N/A

Tabela 5. Isolados e hospedeiros testados por multiplex RT-PCR (TaqMan®) para GVA, GVB e RSPaV.

Amostra	Isolado ou hospedeiro	Conteúdo	Vírus	Fluoróforos	(C _T)		
					TET (GVA)	Cy5 (GVB)	FAM (RSPaV)
A	Planta sadia	C-	-	-	N/A	N/A	N/A
B	<i>N. occidentalis</i>	C+	GVA	TET	19,32	16,66	24,99
			GVB	Cy5			
C	MP13	C+	RSPaV	FAM	22,71	27,00	26,01
			GVA	TET			
D	SY	C+	GVB	Cy5	22,71	27,00	26,01
			RSPaV	FAM			
D	-	Água	-	-	N/A	N/A	N/A

Família *Closteroviridae*

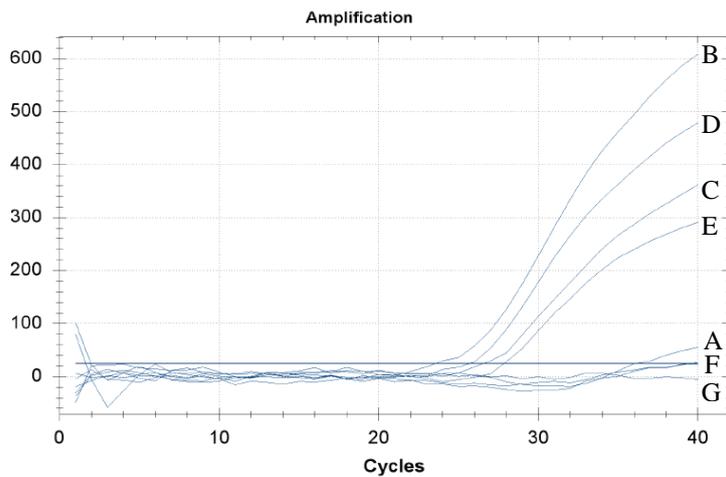


Figura 1. Análise de RT-PCR TaqMan® com fluoróforo FAM para detecção de GLRaV-1, com as devidas curvas de amplificação (C_T).

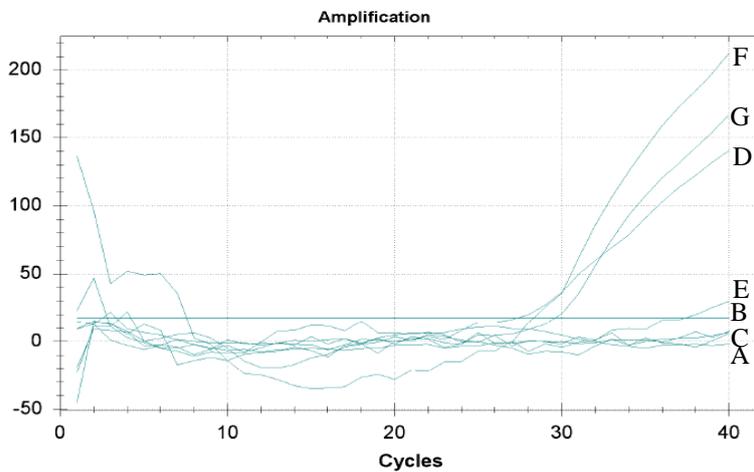


Figura 2. Análise de RT-PCR TaqMan® com fluoróforo TET para detecção de GLRaV-3, com as devidas curvas de amplificação (C_T).

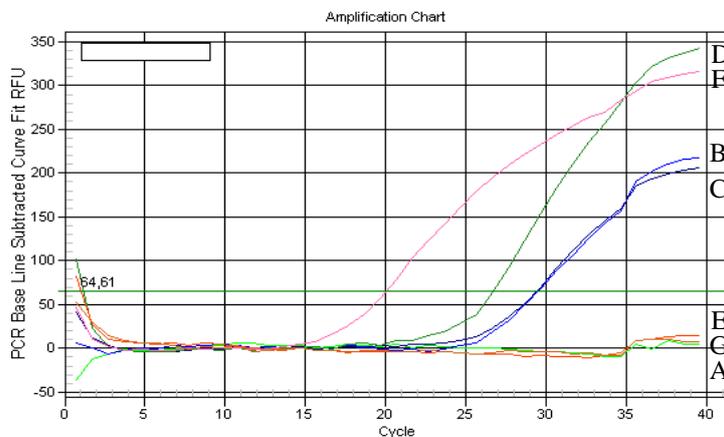


Figura 3. Análise de RT-PCR TaqMan® com fluoróforo Cy5 para detecção de GLRaV-2.

Família *Flexiviridae*

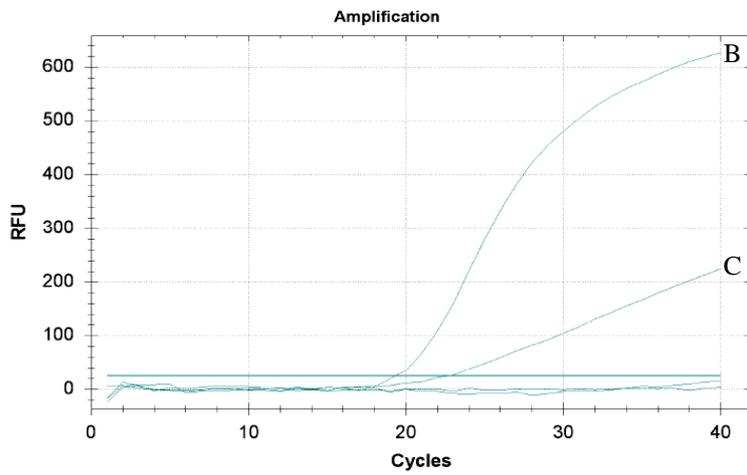


Figura 4. Análise de RT-PCR TaqMan® com fluoróforo TET para detecção de GVA.

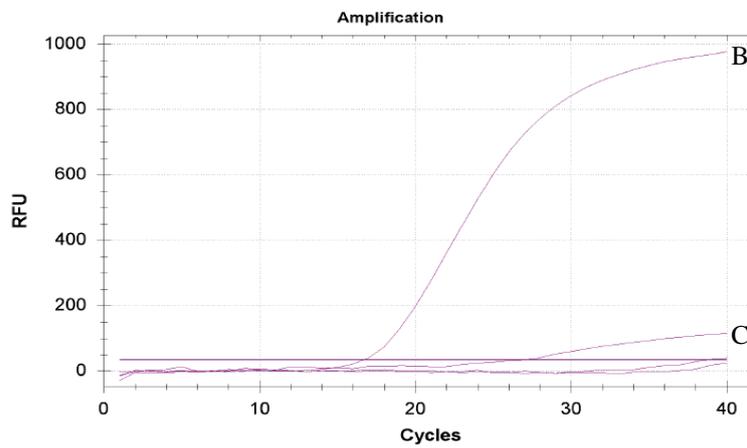


Figura 5. Análise RT-PCR TaqMan® com fluoróforo Cy5 para detecção de GVB.

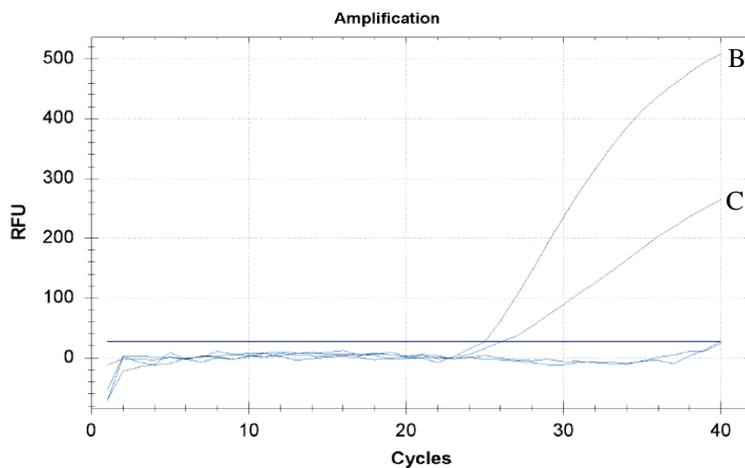


Figura 6. Análise de RT-PCR TaqMan® com fluoróforo FAM para detecção de RSPaV.

CONCLUSÕES GERAIS

1. A caracterização molecular baseada no gene da CP, revelou existir variabilidade genética entre os isolados de RSPaV, GLRaV-2 e GFLV, permitindo a definição de grupos distintos entre os isolados.
2. A definição da variabilidade existente entre isolados locais dessas três espécies virais auxiliaram para uma posterior implementação de métodos de diagnose mais precisos e sensíveis para as viroses causadas por esses vírus.
3. Visando à produção de anti-soros, a expressão dos genes da CP de GLRaV-2 e GVB em bactérias foi capaz de produzir grandes quantidades de antígenos, superando os inconvenientes da purificação desses vírus via tecido infectado, assim como a contaminação dos antígenos com proteínas da planta.
4. Os anti-soros produzidos contra isolados específicos de GLRaV-2 e de GVB podem detectar diferentes isolados destes vírus por ELISA indireto.
5. A disponibilidade de anti-soros de GLRaV-2 e de GVB com sensibilidade e especificidade elevadas, tal como as obtidas neste estudo, possibilitam uma identificação confiável desses vírus.
6. A RT-PCR em tempo real é uma excelente ferramenta para detecção e quantificação de vírus em videira.
7. Foi possível, através de RT-PCR em tempo real, detectar a presença dos vírus da família *Flexiviridae* em reações múltiplas, bem como a concentração de vírus nas plantas infectadas.