

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANIDADE

MARCOS FERNANDO BASSO

DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS SOROLÓGICAS E MOLECULARES PARA
IDENTIFICAÇÃO DE VÍRUS EM VIDEIRAS E COCHONILHAS, ALTERAÇÕES
FISIOLÓGICAS E NA QUALIDADE ENOLÓGICA DA UVA DE VIDEIRAS
INFECTADAS

PONTA GROSSA

2010

MARCOS FERNANDO BASSO

DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS SOROLÓGICAS E MOLECULARES PARA
IDENTIFICAÇÃO DE VÍRUS EM VIDEIRAS E COCHONILHAS E ALTERAÇÕES
FISIOLÓGICAS E NA QUALIDADE ENOLÓGICA DA UVA DE VIDEIRAS
INFECTADAS

Dissertação apresentada para obtenção do título de
mestre em Agronomia na Universidade Estadual de
Ponta Grossa, Área de concentração: Agricultura.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub

Co-orientadores: Dra. Carolina Weigert Galvão

Dr. Thor Vinícius Martins Fajardo

PONTA GROSSA

2010

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

B322d Basso, Marcos Fernando
Desenvolvimento de ferramentas sorológicas e moleculares para identificação de vírus em videiras e cochonilhas e alterações fisiológicas e na qualidade enológica da uva de videiras infectadas./ Marcos Fernando Basso. Ponta Grossa, 2010.
114f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de concentração : Agricultura), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub

Co-orientadores : Dra. Carolina Weigert Galvão

Dr. Thor Vinícius Martins Fajardo

1. *Vitis*. 2. Diagnose. 3. Variabilidade. 4. Sorologia. 5. Qualidade da uva. I. Ayub, Ricardo Antonio. II. Galvão, Carolina Weigert. III. Fajardo, Thor Vinícius Martins. IV. T

CDD : 634.8



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
COORDENAÇÃO DO CURSO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação: "DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS SOROLÓGICAS E MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DE VÍRUS EM VIDEIRA E COCHONILHAS, ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E NA QUALIDADE ENOLÓGICA DE UVA DE VIDEIRAS INFECTADAS".

Nome: Marcos Fernando Basso

Orientador: Ricardo Antonio Ayub

Aprovado pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub



Prof. Dr. Francisco Murilo Zerbini



Dr. Thor Vinicius Martins Fajardo

Data da Realização: 06 de julho de 2010.

“Pouca Ciência torna os homens orgulhosos, muita Ciência torna-os humildes. Assim, como as espigas vazias elevam a cabeça soberba, as cheias inclinam-se humildemente para a terra”. (Anônimo)

“O mundo precisa de pessoas mais simples e transparentes, que trabalhem para realizar seus projetos de vida e não para impressionar os outros”. (Roberto Shinyashiki)

“Prefiro morrer como homem, a que me acovardar por de trás de uma conquista sem ter lutado por ela”. (Autor desconhecido)

Dedico este trabalho aos meus pais, Irineu e Delvina Giacomini Basso pela confiança, compreensão, amor e principalmente pelo apoio para que meus objetivos se tornassem realidade. Ao Dr. Thor V. M. Fajardo, pela excelente co-orientação, pela confiança e pela oportunidade do desenvolvimento do trabalho e do aprendizado. A essas pessoas, dedico e agradeço, o sucesso deste trabalho é graças a vocês.

Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, por iluminar e guiar minha vida, aos meus pais pelo apoio, incentivo e incansável disposição e aos meus irmãos: Marcelo, Márcia e Maurício pela amizade.

Ao Faustino e Tiago Fresqui e a Larissa Basso, pela amizade e alegria de sempre.

Aos professores Dr. Ricardo Antonio Ayub e Dra. Carolina Weigert Galvão pela orientação na parte acadêmica.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade e a coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, em especial, ao Prof. Dr. David S. J. Filho.

Em especial, ao Dr. Thor V. M. Fajardo pela excelente co-orientação em todo o trabalho teórico e prático, pela confiança e oportunidade, pela amizade, dedicação, disponibilidade e, principalmente, pelo exemplo de profissional. Ao Marcos Fernando Vanni, pelos valiosos ensinamentos, auxílio no desenvolvimento dos trabalhos e acima de tudo por sua atenção e amizade.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Uva e Vinho) por permitir e auxiliar no desenvolvimento deste trabalho em seus laboratórios e vinhedos experimentais.

Ao Dr. Marcelo Eiras pelo auxílio nos trabalhos, incentivo, pelos valiosos conselhos e amizade.

À Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos doutores Osmar Nickel, Henrique P. dos Santos, Celito C. Guerra e Marcos Botton, pela amizade, incentivo e auxílio na condução dos trabalhos.

Aos técnicos da Embrapa: Vanessa Buffon, Celso G. R. Oliveira, Gisele E. Perissutti, Daniel A. Souza, Heitor Corbelini, Fabrício A. B. Barbosa, Ronaldo A. Regla e Roque A. Zílio pelo auxílio, amizade e motivação em contribuir.

Aos amigos que tornaram as horas de trabalho muito mais agradáveis: Fabiana de Souza, Sheila Montipó, Jakeline K. Poppe, Norma M. da Silva, Fernando Gomes, Catherine Ribeiro, Maiara Good, Rafael M. Etto, Fernanda Almeida, Isabel Stets, Marcelo Sozim, Mariane Gioppo, Tânia Eidan, Jaciara Gonçalves, Mario Naldoni, Thiago Senne, Diogo Manzano, Leonardo Cury e Clever Briedis.

Aos colegas da Pousada Embrapa: Daniel Bernardi, Marcelo Zart, Leonardo Ferrari, Tatiane Storch, Cindy Chaves, Natalia Pungillo, Ednaldo, Aline, Renata, Ruben e Cintia, pela amizade.

Aos professores e bons amigos: Dr. Francisco M. Zerbini Júnior, Dr. Vera Quecini, Dr. Marco A. Dalbó, Dr. Luiz A. Biasi, Dr. César M. Baratto, Dra. Jane M. L. N. Gelinski, Dr. Guilherme Schnell e Schühli, Dr. Marcos Gonçalves, Dr. Alexandre Levi, Prof. Vinícius Caliarí e Leandro Crestani pelos bons conselhos, amizade e ensinamentos.

A Vinícola Salton e ao Eng. Agrônomo Agliberto Bianchi pela disponibilização de seus vinhedos para condução de parte do trabalho experimental.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Meu sincero agradecimento!

RESUMO

A videira (*Vitis* spp.), por ser propagada vegetativamente, facilita a disseminação dos vírus. O objetivo do Capítulo I foi identificar e caracterizar molecularmente os vírus presentes em dois vinhedos antigos: um da cv. Cabernet Sauvignon (CS) (*Vitis vinifera*) de 1995 e outro da cv. Isabel (*V. labrusca*) de 1971 além de detectar sorologicamente tais isolados. Foram amplificados, por RT-PCR, fragmentos que compreendem genes virais completos ou parciais, utilizando-se 17 pares de oligonucleotídeos específicos para a detecção dos seguintes vírus: *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine virus D* (GVD), *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Grapevine chrome mosaic virus* (GCMV), *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV), *Grapevine leafroll-associated virus 1 a 4* (GLRaV-1 a -4), além de oligonucleotídeos degenerados para a família *Betaflexiviridae* e os gêneros *Closterovirus*, *Trichovirus* e *Vitivirus*. Pelo menos um fragmento amplificado, para cada par de oligonucleotídeos, foi clonado e sequenciado, identificando-se sete isolados de RSPaV, três de GLRaV-2 e dois de GLRaV-3. As sequências obtidas e depositadas no GenBank apresentaram identidades superiores a 90% com os respectivos isolados virais do GenBank. Também GVA, GVB e GLRaV-3 foram detectados via RT-PCR, em três de cinco amostras de cochonilhas coletadas em vinhedos de Caxias do Sul (RS) e Petrolina (PE). A variabilidade genética do RSPaV e a indisponibilidade de anti-soro comercial têm dificultado a detecção deste vírus em videiras. No Capítulo II o objetivo foi produzir anti-soro policlonal utilizando a proteína capsidial (CP) recombinante do RSPaV. O gene completo da CP deste vírus foi previamente amplificado, clonado e sequenciado e, posteriormente subclonado em vetor de expressão pRSET-B, sendo o plasmídeo recombinante utilizado para a expressão em *Escherichia coli* BL21:DE3. O rendimento foi de 17,35 µg de CP do RSPaV expressa por ml de cultura, sendo utilizados 2,55 mg para a imunização do coelho. O anti-soro produzido apresentou uma concentração de 1939 µg de IgG/ml, foi capaz de reconhecer a proteína recombinante em *Western blot* e detectar o RSPaV em tecidos infectados de videira em ELISA indireto. De forma geral, os vírus são capazes de induzir desordens na célula vegetal que incluem alterações fotossintéticas e metabólicas, refletindo na qualidade da uva. No Capítulo III estudaram-se as alterações fisiológicas e da qualidade enológica da uva produzida em videiras infectadas com os vírus GLRaV-2 e RSPaV. Foram determinados nas folhas: potencial fotossintético, clorofilas total (*a* e *b*), açúcares solúveis totais e amido. Quanto às variáveis de qualidade da uva, foram observadas diferenças

significativas, em favor das uvas de plantas sadias, em 5 das 6 variáveis. Uvas sadias apresentaram 2,53 (C. Franc, CF) e 2,72 (CS) °Brix a mais do que as infectadas. Para as variáveis relacionadas às alterações fisiológicas foram observadas diferenças significativas, em favor das folhas sadias ou assintomáticas, para quase todas variáveis analisadas, sendo a fotossíntese de saturação 2,9 (CF) e 2,25 (CS) vezes superior em plantas sadias. Estes vírus podem comprometer a produtividade e a qualidade da produção destas cultivares.

Palavras-chave: *Vitis*, diagnose, variabilidade, sorologia, qualidade da uva.

ABSTRACT

The grapevine (*Vitis* spp.) being vegetatively propagated facilitates the spread of viruses. In general, viruses are able to induce disorders in plant cells including photosynthesis and metabolic changes, causing alterations in grape quality. The purpose of Chapter I was to identify and molecularly characterize the viruses present in vector mealybugs in two established vineyards (Rio Grande do Sul, Brazil), one of cv. Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*), cultivated since 1995, and the of cv. Isabel (*V. labrusca*), cultivated since 1971. Plants were checked serologically for six viruses detected. Fragments that comprise complete or partial viral genes were amplified by RT-PCR using 17 pairs of specific primers for detection of the following viruses: *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine virus D* (GVD), *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV), *Grapevine chrome mosaic virus* (GCMV), *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV) and *Grapevine leafroll-associated virus* 1-4 (GLRaV-1 to -4). Degenerate primers were used for detection of *Closterovirus*, *Trichovirus* and *Vitivirus* genera and *Betaflexiviridae* family. For each primer pair at least one amplicon was cloned and sequenced, identifying seven isolates of RSPaV, three isolates of GLRaV-2 and two isolates of GLRaV-3. The obtained sequences (submitted to GenBank) showed identities higher than 90% with the homologous viral isolates from the GenBank. GVA, GVB and GLRaV-3 were detected in three of five samples of mealybugs collected in Caxias do Sul (RS) and Petrolina (PE) vineyards. High genetic variability of RSPaV and unavailability of commercial antiserum have impaired the detection of this virus in grapevines. In Chapter II the objective was to produce polyclonal antiserum against the recombinant coat protein (CP) of RSPaV. The complete CP gene of this virus was amplified, cloned, sequenced and subcloned into

expression vector pRSET-B, and the recombinant plasmid was used for expression in *Escherichia coli* cells (strain BL21:DE3). The yield of RSPaV CP, expressed per ml of culture, was 17.35 µg for rabbit immunization 2.55 mg were used. The antiserum showed a concentration of 1939 µg IgG/ml which was able to recognize the recombinant protein in Western blot and detect RSPaV in grapevine infected tissues using the indirect ELISA technique. In Chapter III physiological alterations of plant and enological quality changes of the grapes from infected grapevines GLRaV-2 and RSPaV infected were studied. For these evaluations the photosynthetic potential, total chlorophyll (*a* and *b*), total soluble sugars and starch were determined in leaves. Healthy or asymptomatic leaves showed favourable values for almost all characteristics. The saturation photosynthesis was 2.9 (C. Franc) and 2.25 (C. Sauvignon) times higher in healthy than in infected grapevines. Considering the grape quality significant differences between grapes from infected and non-infected grapevine were also observed in five from six characteristics studied. Healthy grapes showed 17.88 (cv. C. Franc) and 16.10 (cv. C. Sauvignon) °Brix values while infected showed 15.35 and 13.38, respectively. Therefore, these viruses can damage the productivity and quality production of these grape cultivars.

Key-words: *Vitis*, diagnosis, variability, serology, quality of grapes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I:

Figura 1 - Sintomas de infecção viral nas folhas e no tronco/porta-enxerto em videira cv. Cabernet Sauvignon e ausência de sintomas de infecção viral na cv. Isabel. Início do ciclo vegetativo (estacas propagadas em casa de vegetação provenientes das plantas avaliadas neste trabalho), meio e final do ciclo vegetativo (aspecto das folhas, tronco e ramos das mesmas plantas a campo). 12

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos da RT-PCR. Géis: (A) RSPaV-SY (SY9F/SY8R); (B) RSPaV (RSPaV_v1/RSPaV_c1); (C) Closterovirus (HSP-P1/HSP-P2); (D) Tricho/Vitivirus (dPR1_v/dPR2_c); (E): Betaflexiviridae (dRW up1/dRW do2); (F) RSPaV (RSP2/RSP21), GLRaV-2 (V2CPf/V2CPr2), GLRaV-3 (LR3 8504/LR3 9445); (G) RSPaV (RSP2/RSP21), GLRaV-2 (V2CPf/V2CPr2), GLRaV-3 (LR3 8504/LR3 9445). M: marcador DNA λ /PstI, SD: planta sadia, CS1 e CS2: plantas cv. Cabernet Sauvignon, IS1, IS2 e IS3: plantas cv. Isabel. 23

Figura 3 - Árvore filogenética por parcimônia, não enraizada, obtida com o software MEGA 4.1, baseada nas sequências de nucleotídeos do gene da proteína capsidial (780 pb) dos isolados de *Rupestris stem pitting-associated virus*. Valores percentuais de “bootstrap” são mostrados nos ramos. As barras indicam número de substituições de nucleotídeos por sítio (50 = 0,05). Códigos dos nucleotídeos dos isolados no GenBank e país: RSPaV (AF026278, EUA), RSPaV-1 (NC_001948, EUA), SG1 (AY881626, EUA), BS (AY881627, Canadá), SY (AY368590, EUA), PN (AY368172, EUA), CS1 (GU166290, Brasil), IS2a (GU166289, Brasil), CF207 (EF636804, Brasil) e RSP-SP (DQ443732, Brasil). Para o grupo externo da árvore foi utilizado a espécie tipo do gênero: *Apple stem pitting virus* (ASPV, *Foveavirus*, NC_003462). 26

Figura 4 - Árvore filogenética por parcimônia, não enraizada, obtida com o software MEGA 4.1, baseada nas sequências parciais de nucleotídeos do gene (339 pb) da proteína replicase de isolados de *Rupestris stem pitting-associated virus*. Valores percentuais de “bootstrap” são mostrados nos ramos. As barras indicam número de substituições de nucleotídeos por sítio (10 = 0,01). Códigos dos nucleotídeos dos isolados no GenBank e país: RSPaV (AF026278, EUA), RSPaV-1 (NC_001948, EUA), SG1 (AY881626, EUA), BS (AY881627, Canadá), SY (AY368590, EUA), PN (AY368172, EUA), CS2b (HM059038, Brasil), Hai1 (AB277787, Japão), IS2b (HM358051, Brasil). Para o grupo externo da árvore foi utilizado a espécie tipo do gênero: *Apple stem pitting virus* (ASPV, *Foveavirus*, NC_003462). 28

Figura 5 - Árvore filogenética por parcimônia, não enraizada, obtida com o software MEGA 4.1, baseada nas sequências parciais de nucleotídeos do gene (831 pb) da proteína replicase dos isolados de *Rupestris stem pitting-associated virus*. Valores percentuais de “bootstrap” são mostrados nos ramos. As barras indicam número de substituições de nucleotídeos por sítio (50 = 0,05). Códigos dos nucleotídeos dos isolados no GenBank e país: RSPaV (AF026278, EUA), RSPaV-1 (NC_001948, EUA), SG1 (AY881626, EUA), BS (AY881627, Canadá), SY (AY368590, EUA), PN (AY368172, EUA), CS2a (HM059036, Brasil), IS1 (HM059037, Brasil). Para o grupo externo da árvore foi utilizado a espécie tipo do gênero: *Apple stem pitting virus* (ASPV, *Foveavirus*, NC_003462)..... 30

Figura 6 - Árvore filogenética por parcimônia, não enraizada, obtida com o software MEGA 4.1, baseada nas sequências parciais de nucleotídeos do gene (628 pb) da proteína replicase dos isolados de *Rupestris stem pitting-associated virus*. Valores percentuais de “bootstrap” são mostrados nos ramos. As barras indicam número de substituições de nucleotídeos por sítio (20 = 0,02). Códigos dos nucleotídeos dos isolados no GenBank e país: RSPaV (AF026278, EUA), RSPaV-1 (NC_001948, EUA), SG1 (AY881626, EUA), BS (AY881627, Canadá), SY (AY368590, EUA), PN (AY368172, EUA), IS3 (HM130524, Brasil). Para o grupo externo da árvore foi utilizado a espécie tipo do gênero: *Apple stem pitting virus* (ASPV, *Foveavirus*, NC_003462). 32

Figura 7 - Árvore filogenética por parcimônia, não enraizada, obtida com o software MEGA 4.1, baseada nas sequências parciais de nucleotídeos do gene (431 pb) da proteína capsidial dos isolados de *Grapevine leafroll-associated virus 2*. Valores percentuais de “bootstrap” são mostrados nos ramos. As barras indicam número de substituições de nucleotídeos por sítio (20 = 0,02). Códigos dos nucleotídeos dos isolados no GenBank: PN (AF039204, EUA), 93/955 (NC_007448, África do Sul), RG (AF314061, EUA), BD (DQ286725, Itália), H4 (AY697863, Itália), CS2 (HM059035, Brasil), IS3 (HM358050, Brasil). Para o grupo externo da árvore foi utilizado a espécie tipo do gênero: *Beet yellows virus* (BYV, *Closterovirus*, NC_001598)..... 34

Figura 8 - Árvore filogenética por parcimônia, não enraizada, obtida com o software MEGA 4.1, baseada nas sequências parciais de nucleotídeos do gene (623 pb) da proteína HSP70 dos isolados de *Grapevine leafroll-associated virus 2*. Valores percentuais de “bootstrap” são mostrados nos ramos. As barras indicam número de substituições de nucleotídeos por sítio (50 = 0,05). Códigos dos nucleotídeos dos isolados no GenBank e país: PN (AF039204, EUA), 93/955 (NC_007448, África do Sul), RG (AF314061, EUA), BD (DQ286725, Itália), Alfie (AY456132, Nova Zelândia), SE (HM130523, Brasil), CS1 (HM059039, Brasil), PV20 (EF012721, França). Para o grupo externo da árvore foi utilizado a espécie tipo do gênero: *Beet yellows virus* (BYV, *Closterovirus*, NC_001598). 36

Figura 9 - Árvore filogenética por parcimônia, não enraizada, obtida com o software MEGA 4.1, baseada nas sequências completas (942 pb) de nucleotídeos do gene da proteína capsidial dos isolados de *Grapevine leafroll-associated virus 3*. Valores percentuais de “bootstrap” são mostrados nos ramos. As barras indicam número de substituições de nucleotídeos por sítio (50 = 0,05). Códigos dos nucleotídeos dos isolados no GenBank e país: GP18 (EU259806, África do Sul), Pet4 (AY753208, Brasil), Pet1 (DQ680141, Brasil), Pet2 (DQ680142, Brasil), CI766 (EU344893, Chile), DW2 (DQ119574, China), Pet3 (DQ062152, Brasil), IS2 (HM059034, Brasil), NY (NC_004667, EUA). Para o grupo externo da árvore foi utilizado a espécie: *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1, *Ampelovirus*, AF195822). 38

Figura 10 - Árvore filogenética por parcimônia, não enraizada, obtida com o software MEGA 4.1, baseada nas sequências parciais (593 pb) de nucleotídeos do gene da proteína HSP70 dos isolados de *Grapevine leafroll-associated virus 3*. Valores percentuais de “bootstrap” são mostrados nos ramos. As barras indicam número de substituições de nucleotídeos por sítio (50= 0,05). Códigos dos nucleotídeos dos isolados no GenBank e país: GP18 (EU259806, África do Sul), WC-HSP-2 (EF103903, África do Sul), M.T (AH013319S2, República Tcheca), NY (NC_004667, EUA), CL766 (EU344893, Chile), NZ-1 (EF508151, Nova Zelândia), WC-HSP-10 (EF103904, África do Sul), IS1 (HM059040, Brasil). Para o grupo externo da árvore foi utilizado a espécie: *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1, *Ampelovirus*, AF195822). 40

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos da RT-PCR a partir de RNA total extraído de cochonilhas. Géis: (A) *Grapevine leafroll-associated virus 1*; (B) *Grapevine leafroll-associated virus 3*; (C) *Grapevine virus A*; (D) *Grapevine virus B*; Amostras: (M) Marcador DNA/*PstI*; (1) *Pseudococcus viburni*, livre de vírus; (2) *Planococcus citri*, amostra n. 40; (3) *Planococcus citri*, amostra n. 51; (4) *Pseudococcus viburni*, amostra caxias; (5) *Planococcus citri*, amostra n. 53; (6) *Pseudococcus viburni*, amostra venturin..... 44

Figura 12 - Árvore filogenética por parcimônia, não enraizada, obtida com o software MEGA 4.1, baseada nas sequências parciais de nucleotídeos do gene (451 pb) da proteína capsidial dos isolados de *Grapevine virus A*. Valores percentuais de “bootstrap” são mostrados nos ramos. As barras indicam número de substituições de nucleotídeos por sítio (20 = 0,02). Códigos dos nucleotídeos dos isolados no GenBank e país: PC40 (HM358052, Brasil), GVA-SP (AY340581, Brasil), GVA-RS (AF494187, Brasil), GTR1-1 (DQ787959, África do Sul), P163-1 (DQ855088, África do Sul), LQ58 (DQ911145, China), 92/778 (AF441234, África do Sul), MSH18-1 (DQ855085, África do Sul). Para o grupo externo da árvore foi utilizado a espécie *Heracleum latent virus* (HLV, *Vitivirus*, X79270). 47

CAPÍTULO II:

Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose do plasmídeo recombinante pRSET-B/CP RSPaV (780 pb) digerido com enzima de restrição *EcoRI*; (M) Marcador DNA λ /*PstI*, (1) e (2) clones de *E. coli*, estirpe BL21:DE3, transformadas com o plasmídeo pRSET-B/CP RSPaV. 62

Figura 14 - Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% corado com *Coomassie blue*; (M) Marcador de massa molecular em kDa, (1) Alíquota (5 μ l) de uma fração da proteína expressada em *Escherichia coli* transformada com a construção pRSET-B CP/RSPaV e purificada em coluna Ni-NTA. 63

Figura 15 - A. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% corado com *Coomassie blue*; B. *Western blot* utilizando anti-soro comercial anti-histidina (1:1000, Invitrogen). Amostras: (M) Marcador de massa molecular em kDa, (1) alíquota (2,5 μ l) do extrato de proteínas totais de *E. coli* induzida após a transformação com o vetor de expressão pRSET vazio, (2) alíquota (5 μ l) do extrato de proteína totais não purificada de *E. coli* transformada e induzida com o vetor pRSET-B/CP RSPaV, (3) alíquota (10 μ l) do extrato de proteína total purificada de *E. coli* induzida com o vetor pRSET-C/CP GLRaV-3 (controle positivo, FAJARDO et al., 2007a), (4) alíquota de 2,5 μ l da CP de RSPaV após a purificação do extrato de proteínas totais de *E. coli* (fração do poço 2 purificada). 64

Figura 16 - *Western blot* utilizando anti-soro produzido contra a CP do RSPaV, expressa e purificada a partir de *E. coli*; (M) Marcador de massa molecular em kDa, (1 a 4) anti-soro produzido nas 3^a, 4^a, 5^a e 6^a sangrias do coelho (1:250 v/v), respectivamente. Poços 1 a 4 carregados com 2,5 μ l da proteína CP do RSPaV expressada e purificada. 65

Figura 17 - Árvore filogenética por parcimônia (“bootstrap” com 2000 replicações), não enraizada, obtida com o programa MEGA 4.1, baseada nas sequências completas (780 pb) de nucleotídeos do gene da proteína capsidial de isolados de *Rupestris stem pitting-associated virus*. Valores percentuais de “bootstrap” são mostrados nos ramos. As barras indicam número de substituições de nucleotídeos por sítio (50 = 0,05). Códigos no GenBank dos isolados brasileiros caracterizados e detectados pelo anti-soro policlonal produzido neste trabalho: CF207 (EF636804), 420A (EU040204), MG (EF690380), CF210 (EF690384), CF195 (EF636803), PN (EF690381), CS1 (GU166289), IS2 (GU166290). Na análise filogenética foram incluídas o isolado RSPaV1 (NC_001948), isolado tipo da espécie e, para o grupo externo da árvore, a espécie tipo do gênero: *Apple stem pitting virus* (ASPV, *Foveavirus*, NC_003462). 69

CAPÍTULO III:

Figura 18 - Sintomas foliares de infecção viral nas cvs. Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon, no início, meio e final do ciclo vegetativo, observados a campo nas plantas avaliadas..... 75

Figura 19 - Formação de tecido corticento (foto a direita) na região de inserção do ramo do ano na cv. C. Sauvignon, verificado a campo nas plantas avaliadas. 75

Figura 20 - Videiras das cvs. Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon, plantas saudias e infectadas, evidenciando os sintomas de infecção viral nas folhas de plantas infectadas. 76

Figura 21 - Curvas com valores médios de fotossíntese líquida ou taxa de assimilação líquida de CO₂ em resposta à densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativo (Radiação). (A) videiras cv. e (B) videiras cv. Cabernet Sauvignon; folhas de plantas infectadas sintomáticas e assintomáticas e folhas de plantas saudias. Sintomas avaliados visualmente e plantas infectadas com RSPaV e GLRaV-2. 81

Figura 22 - Amostras de uva colhidas em videiras saudias e infectadas das cvs. Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon, podendo-se observar maturação irregular nas amostras provenientes de plantas infectadas..... 87

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I:

Tabela 1 – Espécies virais relatadas em videiras (<i>Vitis</i> spp.) em todo mundo.	6
Tabela 2 - Número total de depósitos de sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos de espécies virais que infectam a videira e que foram estudadas neste trabalho, com base no banco de dados do NCBI (GenBank) em 10/05/2010.	8
Tabela 3 - Relação das espécies de cochonilhas relatadas como transmissoras de vírus em videiras...	11
Tabela 4 - Oligonucleotídeos específicos e degenerados utilizados na detecção viral por RT-PCR. ...	15
Tabela 5 - Relação das amostras de cochonilhas <i>Planococcus citri</i> e <i>Pseudococcus viburni</i> (Família: Pseudococcidae) avaliadas para a presença de vírus.....	18
Tabela 6 – Resultados obtidos por RT-PCR para as amostras de videiras avaliadas para presença de 12 espécies virais.....	20
Tabela 7 - Relação das sequências dos isolados virais de RSPaV, GLRaV-2 e GLRaV-3 obtidos no trabalho e depositados no banco de dados do NCBI (GenBank).	21
Tabela 8 - Identidade (%) das sequências de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) do gene da proteína capsial (780 pb) entre diferentes isolados de <i>Rupestris stem pitting-associated virus</i>	25
Tabela 9 - Identidade (%) das sequências de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) da sequência parcial (339 pb) do gene da replicase dos diferentes isolados de <i>Rupestris stem pitting-associated virus</i>	27
Tabela 10 - Identidade (%) das sequências de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) do gene parcial (831pb) da proteína replicase entre diferentes isolados de <i>Rupestris stem pitting-associated virus</i>	29
Tabela 11 - Identidade (%) das sequências de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) do gene parcial (628pb) da proteína replicase entre diferentes isolados de <i>Rupestris stem pitting-associated virus</i>	31

Tabela 12 - Identidade (%) das sequências de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) do gene parcial (431pb) da proteína capsial parcial dos diferentes isolados de <i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i>	33
Tabela 13 - Identidade (%) das sequências de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) do gene parcial (623 pb) da HSP70 entre os diferentes isolados de <i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i>	35
Tabela 14 - Identidade (%) das sequências de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) do gene completo (942 pb) da proteína capsial entre diferentes isolados de <i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i>	37
Tabela 15 - Identidade (%) das sequências de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) do gene parcial (593 pb) da proteína HSP70 entre diferentes isolados de <i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i>	39
Tabela 16 - Relação de isolados “estrangeiros”, depositados no GenBank e que apresentaram maiores identidades de nucleotídeos com os isolados virais de RSPaV, GLRaV-2 e GLRaV-3, caracterizados neste trabalho.	41
Tabela 17 - ELISA indireto das cinco amostras de videiras, para a presença dos vírus RSPaV e GLRaV-2 e ELISA direto para GLRaV-3. Valores das leituras de absorbância no comprimento de onda em 405 nm, aproximadamente 2 horas após a adição do substrato. Resultado de RT-PCR, conforme consta na Tabela 6.	42
Tabela 18 - Relação das amostras de cochonilhas vetoras (Família: Pseudococcidae) testadas por RT-PCR para a presença de vírus.	43
Tabela 19 - Identidade (%) das sequências de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) do gene parcial (451pb) da proteína capsial de diferentes isolados de <i>Grapevine virus A</i>	46

CAPÍTULO II:

Tabela 20 - Resultados do teste ELISA indireto com amostras de videiras infectadas com RSPaV, utilizando-se o anti-soro produzido contra a CP do RSPaV, expressa e purificada a partir de células de <i>E. coli</i> . Valores das leituras de absorbância, no comprimento de onda de 405 nm, aproximadamente, 2 horas após a adição de substrato. Conjugado geral diluído 1:1000 (v/v).....	66
--	----

Tabela 21 - Identidade (%) das seqüências de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) dos genes da proteína capsial de diferentes isolados de RSPaV, previamente caracterizados e detectados por ELISA indireto com o anti-soro policlonal produzido.... 70

CAPÍTULO III:

Tabela 22 - Valores de fotossíntese máxima, radiação de saturação, ponto de compensação de luz, taxa de respiração no escuro e rendimento quântico aparente de folhas de videiras (*Vitis vinifera*) cvs. Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon sadias e infectadas (folhas sintomáticas e assintomáticas) com *Rupestris stem pitting-associated virus* e *Grapevine leafroll-associated virus 2*. 82

Tabela 23 - Teores totais e individuais de clorofila (*a* e *b*) em folhas de videiras (*Vitis vinifera*) cv. Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon, sadias e infectadas (folhas sintomáticas e assintomáticas) com *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV) e *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2). 84

Tabela 24 - Teores de açúcares solúveis totais e de amido em folhas de videiras (*Vitis vinifera*) cv. Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon, sadias e infectadas (folhas sintomáticas e assintomáticas) com *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV) e *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2). 85

Tabela 25 - Resultados da avaliação da qualidade enológica de uvas colhidas de videiras cvs. Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon infectadas com *Rupestris stem pitting-associated virus* e *Grapevine leafroll-associated virus 2* e sadias. Média de 10 plantas. 88

Tabela 26 - Valores de fotossíntese de saturação, radiação de saturação, fotossíntese máxima, ponto de compensação, taxa de respiração no escuro e rendimento quântico aparente de folhas de videiras (*Vitis vinifera*) cv. Cabernet Franc sadias e infectadas (folhas sintomáticas e assintomáticas) com *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV) e *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2). 90

Tabela 27 - Valores de fotossíntese de saturação, radiação de saturação, fotossíntese máxima, ponto de compensação, taxa de respiração no escuro e rendimento quântico aparente de folhas de videiras (*Vitis vinifera*) cv. Cabernet Sauvignon sadias e infectadas (folhas sintomáticas e assintomáticas) com *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV) e *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2). 91

Tabela 28 - Teores totais e individuais de clorofila (*a* e *b*) em folhas de videiras (*Vitis vinifera*) cv. Cabernet Sauvignon sadias e infectadas (folhas sintomáticas e assintomáticas) com *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV) e *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2). 92

Tabela 29 - Teores totais e individuais de clorofila (<i>a</i> e <i>b</i>) em folhas de videiras (<i>Vitis vinifera</i>) cv. Cabernet Franc sadias e infectadas (folhas sintomáticas e assintomáticas) com <i>Rupestris stem pitting-associated virus</i> (RSPaV) e <i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i> (GLRaV-2).	93
Tabela 30 - Teores de açúcares solúveis totais e amido em folhas de videiras (<i>Vitis vinifera</i>) cv. Cabernet Franc sadias e infectadas (folhas sintomáticas e assintomáticas) com <i>Rupestris stem pitting-associated virus</i> (RSPaV) e <i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i> (GLRaV-2).	94
Tabela 31 - Teores de açúcares solúveis totais e amido em folhas de videiras (<i>Vitis vinifera</i>) cv. Cabernet Sauvignon sadias e infectadas (folhas sintomáticas e assintomáticas) com <i>Rupestris stem pitting-associated virus</i> (RSPaV) e <i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i> (GLRaV-2).....	95
Tabela 32 - Resultados da avaliação da qualidade enológica das uvas provenientes de videiras da cv. Cabernet Franc infectadas com <i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i> e <i>Rupestris stem pitting-associated virus</i> ou de plantas sadias.	96
Tabela 33 - Resultados da avaliação da qualidade enológica das uvas provenientes de videiras cv. Cabernet Sauvignon infectadas com <i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i> e <i>Rupestris stem pitting-associated virus</i> ou de plantas sadias.	97

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1	A cultura da videira e a importância das viroses no Brasil	1
2	CAPÍTULO I: RT-PCR para detecção de vírus em vinhedos antigos e em cochonilhas vetoras e estudo de variabilidade	4
2.1	Resumo	4
2.2	Introdução.....	5
2.3	Material e métodos	11
2.4	Resultados e discussão	19
2.5	Anexos.....	48
3	CAPÍTULO II: Produção de anti-soro policlonal utilizando a proteína capsial recombinante do <i>Rupestris stem pitting-associated virus</i>	54
3.1	Resumo	54
3.2	Introdução.....	55
3.3	Materiais e métodos.....	57
3.4	Resultados e discussão	61
3.5	Anexos.....	71
4	CAPÍTULO III: Fisiologia foliar e qualidade enológica da uva em videiras infectadas por vírus	72
4.1	Resumo	72
4.2	Introdução.....	72
4.3	Material e métodos	74
4.4	Resultados e discussão	80
4.5	Anexos.....	90
4.6	Referências bibliográficas	97

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 A cultura da videira e a importância das viroses no Brasil

A videira pertence a família *Vitaceae* e ao gênero *Vitis*, o qual possui inúmeras espécies, destacando-se a *Vitis vinifera* L., conhecida como produtora de uvas finas, de origem européia e a *Vitis labrusca* L., conhecida como produtora de uvas rústicas, de origem americana e que predominam no Brasil (TEIXEIRA et al., 2002; ROBERTO et al., 2008; GIOVANNINI, 2008; CORRÊA et al., 2008).

Conforme o “Panorama 2009” da vitivinicultura brasileira (EMBRAPA, 2010a), a área cultivada com vinhedos no Brasil em 2009 foi de 82.584 hectares, com produção de 1.345.719 toneladas, sendo 678.169 toneladas destinadas para processamento e 667.550 toneladas para consumo in natura. A viticultura no Brasil está concentrada principalmente nos Estados das Regiões Sul, Sudeste e Nordeste, onde se destacam os maiores produtores nacionais, em ordem decrescente de área cultivada: Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco, Paraná, Bahia, Santa Catarina e Minas Gerais. Além destas, a cultura da videira também tem se expandido para outras regiões não tradicionais a exemplo de áreas situadas no Mato Grosso do Sul, Goiás, Espírito Santo e Ceará (EMBRAPA, 2010a).

O Brasil nos últimos anos tem demonstrado bom desempenho na produção de uvas, seja para consumo in natura ou para processamento. Contudo, a ocorrência de doenças é sempre mencionada como uma das ameaças ao setor, pois pode ocasionar danos significativos à produção e elevar os custos da mesma. Dentre os patógenos da videira, os vírus merecem destaque devido aos danos que podem causar, podendo resultar na inviabilidade econômica desta atividade. Assim, é de fundamental importância o conhecimento dos principais fitopatógenos associados a esta cultura, principalmente das viroses. Em determinadas cultivares e porta-enxertos, por não produzirem sintomas visualmente perceptíveis ou facilmente distinguíveis, as viroses podem passar despercebidas, havendo maior probabilidade de que sejam propagados indefinidamente, o que resultaria em maior grau de infecção dos materiais propagativos (FAJARDO et al., 2003a; MARTELLI & BOUDON-PADIEU, 2006).

No Brasil, as viroses ocorrem em todas as regiões vitícolas e a incidência na maioria das cultivares americanas e principalmente nas viníferas é considerada alta. Dentre os prejuízos causados citam-se redução na produtividade e na qualidade das uvas, redução da

vida útil do vinhedo e, dependendo da severidade da infecção, pode causar perda total da produção, ou até a morte da planta (BRAR et al., 2008; CABALEIRO et al., 1999).

Até o momento, já foram relatadas no mundo pelo menos 60 espécies virais na cultura da videira, embora nem todas se destaquem em nível de importância (MARTELLI, 2009; MONIS et al., 2010). No Brasil, dez destes vírus já foram detectados: *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV-1, -2, -3, -5 e -6), *Grapevine virus A e B* (GVA e GVB), *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV), *Grapevine fleck virus* (GFkV) e *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) (FAJARDO et al., 2003a). As viroses que se destacam pelas maiores incidência e importância econômica são o enrolamento da folha (GLRaV-1, -2 e -3) e o lenho rugoso da videira, complexo formado por quatro viroses, do qual fazem parte o intumescimento dos ramos (GVB), acanaladura do lenho de Kober (GVA), caneluras do tronco de *Rupestris* (RSPaV) e acanaladura do lenho de LN33 (vírus desconhecido) (KUNIYUKI et al., 2002; MOREIRA et al., 2004).

A videira, por ser propagada vegetativamente, facilita a disseminação e favorece o aparecimento de doenças complexas, pelo acúmulo de diferentes espécies/estirpes virais em uma mesma planta (MONIS, 2008; MARTELLI, 2009). Nem sempre despertam a atenção dos viticultores, talvez pelo desconhecimento de sua sintomatologia, a qual pode também ser confundida visualmente, por exemplo, com deficiências nutricionais ou até com outros fitopatógenos (GARRIDO et al., 2008). Dependendo da combinação entre a cultivar e a espécie viral, os primeiros sintomas característicos poderão ser perceptíveis somente após 2 ou 3 anos da infecção (FAJARDO et al., 2003a).

As plantas afetadas apresentam sintomas que variam com as condições climáticas, estágio fenológico da planta, fertilidade do solo, estirpe viral e com a cultivar da videira (CHARLES et al., 2006). Os sintomas das viroses do enrolamento das folhas e do complexo rugoso, por exemplo, podem ser percebidos em cultivares sensíveis (viníferas), principalmente no final do ciclo vegetativo (CABALEIRO & SEGURA, 2006) e, em plantas muito afetadas, os sintomas podem começar a se pronunciar a partir da floração. Porém, o mais comum é na época próxima à maturação da uva ou ao final do ciclo vegetativo (CREDI & BABINI, 1997).

Até o momento o único controle viável a campo é a utilização de mudas ou material propagativo proveniente de plantas matrizes sadias (livre de vírus). Uma vez que a planta esteja infectada no campo, é impossível curá-la por métodos tradicionais como aqueles utilizados para outros patógenos (bactérias, fungos, etc) (ANDRET-LINK et al., 2004). A partir de uma planta infectada, somente pela adoção de técnicas laboratoriais (ex. cultura de

tecidos, termoterapia, quimioterapia) é possível a obtenção e regeneração de plantas livres de viroses (LAIMER et al., 2009; VALAT et al., 2003; SALAMI et al., 2010).

Além da disseminação por meio do material propagativo, o GFLV é disseminado por nematoídes do gênero *Xiphinema* e as espécies do gênero *Ampelovirus* (GLRaV-1 e -3, -5, -9) e *Vitivirus* (GVA e GVB) são também disseminados de maneira semipersistente por cochonilhas algodonosas (Família Pseudococcidae) e de carapaça (Família Coccidae) (Tabela 3). De maneira geral, neste tipo de transmissão, o vírus é adquirido pelos insetos quando estes se alimentam em planta infectada (LIMA, 2009).

Desta forma a recomendação ao viticultor é que utilize material propagativo certificado, que apresente garantia de sanidade, além de se fazer monitoramento e o controle destes insetos vetores (EMBRAPA, 2010b).

Embora progressos consideráveis tenham ocorrido nos últimos anos sobre as características biológicas e moleculares, formas de disseminação, técnicas de detecção e identificação e os efeitos fisiológicos induzidos pelos vírus que infectam a videira, a compreensão destes temas ainda não é completa, a ponto de permitir a definição de métodos de controle eficientes. Os resultados obtidos neste trabalho visam contribuir neste sentido.

2 CAPÍTULO I: RT-PCR para detecção de vírus em vinhedos antigos e em cochonilhas vetoras e estudo de variabilidade

2.1 Resumo

A propagação vegetativa da videira favorece a ocorrência de infecções virais múltiplas. A variabilidade genética de espécies virais, muitas vezes, resultam em dificuldades para gerar ferramentas moleculares confiáveis, sejam específicas ou universais, para a detecção e/ou identificação viral. Os objetivos deste capítulo foram identificar os vírus presentes em dois vinhedos experimentais: um da cv. Cabernet Sauvignon (CS) (*Vitis vinifera*), implantado em 1995, e outro da cv. Isabel (IS) (*Vitis labrusca*) de 1971. Também se realizou a detecção sorológica destes isolados, comparando-se os resultados dos testes sorológicos e moleculares. Marcou-se duas plantas de C. Sauvignon e três de Isabel, extraíram-se dsRNAs de ramos maduros, que foram submetidos a RT-PCR com 17 pares de oligonucleotídeos específicos para a detecção dos seguintes vírus: *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine virus D* (GVD), *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Arabid mosaic virus* (ArMV), *Grapevine chrome mosaic virus* (GCMV), *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV), *Grapevine leafroll-associated virus 1 a 4* (GLRaV-1 a -4), além de oligonucleotídeos degenerados para a família *Betaflexiviridae* e os gêneros *Closterovirus*, *Trichovirus* e *Vitivirus*. Pelo menos um fragmento amplificado, com cada par de oligonucleotídeos, correspondente a um dos isolados, foi clonado e sequenciado. Nas plantas avaliadas foram detectados RSPaV, GLRaV-2 ou GLRaV-3, tendo sido sequenciados sete isolados de RSPaV: CS1 (GU166289), CS2a (HM059036), CS2b (HM059038), IS1 (HM059037), IS2a (GU166290), IS3 (HM130524), IS2b (HM358051); três isolados de GLRaV-2: CS1 (HM059039), CS2 (HM059035) e IS3 (HM358050); dois isolados de GLRaV-3: IS1 (HM059040) e IS2 (HM059034). As sequências obtidas e depositadas em banco de dados (GenBank) apresentaram identidades superiores a 90% com os respectivos isolados virais do GenBank. Os anti-soros testados reconheceram todos os isolados das três espécies virais detectadas e caracterizadas. Amostras de cochonilhas *Pseudococcus viburni* e *Planococcus citri* provenientes de vinhedos de Caxias do Sul (RS) e Petrolina (PE), respectivamente, foram avaliadas por RT-PCR para a presença de GVA, GVB, GLRaV-1 e GLRaV-3 com oligonucleotídeos específicos. Três espécies virais, GVA, GVB, GLRaV-3

foram detectadas em três de cinco amostras, comprovando indiretamente, o potencial destas como vetoras de vírus e a eficiência dos oligonucleotídeos empregados na detecção.

Palavras-chave: Viroses, RSPaV, GLRaV-2, GLRaV-3, *Vitis*, variabilidade

2.2 Introdução

Já foram relatadas infectando videiras 55 espécies virais distintas (Tabela 1), além de inúmeras estirpes específicas de algumas destas espécies (MARTELLI, 2009; MONIS et al., 2010). Também foram relatadas em videiras cinco doenças consideradas de origem viral, enação da videira (*Grapevine enation*), mosqueado de verão da videira (*Grapevine summer mottle*), mosaico das nervuras da videira (*Grapevine vein mosaic*), necrose das nervuras da videira (*Grapevine vein necrosis*) e acanaladura do lenho de LN 33 (*LN 33 stem grooving*), cujos os agentes causais (vírus) ainda não foram identificados. Entre os vírus mais importantes que afetam a videira destacam-se aqueles pertencentes as famílias *Closteroviridae*, *Secoviridae*, *Betaflexiviridae* e *Tymoviridae* (MARTELLI & BOUDON-PADIEU, 2006).

Tabela 1 – Espécies virais relatadas em videiras (*Vitis* spp.) em todo mundo.

Família	Gênero	Espécie	Referência
<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Potexvirus</i>	<i>Potato virus X</i> (PVX)	Fauquet et al. (2005); Martelli & Boudon-Padieu (2006)
		<i>Rupestris stem pitting-associated virus</i> (RSPaV) (= <i>Grapevine rupestris stem pitting-associated virus</i> , GRSPaV)	Adams et al. (2004); Martelli et al. (2007)
<i>Betaflexiviridae</i>	<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)	Martelli et al. (1997);
		<i>Grapevine virus B</i> (GVB)	Adams et al. (2004)
		<i>Grapevine virus D</i> (GVD)	
		<i>Grapevine virus E</i> (GVE)	Nakaune et al. (2008)
<i>Bromoviridae</i>	<i>Alfamovirus</i>	<i>Alfalfa mosaic virus</i> (AMV)	Fauquet et al. (2005);
	<i>Cucumovirus</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	Martelli & Boudon-Padieu (2006)
	<i>Ilarvirus</i>	<i>Grapevine line pattern virus</i> (GLPV)	Martelli (2009)
	<i>Ilarvirus</i> não classificado	<i>Grapevine angular mosaic virus</i> (GAMoV)	
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Tospovirus</i>	<i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV)	Fauquet et al. (2005); Martelli & Boudon-Padieu (2006)
		<i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i> (GLRaV-2) (= <i>Grapevine rootstock stem lesion associated virus</i> , GRSLaV)	Karasev (2000); Martelli et al. (2002)
<i>Closteroviridae</i>	<i>Ampelovirus</i>	<i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i> (GLRaV-1)	Ling et al. (1997); Martelli et al. (2002)
		<i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i> (GLRaV-3)	
		<i>Grapevine leafroll-associated virus 5</i> (GLRaV-5)	
	<i>Ampelovirus</i> não classificado	<i>Grapevine leafroll-associated virus 4</i> (GLRaV-4)	Abou Ghanem-Sabanadzovic (2006);
		<i>Grapevine leafroll-associated virus 6</i> (GLRaV-6)	Martelli & Boudon-Padieu (2006)
	<i>Closteroviridae</i> não classificado	<i>Grapevine leafroll-associated virus 8</i> (GLRaV-8)	
	<i>Grapevine leafroll-associated virus 9</i> (GLRaV-9)		
		<i>Grapevine leafroll-associated virus 7</i> (GLRaV-7)	Turturo et al. (2000); Alrwahnih et al. (2008)
<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	Vírus semelhante a potyvírus, não identificado, isolado no Japão de uma cultivar russa	Martelli & Boudon-Padieu (2006)

Continuação: (Tabela 1 - Espécies virais relatadas em videiras (*Vitis* spp.) em todo mundo).

Família	Gênero	Espécie	Referência	
Secoviridae	<i>Fabavirus</i>	<i>Broad bean wilt virus</i> (BBWV)	Fauquet et al. (2005); Martelli & Boudon-Padieu (2006)	
	Subgrupo A	<i>Arabid 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) <i>Tobacco ringspot virus</i> (TRSV)	Martelli & Boudon-Padieu (2006)	
	Subgrupo B	<i>Artichoke Italian latent virus</i> (AILV)	Fauquet et al. (2005);	
		<i>Grapevine chrome mosaic virus</i> (GCMV) <i>Tomato black ring virus</i> (TBRV)	Martelli & Boudon-Padieu (2006)	
	Subgrupo C	<i>Blueberry leaf mottle virus</i> (BBLMV) <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>Grapevine Bulgarian latent virus</i> (GBLV)		
		<i>Grapevine Anatolian ringspot virus</i> (GARSV) <i>Grapevine deformation virus</i> (GDefV)		
	Secoviridae não classificado	<i>Strawberry latent ringspot virus</i> (SLRV)	Martelli & Boudon-Padieu (2006)	
	Tombusviridae	<i>Carmovirus</i>	<i>Carnation mottle virus</i> (CarMV)	Fauquet et al. (2005);
		<i>Necrovirus</i>	<i>Tobacco necrosis virus D</i> (TNV-D)	Martelli & Boudon-Padieu (2006)
<i>Tombusvirus</i>		<i>Grapevine Algerian latent virus</i> (GALV) <i>Petunia asteroid mosaic virus</i> (PetAMV)		
Tymoviridae	<i>Maculavirus</i>	<i>Grapevine fleck virus</i> (GFkV)	Fauquet et al. (2005);	
	<i>Maculavirus</i> não classificado	<i>Grapevine Red Globe virus</i> (GRGV)	Martelli & Boudon-Padieu (2006)	
	<i>Marafivirus</i>	<i>Grapevine rupestris vein feathering virus</i> (GRVfV) <i>Grapevine asteroid mosaic-associated virus</i> (GAMaV) <i>Grapevine virus Q</i> (GVQ) = (<i>Grapevine Syrah virus -1</i> , GSyV-1)	Sabanadzovic et al. (2009); Alrwahnih et al. (2009)	
Virgaviridae	<i>Tobamovirus</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV) <i>Tomato mosaic virus</i> (ToMV)	Martelli & Boudon-Padieu (2006)	
	-	<i>Idaeovirus</i>	<i>Raspberry bushy dwarf virus</i> (RBDV)	Fauquet et al. (2005);
-	<i>Sobemovirus</i>	<i>Sowbane mosaic virus</i> (SoMV)	Martelli & Boudon-Padieu (2006)	
-	-	<i>Grapevine Ajinashika virus</i> (GAjV)		
-	-	<i>Grapevine stunt virus</i> (GSV)		
-	-	<i>Grapevine labile rod-shaped virus</i> (GLRSV)		

Nem todas as espécies mencionadas na Tabela 1 apresentam significativa importância econômica, pois esta pode ser em função da origem geográfica, da estirpe viral e da cultivar da videira.

Dentre as doenças virais que afetam a videira (*Vitis* spp.) e que ocorrem no Brasil, o complexo rugoso e o enrolamento das folhas apresentam-se como as de maior relevância, devido a expressiva incidência e aos danos causados pelos vírus que compõem estes dois complexos (FAJARDO et al., 2003a). Visando apresentar, mesmo que de maneira indireta, a importância relativa das espécies virais, objeto de estudo neste Capítulo, a Tabela 2 mostra o número de sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos depositados no banco de dados do NCBI (GenBank).

Tabela 2 - Número total de depósitos de sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos de espécies virais que infectam a videira e que foram estudadas neste trabalho, com base no banco de dados do NCBI (GenBank) em 10/05/2010.

Vírus	Família / sub-família / Gênero	Nº de seq. de nucleotídeos	Nº de seq. de aminoácidos deduzidos
<i>Arabid mosaic virus</i> (ArMV)	<i>Secoviridae</i> / <i>Comovirinae</i> / <i>Nepovirus</i>	49	65
<i>Grapevine fanleaf virus</i> (GFLV)	<i>Secoviridae</i> / <i>Comovirinae</i> / <i>Nepovirus</i>	350	374
<i>Grapevine chrome mosaic virus</i> (GCMV)	<i>Secoviridae</i> / <i>Comovirinae</i> / <i>Nepovirus</i>	4	14
<i>Grapevine fleck virus</i> (GFkV)	<i>Tymoviridae</i> / <i>Maculavirus</i>	8	15
<i>Rupestris stem pitting-associated virus</i> (RSPaV)	<i>Betaflexiviridae</i> / <i>Foveavirus</i>	368	421
<i>Grapevine virus A</i> (GVA)	<i>Betaflexiviridae</i> / <i>Vitivirus</i>	49	113
<i>Grapevine virus B</i> (GVB)	<i>Betaflexiviridae</i> / <i>Vitivirus</i>	75	95
<i>Grapevine virus D</i> (GVD)	<i>Betaflexiviridae</i> / <i>Vitivirus</i>	3	4
<i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i> (GLRaV-1)	<i>Closteroviridae</i> / <i>Ampelovirus</i>	69	82
<i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i> (GLRaV-2)	<i>Closteroviridae</i> / <i>Closterovirus</i>	213	265
<i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i> (GLRaV-3)	<i>Closteroviridae</i> / <i>Ampelovirus</i>	127	176
<i>Grapevine leafroll-associated virus 4</i> (GLRaV-4)	<i>Closteroviridae</i> / <i>Ampelovirus</i> não classificado	17	18

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root> (acessado em 10/05/2010)

A virose do enrolamento das folhas, que ocorre em praticamente todas as regiões do mundo onde a videira é cultivada, é causada por um complexo de até nove espécies virais, sorologicamente distintas e denominadas “vírus associados ao enrolamento da folha da videira” (*Grapevine leafroll-associated virus*, GLRaV-1 a -9). Os principais vírus do

complexo do enrolamento são o GLRaV-2 e GLRaV-3 (Tabela 2) em função da maior incidência e dos danos que podem induzir (MARTELLI et al., 2002; FAJARDO et al., 2003a). Mesmo que esta doença seja causada por um complexo viral, em situações específicas, embora raras, estes vírus podem ocorrer de forma isolada (FAJARDO et al., 2003a). No Brasil já foram detectados GLRaV-1, -2, -3, -5 e -6 (RADAELLI et al., 2009; KUNIYUKI et al., 2003).

O GLRaV-2 também está associado a sintomas de incompatibilidade da enxertia e declínio em vinhedos novos (ABOU GHANEM-SABANADZOVIC et al., 2000; MARTELLI et al., 2002; BERTAZZON & ANGELINI, 2004; MENG et al., 2005b). Pertence a família *Closteroviridae* e ao gênero *Closterovirus*, possui partículas alongadas e flexuosas, genoma de RNA fita simples e senso positivo, com 16.494 nucleotídeos (nt) organizados em oito fases abertas de leituras (ORFs, “open reading frame”) e é mecanicamente transmissível (ABOU-GHANEM et al., 1998; MENG et al., 2005b; BEUVE et al., 2007).

O GLRaV-3, família *Closteroviridae* e gênero *Ampelovirus*, possui partículas alongadas e flexuosas de cerca de 1800-2100 nm de comprimento por 12 nm de diâmetro e genoma composto de RNA fita simples, senso positivo com 17.919 nt organizados em 13 ORFs (LING et al., 1997; MARTELLI et al., 2002). É o vírus melhor caracterizado dentre aqueles que compõem o complexo do enrolamento da folha da videira, sendo o membro-tipo do seu gênero. Não é transmissível mecanicamente e se dissemina naturalmente nos vinhedos pela transmissão, de maneira semi-persistente, por várias espécies de pseudococcídeos e coccídeos (BOTTON et al., 2003).

O *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV) foi identificado e caracterizado molecularmente (MENG et al., 1998; ZHANG et al., 1998) como o agente causal das caneluras do tronco de *Rupestris*, conhecida por “lenho estriado de *Rupestris*” em São Paulo e por “caneluras do tronco de *Rupestris*” no Rio Grande do Sul (ESPINHA et al., 2003). Faz parte do “complexo rugoso da videira” e caracteriza-se por induzir alterações no lenho das videiras, com reflexos negativos na qualidade e na produção (MARTELLI, 1993; CREDI, 1997). RSPaV, família *Betaflexiviridae*, gênero *Foveavirus*, possui partículas alongadas e flexuosas com cerca de 800 x 12 nm, genoma de RNA de fita simples, senso positivo, com aproximadamente 8.726 nt organizados em 5 ORFs.

Alguns trabalhos relatam que o RSPaV se apresenta como uma espécie muito variável, sendo que infecções múltiplas com outros vírus também são comumente detectadas em videiras, o que dificulta a definição das propriedades biológicas das diferentes estirpes deste

vírus (MENG et al. 1999 e 2005a), a exemplo das estirpes “Syrah” (LIMA et al., 2006a) e “Pinot Noir, PN” (LIMA et al., 2009). Recentemente, Nakaune et al. (2008) e Radaelli et al. (2009) destacaram a variabilidade genética deste vírus, por meio do estudo de análises de sequências de isolados do RSPaV.

De modo geral, os vírus apresentam grande potencial de exibirem variabilidade genética, pois são agentes infecciosos que podem estabelecer longos processos infecciosos ao longo de todo o ciclo de vida da hospedeira associado a propensão a erros na replicação do seu genoma e deficiências nos mecanismos de reparo do RNA (KOMÍNEK et al., 2005; PROSSER et al., 2007).

A expressiva variabilidade genética apresentada por algumas das espécies virais que infectam a videira tem conduzido a dificuldades para gerar ferramentas moleculares universais de detecção e identificação. Já foi demonstrada que a indexação por RT-PCR de videiras infectadas, com determinado isolado viral, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para outro isolado, pode resultar em falso-negativo (BERTAZZON & ANGELINI, 2004). Tais resultados servem para ressaltar a importância do estudo de variabilidade genética viral.

Embora diversas espécies já tenham sido identificadas e caracterizadas no Brasil e no mundo e em diferentes genótipos de videiras, ainda há carência de trabalhos de caracterização molecular mais abrangentes, o que permitiria aumentar o conhecimento destes patógenos, além do estabelecimento de ferramentas para o diagnóstico mais preciso e sensível (BEUVE et al., 2007).

A transmissão do GLRaV-2, GLRaV-3 e RSPaV ocorre principalmente através de enxertia utilizando-se gemas infectadas, enquanto a dispersão se dá por meio de material propagativo infectado. No caso do GLRaV-3, também pode ser transmitido por insetos vetores (cochonilhas).

Uma vez que a videira esteja infectada por vírus a campo, é impossível curá-la pelos métodos tradicionalmente utilizados para outras doenças, agravando-se o problema quando se considera que a planta infectada também poderá servir de fonte de inóculo para a disseminação por insetos vetores, enquanto as mesmas permanecerem no vinhedo.

As cochonilhas das famílias Pseudococcidae e Coccidae têm sido consideradas como as principais vetoras de algumas das principais espécies virais que infectam a videira, sendo responsáveis pela dispersão destes patógenos (Tabela 3) (CABALEIRO & SEGURA, 1997; KUNIYUKI et al., 2005). Segundo Botton et al. (2003), algumas espécies já identificadas em

vinhedos brasileiros, como *Pseudococcus viburni*, *P. vitis*, *P. longispinus* e *Planococcus citri*, são consideradas importantes vetoras de vírus.

Tabela 3 - Relação das espécies de cochonilhas relatadas como transmissoras de vírus em videiras.

Espécies	Vírus					
	Complexo do enrolamento da folha				Acanaladura do lenho de Kober	Intumescimento dos ramos
Cochonilha "Algodonosa" (<i>Pseudococcidae</i>)	GLRaV-1	GLRaV-3	GLRaV-5	GLRaV-9	GVA	GVB
<i>Heliooccus bohemicus</i>	x	x			x	
<i>Phenacoccus aceris</i>	x	x				
<i>Planococcus citri</i>		x			x	x
<i>Planococcus ficus</i>		x			x	x
<i>Pseudococcus viburni</i> (= <i>P. affinis</i>)		x			x	x
<i>Pseudococcus calceolariae</i>		x				
<i>Pseudococcus comstocki</i>		x			x	
<i>Pseudococcus longispinus</i>		x	x	x	x	x
<i>Pseudococcus maritimus</i>		x				
Cochonilha de "Carapaça" (<i>Coccidae</i>)						
<i>Neopulvinaria innumerabilis</i>					x	
<i>Parthenolecanium corni</i>	x					
<i>Pulvinaria vitis</i>	x	x				
<i>Pulvinaria innumerabilis</i>	x	x				

No Brasil inexistem trabalhos conduzidos sobre dispersão de vírus de videira em condições naturais (vinhedos), e os poucos trabalhos conduzidos se restringem a testes de transmissão sob condições controladas (KUNIYUKI et al., 2005 e 2006). A concentração viral em insetos vetores, as técnicas de detecção, incluindo a definição de oligonucleotídeos adequados, são aspectos importantes a serem estudados para que possam contribuir com resultados que permitam fundamentar a proposição de estudos epidemiológicos.

Os objetivos deste trabalho foram identificar e caracterizar molecularmente os vírus presentes em dois vinhedos, com diferentes pares de oligonucleotídeos e comparar a detecção molecular com a sorológica, além de detectar molecularmente vírus em cochonilhas vetoras.

2.3 Material e métodos

Isolados virais: Os isolados virais foram obtidos a partir de diferentes videiras, provenientes de vinhedos antigos da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves (RS). Os dois vinhedos avaliados são da cultivar Isabel (*Vitis labrusca*), plantio em pé franco, implantado

em 1971, e o outro, da cv. Cabernet Sauvignon (*V. vinifera*), plantio com porta-enxerto Paulsen 1103 e implantado em 1995.

Os sintomas observados a campo na cv. C. Sauvignon, a partir do meio para o final do ciclo vegetativo, foram folhas coriáceas com avermelhamento e enrolamento dos bordos das folhas para baixo, sendo que as nervuras principais permaneceram verdes, presença de caneluras no porta-enxerto e intumescimento com formação de tecido corticento na base do ramo do ano. Já na cv. Isabel não foi verificado sintomas típicos de infecção viral nas folhas, ramos e tronco em todo seu ciclo vegetativo. Estacas lenhosas provenientes das plantas avaliadas a campo, de ambos os vinhedos, também foram propagadas em casa-de-vegetação, nas quais, no início do ciclo vegetativo não foi verificado sintomas típicos de infecção viral (Figura 1).

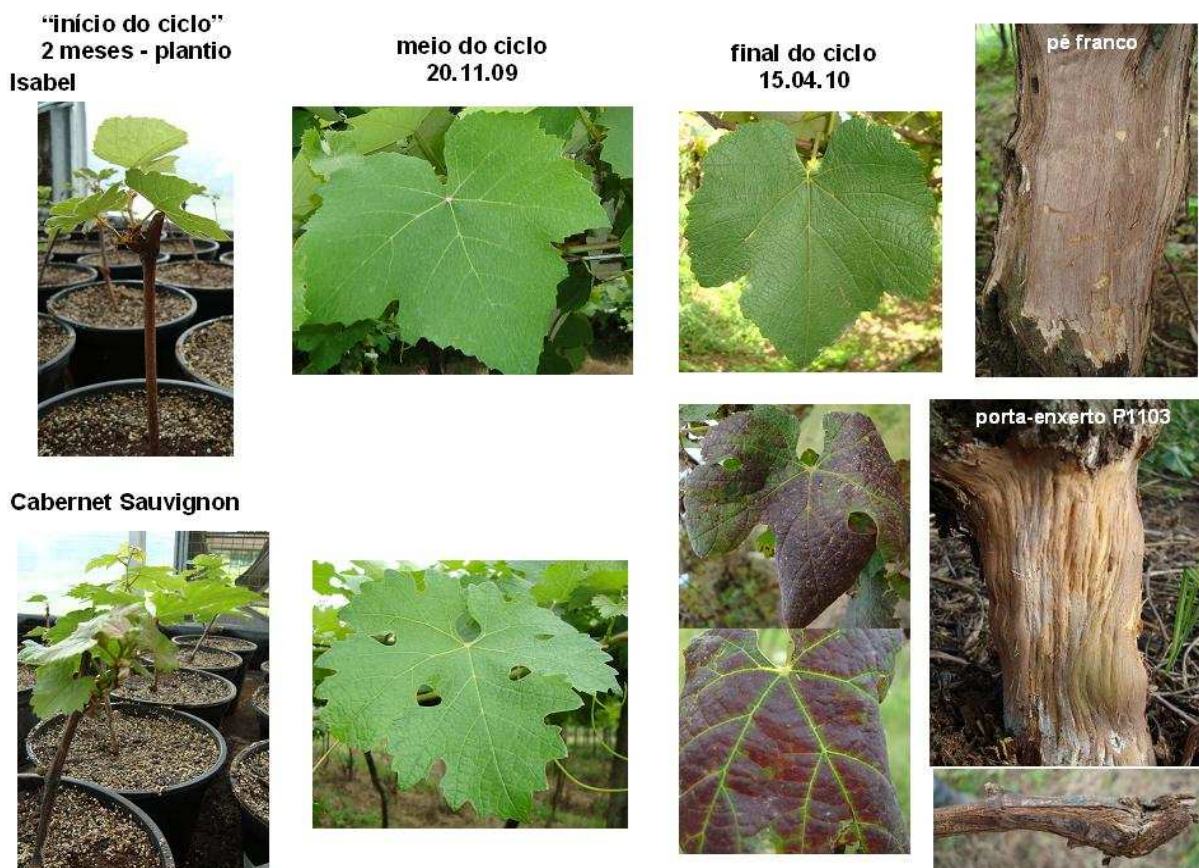


Figura 1 - Sintomas de infecção viral nas folhas e no tronco/porta-enxerto em videira cv. Cabernet Sauvignon e ausência de sintomas de infecção viral na cv. Isabel. Início do ciclo vegetativo (estacas propagadas em casa de vegetação provenientes das plantas avaliadas neste trabalho), meio e final do ciclo vegetativo (aspecto das folhas, tronco e ramos das plantas a campo).

Extração de dsRNA: Foram selecionadas duas plantas da cv. C. Sauvignon, três de Isabel e uma Paulsen 1103 (sadia, material obtido por meio de cultura de tecidos) nas quadras 7, 16 e 4, respectivamente, no campo experimental da Embrapa Uva e Vinho. O dsRNA foi extraído a partir de ramos maduros de acordo com a metodologia descrita por Valverde et al. (1990) com algumas modificações. Trinta gramas de tecido vegetal foram macerados em almofariz na presença de nitrogênio líquido e tampão de extração [90 ml 2X STE, 35 ml SDS 10%, 2 ml de bentonita (45 mg/ml) e 2 ml β -mercaptoetanol]. Após agitação durante 5 minutos a temperatura ambiente, acrescentaram-se 35 ml de fenol saturado com STE 2X, pH 7,5 e 35 ml de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v), mantendo-se novamente em agitação por 45 min e, posteriormente, centrifugando a 16274 g por 10 min. O dsRNA obtido foi purificado em coluna de celulose (CF 11, Whatman) e ressuspendido em água autoclavada.

Síntese de cDNA e PCR: A síntese do cDNA e as reações da PCR foram conduzidas conforme metodologia descrita por Sambrook & Russel (2001) e Fajardo et al. (2000), com algumas modificações. As reações de síntese do cDNA consistiram, para todas as amostras de: 4 μ l de dsRNA, 1 μ l de oligonucleotídeo antisense (10 μ M) (Tabela 4), 5 μ l de água autoclavada, incubando-se a 94°C por 5 min, e, posteriormente, adicionando-se: 5 μ l de tampão da enzima RT 5X, 1 μ l de dNTP (2,5 mM), 1 μ l de enzima transcriptase reversa M-MLV (200 U/ μ l, Promega), 1 μ l de inibidor de RNase (40 U/ μ l, Promega) e 7 μ l de água autoclavada. Na sequência, a reação foi incubada a 37°C por uma hora.

As reações de PCR consistiram de: 10 μ l de cDNA, 5 μ l de tampão da enzima Taq DNA polimerase 10X, 1,5 μ l de $MgCl_2$ (50 mM), 5 μ l de dNTP (2,5 mM), 1 μ l de cada oligonucleotídeo senso e antisense (10 μ M) (Tabela 4), 0,5 μ l de Taq DNA polimerase (5 U/ μ l, Invitrogen) e 26 μ l de água autoclavada.

As reações foram submetidas a uma desnaturação inicial (94°C por 5 min) seguida por 35 ciclos de amplificação: desnaturação (94°C por 50 seg), pareamento (50°C por 50 seg) e extensão (72°C por 1 min), além de uma extensão final (72°C por 7 min). Para os fragmentos menores que 500 pb, a extensão foi 72°C por 50 seg e para os pares de oligonucleotídeos degenerados, o pareamento foi de 48°C.

Os produtos da RT-PCR foram analisados em géis de agarose 1,2% preparado em tampão TBE pH 8,0, corados com brometo de etídeo e visualizados em transluminador sob luz UV. As bandas observadas, com o fragmento de tamanho esperado, foram recortadas do gel e

eluídas com a utilização do kit comercial "HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction" (RBC Real Genomics), de acordo com as especificações do fabricante.

Oligonucleotídeos utilizados: As plantas foram avaliadas para a presença de 12 espécies virais: *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine virus D* (GVD), *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV), *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV), estirpes "típica" deste mesmo vírus, Syrah (SY) e Pinot Noir (PN), *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV-1 a 4) e *Grapevine chrome mosaic virus* (GCMV), com 17 pares de oligonucleotídeos específicos, além de três pares degenerados para a família *Betaflexiviridae* e para os gêneros *Closterovirus*, *Trichovirus* e *Vitivirus*, os quais amplificam fragmentos em diferentes regiões do genoma viral (Tabela 4).

Tabela 4 - Oligonucleotídeos específicos e degenerados utilizados na detecção viral por RT-PCR.

Vírus	Oligonucleotídeos	Sequência 5'-3'	Orientação	Fragmento amplificado (pb)	Referência
GVA	766	GGGGAGGTAGATATAGTAGG	Senso	451 (CP, meio e 3' terminal)	Fajardo et al. (2003b)
	C1197	TACCCGTGAGAAATGATGGG	Antisenso		
GVB	GVB_v	CAAGCAATCCCCGAGAGT	Senso	693 (CP e regiões que flanqueiam)	Moreira et al. (2005)
	GVB_c	TTTAGCCGCACTCCTTGACT	Antisenso		
GVD	GVD_v	GACGCAGGGATGTAACCTTAGGACG	Senso	963 (CP e regiões que flanqueiam)	Abou-Ghanem et al. (1997)
	GVD_c	CCTCTACTTATGGAAATGCGCTC	Antisenso		
GFkV	GFkV_v	ATGAGCCTCCCCGCTGACCTCC	Senso	693 (CP)	baseado no acesso NC_003347
	GFkV_r	TCATGACGAGGGAGTGGGGCGG	Antisenso		
	GFkV_v	AGTACCTCCTCCACCGCACC	Senso	245 (REP, parcial)	Fajardo et al. (2004b)
	GFkV_c	TTTCTCGGGCAGAGACCGT	Antisenso		
GFLV	GFLVs2515	GGAAGAGGCCACTTCTTTCCTTGGG	Senso	809 (CP, parcial)	Bashir & Hajizadeh (2007)
	GFLVa3300	CCCACCAGCTTCGTGATGGTAACGC	Antisenso		
ArMV	H428v	GCGGGCGATTGGGAGTT	Senso	440 (CP, parcial)	Stewart & Nassuth (2001)
	C867c	CGATGGTAGGGGAGCGTATT	Antisenso		
RSPaV	RSPaV_v1	ATGGCAAGTCAAATGGGAAAC	Senso	780 (CP)	Radaelli et al. (2009)
	RSPaV_c1	TCATTCATGTGTAACATTTGAA	Antisenso		
	RSP2	CAAGCATGCTCTTGGCAAC	Senso	831 (REP, parcial)	Fajardo et al. (2004b)
	RSP21	CCCTCTGGCGATTGAATTG	Antisenso		
RSPaV-PN	2R	TTCCCCAACTTCCAACCTTAC	Senso	505 (Metil-transferase, parcial)	Lima et al. (2009)
	PN1F	GATGGATAACAAGTTACGGGC	Antisenso		
RSPaV-SY	SY9F	AGGATTCCAAACTGTAGAGCAA	Senso	628 (REP, parcial)	Lima et al. (2006a)
	SY8R	TTGGTCGTCATCTTCCAGTT	Antisenso		
GLRaV-1	GLRaV-1_v	ATGGCTAGCGTTATATCTCAA	Senso	969 (CP)	baseado no acesso AF195822
	GLRaV-1_r	TTACACCTTAAGCTCGTAGTA	Antisenso		
	LRA	ACGTTGAGATTAGTCTGACTC	Senso	1019 (CPd2, parcial)	Little et al. (2001)
	CPdR	TCACAGCATCAATATCTTTTCC	Antisenso		
GLRaV-2	V2CPf	CTAGTCTAAATGGTGTGCA	Senso	431 (CPm, parcial)	Bertazzon & Angelini (2004)
	V2CPr2	TTCAGAGAGCTTCGGGCAAG	Antisenso		
GLRaV-3	LR3 8504v	ATGGCATTGAACTGAAATT	Senso	942 (CP)	Fajardo et al. (2007a)
	LR3 9445c	CTACTTCTTTTGAATAGTT	Antisenso		
GLRaV-4	LR4f	ACCCTTCATAAGCAGGAACC	Senso	500 (OFR1 e 2, parcial)	Fazeli et al. (1998)
	LR4r	CTTGTGAAACCGACGGCC	Antisenso		
GCMV	GCMVsense	ATGTGTGCCACTACTGGCATGCA	Senso	391 (CP parcial e região que flanqueia 3')	Digiario et al. (2007)
	GCMVantisense	TTCTCTTCAAGAAATGCCTAAGA	Antisenso		
<i>Closterovirus</i>	HSP-P1	GGITTIGAITTYGGIACIAC	Senso	560-660 (HSP70, parcial)	Tian et al. (1996); Radaelli (2009)
	HSP-P2	RTCIAAIGTICICCCICCRAA	Antisenso		
<i>Tricho/Vitivirus</i>	dPR1_v	GCDAAARGCNGNCARACHHTVGCBTGYTT	Senso	363 (REP, parcial)	Saldarelli et al. (1998)
	dPR2_c	RAAYTCNCCNSWRAANCKCAT	Antisenso		
<i>Betaflexiviridae</i>	dRW up1	WG CIAARGCIGGICARAC	Senso	330 (REP, parcial)	Dovas & Katis (2003)
	dRW do2	RMYTCICCSWRAAICKCAT	Antisenso		

Todos os oligonucleotídeos utilizados (Tabela 4) foram previamente testados na amplificação de controles positivos, a exceção daqueles direcionados para a amplificação dos

vírus ArMV, GLRaV-4, GVD, GCMV, RSPaV-SY e RSPaV-PN, pois não havia disponibilidade de tais controles (vírus ainda não relatados no Brasil).

Clonagem e seleção de clones recombinantes: Os fragmentos de DNA eluídos foram ligados ao vetor pGEM-T Easy (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. A seguir, as ligações foram utilizadas na transformação de células competentes de *Escherichia coli* DH5 α , por choque térmico ou eletroporação no aparelho Gene Pulse II (Biorad), conforme metodologia descrita por Sambrook & Russel (2001).

O DNA plasmidial das colônias bacterianas transformadas foi extraído utilizando-se o kit comercial “Illustra plasmid Prep Mini Spin Kit” (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante. A confirmação da presença dos fragmentos virais amplificados nos plasmídeos recombinantes foi realizada por digestão com a enzima de restrição *EcoRI*. Procedeu-se ao sequenciamento automático de pelo menos um clone (isolado viral) obtido para cada fragmento amplificado.

Análises das sequências: As sequências de nucleotídeos (nt) foram alinhadas com o auxílio do software Clustal X 1.8 (LARKIN et al., 2007). As comparações entre as sequências de nt e aminoácidos deduzidos (aad) obtidas com outros isolados disponíveis no GenBank foram realizadas utilizando-se o programa BLASTn ou BLASTp do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Os alinhamentos múltiplos e as análises filogenéticas foram realizados para as sequências completas ou parciais de nt dos diferentes genes de cada vírus (RSPaV, GLRaV-2 e GLRaV-3), utilizando o software Mega 4.1 (TAMURA et al., 2007). As árvores filogenéticas foram obtidas por meio de análise de máxima parcimônia e “bootstrap” com 2000 replicações.

Foram incluídas nestas análises, sequências dos genes homólogos de isolados “estrangeiros” depositadas no banco de dados do NCBI (GenBank). Também foram incluídas as sequências dos isolado-tipo de cada espécie viral (RSPaV, NC_001948; GLRaV-2, NC_007448; GLRaV-3, NC_004667) e, para os grupos externos das árvores, foram utilizadas as espécies-tipo de cada gênero: *Apple stem pitting virus* (ASPV, *Foveavirus*, NC_003462) e *Beet yellows virus* (BYV, *Closterovirus*, NC_001598). Para o grupo externo aos isolados de GLRaV-3 foi utilizado o *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1, *Ampelovirus*, AF195822).

Deteção sorológica dos isolados: As mesmas plantas testadas por RT-PCR também foram avaliadas pelo teste ELISA indireto, utilizando-se anti-soros policlonais contra as CPs do GLRaV-2 (RADAELLI et al., 2008) e do RSPaV (anti-soro produzido neste trabalho, Capítulo II) e por ELISA direto para GLRaV-3, com anti-soro comercial (Agritest, Bari - Valenzano, Itália).

As amostras para os testes ELISA consistiram de ramos e/ou pecíolos maduros de videiras, os quais foram triturados em almofariz na presença de nitrogênio líquido. Como controle negativo foi utilizada a cv. Rupestris du Lot obtida por cultura de tecidos e previamente testada.

Para o teste ELISA indireto (GLRaV-2 e RSPaV), placas de poliestireno foram carregadas com 200 µl de cada amostra, diluída 1:3 (p/v) em tampão de revestimento (carbonato de sódio 0,05 M, pH 9,6), incubando-se por 12h a 4°C. Após lavagens (três vezes com tampão PBS-T, pH 7,4 em intervalos de 5 min cada) foi adicionada a IgG (4 µg/ml) diluída em tampão de conjugado [PBS-T, pH 7,4, 2% de PVP 40.000 (p/v) e 0,2% de BSA (p/v)]. Após incubação por 3 horas a 37°C, seguida de nova lavagem, adicionaram-se 200 µl de conjugado geral (Sigma), diluído 1:1000 em tampão de conjugado e, novamente, incubando a 37°C por 3 horas. Após nova lavagem, adicionou-se o substrato da enzima (4-nitrofenil-fosfato dissódico hexahidratado, Sigma) diluído (1 mg/ml) em dietanolamina 10%, pH 9,8 (ALMEIDA & LIMA, 2001).

Para o ELISA direto (GLRaV-3), placas de poliestireno foram submetidas a cobertura com 200 µl de anti-soro comercial diluído em tampão de revestimento, conforme instruções do fabricante e em seguida incubadas a 37°C por 4 horas. Após lavagens, as amostras trituradas e diluídas 1:3 (p/v) em tampão de extração [Tris-HCl 0,5 M, pH 8,2, 0,8% NaCl (p/v), 2% PVP 40.000 (p/v), 1% PEG 6000 (p/v) e 0,05% Tween 20 (v/v)] foram adicionadas à placa (200 µl) e incubadas por 12h a 4°C. Após novas lavagens, foram adicionados 200 µl de “conjugado específico”, diluído em tampão de conjugado, conforme as instruções do fabricante. Após incubação por 3 horas a 37°C, seguida de lavagens, adicionou-se o substrato da enzima, conforme descrito anteriormente (ALMEIDA & LIMA, 2001).

As leituras de absorbância, em 405 nm, foram registradas no aparelho leitor de placas (Anthos 2020). As amostras foram consideradas positivas quando a leitura de absorbância foi duas vezes superior àquela verificada para a planta sadia. Os valores foram obtidos, em média, 2 a 3h após a adição do substrato.

Deteção de vírus em cochonilhas vetoras: As cochonilhas foram coletadas em vinhedos de Caxias do Sul (RS) e Petrolina (PE) (Tabela 5). A extração do RNA total (RNAt) foi realizada com o reagente TRIzol (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante. As amostras foram compostas de 6 a 8 insetos adultos ou ninfas em diferentes estádios, maceradas em tampão de extração [0,5 M Tris-HCl, pH 8,3, 0,14 M NaCl, 2% PVP-40 (p/v), 0,05% Tween 20 (v/v)] e homogeneizadas no reagente TRIzol. Foram utilizados clorofórmio para a separação de fases, álcool isopropílico para a precipitação do RNAt e, o sedimento final seco foi ressuspensionado com água autoclavada. Em seguida procedeu-se à síntese do cDNA viral e as reações de PCR conforme descrito anteriormente.

As amostras de cochonilhas foram avaliadas para a presença dos vírus: GVB (oligonucleotídeos GVB6445 5' ATGGAAAATATATCCCGGATGG 3' e antisenso GVB7038r 5' ACTCGTCAGACA ACTCTATATC 3') (SALDARELLI et al., 1996; RADAELLI et al., 2008), GVA (766/C1197), GLRaV-1 (GLRaV-1_v/GLRaV-1_r) e GLRaV-3 (LR3 8504v/LR3 9445c) (Tabela 4). Como controle negativo das reações da RT-PCR, foram utilizadas cochonilhas da espécie *Pseudococcus viburni*, não virulíferas, criadas e mantidas em frutos de abóbora, no Laboratório de Entomologia da Embrapa Uva e Vinho.

Tabela 5 - Relação das amostras de cochonilhas *Planococcus citri* e *Pseudococcus viburni* (Família: Pseudococcidae) avaliadas para a presença de vírus.

Amostra	Localização do vinhedo	Data coleta	Espécie
n. 40	Fazenda Terra do Sol, Petrolina (PE)	07.10.09	<i>Planococcus citri</i>
n. 51	Fazenda Queiroz Galvão Alimentos, Petrolina (PE)	08.10.09	<i>Planococcus citri</i>
n. 53	Petrolina (PE)	17.02.10	<i>Planococcus citri</i>
caxias	Caxias do Sul (RS)	28.01.10	<i>Pseudococcus viburni</i>
venturin	Caxias do Sul (RS)	26.01.10	<i>Pseudococcus viburni</i>

Os produtos da RT-PCR foram analisados em géis de agarose. Para a comprovação da especificidade das reações de RT-PCR, uma das amostras foi sequenciada. Para isto, a banda correspondente ao fragmento de 451 pb de GVA, da amostra n. 40, foi recortada do gel, eluída e clonada conforme mencionado anteriormente.

A sequência de nt deste isolado de GVA foi analisada conforme descrito anteriormente. Foram incluídas nestas análises as sequências homólogas de isolados brasileiros e “estrangeiros” depositadas no banco de dados do NCBI (GenBank) e que

apresentaram maiores idêntidades de nt com o isolado de GVA obtido. Para o grupo externo da árvore filogenética foi adicionada a espécie *Heracleum latent virus* (HLV, *Vitivirus*, X79270).

2.4 Resultados e discussão

Detecção molecular dos vírus: De modo geral, os vírus que infectam a videira apresentam baixa concentração na planta, são restritos a tecidos específicos (ex. floema), além de o título viral flutuar bastante segundo o estágio fenológico da planta hospedeira, quando se compara com vírus que infectam outras culturas (BOSCIA et al., 1992). Contudo, a extração a partir de dsRNA possibilitou a obtenção de ácidos nucleicos com maior integridade, qualidade, pureza e concentração, quando comparada a extração de RNA_t de videiras (dados não mostrados), o que resultou em reações de RT-PCR com maior especificidade e sensibilidade.

As cinco plantas provenientes dos dois vinhedos avaliados foram testadas para a presença de 12 espécies virais, sendo apenas 3 delas detectadas: RSPaV, GLRaV-2 e GLRaV-3 (Tabela 6). A não detecção das demais espécies pode ser atribuída a sua efetiva ausência nas amostras, ou a presença de isolados específicos para os quais os oligonucleotídeos utilizados não foram adequados, ou ainda, devido ao título viral extremamente baixo nas amostras. Além dos vírus anteriormente mencionados, que não possuem relatos no Brasil, o GLRaV-1 é prevalente em vinhedos do Vale do São Francisco, apresentando menor incidência no Rio Grande do Sul. O vírus GFLV e GFkV normalmente também apresentam baixa incidência, além da infecção ser latente nos vinhedos brasileiros.

Tabela 6 – Resultados obtidos por RT-PCR para as amostras de videiras avaliadas para presença de 12 espécies virais.

Vírus	Oligonucleotídeos	Localização do fragmento amplificado em relação ao acesso completamente sequenciado	Tamanho do Fragmento (pb)	Amostra				
				CS1	CS2	IS1	IS2	IS3
GVA	766/C1197	CP	451	-	-	-	-	-
GVB	GVB_v/GVB_c	CP	693	-	-	-	-	-
GVD	GVD_v/GVD_c	CP	963	-	-	-	-	-
GFkV	GFkV_v/GFkV_r	CP	693	-	-	-	-	-
	GFkV_v/GFkV_c	REP	245	-	-	-	-	-
GFLV	GFLVs2515/GFLVa3300	CP	809	-	-	-	-	-
ArMV	H428v/C867c	CP	440	-	-	-	-	-
RSPaV	RSPaV_v1/RSPaV_c1	7771-8550 (NC_001948)	780	(+)*	+	+	(+)*	+
	RSP2/RSP21	654-1484 (NC_001948)	831	-	(+)*	(+)*	-	-
RSPaV-PN	2R/PN1F	MTR	505	-	-	-	-	-
RSPaV-SY	SY9F/SY8R	2082-2710 (NC_001948)	628	+	+	+	+	(+)*
GLRaV-1	GLRaV-1_v/GLRaV-1_r	CP	969	-	-	-	-	-
	LRA/CPdR	CPd2	1019	-	-	-	-	-
GLRaV-2	V2CPf/V2CPr2	14631-15061 (NC_007448)	431	+	(+)*	+	+	(+)*
GLRaV-3	LR3 8504v/LR3 9445c	13269-14210 (NC_004667)	942	-	-	+	(+)*	+
GLRaV-4	LR4f/LR4r	ORF1 e 2	500	-	-	-	-	-
GCMV	GCMVsense/GCMVantisense	CP	391	-	-	-	-	-
<i>Closterovirus</i>	HSP-P1/HSP-P2	10554-11176 (NC_007448)	623					
		10104-10896 (NC_004667)	593	(+) ^{LR2}	+	(+) ^{LR3}	+	+
<i>Tricho/Vitivirus</i>	dPR1_v/dPR2_c	5729- 6068 (NC_001948)	339	-	+	+	(+) ^{RSP}	-
<i>Betaflexiviridae</i>	dRW up1/dRW do2	5746-6084 (NC_001948)	339	+	(+) ^{RSP}	+	+	+

(+)* Sequências depositadas no banco de dados do NCBI (GenBank); CS: Cabernet Sauvignon; IS: Isabel

No total, foram obtidos e clonados 12 isolados virais: sete isolados de RSPaV: CS1 e IS2a (780 pb), CS2a e IS1 (831 pb), CS2b (339 pb), IS2b (339 pb) e IS3 (628 pb), três isolados de GLRaV-2: CS1 (623 pb), CS2 (431 pb) e IS3 (431 pb) e dois isolados de GLRaV-3: IS1 (593 pb) e IS2 (942 pb) (Tabela 6 e 7), os quais foram sequenciados e tiveram suas sequências depositadas no banco de dados do NCBI (GenBank) (Tabela 7).

Tabela 7 - Relação das sequências dos isolados virais de RSPaV, GLRaV-2 e GLRaV-3 obtidos no trabalho e depositados no banco de dados do NCBI (GenBank).

Vírus	Gene sequenciado	n° nucleotídeos / n° aminoácidos deduzidos	Código no GenBank	Nome do isolado viral
RSPaV	proteína capsidial (completa)	780	GU166289	CS1
		259	ACZ43912	
		780	GU166290	IS2a
		259	ACZ43913	
	replicase (parcial)	831	HM059036	CS2a
		276	ADG57583	
		831	HM059037	IS1
		276	ADG57584	
		339	HM059038	CS2b
		113	ADG57585	
		339	HM358051	IS2b
		112	ADI87216	
		628	HM130524	IS3 (RSPaV estirpe Syrah)
209	ADG57589			
GLRaV-2	proteína capsidial (parcial)	431	HM059035	CS2
		143	ADG57582	
		431	HM358050	IS3
	143	ADI87215		
proteína de choque térmico 70 (parcial) (HSP70)	623	HM059039	CS1	
	207	ADG57586		
GLRaV-3	proteína capsidial (completa)	942	HM059034	IS2
		313	ADG57581	
	proteína de choque térmico 70 (parcial) (HSP70)	593	HM059040	IS1
197	ADG57587			

Para a presença de RSPaV, as plantas foram avaliadas com dois pares de oligonucleotídeos específicos (RSPaV_v1/RSPaV_c1 e RSP2/RSP21) e dois pares degenerados (dPR1_v/dPR2_c e dRW up1/dRW do2). Todos promoveram a detecção de RSPaV nas amostras avaliadas, com diferentes eficiências, variando de 2 a 5 plantas infectadas (Tabela 6 e Figuras 2B, 2D, 2E, 2F e 2G), fato, provavelmente atribuído a especificidade do oligonucleotídeos em relação ao isolado de RSPaV presente na amostra. Com o par dPR1_v/dPR2_c desenhado para os gêneros *Tricho/Vitivirus* foi possível detectar o RSPaV em apenas 3 amostras. Este par de oligonucleotídeo permitiu a detecção do RSPaV, *Foveavirus*, em função da suas sequências degeneradas.

Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho foram obtidos por Bertazzon & Angelini (2004), em testes de detecção de diferentes isolados de GLRaV-2, os quais obtiveram resultados falso-negativos em função do oligonucleotídeo utilizado.

Meng et al. (1999) destacam a importância da escolha dos oligonucleotídeos na indexagem de plantas infectadas por RSPaV, e demonstram que a eficiência entre diferentes

pares de oligonucleotídeos testados foi de 85 a 100%. Beuve et al. (2007) também ressaltam a importância de oligonucleotídeos desenhados com base em regiões conservadas, levando-se em consideração a variabilidade entre os isolados da mesma espécie.

Todas as plantas avaliadas também se mostraram infectadas com RSPaV, estirpe Syrah (RSPaV-SY) (Figura 2A), uma estirpe específica do RSPaV que causa engrossamento na região da enxertia na videira cultivar Syrah, além de necroses nesta região (LIMA et al., 2006a). Este pode ser considerado o primeiro relato desta estirpe em vinhedos brasileiros, o que reforça a importância de estudos da variabilidade. Estudos adicionais de caracterização biológica necessitam ser conduzidos neste caso.

Estes resultados demonstram a ocorrência de infecções virais múltiplas, considerando espécies e estirpes virais, em uma mesma planta (videira). Tal situação torna o diagnóstico mais complexo e o estudo de eficiência/eficácia de utilização de ferramentas moleculares adquire particular relevância.

Os oligonucleotídeos específicos para a estirpe Syrah (LIMA et al., 2006a) foram desenhados com base no gene da replicase, uma região considerada bastante variável e que permite diferenciar esta estirpe específica da estirpe típica do RSPaV (HALIBI et al., 2006).

Também se avaliou a presença da estirpe Pinot Noir (PN) do RSPaV (RSPaV-PN) com oligonucleotídeos específicos (LIMA et al., 2009) porém não houve amplificação nas plantas avaliadas. Ainda não há relato da ocorrência desta estirpe em vinhedos brasileiros até o presente momento. Esta estirpe, caracterizada por Lima et al. (2009) possui identidade de nt com outros isolados de RSPaV, variando de 76% a 78%.

Para a presença do GLRaV-2, foram testados um par de oligonucleotídeos específico (V2CPf/V2CPr2) e um degenerado (HSP-P1/HSP-P2). Pôde-se verificar que os mesmos apresentaram alta sensibilidade, permitindo a detecção desta espécie viral em todas as plantas avaliadas, tanto com o par específico (Figuras 2F e 2G), quanto com o degenerado (Figura 2C).

Para o vírus GLRaV-3 foram utilizados um par de oligonucleotídeos específico (LR3 8504v/LR3 9445c) e um degenerado (HSP-P1/HSP-P2). Apenas as plantas da cv. Isabel apresentaram-se infectadas, tanto na determinação com o par de oligonucleotídeos específicos (Figuras 2F e 2G), quanto com o degenerado (Figura 2C). O par HSP-P1/HSP-P2, desenhado para o gênero *Closterovirus*, permitiu também a detecção do GLRaV-3, o qual pertence a família *Closteroviridae*.

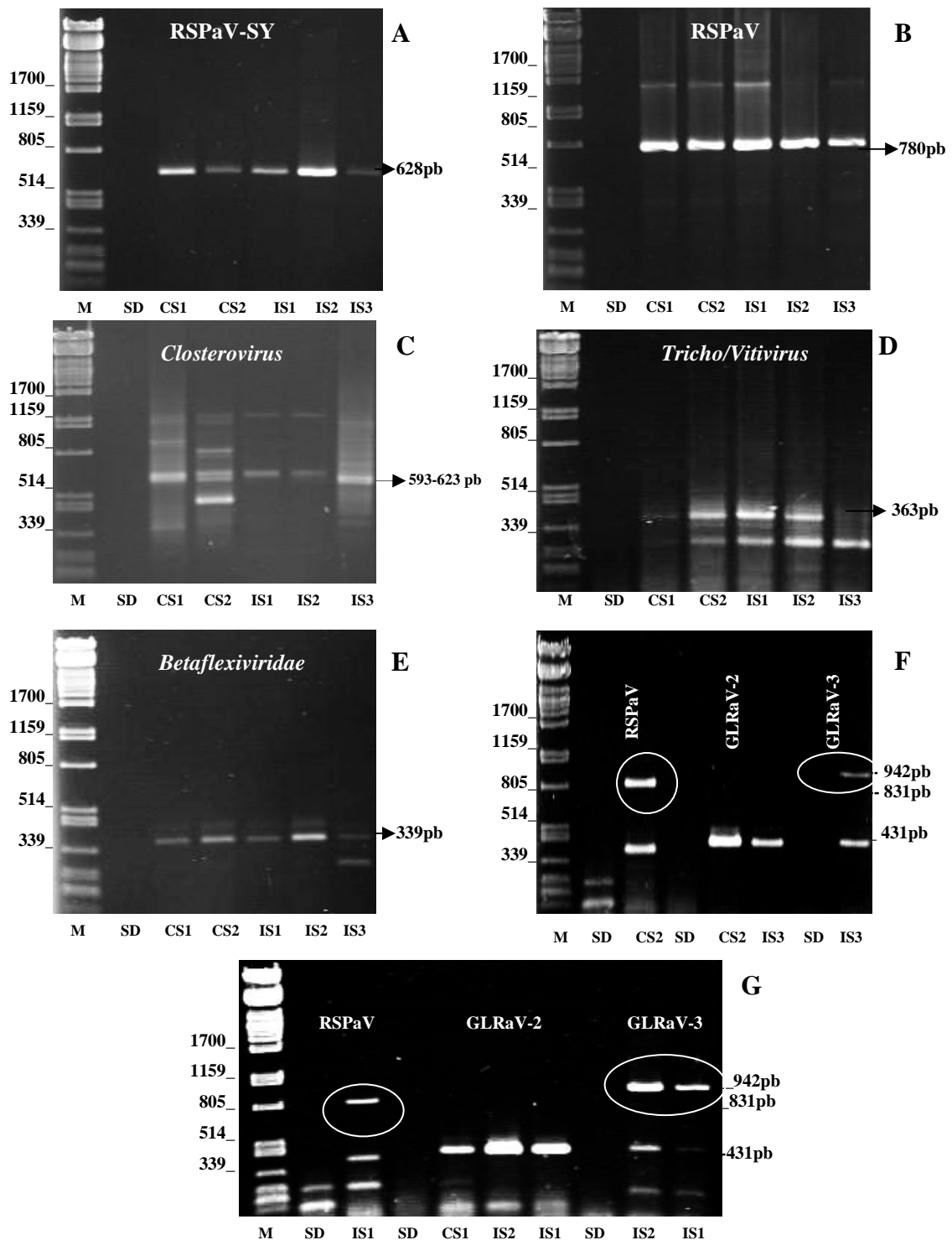


Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos da RT-PCR. Géis: (A) RSPaV-SY (SY9F/SY8R); (B) RSPaV (RSPaV_v1/RSPaV_c1); (C) *Closterovirus* (HSP-P1/HSP-P2); (D) *Tricho/Vitivirus* (dPR1_v/dPR2_c); (E): *Betaflexiviridae* (dRW up1/dRW do2); (F) RSPaV (RSP2/RSP21), GLRaV-2 (V2CPf/V2CPr2), GLRaV-3 (LR3 8504/LR3 9445); (G) RSPaV (RSP2/RSP21), GLRaV-2 (V2CPf/V2CPr2), GLRaV-3 (LR3 8504/LR3 9445). M: marcador DNA/*Pst*I, SD: planta sadia, CS1 e CS2: plantas cv. Cabernet Sauvignon, IS1, IS2 e IS3: plantas cv. Isabel.

Os resultados obtidos demonstram a ocorrência de infecções virais múltiplas nas cinco plantas avaliadas, envolvendo GLRaV-2, GLRaV-3 e RSPaV, incluindo a estirpe RSPaV-SY. Estas mesmas plantas não apresentaram infecções com as espécies virais de GVA, GVB, GFkV, GFLV, GLRaV-1, GVD, ArMV, GLRaV-4 e GCMV.

As plantas avaliadas de ambos o vinhedos, como mencionadas anteriormente, eram assintomáticas no início o ciclo vegetativo, sendo que a cv. Isabel, não expressou sintomas de infecção viral em todo seu ciclo vegetativo, contudo, nesta cultivar também foram detectadas infecções múltiplas.

Os resultados demonstram a prevalência e a importância das três espécies virais detectadas nas amostras, o que está em concordância com outros relatos em diferentes países vitícolas do mundo (MARTELLI, 2009) e, indiretamente, também expresso pelo número de sequências destes três vírus depositadas no banco de dados do NCBI (GenBank) (Tabela 2).

Análises das sequências: Todas as 12 sequências obtidas para os vírus RSPaV, GLRaV-2 e GLRaV-3 foram comparadas com regiões genômicas homólogas de outros isolados disponíveis no GenBank, através de análise de identidade de nucleotídeos (nt) e aminoácidos deduzidos (aad), além de terem sido submetidas a análises filogenéticas.

RSPaV (Identidade do gene da proteína capsidial): Nas comparações de sequência foram considerados os isolados-tipo de RSPaV completamente sequenciados (RSPaV, RSPaV-1), suas estirpes (SG1, BS, SY, PN) além do isolado CF207, cujo gene foi expressado no Capítulo II deste trabalho e o isolado RSP-SP, obtido em vinhedos de São Paulo (Pereira, 2008).

Pela análise de identidade de nt do gene completo da CP, verifica-se que os isolados caracterizados CS1 e IS2a apresentaram maiores identidades de nt com os isolados SG1 (95,7%) e BS (91,5%), respectivamente. As identidades de nt e aad apresentadas entre os dois isolados caracterizados foram de 84,7% e 81,8%, respectivamente. Em relação ao isolado tipo da espécie (RSPaV-1), o isolado CS1 apresentou identidade de 91,6% (nt) e 89,5% (aad) e o isolado IS2a apresentou 84,7% (nt) e 89,5% (aad). Quando comparados com os outros dois isolados brasileiros, CF207 caracterizado por Radaelli et al. (2009), também proveniente de vinhedos do Rio Grande do Sul e RSP-SP caracterizado por Pereira (2008), verificou-se baixa identidade de nt, entre 82,9-90,6% (Tabela 8).

Tabela 8 - Identidade (%) das sequências de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) do gene da proteína capsidial (780 pb) entre diferentes isolados de *Rupestris stem pitting-associated virus*.

	RSPaV	RSPaV-1	SG1	BS	SY	PN	CS1	IS2a	CF207	RSP-SP
RSPaV	-	99,6	95,7	92,6	92,6	93,4	89,5	89,5	98,1	91,8
RSPaV-1	99,4	-	96,1	92,6	93,0	93,4	89,5	89,5	98,4	91,8
SG1	90,9	90,8	-	90,7	91,5	91,8	88,8	87,2	94,5	89,1
BS	82,4	82,5	81,9	-	92,6	95,3	84,5	93,0	93,4	96,9
SY	85,2	85,6	85,8	84,2	-	93,4	85,3	88,0	93,8	92,2
PN	82,6	83,0	81,1	88,1	84,3	-	85,7	91,1	94,2	94,9
CS1	91,4	91,6	95,7	83,2	85,7	82,4	-	81,8	88,0	92,7
IS2a	84,7	84,7	83,5	91,5	85,1	89,1	84,7	-	89,5	83,3
CF207	96,8	96,8	88,8	84,6	86,2	84,7	89,7	85,1	-	92,6
RSP-SP	83,7	81,2	85,0	92,8	84,4	87,6	82,9	90,6	86,1	-

Códigos dos nucleotídeos dos isolados no GenBank e país: RSPaV (AF026278, EUA), RSPaV-1 (NC_001948, EUA), SG1 (AY881626, EUA), BS (AY881627, Canadá), SY (AY368590, EUA), PN (AY368172, EUA), CS1 (GU166290, Brasil), IS2a (GU166289, Brasil), CF207 (EF636804, Brasil) e RSP-SP (DQ443732, Brasil).

Pôde-se verificar, com base na análise filogenética do gene da proteína capsidial desses isolados, a formação de agrupamentos distintos, à semelhança de outros trabalhos (RADAELLI et al., 2009; LIMA et al., 2006a; MENG et al., 2006; NOLASCO et al., 2006; NAKAUNE et al., 2008). Observa-se a formação de pelo menos dois grupos, no qual o isolado IS2a se apresenta no grupo II, próximo aos isolados RSP-SP (Brasil), BS (Canadá) e PN (Estados Unidos) (Figura 3).

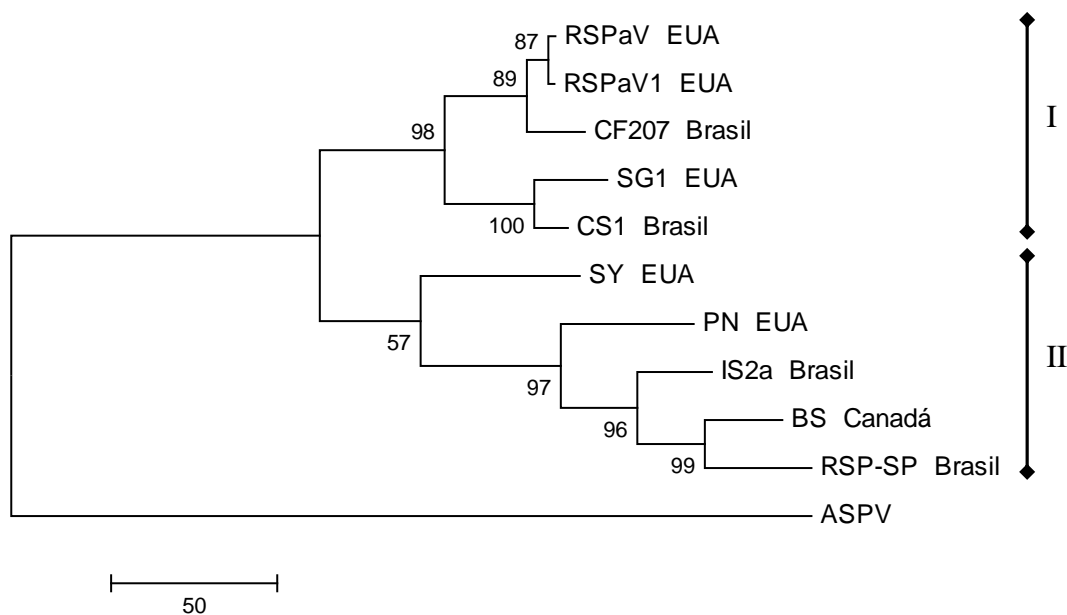


Figura 3 - Árvore filogenética por parcimônia, não enraizada, obtida com o software MEGA 4.1, baseada nas sequências de nucleotídeos do gene da proteína capsial (780 pb) dos isolados de *Rupestris stem pitting-associated virus*. Valores percentuais de “bootstrap” são mostrados nos ramos. As barras indicam número de substituições de nucleotídeos por sítio (50 = 0,05). Códigos dos nucleotídeos dos isolados no GenBank e país: RSPaV (AF026278, EUA), RSPaV-1 (NC_001948, EUA), SG1 (AY881626, EUA), BS (AY881627, Canadá), SY (AY368590, EUA), PN (AY368172, EUA), CS1 (GU166290, Brasil), IS2a (GU166289, Brasil), CF207 (EF636804, Brasil) e RSP-SP (DQ443732, Brasil). Para o grupo externo da árvore foi utilizado a espécie tipo do gênero: *Apple stem pitting virus* (ASPV, *Foveavirus*, NC_003462).

Pereira (2008) também caracterizaram o gene da CP de um isolado brasileiro de RSPaV (RSP-SP, DQ443732), provenientes de vinhedos do Estado de São Paulo, e este apresentou maior identidade da sequência de nt com o isolado canadense BS. Por analogia o isolado IS2a caracterizado neste trabalho seria mais próximo ao isolado de São Paulo do que o isolado CS1 (Tabela 8).

Os dois isolados “estrangeiros” (SG1 e BS) considerados mais próximos dos isolados brasileiros foram caracterizados por Meng et al. (2005a) e apresentaram 81,9% de identidade de nt entre si (Tabela 8). Estes autores demonstraram experimentalmente que a infecção da videira cv. St. George com o isolado SG1 é assintomática.

RSPaV (Identidade do fragmento do gene da replicase de 339 pb): A análise de identidade de nt dos isolados onde se amplificou parcialmente (339 pb) o gene da replicase demonstrou que o isolado CS2b apresentou maior identidade de nt com o isolado Hai1 (96,1%). Já o isolado IS2b apresentou maior identidade de nt com o isolado SG1 (91,0%) (Tabela 9).

Tabela 9 - Identidade (%) das sequências de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) da sequência parcial (339 pb) do gene da replicase dos diferentes isolados de *Rupestris stem pitting-associated virus*.

	RSPaV	RSPaV-1	SG1	BS	SY	PN	CS2b	Hai1	IS2b
RSPaV	-	100	98,2	99,1	93,6	95,4	94,6	95,4	98,0
RSPaV-1	97,8	-	98,2	99,1	93,6	95,4	94,6	95,4	98,0
SG1	88,8	89,6	-	99,1	94,5	96,3	95,5	96,3	98,0
BS	89,5	89,1	90,0	-	94,5	96,3	95,5	96,3	99,0
SY	77,0	76,4	78,2	78,6	-	96,3	93,7	95,4	96,0
PN	80,9	81,0	81,7	81,5	80,6	-	97,3	98,1	98,0
CS2b	81,4	80,9	80,9	81,3	80,9	84,0	-	98,1	97,0
Hai1	81,4	80,6	81,2	80,7	82,4	84,9	96,1	-	96,0
IS2b	87,6	87,8	91,0	89,9	78,8	80,4	80,4	80,1	-

Códigos dos nucleotídeos dos isolados no GenBank e país: RSPaV (AF026278, EUA), RSPaV-1 (NC_001948, EUA), SG1 (AY881626, EUA), BS (AY881627, Canadá), SY (AY368590, EUA), PN (AY368172, EUA), CS2b (HM059038, Brasil), Hai1 (AB277787, Japão), IS2b (HM358051, Brasil).

Pôde-se verificar, com base na análise filogenética da sequência parcial de nt do gene da replicase, a formação de pelo menos três grupos, onde os isolados IS2b e CS2b encontram-se no grupo II (SG1 - EUA, BS - Canadá e IS2b - Brasil) e no grupo III (Hai1 - Japão, PN - EUA e CS2b - Brasil, respectivamente) (Figura 4).

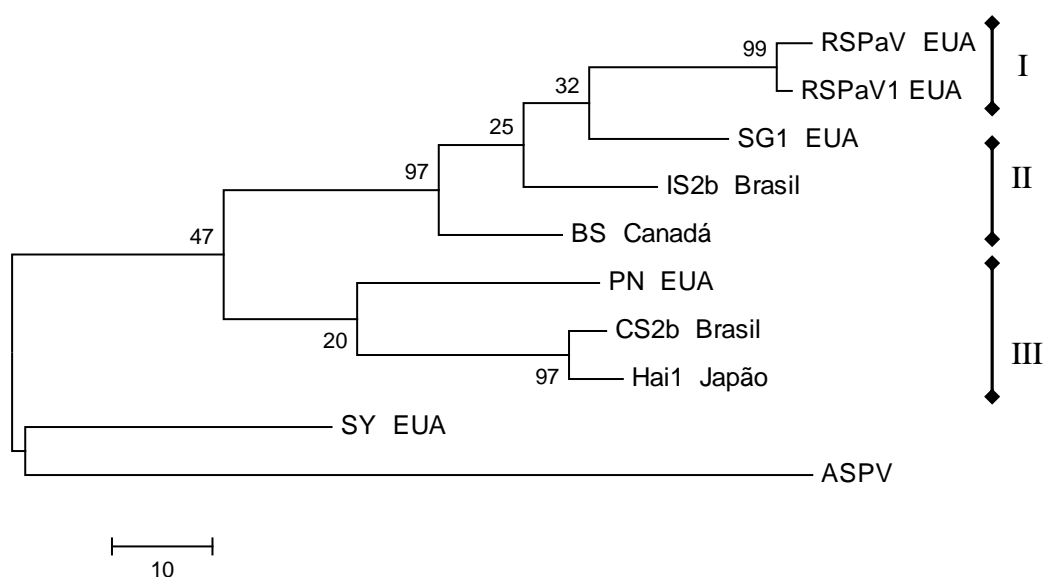


Figura 4 - Árvore filogenética por parcimônia, não enraizada, obtida com o software MEGA 4.1, baseada nas sequências parciais de nucleotídeos do gene (339 pb) da proteína replicase de isolados de *Rupestris stem pitting-associated virus*. Valores percentuais de “bootstrap” são mostrados nos ramos. As barras indicam número de substituições de nucleotídeos por sítio (10 = 0,01). Códigos dos nucleotídeos dos isolados no GenBank e país: RSPaV (AF026278, EUA), RSPaV-1 (NC_001948, EUA), SG1 (AY881626, EUA), BS (AY881627, Canadá), SY (AY368590, EUA), PN (AY368172, EUA), CS2b (HM059038, Brasil), Hai1 (AB277787, Japão), IS2b (HM358051, Brasil). Para o grupo externo da árvore foi utilizado a espécie tipo do gênero: *Apple stem pitting virus* (ASPV, *Foveavirus*, NC_003462).

RSPaV (Identidade do fragmento do gene da replicase de 831 e 628 pb): Para aqueles isolados em que foi amplificado parcialmente (831 pb) o gene da replicase do RSPaV, verificou-se que estes isolados (CS2a e IS1) apresentaram maiores identidades de nt com os isolados SG1 (92,4%) e RSPaV (96,4%), respectivamente. As identidades de aad apresentadas pelos isolados caracterizados, quando comparados com outros isolados disponíveis em banco de dados, foi entre 80,7-89,4% (CS2a) e 81,1-90,9% (IS1) e entre os dois isolados caracterizados foi de 87,2% (nt) e 91,3% (aad). Quando estes dois isolados foram comparados com o isolado tipo da espécie (RSPaV-1), verificaram-se identidades de nt de 87,1% e 96,2% e de aad de 88,4% e 90,5%, respectivamente (Tabela 10).

Tabela 10 - Identidade (%) das sequências de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) do gene parcial (831pb) da proteína replicase entre diferentes isolados de *Rupestris stem pitting-associated virus*.

	RSPaV	RSPaV-1	SG1	BS	SY	PN	CS2a	IS1
RSPaV	-	98,1	93,4	97,8	87,3	89,8	88,7	90,9
RSPaV-1	98,0	-	93,1	96,7	86,9	89,4	88,4	90,5
SG1	86,6	86,3	-	93,8	87,3	89,1	89,4	85,8
BS	86,2	86,0	85,6	-	88,7	89,8	89,1	89,4
SY	75,6	76,0	76,8	77,8	-	86,2	80,7	81,1
PN	77,8	77,5	78,4	76,5	76,1	-	83,3	83,6
CS2a	87,2	87,1	92,4	86,1	76,0	77,9	-	91,3
IS1	96,4	96,2	85,5	85,3	75,9	77,1	87,2	-

Códigos dos nucleotídeos dos isolados no GenBank e país: RSPaV (AF026278, EUA), RSPaV-1 (NC_001948, EUA), SG1 (AY881626, EUA), BS (AY881627, Canadá), SY (AY368590, EUA), PN (AY368172, EUA), CS2a (HM059036, Brasil), IS1 (HM059037, Brasil).

A análise filogenética da sequência parcial de nt da proteína replicase destes dois isolados, verificou-se a formação de pelo menos dois grupos: grupo I, formado pelos isolados RSPaV - EUA, RSPaV-1 - EUA, IS1 - Brasil e o grupo II, contendo os isolados SG1 - EUA e CS2a - Brasil (Figura 5).

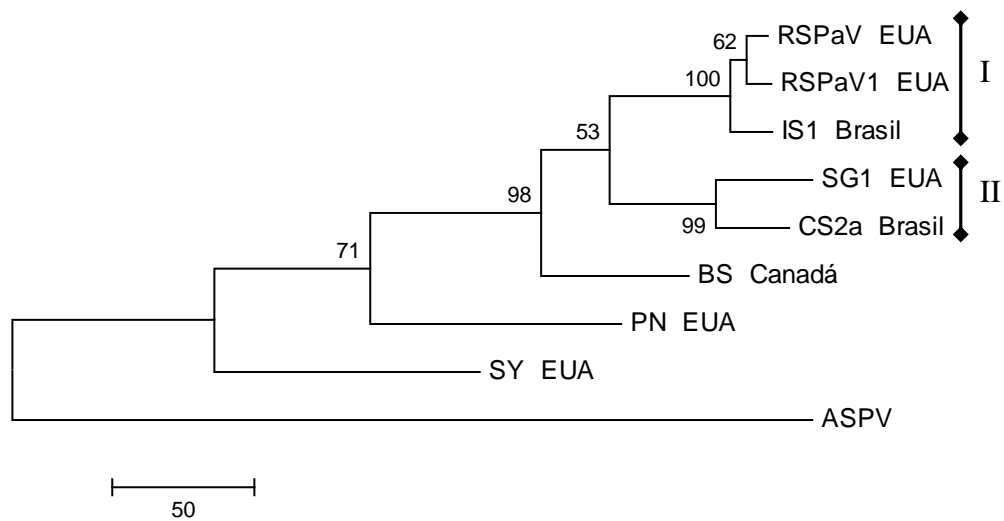


Figura 5 - Árvore filogenética por parcimônia, não enraizada, obtida com o software MEGA 4.1, baseada nas sequências parciais de nucleotídeos do gene (831 pb) da proteína replicase dos isolados de *Rupestris stem pitting-associated virus*. Valores percentuais de “bootstrap” são mostrados nos ramos. As barras indicam número de substituições de nucleotídeos por sítio (50 = 0,05). Códigos dos nucleotídeos dos isolados no GenBank e país: RSPaV (AF026278, EUA), RSPaV-1 (NC_001948, EUA), SG1 (AY881626, EUA), BS (AY881627, Canadá), SY (AY368590, EUA), PN (AY368172, EUA), CS2a (HM059036, Brasil), IS1 (HM059037, Brasil). Para o grupo externo da árvore foi utilizado a espécie tipo do gênero: *Apple stem pitting virus* (ASPV, *Foveavirus*, NC_003462).

Para o isolado IS3, em que foi amplificado parcialmente (628 pb) o gene da replicase, verificou-se maior identidade de nt com o isolado SY (91,1%), sendo que as identidades com os demais isolados foram bem inferiores (menores que 74,4%). A identidade de aad com o isolado SY foi de 93,3% e com os demais isolados foi inferior a 78,5% (Tabela 11).

Tabela 11 - Identidade (%) das seqüências de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) do gene parcial (628pb) da proteína replicase entre diferentes isolados de *Rupestris stem pitting-associated virus*.

	RSPaV	RSPaV-1	SG1	BS	SY	PN	IS3
RSPaV	-	97,3	84,2	88,1	72,6	75,0	73,7
RSPaV-1	97,6	-	87,1	87,6	77,0	74,0	76,8
SG1	86,8	87,2	-	85,1	78,5	75,1	70,4
BS	88,1	87,9	87,5	-	76,0	76,5	77,0
SY	72,7	72,8	71,0	73,8	-	77,9	93,3
PN	76,4	75,4	72,8	77,3	73,8	-	78,5
IS3	74,1	74,3	73,1	74,4	91,1	73,5	-

Códigos dos nucleotídeos dos isolados no GenBank e país: RSPaV (AF026278, EUA), RSPaV-1 (NC_001948, EUA), SG1 (AY881626, EUA), BS (AY881627, Canadá), SY (AY368590, EUA), PN (AY368172, EUA), IS3 (HM130524, Brasil).

As análises de identidade de nt confirmam os resultados obtidos com os oligonucleotídeos específicos para o RSPaV-SY, pois demonstraram que o isolado IS3 corresponde realmente à estirpe Syrah do RSPaV.

Pôde-se verificar pela análise filogenética, que o isolado IS3, quando comparado com diferentes isolados, resultou na formação de pelo menos dois grupos: grupo I, formado pelas estirpes típicas do RSPaV (RSPaV - EUA, RSPaV-1 - EUA) e II, formado pela estirpe Syrah, caracterizada nos EUA (SY - EUA) e o isolado brasileiro (IS3 - Brasil) (Figura 6).

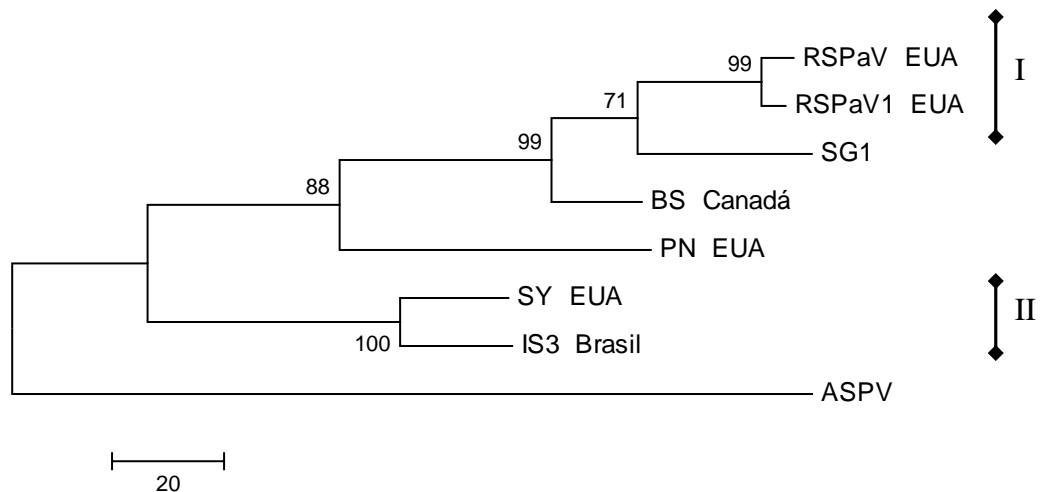


Figura 6 - Árvore filogenética por parcimônia, não enraizada, obtida com o software MEGA 4.1, baseada nas sequências parciais de nucleotídeos do gene (628 pb) da proteína replicase dos isolados de *Rupestris stem pitting-associated virus*. Valores percentuais de “bootstrap” são mostrados nos ramos. As barras indicam número de substituições de nucleotídeos por sítio (20 = 0,02). Códigos dos nucleotídeos dos isolados no GenBank e país: RSPaV (AF026278, EUA), RSPaV-1 (NC_001948, EUA), SG1 (AY881626, EUA), BS (AY881627, Canadá), SY (AY368590, EUA), PN (AY368172, EUA), IS3 (HM130524, Brasil). Para o grupo externo da árvore foi utilizado a espécie tipo do gênero: *Apple stem pitting virus* (ASPV, *Foveavirus*, NC_003462).

Neste trabalho verificou-se a existência de variabilidade significativa entre os isolados de RSPaV estudados, independente dos genes (completos ou parciais) caracterizados, confirmando resultados anteriores, obtidos por Nolasco et al. (2006), Nakaune et al. (2008), Meng et al. (2006) e Radaelli et al. (2009). Com base na identidade das sequências de nt, verificou-se que o gene da CP (84,7-91,6%) se mostrou mais conservado que o gene da replicase (80,9-96,4%) a exceção do isolado SY (Tabela 8 a 11) confirmando resultados obtidos por Alabi et al. (2010).

A maior variabilidade apresentada pelos isolados de RSPaV estudados, foi observada com o isolado IS3 (RSPaV-SY), o qual apresentou identidade de nucleotídeos com isolados tipo desta espécie, de 74,1-74,3% (nt) e 73,7-76,8% (aad) (Tabela 11). Lima et al. (2006a) caracterizaram originalmente o isolado de RSPaV designado RSPaV-SY (estirpe Syrah) e observaram que a identidade de nucleotídeos com outros isolados foi de, aproximadamente, 77%. Adams et al. (2004) definem que identidade da sequência de nucleotídeos menor que 72% ou que 80% para aminoácidos, nos genes CP ou REP, determinam a demarcação de novas espécies para a família *Betaflexiviridae*.

GLRaV-2 (Identidade do fragmento do gene da CP de 431 pb): Pela análise de identidade de nt dos isolados em que foi amplificado parcialmente (431 pb) o gene da CP, verificou-se que os isolados CS2 e IS3 apresentaram maiores identidades de nt e aad com o isolado H4 [92,5% (nt) e 93,7% (aad); 92,7% (nt) e 93,6% (aad), respectivamente]. A identidade de nt entre os dois isolados foi considerada alta (98,8%) e com o isolado tipo da espécie (93/955) foi de aproximadamente 87% (Tabela 12).

Tabela 12 - Identidade (%) das sequências de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) do gene parcial (431pb) da proteína capsidial parcial dos diferentes isolados de *Grapevine leafroll-associated virus 2*.

	PN	93/955	RG	BD	H4	CS2	IS3
PN	-	96,5	88,8	83,2	93,7	95,8	95,0
93/955	91,2	-	88,8	82,5	93,7	93,7	93,6
RG	75,6	75,8	-	82,5	87,4	86,7	86,6
BD	73,08	75,9	77,7	-	83,2	83,2	82,3
H4	88,4	86,07	77,2	75,6	-	93,7	93,6
CS2	87,7	87,2	77,2	75,1	92,5	-	97,8
IS3	87,9	87,4	77,7	76,1	92,7	98,8	-

Códigos dos nucleotídeos dos isolados no GenBank: PN (AF039204, EUA), 93/955 (NC_007448, África do Sul), RG (AF314061, EUA), BD (DQ286725, Itália), H4 (AY697863, Itália), CS2 (HM059035, Brasil), IS3 (HM358050, Brasil).

Verificou-se, com base na análise filogenética das sequências parciais de nt do gene da proteína capsidial dos isolados CS2 e IS3 a formação de três grupos, estando os dois isolados estudados (CS2 e IS3) incluídos no grupo I, juntamente com o isolado H4 (Figura 7).

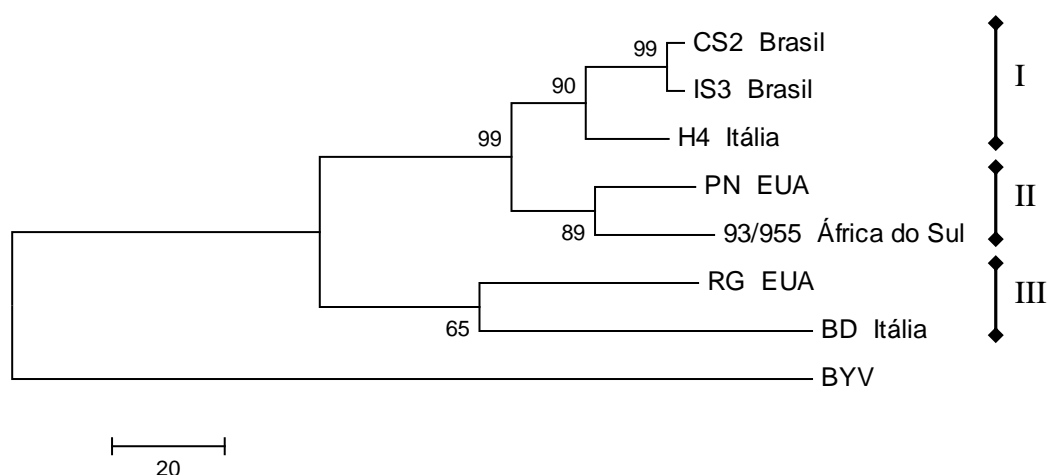


Figura 7 - Árvore filogenética por parcimônia, não enraizada, obtida com o software MEGA 4.1, baseada nas sequências parciais de nucleotídeos do gene (431 pb) da proteína capsidial dos isolados de *Grapevine leafroll-associated virus 2*. Valores percentuais de “bootstrap” são mostrados nos ramos. As barras indicam número de substituições de nucleotídeos por sítio (20 = 0,02). Códigos dos nucleotídeos dos isolados no GenBank: PN (AF039204, EUA), 93/955 (NC_007448, África do Sul), RG (AF314061, EUA), BD (DQ286725, Itália), H4 (AY697863, Itália), CS2 (HM059035, Brasil), IS3 (HM358050, Brasil). Para o grupo externo da árvore foi utilizado a espécie tipo do gênero: *Beet yellows virus* (BYV, *Closterovirus*, NC_001598).

O isolado H4 foi caracterizado por Abou Ghanem-Sabanadzovic et al. (2000) como sendo uma variante biológica do GLRaV-2, distinta de outros isolados transmitidos mecanicamente do mesmo vírus, devido à diferenças nas reações em hospedeiras herbáceas e na sequência do gene da CP. Este autores verificaram que o isolado H4 induz lesões locais necróticas em *Nicotiana clevelandii*, além de infecção sistêmica em *N. occidentalis*. O isolado H4 diferiu em aproximadamente 12% na sequência de nt do gene da CP em relação a outros isolados deste mesmo vírus. Meng et al. (2005b) mostraram que o isolado americano, 93/955 diferiu em 7,4% de nt quando comparado ao isolado PN e 11,1% com o isolado H4. Radaelli et al. (2009) caracterizaram seis isolados brasileiros deste vírus e destes, três (M/C, MH e RI), também se mostraram mais próximos ao isolado H4.

GLRaV-2 (Identidade do fragmento do gene HSP70 de 623 pb): Para o isolado CS1, em que foi amplificado parcialmente (623 pb) o gene da proteína HSP70, verificou-se maior identidade de nt com o isolado PV20 (94,8%), e de 74-75,2% com os demais isolados, onde está incluso o isolado tipo da espécie (93/955). Em relação à identidade de aad, esta foi de

98% entre os isolados CS1 e PV20 e de aproximadamente 83% com os demais isolados (Tabela 13).

Tabela 13 - Identidade (%) das sequências de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) do gene parcial (623 pb) da HSP70 entre os diferentes isolados de *Grapevine leafroll-associated virus 2*.

	PN	93/955	RG	BD	Alfie	SE	CS1	PV20
PN	-	93,3	85,7	86,2	86,2	83,8	85,3	86,6
93/955	88,2	-	85,3	84,3	84,3	83,8	84,8	84,7
RG	74,4	74,1	-	91,9	91,9	98,9	83,8	84,2
BD	75,04	74,1	80,8	-	99,0	90,4	82,8	84,2
Alfie	75,7	74,3	81,3	98,1	-	90,4	82,8	84,2
SE	73,2	73,4	97,4	79,7	80,2	-	82,3	82,8
CS1	74,0	74,9	74,0	75,2	74,7	73,4	-	98,0
PV20	73,4	74,3	75,8	75,9	75,2	75,3	94,8	-

Códigos dos nucleotídeos dos isolados no GenBank e país: PN (AF039204, EUA), 93/955 (NC_007448, África do Sul), RG (AF314061, EUA), BD (DQ286725, Itália), Alfie (AY456132, Nova Zelândia), SE (HM130523, Brasil), CS1 (HM059039, Brasil), PV20 (EF012721, França).

Verificou-se também, com base na análise filogenética, a formação de quatro grupos, sendo que o isolado CS1 foi incluído no grupo III, juntamente com o isolado PV20 (Figura 8).

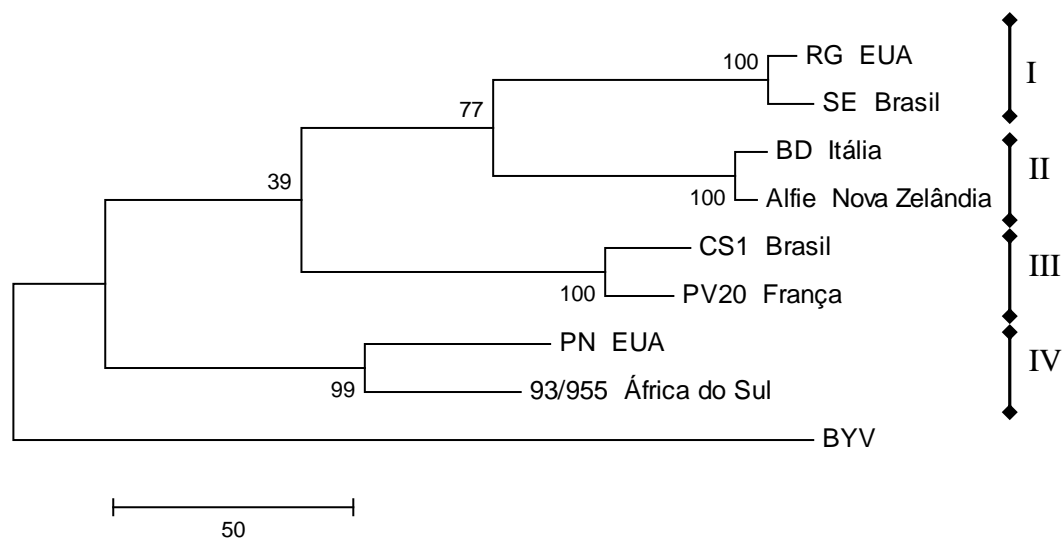


Figura 8 - Árvore filogenética por parcimônia, não enraizada, obtida com o software MEGA 4.1, baseada nas sequências parciais de nucleotídeos do gene (623 pb) da proteína HSP70 dos isolados de *Grapevine leafroll-associated virus 2*. Valores percentuais de “bootstrap” são mostrados nos ramos. As barras indicam número de substituições de nucleotídeos por sítio (50 = 0,05). Códigos dos nucleotídeos dos isolados no GenBank e país: PN (AF039204, EUA), 93/955 (NC_007448, África do Sul), RG (AF314061, EUA), BD (DQ286725, Itália), Alfie (AY456132, Nova Zelândia), SE (HM130523, Brasil), CS1 (HM059039, Brasil), PV20 (EF012721, França). Para o grupo externo da árvore foi utilizado a espécie tipo do gênero: *Beet yellows virus* (BYV, *Closterovirus*, NC_001598).

O isolado PV20 foi caracterizado por Beuve et al. (2007), tendo apresentado baixa identidade nt com os demais isolados incluídos naquele estudo. Isto também foi verificado neste trabalho, pois a alta identidade verificada entre os isolados CS1 e PV20 não foi verificada com os demais isolados.

Os isolados inseridos nas análises de identidade e filogenia, PN (MENG et al., 2005b), RG (ROWHANI et al., 2002), BD (BERTAZZON & ANGELINI, 2004), H4 (ABOU GHANEM-SABANADZOVIC et al., 2000) e Alfie (BONFILIOLI et al., 2003), são distantemente relacionados com o isolado tipo desta espécie (isolado 93/955).

GLRaV-3 (Identidade do gene da proteína capsidial): Pela análise de identidade de nt do isolado IS2, em que foi amplificado o gene completo (942 pb) da CP, pôde-se verificar que este isolado apresentou maior identidade de nt com o isolado GP18 (98,4%). O isolado IS2 apresentou as seguintes identidades de nt quando comparado a outros isolados brasileiros: 92,9% (Pet1), 92,8% (Pet2), 92,7% (Pet3) e 97,7% (Pet4) (Tabela 14). Os isolados brasileiros

Pet1, 2 e 3 (DIANESE et al., 2005), apresentaram alta identidade de nt entre si, e menor com o isolado Pet4. Todos estes isolados são provenientes de vinhedos de Petrolina (PE) (FAJARDO et al., 2007b). Em relação ao isolado tipo da espécie (NY), verificaram-se identidades de 92,3% (nt) e 93,9% (aad) (Tabela 14).

Tabela 14 - Identidade (%) das sequências de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) do gene completo (942 pb) da proteína capsidial entre diferentes isolados de *Grapevine leafroll-associated virus 3*.

	GP18	Pet4	Pet1	Pet2	CI766	DW2	Pet3	IS2	NY
GP18	-	97,4	95,5	95,2	95,5	95,5	95,2	98,0	94,5
Pet4	97,5	-	95,8	95,5	95,8	95,8	95,5	96,4	94,8
Pet1	93,01	93,4	-	99,6	100	100	99,6	94,8	99,0
Pet2	92,9	93,3	99,8	-	99,6	99,6	99,3	94,5	98,7
CI766	92,8	93,2	99,5	99,4	-	100	99,6	94,8	99,0
DW2	92,8	93,2	99,6	99,5	99,4	-	99,6	94,8	99,0
Pet3	92,8	93,2	99,7	99,6	99,3	99,4	-	94,5	98,7
IS2	98,4	97,7	92,9	92,8	92,7	92,7	92,7	-	93,9
NY	92,4	92,9	99,4	99,3	99,0	99,1	99,2	92,3	-

Códigos dos nucleotídeos dos isolados no GenBank e país: GP18 (EU259806, África do Sul), Pet4 (AY753208, Brasil), Pet1 (DQ680141, Brasil), Pet2 (DQ680142, Brasil), CI766 (EU344893, Chile), DW2 (DQ119574, China), Pet3 (DQ062152, Brasil), IS2 (HM059034, Brasil), NY (NC_004667, EUA).

Com base na análise filogenética, verificou-se a formação de dois grupos distintos, com o isolado CS1 incluído no grupo II, cujos membros apresentaram identidades de 97,5-98,4% (nt) (Figura 9).

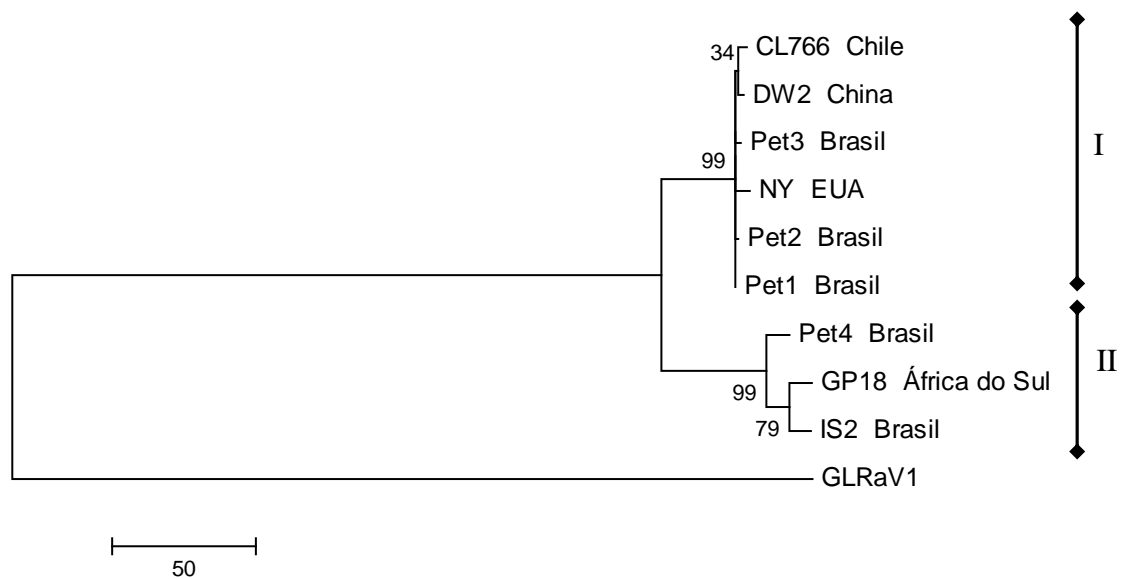


Figura 9 - Árvore filogenética por parcimônia, não enraizada, obtida com o software MEGA 4.1, baseada nas sequências completas (942 pb) de nucleotídeos do gene da proteína capsidial dos isolados de *Grapevine leafroll-associated virus 3*. Valores percentuais de “bootstrap” são mostrados nos ramos. As barras indicam número de substituições de nucleotídeos por sítio (50 = 0,05). Códigos dos nucleotídeos dos isolados no GenBank e país: GP18 (EU259806, África do Sul), Pet4 (AY753208, Brasil), Pet1 (DQ680141, Brasil), Pet2 (DQ680142, Brasil), CI766 (EU344893, Chile), DW2 (DQ119574, China), Pet3 (DQ062152, Brasil), IS2 (HM059034, Brasil), NY (NC_004667, EUA). Para o grupo externo da árvore foi utilizado a espécie: *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1, *Ampelovirus*, AF195822).

GLRaV-3 (Identidade do fragmento do gene HSP70 de 593 pb): Pela análise de identidade de nt do isolado IS1, em que foi amplificado parcialmente (593 pb) o gene da proteína HSP70, verificou-se que este apresentou maior identidade de nt com o isolado WC-HSP-2 (98,1%). A identidade de aad com outros isolados variou entre 87,3-98,9%. O isolado IS1 apresentou identidades de 94,1% (nt) e 97,9% (aad) com o isolado tipo da espécie (NY) (Tabela 15).

Tabela 15 - Identidade (%) das sequências de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) do gene parcial (593 pb) da proteína HSP70 entre diferentes isolados de *Grapevine leafroll-associated virus 3*.

	GP18	WC-HSP-2	M.T	NY	CL766	NZ-1	WC-HSP-10	IS1
GP18	-	97,5	98,4	98,0	98,5	87,6	86,5	98,9
WC-HSP-2	97,9	-	97,4	96,5	97,0	86,0	87,0	97,9
M.T	95,6	94,5	-	99,5	100	88,3	87,3	98,4
NY	95,2	94,1	99,3	-	99,5	88,1	86,0	97,9
CL766	95,1	93,9	99,1	98,8	-	88,6	86,5	98,4
NZ-1	76,2	75,5	77,1	76,5	77,2	-	86,3	87,3
WC-HSP-10	71,3	71,3	71,9	72,3	71,6	71,8	-	87,3
IS1	97,8	98,1	94,4	94,1	93,9	75,8	72,3	-

Códigos dos nucleotídeos dos isolados no GenBank e país: GP18 (EU259806, África do Sul), WC-HSP-2 (EF103903, África do Sul), M.T (AH013319S2, República Tcheca), NY (NC_004667, EUA), CL766 (EU344893, Chile), NZ-1 (EF508151, Nova Zelândia), WC-HSP-10 (EF103904, África do Sul), IS1 (HM059040, Brasil).

A análise filogenética da sequência parcial de nt do gene da proteína HSP70 demonstrou a formação de pelo menos dois grupos, encontrando-se o isolado caracterizado (IS1) no grupo I, juntamente com os isolados da África do Sul, WC-HSP-2 e GP18 (Figura 10).

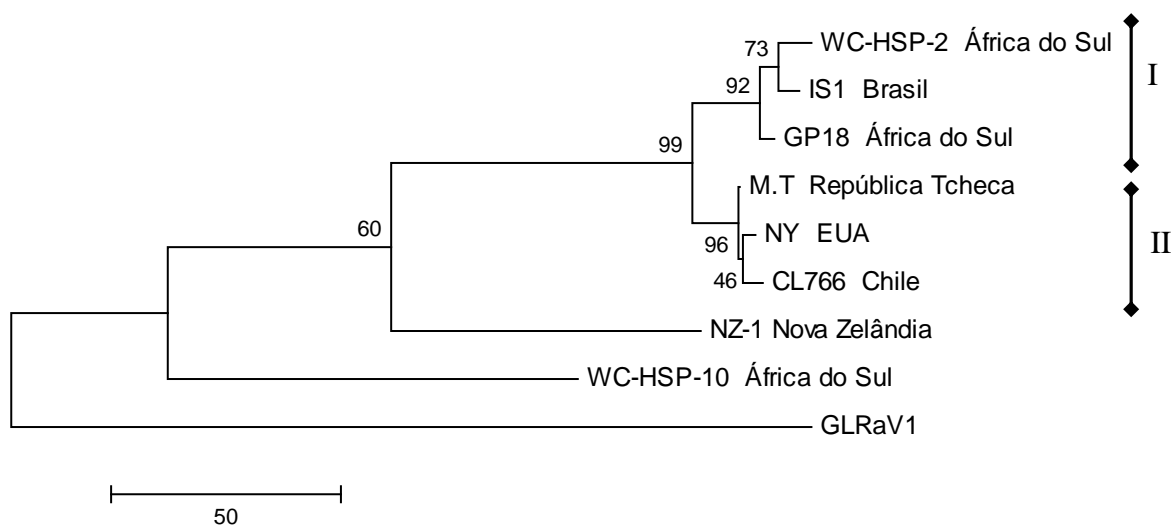


Figura 10 - Árvore filogenética por parcimônia, não enraizada, obtida com o software MEGA 4.1, baseada nas sequências parciais (593 pb) de nucleotídeos do gene da proteína HSP70 dos isolados de *Grapevine leafroll-associated virus 3*. Valores percentuais de “bootstrap” são mostrados nos ramos. As barras indicam número de substituições de nucleotídeos por sítio (50= 0,05). Códigos dos nucleotídeos dos isolados no GenBank e país: GP18 (EU259806, África do Sul), WC-HSP-2 (EF103903, África do Sul), M.T (AH013319S2, República Tcheca), NY (NC_004667, EUA), CL766 (EU344893, Chile), NZ-1 (EF508151, Nova Zelândia), WC-HSP-10 (EF103904, África do Sul), IS1 (HM059040, Brasil). Para o grupo externo da árvore foi utilizado a espécie: *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1, *Ampelovirus*, AF195822).

Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho foram obtidos por Fajardo et al. (2005). Os autores observaram a ocorrência de sequências variantes do GLRaV-3 em uma mesma planta, com base na sequência parcial do gene da proteína HSP70, obtendo homologias de 75,1-81% com o isolado tipo desta espécie (NY).

A Tabela 16 apresenta um resumo dos resultados do estudo de identidade de sequências, apresentando a relação de isolados “estrangeiros” que exibiram maiores identidades de nucleotídeos com os isolados locais estudados neste trabalho.

Tabela 16 - Relação de isolados “estrangeiros”, depositados no GenBank e que apresentaram maiores identidades de nucleotídeos com os isolados virais de RSPaV, GLRaV-2 e GLRaV-3, caracterizados neste trabalho.

Vírus	Gene sequenciado	n° nucleotídeos	Código no GenBank	Isolado viral caracterizado	Isolado “estrangeiro” com maior identidade
RSPaV	proteína capsial (completa)	780	GU166289	CS1	SG1 - EUA
		780	GU166290	IS2a	BS - Canadá
	replicase (parcial)	831	HM059036	CS2a	SG1 - EUA
		831	HM059037	IS1	RSPaV - EUA
		339	HM059038	CS2b	Ha1 - Japão
		340	HM358051	IS2b	SG1 - EUA
		628	HM130524	IS3 (estirpe Syrah)	SY - EUA
GLRaV-2	proteína capsial (parcial)	431	HM059035	CS2	H4 - Itália
		431	HM358050	IS3	H4 - Itália
	proteína de choque térmico 70 (HSP70) (parcial)	623	HM059039	CS1	PV20 - França
GLRaV-3	proteína capsial (completa)	942	HM059034	IS2	GP18 – África do Sul
	proteína de choque térmico 70 (HSP70) (parcial)	593	HM059040	IS1	WC-HSP-2 - África do Sul

A frequente infecção viral múltipla em videiras, como verificado neste trabalho, a impossibilidade (RSPaV e GLRaV-3) ou a dificuldade de transmissão (GLRaV-2) dos vírus estudados para hospedeiras herbáceas impedem ou dificultam bastante a geração de informações sobre as características biológicas destes isolados, tais como sintomatologia específica, virulência, etc.

Detecção sorológica dos isolados caracterizados: Os resultados da detecção sorológica por meio do teste ELISA corresponderam integralmente aos resultados obtidos pelo teste molecular (RT-PCR), para os três vírus avaliados, RSPaV, GLRaV-2 e GLRaV-3 (Tabela 17). Como descrito anteriormente, a cv. C. Sauvignon (*V. vinifera*) expressa vários sintomas de infecção viral a partir do meio ao final do ciclo vegetativo, já na cv. Isabel (*V. labrusca*) estes sintomas são muito mais discretos ou nem chegam a se expressar, não sendo observados sintomas típicos em todo seu ciclo vegetativo.

Assim, o teste ELISA se apresenta como uma boa alternativa, principalmente, para indexação de um número maior de amostra, por sua versatilidade, praticidade e baixo custo (Tabela 17).

Tabela 17 - ELISA indireto das cinco amostras de videiras, para a presença dos vírus RSPaV e GLRaV-2 e ELISA direto para GLRaV-3. Valores das leituras de absorbância no comprimento de onda em 405 nm, aproximadamente 2 horas após a adição do substrato. Resultado de RT-PCR, conforme consta na Tabela 6.

Vírus	Amostra	Isolado	Absorbância (405 nm)	RT-PCR
RSPaV	Rupestris du Lot (Sadia)	-	0,24 (-)	(-)
	Cabernet Sauvignon, planta 1	CS1	1,62 (+)	(+)
	Cabernet Sauvignon, planta 2	CS2	1,82 (+)	(+)
	Isabel, planta 1	IS1	1,11 (+)	(+)
	Isabel, planta 2	IS2	1,08 (+)	(+)
	Isabel, planta 3	IS3	0,67 (+)	(+)
GLRaV-2	Rupestris du Lot (Sadia)	-	0,18 (-)	(-)
	Cabernet Sauvignon, planta 1	CS1	0,99 (+)	(+)
	Cabernet Sauvignon, planta 2	CS2	0,98 (+)	(+)
	Isabel, planta 1	IS1	0,60 (+)	(+)
	Isabel, planta 2	IS2	0,69 (+)	(+)
	Isabel, planta 3	IS3	0,44 (+)	(+)
GLRaV-3	Rupestris du Lot (Sadia)	-	0,11 (-)	(-)
	Cabernet Sauvignon, planta 1	CS1	0,16 (-)	(-)
	Cabernet Sauvignon, planta 2	CS2	0,16 (-)	(-)
	Isabel, planta 1	IS1	1,27 (+)	(+)
	Isabel, planta 2	IS2	1,27 (+)	(+)
	Isabel, planta 3	IS3	1,24 (+)	(+)

Diferenças observadas nas sequências de nucleotídeos ou de aminoácidos do gene da CP podem ter efeito sobre todas as funções desta proteína, incluindo o reconhecimento sorológico (BERTAZZON & ANGELINI, 2004). Portanto, a variabilidade genética deste gene deve ser considerada, uma vez que alguns epitopos na CP são a base para que os anticorpos a reconheçam e possam reagir em ELISA (FAJARDO et al., 2007a). Contudo, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a sensibilidade dos anti-soros testados não foi afetada pela variabilidade apresentada pelos isolados testados.

O baixo título viral comumente verificado em videira e a variabilidade genética podem conduzir a resultados falso-negativos em testes sorológicos e até moleculares. Assim, a escolha dos métodos mais adequados, com base nas características virais, pode definir o sucesso da detecção viral.

Deteção de vírus em cochonilhas vetoras: As amostras de cochonilhas *Planococcus citri* e *Pseudococcus viburni*, coletadas nos meses de outubro a fevereiro e provenientes de vinhedos de Petrolina (PE) e de Caxias do Sul (RS), respectivamente, foram avaliadas para a presença dos vírus GVA, GVB, GLRaV-1 e GLRaV-3 (Tabela 18). A partir da amostra de *P. citri* n. 40 foi possível detectar o GVA (Figura 11C). Na amostra de *P. viburni* “caxias” detectou-se GLRaV-3, e na amostra “venturin”, GLRaV-3, GVA e GVB (Figuras 11B, 11C e 11D, respectivamente). Nas demais amostras não foram detectado nenhum dos vírus testados. O GLRaV-1, também transmitido por pseudococcídeos, não foi detectado em nenhuma das amostras (Figura 11A), contudo, ainda não há relato de sua transmissão pelas duas espécies de cochonilhas avaliadas neste trabalho.

Tabela 18 - Relação das amostras de cochonilhas vetoras (Família: Pseudococcidae) testadas por RT-PCR para a presença de vírus.

Ordem no gel	Espécie	Amostra	Localização do vinhedo	Vírus			
				GVA	GVB	GLRaV-1	GLRaV-3
1	<i>Pseudococcus viburni</i>	avirulífero, mantido em laboratório					
2	<i>Planococcus citri</i>	n. 40	Petrolina, PE	(+)*	-	-	-
3	<i>Planococcus citri</i>	n. 51	Petrolina, PE	-	-	-	-
4	<i>Pseudococcus viburni</i>	caxias	Caxias do Sul, RS	-	-	-	+
5	<i>Planococcus citri</i>	n. 53	Petrolina, PE	-	-	-	-
6	<i>Pseudococcus viburni</i>	venturin	Caxias do Sul, RS	+	+	-	+

(+)* fragmento sequenciado e depositado no GenBank.

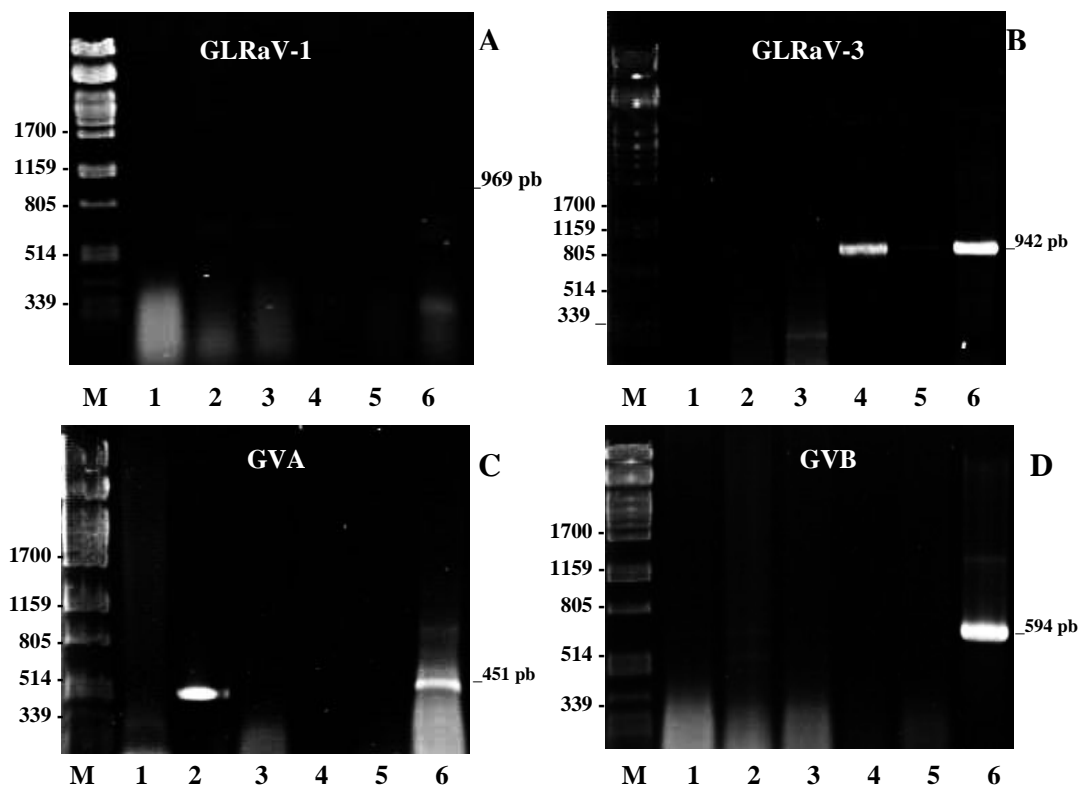


Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos da RT-PCR a partir de RNA total extraído de cochonilhas. Géis: (A) *Grapevine leafroll-associated virus 1*; (B) *Grapevine leafroll-associated virus 3*; (C) *Grapevine virus A*; (D) *Grapevine virus B*; Amostras: (M) Marcador DNA/*PstI*; (1) *Pseudococcus viburni*, avirulífero; (2) *Planococcus citri*, amostra n. 40; (3) *Planococcus citri*, amostra n. 51; (4) *Pseudococcus viburni*, amostra caxias; (5) *Planococcus citri*, amostra n. 53; (6) *Pseudococcus viburni*, amostra venturin.

Em diversos trabalhos na literatura, há comprovação que as cochonilhas das famílias Pseudococcidae e Coccidae são vetoras de algumas espécies virais em videiras (Tabela 3). Nestes trabalhos demonstrou-se que GVA, GVB e GLRaV-3 podem ser transmitidos entre videiras por diversas espécies de cochonilhas, dentre as quais incluem-se *P. viburni* e *P. citri* (ROSCIGLIONE et al., 1983; LA NOTTE et al., 1997; GARAU et al., 1995; KUNIYUKI et al., 2005 e 2006; WOERNER, 1983; CID et al., 2007; CABALEIRO & SEGURA, 1997; GOLINO et al., 1995).

As detecções promovidas neste trabalho comprovam o “status” de virulíferas para cochonilhas presentes em duas importantes regiões vitícolas, bastante distintas e distantemente localizadas. Apesar de um número reduzido de amostras, foi possível verificar que as cochonilhas apresentam grande potencial de aquisição de partículas virais, demonstrando sua

grande importância epidemiológica na disseminação destes patógenos, a exemplo da amostra “venturin”, na qual foi detectada a presença de até três espécies virais.

A detecção sorológica ou molecular de vírus diretamente de cochonilhas pode fornecer resultados falso-negativos devido ao baixo título viral, ou devido à variabilidade viral (MINAFRA & HADIDI, 1994; ACHECHE et al., 1999). Contudo, a metodologia empregada e os resultados obtidos neste trabalho demonstraram ser eficiente a detecção viral por RT-PCR a partir de cochonilhas virulíferas. A extração do RNA_t pelo método do Reagente TRIzol permitiu obter ácidos nucleicos virais de alta qualidade e integridade e o número de cochonilhas utilizadas por amostra na extração dos mesmos, foi suficiente para permitir a detecção molecular. Os oligonucleotídeos empregados demonstraram-se eficientes na detecção dos isolados virais.

Através da análise de identidade de nt do isolado PC40, obtido em *P. citri*, para o qual foi amplificado parcialmente (451 pb) o gene da CP, comprovou-se tratar-se de GVA. Este isolado apresentou maior identidade de nt com o isolado P163-1 (90,2%) e de aad com o isolado LQ58 (97,8%). A identidade de nt, apresentada por este isolado obtido de cochonilha, com outros dois isolados brasileiros de GVA, foi de 80,7% (GVA-SP) e 88,5% (GVA-RS). Este isolado, quando comparado com todos os isolados disponíveis no banco de dados do NCBI (GenBank), apresentou maiores identidades de nt com isolados da África do Sul, China e Brasil (Tabela 19).

Tabela 19 - Identidade (%) das sequências de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) do gene parcial (451pb) da proteína capsial de diferentes isolados de *Grapevine virus A*.

	GVA-SP	GVA-RS	GTR1-1	P163-1	LQ58	92/778	MSH18-1	PC40
GVA-SP	-	94,9	84,3	83,8	84,3	97,9	97,9	88,5
GVA-RS	89,4	-	85,3	84,8	85,3	94,9	94,9	92,1
GTR1-1	81,1	85,6	-	99,4	97,9	84,8	84,3	97,1
P163-1	81,9	85,1	96,9	-	97,4	84,3	83,8	96,4
LQ58	80,7	82,4	94,1	92,8	-	84,8	84,3	97,8
92/778	92,3	89,4	82,2	82,3	82,6	-	97,9	89,2
MSH18-1	93,3	89,5	81,6	82,4	79,4	93,3	-	88,5
PC40	80,7	88,5	90,0	90,2	89,4	82,3	81,1	-

Códigos dos nucleotídeos dos isolados no GenBank e país: PC40 (HM358052, Brasil), GVA-SP (AY340581, Brasil), GVA-RS (AF494187, Brasil), GTR1-1 (DQ787959, África do Sul), P163-1 (DQ855088, África do Sul), LQ58 (DQ911145, China), 92/778 (AF441234, África do Sul), MSH18-1 (DQ855085, África do Sul).

A análise filogenética da sequência parcial de nt da CP indicou a formação de pelo menos dois grupos: sendo que o isolado PC40 se encontra no grupo I, juntamente com dois outros isolados da África do Sul (GTR1-1 e P163-1) e um isolado da China (LQ58) (Figura 12).

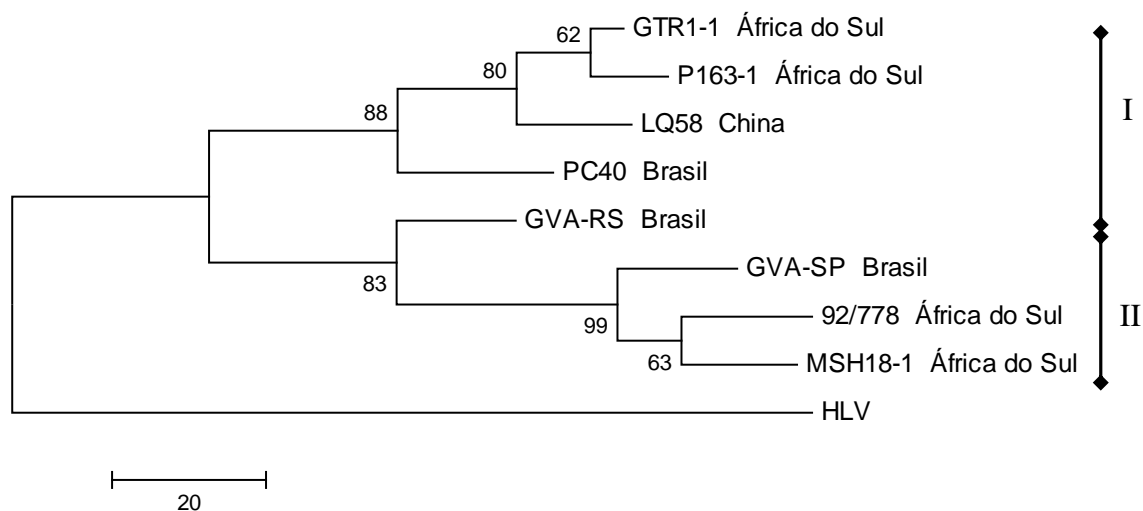


Figura 12 - Árvore filogenética por parcimônia, não enraizada, obtida com o software MEGA 4.1, baseada nas sequências parciais de nucleotídeos do gene (451 pb) da proteína capsidial dos isolados de *Grapevine virus A*. Valores percentuais de “bootstrap” são mostrados nos ramos. As barras indicam número de substituições de nucleotídeos por sítio (20 = 0,02). Códigos dos nucleotídeos dos isolados no GenBank e país: PC40 (HM358052, Brasil), GVA-SP (AY340581, Brasil), GVA-RS (AF494187, Brasil), GTR1-1 (DQ787959, África do Sul), P163-1 (DQ855088, África do Sul), LQ58 (DQ911145, China), 92/778 (AF441234, África do Sul), MSH18-1 (DQ855085, África do Sul). Para o grupo externo da árvore foi utilizado a espécie *Heracleum latent virus* (HLV, *Vitivirus*, X79270).

O resultado também demonstrou que o GVA apresenta expressiva variabilidade entre diferentes isolados. Goszczynski & Jooste (2003) caracterizaram oito isolados deste vírus, que exibiam diferentes sintomatologias e observaram a formação de três grupos distintos, os quais apresentaram de 91-99,8% de variabilidade de nt dentro e 78-89,3% entre os grupos.

O estudo da relação entre vírus-vetor é uma área bastante promissora e importante para a epidemiologia (FUCHS et al., 2009). A metodologia empregada para a detecção de vírus em cochonilhas vetoras mostrou-se simples, rápida e confiável. Os resultados obtidos também reforçam, mesmo que indiretamente, a importância epidemiológica dessas espécies de cochonilhas, uma vez que videiras mantidas por muitos anos no campo, na presença destes insetos podem estar sujeitas a infecção. Assim sendo, precauções deveriam ser tomadas em regiões vitícolas do Brasil, principalmente, em locais onde se mantém matrizes livres das principais viroses da videira.

Este estudo contribui com informações que permitirão aperfeiçoamentos na execução de testes sorológicos e moleculares visando a diagnose e caracterização viral, tornando-as

mais consistentes e confiáveis. Isto auxiliará para se alcançar maior eficiência na indexagem viral em materiais propagativos e em testes de rotina.

2.5 Anexos

Anexo 1 – Sequências virais de nucleotídeos (linha superior) e de aminoácidos deduzidos (linha inferior) obtidas e depositadas no GenBank. Código no GenBank e descrição do vírus/isolado.

GU166289 - 780 pb, *Rupestris stem pitting-associated virus*, isolado CS1, gene completo da proteína capsidial.

```
atggcaagtcaaattgggaaactcctggcgaatcaaatgaggcatttgaagcccggctg
M A S Q I G K L P G E S N E A F E A R L
aatcactggagttggctagagctcagaagcagccagaaggctcaaacacaccgccatt
K S L E L A R A Q K Q P E G S N T P P I
ctcagtggtgtgcttgccaacgtaagagggttatgagaatgcactctcaaagacagtg
L S G V L A K R K R V I E N A L S K T V
gacatgagggaagtgttgaacatgaaacgggttgtaatttctccaaatgtcatggatgag
D M R E V L K H E T V V I S P N V M D E
ggtgcaatagatgagctgattcgtgcatttggagaatcaggcatagctgagaacgcacaa
G A I D E L I R A F G E S G I A E N A Q
tttgatgtggccatagatatagcacgtcactgctctgatgttggaaagctccaaaggtca
F D V A I D I A R H C S D V G S S Q R S
accttgattggcaaaagtcattctgtgatctgaatagatcagaaattgcccgggattata
T L I G K S P F C D L N R S E I A G I I
agggaggttaaccatttgcgcagattttgcatgtactatgcaaaaatcgtgtggaatat
R E V T T F A Q I L H V L C K N R V E Y
ccatctggagacggggatccccagctaattgggcaaagaaggatttaatgagaatgaa
P S G D G D T P A N W A K K G F N E N E
aaatttgcagccttgcacttctcctgggagtcacagataagagtgcgcttgaaccaaag
K F A A F D F F L G V T D K S A L E P K
ggtggaatcaaagagctccaacaaaagctgagatggtcgctaataatcgccctcttttgag
G G I K R A P T K A E M V A N I A S F E
gttcaagtgtcagacaggtatggctgaaggcaagcggagttccaaccttgagagatt
V Q V L R Q A M A E G K R S S N L G E I
agtgggtggaacggctggcgcactcatcaacaacccttttcaaattgttacacatgaatga
S G G T A G A L I N N P F S N V T H E *
```

GU166290 - 780 pb, *Rupestris stem pitting-associated virus*, isolado IS2a, gene completo da proteína capsidial.

```
atggcaagtcaaattgggaaactgcctggcgaatcaaatgaagcatatgaagcccgactt
M A S Q I G K L P G E S N E A Y E A R L
aaggcttttagagttagcaagggctcaaaaagctccggaagtctctaataacacctccacg
K A L E L A R A Q K A P E V S N Q P P T
cttagtggtattctggctaaaaggaaaagagtaattgagaatgcactctcgaagacagtt
L S G I L A K R K R V I E N A L S K T V
gacatgctgaggttttgagccatgaatctggtgtgctctccccaaatgtgatggatgag
D M R E V L R H E S V V L S P N V M D E
ggagcaatagatgagctgattcgcgcctttggggagtcaggcatagctgagaatgtgcaa
G A I D E L I R A F G E S G I A E N V Q
tttgatgttgaatagacattgcccgtcattgctctgatgtggaaagctcccagaggtca
F D V A I D I A R H C S D V G S S Q R S
accttgattggtaagagcccttctgaggttaaataggtctgaaatagctggaattata
T L I G K S P F C E L N R S E I A G I I
agagaggtgaccacgctgctgtagattttgcatgtactacgcaaaaattgtgtggaacatc
R E V T T L R R F C M Y Y A K I V W N I
catctggagacgggaataaccaccagctaattgggccaagaaggatttaatgagaatgaa
H L E T G I P P A N W A K K G F N E N E
aagtttcagcccttgacttctccttggagttacagatgaaagcgcgcttgaacctaag
```

K F Q P L T S S L E L Q M K A P L E P K
 ggtgggtgcaagagagctccaacaaaagcagaaatggctcgctaataatcgccctcttttgaa
 G G V K R A P T K A E M V A N I A S F E
 gttaaagtgtcagacaaactatggctgaaggaaagcggagctccaatcttgagagatc
 V K V L R Q T M A E G K R S S N L G E I
 agtggcggaacggctggggcgcttatcaataacccttttcaaagtgttacacatgaatga
 S G G T A G A L I N N P F S N V T H E *

HM059036 - 831 pb, *Rupestris stem pitting-associated virus*, isolado CS2a, gene parcial da proteína da replicase.

caagcatgctcttggcaactgcagtgatccccccagaagtgtggtcggttctcctgagagc
 S M L L A T A V I P P E V L V G S P E S
 cttaaccttgggctaccagtacaaaattagtagcgatcagctgctcttgcctccagat
 L N P W A Y Q Y K I S S D Q L L F A P D
 ggcacatggaatgagatgtattcacacaccttggctatgcagatacttactaaaggcaaga
 G I W N E M Y S Q P L S C R Y L L K A R
 tcggtgggttctgcccagggcctcgcgctattctgttgatattcattcaccocaaaattct
 S V V L P E A S R Y S V D I H S P Q N S
 gccaccacttgccttagtttccccatgggcaatctttgacctcaaacatgaggtgtttt
 A T T C L V F P H G Q S L T S N M R C F
 tcgggttggagcgaataggcataaaggatcttgagccttaagccggtggcatgcacagt
 S G L D A I G I K D L E P L S R G M H S
 tgtttccagtgcatcatgatgtcgtaaccaagatatacctttacttaagaactcttaag
 C F P V H H D V V T K I Y L Y L R T L K
 aagccagacaaggagtctgctgaggcaaagcttcgtaactcattgacaagcccacaggg
 K P D K E S A E A K L R Q L I D K P T G
 agggagataaaattcattgaggatttttctcattagttataagctgtggaaggagtggc
 R E I K F I E D F S S L V I S C G R S G
 tctttgcttatgcttaacattttctaagctagtcataatcattcttctgcccgaatgatgcca
 S L L M P N F Y I S K L V I S F F C R M M P
 aatgccccttgctaggtctcttcaaattttcgagagtggtcactagattcatttgtttac
 N A L A R L S S N F R E C S L D S F V Y
 tcacttgagccattcaacttttcagttacttagtgagacataactcctgatttctttgag
 S L E P F N F S V N L V D I T P D F F E
 cacttatttcttttctcctgctcagtgatgatggaggagaacggttgaggtgggtcaag
 H L F L F S C L S E L M E E N V E V V K
 gacaattcttggctgactcggggatccgcaattcaatcgctcagaggg
 D N S W S G L G D P Q F N R Q R

HM059038 - 339 pb, *Rupestris stem pitting-associated virus*, isolado CS2b, gene parcial da proteína da replicase.

tcagcacgctgtttgggttcgctttgcaccttacatgagatacattgaaaagaagctcatg
 Q H A V L V R F A P Y M R Y I E K K L M
 caagcattgaaaccaacttctatattcactcaggcaaaggcttctgatgagctaaatgaa
 Q A L K P N F Y I H S G K G L D E L N E
 tgggttagggcaagaggtttcacaggtgtatgcacagagtcagactatgaagcttttgat
 W V R A R G F T G V C T E S D Y E A F D
 gcatcccaggaccatttcatcttggcatttgaactgcaaattatgagatttttaggactg
 A S Q D H F I L A F E L Q I M R F L G L
 ccagaagatctaattctggactatgaattcatcaaaattcatcttggttcaaagcttggc
 P E D L I L D Y E F I K I H L G S K L G
 tctttcgcgataatgagctttaccggcgaggaatcac
 S F A I M S F T G E V I

HM358051 - 339 pb, *Rupestris stem pitting-associated virus*, isolado IS2b, gene parcial da proteína da replicase.

agacaatagcgtgctttcaacatgctgttctggctcgctttgcaocttatatgagatatatt
 T I A C F Q H A V L V R F A P Y M R Y I
 gaaaagaagctgatgcaagccctaaagcccaacttctatattcattcaggtaaaggccta
 E K K L M Q A L K P N F Y I H S G K G L
 gatgagttgaatgagtggttcaaagctagaggatttactggcatctgcacagaatctgat
 D E L N E W V K A R G F T G I C T E S D
 tacgaggcttttgatgcctccaagaccatttcatccttagcatttgaggttcagataatg
 Y E A F D A S Q D H F I L A F E L Q I M
 aaatttttgggtgctgaggtatcaattttggattatgaattcataaaaatccacttg

K F L G L P E D L I L D Y E F I K I H L
gggtcaaagcttggttcattctctataatgaggttct
G S K L G S F S I M R F

HM059037 - 831 pb, *Rupestris stem pitting-associated virus*, aislado IS1, gene parcial da proteína da replicase.

caagcatgctcttggcaactgcagtaatccctccagaagtgctggttggctctcctgagagt
S M L L A T A V I P P E V L V G S P E S
cttaacccttggcctaccagtacaaagtcagtggaaccaactactcttcgcaccagat
L N P W A Y Q Y K V S G N Q L L F A P D
ggcaactggaatgagatgtactcacaaccttggcatgcatgatacttgctcaaggccaga
G N W N E M Y S Q P L S C R Y L L K A R
tctgtagttctgcccgggctcgcgctactcggttggccatcattccactcaaaattta
S V V L P G A S R Y S V G H H S T Q N L
gccccactgcttagtttccccatgggaatctttgacctcaacctgcatggtttt
A P T C L V F P H G E S L T S T M R C F
tctggcttcgactgcaataggcataaaagatcttgaaccttaagccggtggcatgcacagt
S G F D A I G I K D L E P L S R G M H S
tgcttcccagtacatcatgatgttgaactaagatatctttatttgagaactctcaag
C F P V H H D V V T K I Y L Y L R T L K
aagccagataaggagtctgcccaggcaagcttcgacaactcatagaaaaacccacaggg
K P D K E S A E A K L R Q L I E K P T G
agggagataaagttatcgaggatttttctcactagtaataaattgtgggaggagtggc
R E I K F I E D F S S L V I N C G R S G
tcttggctttagcccaacatttctaagttggctcatatcattcttttgcggatgatgcca
S L L M P N I S K L V I S F F C R M M P
aatgcactcgccaggcttttcttagctttcgagagtgttcacttgattcatttgtgtac
N A L A R L S S S F R E C S L D S F V Y
tcacttgagcccttaattttccattaatttgggtggatcactcctgatttctttgag
S L E P F N I S I N L V D I T P D F F E
catttatttctctcctcctgctaaatgagttgatcgaggagaacgttgaagaggtcatg
H L F L S S C L N E L I E E N V E E V M
gacaattcttgggttggacttggggacttacaattcaatcgccagaggg
D N S W F G L G D L Q F N R Q R

HM130524 - 628 pb, *Rupestris stem pitting-associated virus*, aislado IS3, gene parcial da proteína da replicase.

aggattccaaactgtagagcaagctgcatgtgctcatcctgtgaatgatgctctttgcatt
G F Q T V E Q A A C A H P V N D A L C I
gatttggctcaaccgtctgtcaagaatttggaaaatcttttgtcttgaggaaatgaaa
D L A Q P S V K K F E K S F C L E E L K
attccggttggggtcttaccaaagccctttgattgggtagtgaagaacatcagcttcaat
I P V G V L P K P F D W V V K N I S F N
gataaactaagggggaggcagcttcttttcttttcaaacctggaatcctgagttatagc
D K L R G R R A S F F S K P G I L S Y S
tacaatgggggagccatacagagcctcggttggccaaaatttcttgatgaaatccttagc
Y N G G S H T S L G W P K F L D E I L S
ttcactgggtggcgttagttactataactcatgcttagtccaaatgtatgaggagaattca
F T G G R S Y Y N S C L V Q M Y E E N S
aagttagccttgcataaggatgacgaaagctgttatgagcctggacataaagtttggact
K L A L H K D D E S C Y E P G H K V L T
gtcaatctaactcggttcagccactttcacagtcagtaagactggaaacctagttgaagga
V N L I G S A T F T V S K T G N L V E G
aaccattgacgcttaacaattgaaccagcgagttctttgagatgctcggggtatgcaa
N H C S L T I E P S E F F E M P R G M Q
agcagctttttccatgggtgtttccaattgccttagtgggagaggtgtctttgacattccgg
S S F F H G V S N C L S G R V S L T F R
cgtcaaaaactggaagatgacgaccaa
R Q K L E D D D Q

HM059039 - 623 pb, *Grapevine leafroll-associated virus 2*, aislado CS1, gene parcial da proteína de choque térmico 70.

ttgggttggagtttgcgacgactttttcgactggttgtgtgtataaggacggtcgagtgtac
G L E F A T T F S T V C V Y K D G R V Y

tcttttaacaaaacaattccgcgtacattccgacgtatctctaccttttctcaaattct
S F K Q N N S A Y I P T Y L Y L F S N S
aacgatatgactttcgggtatgaggctgaatcgctcatgcacaacccgaaagtgaggggc
N D M T F G Y E A E S L M H N P K V R G
tcttttatagagatttgaacggttgggtgaggggtgatggaataaacctggatgagtac
S F Y R D L K R W V G C D G N N L D E Y
tgcgagcgtttaaaaccgcattattcagttcgattagtggaagattggtgctggtttgaat
C E R L K P H Y S V R L V K I G A G L N
gaaaccggtttcgcgataggtaactacggggcactgtcaaaccgaggtgcattaccgggt
E T V S I G N Y G G T V K S E V H L P G
ttgatagcaggttttattaatcgatgggtcagttgtgcagagtcggctttcgcctgccc
L I A S F I K S M V S C A E S A F A C P
tgcactggaatagtttgcagttcctcgcgaattacgatagtggtcaaaggaacttcact
C T G I V C S V P A N Y D S V Q R N F T
gaccaatgctgacattgagtgatcgatgctgtacatggcgaaccttctgct
D Q C V T L S G Y R C V Y M V N E P S A
gccgcctttcgcactgtaatatgataaataagaaatccgcaagtcagcctgatgat
A A L S C T C N M I N K K S A S L A V Y D
tttggcggcggcaccttcgac
F G G G T F D

HM059035 - 431 pb, *Grapevine leafroll-associated virus 2*, aislado CS2, gene parcial da proteína capsidial.

ctagtctaaatgggtgctgataagaacttctagctgcggaagttataaaaatggttgggcaa
S L N G V D K K L L A A E V I K M L V Q
aagggtgccctaaagaaggtatagaagtgatcctcgggtcacttctttacgcgctcgca
K G A P N E G I E V I F G L L L Y A L A
gcaagaactacgtcgcctaaagggtcagcgcgcgattctgacttaatatctcaaacagt
A R T T S P K V Q R A D S D L I F S N S
ttcggagagagaaaacgtagtggtgacggagggtgaccttaaaaaagttctcgacgggtgt
F G E R N V V V T E G D L K K V L D G C
gcgctctcactaagttcactaacaacttagaacattcggctcgcactttcactgaggcc
A P L T R F T N K L R T F G R T F T E A
tacctcgacttttgtattgctgataagcataagttacctcaactcaatgccgcagcagaa
Y I D F C I A Y K H K L P Q L N A A A E
ttagggataaccagctgaagattcacttagctgcagattttctaggcacttgcccgaag
L G I P A E D S Y L A A D F L G T C P K
ctctctgaa
L S E

HM358050 - 431 pb, *Grapevine leafroll-associated virus 2*, aislado IS3, gene parcial da proteína capsidial.

ctcgtctaaatgggtgctgataagaacttctagctgcggaagttataaataatggttgggcaa
R L N G V D K K L L A A E V I I M L V Q
aagggtgctcctaagcggggtatagaagtgatcctcgggtcacttctttacgcgctcgca
K G A P N G G I E V I F G L L L Y A L A
gcaagaactacgtcgcctaaagggtcagcgcgcgattctgacttaatatctcaaacagt
A R T T S P K V Q R A D S D L I F S N S
ttcggagagagaaaacgtagtggtgacggagggtgaccttaaaaaagttctcgacgggtgt
F G E R N V V V T E G D L K K V L D G C
gcgctctcactaggttcaactaacaacttagaacattcggctcgcactttcactgaggcc
A P L T R F T N K L R T F G R T F T E A
tacctcgacttttgtattgctgataagcataagttacctcaactcaatgccgcagcagaa
Y I D F C I A Y K H K L P Q L N A A A E
ttagggataaccagctgaagattcacttagctgcagattttctaggcacttgcccgaag
L G I P A E D S Y L A A D F L G T C P K
ctctctgaa
L S E

HM130523 - 596 pb, *Grapevine leafroll-associated virus 2*, aislado SE, gene parcial da proteína de choque térmico 70.

ttcgggacgactttttcgcaggtctgcggtataaagatggtaaggtttactcattcaaa
F G T T F S T V C V Y K D G K V Y S F K
caaaacaattctcgtacattccgcatacctcacttttctccgaaaccaatcacatg

Q N N S A Y I P T Y L Y L F S E T N H M
gtttttggttatgaagccgaatcactgatgcataatgcgaaggtgagaggctctttcttt
V F G Y E A E S L M H N A K V R G S F F
agggacttaaacgctgggtgggttgcgactccagcaactttagtactactttgatcgc
R D L K R W V G C D S S N F S D Y F D R
ctgaagccacactatgctgggtcgcctgataaaaataggtagctgctgaatgatacggtg
L K P H Y A V R P Y K I G T G L N D T V
attataggaactacgggggtaccgttcgttccgaagtgcatgtttagcactaatagct
I I G N Y G G T V R S E V H L L A L I A
tcctttatcaaggcgatgggttagttgtgcccgagaatgctttttctgacttgcacggga
S F I K A M V S C A E N A F S C T C T G
gtgatgttccagtgccagcgaattatgacagtggtcagaggaatttcactgatcagtg
V I C S V P A N Y D S V Q R N F T D Q C
gtttccttgagtggtatcaatgtgtgtacatgggtcaacgaacctcccggtgctgtta
V S L S G Y Q C V Y M V N E P S A A A L
tcagcgtgcaatctgataaacaagaagtcggcgaacttggctgtatacagatttgg
S A C N L I N K K S A N L A V Y D F

HM059040 - 593 pb, *Grapevine leafroll-associated virus 3*, isolado IS1, gene parcial da proteína de choque térmico 70.

tttgggacgactttcagcacaatctgcttttccccatctggggcagtggttgtactcct
F G T T F S T I C F S P S G V S G C T P
gtagctggtagtgtttacgttgaacccaaattttcgtacctgtaggttagcagtagcttat
V A G S V Y V E T Q I F V P V G S S T Y
ttaattggtaaagcagcgggaaagcttatcgcgacgggttagagggaaaggttgtatgtt
L I G K A A G K A Y R D G V E G R L Y V
aacccgaaaaggtgggttaggtgtgacgagggataacgtcggacgttacgttgagaaatta
N P K R W V G V T R D N V G R Y V E K L
aaaccacatacaccgtaaagatagacagcggaggcgccttattaatcggagggttaggt
K P T Y T V K I D S G G A L L I G G L G
tccggaccggacaccttatgggggtcgttgacgtgatattttattccttgagagccttg
S G P D T L R V V D V I C L F L R A L
atactggagtgcaaaaggtatacgtctactacgggttacagcgcagtcgtaacggtagc
I L E C E R Y T S T T V T A A V V T V P
gctgattataactcctttaaacgaagcttcgttgtgaggcactgaaaggtcctgggtata
A D Y N S F K R S F V V E A L K G L G I
ccggttagaggtgttggtaaaccgaaccgacagccgcagcccttattccttagctaagtcg
P V R G V V N E P T A A A L Y S L A K S
cgagtagaagacctattattagcggttttcgcacttcggcggcggcaccttcga
R V E D L L L A V F D F G G G T F

HM059034 - 942 pb, *Grapevine leafroll-associated virus 3*, isolado IS2, gene completo da proteína capsidial.

atggcatttgaactgaaattagggcagatatatgaagttgtccccgaaaacaatctgaga
M A F E L K L G Q I Y E V V P E N N L R
gttagagtaggggatgcccagcaagaaagtttagtaaggcagtttcttaaaatcgtt
V R V G D A A Q G K F S K A S F L K Y V
aaggcgggacggcggaggttaacaggaatcgctgtagtgcgggaaaagtagctattc
K D G T Q A E L T G I A V V P E K Y V F
gccacagcagcttttagctacagcggcacagggaccacctaagcagccgacacgcaagtg
A T A A L A T A A Q E P P K Q P T T Q V
gtggaaccaccagaagccgataggggtgggtgcccgaatctgagactcttacaccaat
V E P P E A D I G V V P E S E T L T P N
aagctgggttttgagaaagatccagacaagttcttaaagactatgggtaaggggatagct
K L V F E K D P D K F L K T M G K G I A
ttggacttaacgggggtaccataaaccgaaagtattaaacgaaccgggaaaagttcca
L D L T G G T H K P K V I N E P G K V P
gtagaggttagcaatgaagattaataccgcattggtagagctgtgtaagaaggttatgggc
V E V A M K I N T A L V E L C K K V M G
tccgatgactcaacaccaagacaaaattcttctgtacgtgatgcagatcgcttgacg
S D D S T P K T K F F L Y V M Q I A C T
ttctttacatcgtcttcgacggagttcaaggagttcgcactacatagaacggacgatgga
F F T S S S T E F K E F D Y I E T D D G
aagaagatatgctgggtgtgggtatacagattgcattaaccaagctgcccgttcaacgggt
K K I Y A V W V Y D C I N Q A A A S T G
tacgaaaaccggtaagggcagtagcttagcacttccagccaaccttgatcacggcgacc
Y E N P V R Q Y L A Y F T P T L I T A T
ctgaatggtaactgggtgatgaatgaaaggtcatggcacagcatggagtagaccaccgaaa
L N G K L V M N E K V M A Q H G V P P K

ttctttccgtacgcgattgactgcggttcgctccgacgtacgatctgttcaataacgacgca
F F P Y A I D C V R P T Y D L F N N D A
atactagcatggaattagctagacagcagcggttagaaataagacgggtgacggccgat
I L A W N L A R Q Q A F R N K T V T A D
aacaccttacacaacgtcttccaactattgcaaaagaagtag
N T L H N V F Q L L Q K K *

HM358052 - 451 pb, *Grapevine virus A*, isolado PC40, gene parcial da proteína capsidial.

ggggaggtagatatagtaggacctaagtctagcaggaagaccggcctggatccacggggt
G E V D I V G P N A S R K T G L D P R G
aaaataaacgtgagcagcatggtggcgcgaatgaggactctcagcgcagccgtaagcgag
K I N V S S M V A R M R T L S A A V S E
ggacctgtcaagggggcaaccctaaggcagatgtgagcagcattcgctcaaacgcttac
G P V K G A T L R Q M C E P F A Q N A Y
gactttctggtcgttatggcagagctggggacgtatacgcagttagcttctaagatgact
D F L V V M A E L G T Y T Q L A S K M T
aggtcgggcttcaaggagccacaggttatgttcgactttgcgctcgggcttagacttgaag
R S G F K E P Q V M F D F A S G L D L K
accttaactctacaggaagcaactgttatacaatccatgcactctcgtctctttcgtact
T L T L Q E A T V I Q S M H S R L F R T
gaaggggcaaggggtgtgttcaacgctcagctagcgtcggcagcaagctgtcagagata
E G A K G V F N A Q S S V G E Q A V E I
tagatggatgacctcatttctcacgggta
*

3 CAPÍTULO II: Produção de anti-soro policlonal utilizando a proteína capsidial recombinante do *Rupestris stem pitting-associated virus*

3.1 Resumo

O lenho rugoso da videira, doença viral transmissível pelo material propagativo, é uma das viroses de maior importância econômica para esta cultura. Os sintomas são caracterizados pelo desenvolvimento de reentrâncias (caneluras) no lenho e as videiras afetadas geralmente apresentam declínio e redução da produção. O *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV), família *Betaflexiviridae*, gênero *Foveavirus*, é o agente causal da doença. O objetivo deste Capítulo foi produzir anti-soro policlonal utilizando a proteína capsidial recombinante do RSPaV e avaliar sua especificidade e sensibilidade na detecção de diferentes isolados deste vírus. O gene da proteína capsidial (CP), com 780 pb, do isolado CF207 de RSPaV, foi amplificado via RT-PCR a partir de RNA total de videira infectada, clonado em vetor pGEM-T Easy e sequenciado (acesso GenBank EF636804). O fragmento foi subclonado no sítio de restrição *EcoRI* no vetor de expressão pRSET-B e o plasmídeo recombinante foi utilizado para induzir a expressão da CP em células de *Escherichia coli* estirpe BL21:DE3. A proteína capsidial, ligada a uma cauda de seis histidinas, foi purificada por meio de cromatografia de afinidade em coluna de Ni-NTA a partir do extrato de proteínas totais extraídas de *E. coli*. A identidade da proteína purificada foi confirmada em SDS-PAGE e *Western blot*, utilizando-se anticorpos comerciais contra a cauda de seis histidinas. A CP recombinante expressada *in vitro* apresentou massa molecular de cerca de 31 kDa (28 + 3 kDa correspondentes aos aminoácidos histidina ligados ao N-terminal). A proteína purificada foi quantificada e 2,55 mg utilizados para a imunização do coelho. O anti-soro policlonal obtido reagiu com a CP expressada do RSPaV em *Western blot* e com extratos de videiras infectadas por este vírus em ELISA indireto. A expressão de proteína capsidial recombinante apresenta-se como alternativa para o desenvolvimento de anticorpos específicos, base para um diagnóstico sorológico confiável.

Palavras-chave: videira, RSPaV, proteína recombinante, sorologia, variabilidade

3.2 Introdução

O lenho rugoso (“Rugose wood”) da videira (*Vitis* spp.), que ocorre em vinhedos no Brasil e em vários outros países vitícolas do mundo, é um complexo de quatro espécies virais, caracterizadas por induzir alterações no lenho e declínio em videiras, com reflexos negativos na quantidade e qualidade dos frutos (MARTELLI, 1993; CREDI, 1997; FAJARDO et al., 2004a). Deste complexo faz parte a virose “*Rupestris stem pitting* - RSP” (CREDI, 1997; STEWART & NASSUTH, 2001), conhecida por “lenho estriado de *Rupestris*” em São Paulo e por “caneluras do tronco de *Rupestris*” no Rio Grande do Sul (ESPINHA et al., 2003).

O *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV) foi identificado e caracterizado molecularmente (MENG et al., 1998; ZHANG et al., 1998) como agente causal das caneluras do tronco de *Rupestris*. É classificado na família *Betaflexiviridae* e no gênero *Foveavirus* (MARTELLI & JELKMANN, 2000), possui partículas alongadas e flexuosas com cerca de 800 x 12 nm, proteína capsial (CP) com massa molecular de 28 kDa e genoma formado de RNA de fita simples e senso positivo com 8.726 nucleotídeos (nt), organizados em cinco fases abertas de leitura (ORFs). A ORF 5 (nt 7.771 a 8.550) codifica o gene CP (MENG et al., 1998; ZHANG et al., 1998; FAUQUET et al., 2005; MINAFRA et al., 2000).

A videira é a única hospedeira natural do RSPaV, que não é transmitido mecanicamente e até o momento não tem vetor conhecido (FAJARDO et al., 2004a). A transmissão do RSPaV ocorre através da enxertia utilizando-se gemas infectadas, enquanto a dispersão se dá por meio de material propagativo infectado (MARTELLI & JELKMANN, 2000).

Há relatos de sua transmissão em de sementes de uva, porém em baixa taxa (LIMA et al., 2006b). Trabalhos relatam que o RSPaV é um vírus que apresenta diversas sequências altamente variantes, além de ocorrer comumente em videiras em infecções mistas, o que dificulta a definição de suas propriedades biológicas nesta hospedeira (MENG et al. 1999; MENG et al., 2005a; FAJARDO et al., 2004a). Nakaune et al. (2008) e Radaelli et al. (2009) estudaram a variabilidade do RSPaV associada ao lenho rugoso e destacaram a importância deste tipo de estudo, por meio de análises de sequências de diferentes isolados, para implantar melhorias no diagnóstico.

Radaelli et al. (2009) sequenciaram o gene da proteína capsial de nove isolados de RSPaV, definindo a formação de quatro grupos monofiléticos, cujos membros apresentaram identidades de 81,1 a 99,7% entre si. Lima et al. (2006a) caracterizaram um isolado de

RSPaV, designado RSPaV-SY (estirpe Syrah), e observaram que a identidade de nt com outros isolados de RSPaV foi de até 77%. Lima et al. (2009) também caracterizaram um outro isolado de RSPaV, designado RSPaV-PN (estirpe Pinot Noir), e verificaram identidade de nt entre 76-78% com outros isolados de RSPaV.

Verifica-se que métodos moleculares, como a RT-PCR, não são plenamente adequados como teste de rotina para a indexação de grande número de amostras. Normalmente este volume de amostras é manipulado, por exemplo, em programas que visam a produção de material propagativo livre de vírus. Em função dos custos e da relativa complexidade de execução, a RT-PCR e a indexação em indicadores lenhosas, que apresenta a desvantagem do longo período requerido até a expressão de sintomas, levam relativa desvantagem, por exemplo, em relação aos testes sorológicos (NICKEL et al., 2004). Também foi demonstrado que a indexação por RT-PCR de videiras infectadas, utilizando-se oligonucleotídeos para um isolado específico, pode resultar em falso-negativo para outro (BERTAZZON & ANGELINI, 2004; NOLASCO et al., 2000; BEUVE et al., 2007).

Pelas razões anteriormente descritas, tradicionalmente, a sorologia tem sido indicada para a diagnose de vírus em grande número de amostras, com destaque para o teste ELISA utilizando anti-soros policlonais específicos (ZIMMERMANN et al., 1990; LING et al., 2001). Contudo, a indisponibilidade de anti-soros comerciais contra o RSPaV e, em especial, contra isolados locais, o que dificulta a detecção sorológica deste vírus.

Considerando-se o fato de o gene da proteína capsidial (CP) ser relativamente conservado entre variantes/estirpes do RSPaV (NOLASCO et al., 2006; ALABI et al., 2010), a produção de um anti-soro contra esta proteína poderia constituir-se em uma ferramenta importante para a detecção deste vírus. Assim sendo, a produção de um anti-soro contra a CP de um isolado brasileiro de RSPaV é muito interessante, pois permitiria a detecção do vírus em testes aplicáveis em larga escala, que poderiam ser utilizados, por exemplo, em levantamentos de ocorrência deste vírus ou em programas de produção de material propagativo livre de vírus.

A produção de anti-soros é normalmente realizada via injeção de partículas virais purificadas na corrente sanguínea de coelhos. Entretanto, a purificação viral normalmente é um processo trabalhoso, e, comumente, pode resultar em preparações com pureza e concentrações insatisfatórias, comprometendo a qualidade do anti-soro a ser produzido. Também é comum que anti-soros produzidos a partir de preparações purificadas distintas possuam título e especificidades distintos (FAJARDO et al., 2007a; RADAELLI et al., 2008).

Especificamente, em relação à purificação de partículas virais do RSPaV a partir da videira, dificuldades adicionais são mencionadas: a inexistência de hospedeiras herbáceas para a manutenção e multiplicação deste vírus; a constante presença de complexos virais, com nula (ou muito restrita) possibilidade de isolamento biológico; a característica lenhosa desta planta e a presença de compostos polifenólicos que se oxidam facilmente; a baixa concentração viral na planta infectada, restrita a tecidos específicos (floema). Aliado a tudo isto, o RSPaV apresenta partículas alongadas, o que pode favorecer a agregação ou fragmentação das mesmas no processo de purificação (BARBIERI et al., 2004; NICKEL et al., 2004).

Com o desenvolvimento da biologia molecular, a clonagem de genes virais de proteínas estruturais (ex. proteína capsial) (LING et al., 1997; MINAFRA et al., 2000) ou não estruturais em vetores que permitam sua expressão tornou-se uma importante estratégia de obtenção de antígenos, o que resulta na obtenção de grande quantidade da proteína viral expressa.

Uma vez que, para a grande maioria dos vírus de plantas, a CP é a única proteína estrutural com propriedades imunogênicas, um anti-soro produzido a partir da proteína livre apresentará as mesmas propriedades daquele produzido a partir de partículas virais purificadas. Além disso, como o protocolo de purificação da proteína a partir de *E. coli* é relativamente simples, preparações distintas possuirão as mesmas propriedades, levando à produção de anti-soros que também apresentarão as mesmas propriedades (TARGON et al., 1997; FAJARDO et al., 2007a; RADAELLI et al., 2008).

Os objetivos deste trabalho foram, expressar o gene da proteína capsial do RSPaV em *Escherichia coli*, produzir um anti-soro policlonal e avaliar sua especificidade e sensibilidade na detecção de diferentes isolados deste vírus.

3.3 Materiais e métodos

Obtenção do inserto: O gene completo da proteína capsial do isolado viral de RSPaV, denominado CF207 (EF636804) (Anexo 1 deste Capítulo), obtido de videira cv. Cabernet Franc, proveniente de um vinhedo experimental da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves (RS), foi previamente amplificado com os oligonucleotídeos específicos RSPaV-v1 viral (5' ATGGCAAGTCAAATTGGGAAAC 3') e RSPaV-c1 complementar (5' TCATTCATGTGTAACATTTGAA 3') (RADAELLI et al., 2009). Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose e o fragmento de tamanho

esperado foi recortado e eluído com auxílio do kit comercial "HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction" (RBC Real Genomics), de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida o fragmento purificado foi ligado ao vetor pGEM-T Easy (Promega) e transferido para *Escherichia coli* DH5 α por meio de choque-térmico. O fragmento clonado foi sequenciado para a confirmação de sua identidade e integridade.

O clone bacteriano contendo o gene da proteína capsidial do RSPaV com 780 pb, foi inoculado em 5 ml de meio de cultura LB, contendo ampicilina (100 μ g/ml) e incubado sob agitação a 37°C por 12 horas. O DNA plasmidial recombinante foi extraído utilizando-se o kit "Flexi Prep" (Amersham Biosciences), seguindo-se as recomendações do fabricante.

Construção do vetor de expressão: O vetor de expressão pRSET-B (Invitrogen) foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* e em seguida, defosforilado utilizando-se a enzima fosfatase alcalina (CIAP) (Promega). O produto desta reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose e a banda correspondente ao vetor digerido foi recortada e eluída. O gene da CP do RSPaV também foi removido do plasmídeo pGEM-T Easy pela digestão com enzima de restrição *EcoRI*, eluição a partir de gel de agarose e, posteriormente, ligação ao vetor de expressão.

A ligação entre o fragmento viral e vetor, a transformação de *E. coli* DH5 α e a seleção de clones recombinantes foram realizadas de acordo com técnicas padrão descritas por Sambrook & Russel (2001). A orientação correta (senso) do inserto no vetor foi comprovada através de PCR com os oligonucleotídeos T7 e RSPaV_c1 e pelo sequenciamento do plasmídeo recombinante.

Expressão da CP/RSPaV: Para a expressão *in vitro*, a construção pRSET-B/CP RSPaV foi transferida para a estirpe BL21:DE3 de *E. coli*, utilizando-se a transformação por choque térmico (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Após cultivo em meio de cultura LB sólido com ampicilina (100 μ g/ml), uma colônia isolada foi inoculada em 5 ml de meio de cultura LB líquido com ampicilina e cultivada por 12h sob agitação a 37°C. Utilizou-se 100 μ l deste pré-inóculo para o cultivo de 200 ml de LB líquido com ampicilina, incubando a 37°C até atingir OD_(600nm) aproximada de 0,5. Neste ponto a expressão da CP foi induzida por adição de IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside), na concentração final de 2 mM, e 6 horas após a indução, as células foram coletadas por centrifugação (6000 g por 10 min). No total, 700 ml de cultivo bacteriano foram induzidos.

Extração da proteína: Um extrato de proteínas totais de *E. coli* foi obtido conforme descrito por Noueiry et al. (1994), segundo protocolo não desnaturante, envolvendo a ressuspensão do sedimento bacteriano em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0), tratamento com lisozima (0,5 mg/ml) e sonicação para promover a lise celular. Ao final, ressuspendeu-se o sedimento em 1 ml de tampão N (NaHCO₃ 100 mM, pH 9,0) com SDS 1% (p/v).

Purificação da proteína expressa: A proteína CP/RSPaV foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de resina Ni-NTA (Qiagen), conforme instruções do fabricante e avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 4% gel concentrador e 12% gel separador) corado com *Coomassie blue* (SAMBROOK & RUSSEL, 2001) e também por *Western blot* (TOWBIN et al., 1979) utilizando-se anti-soro comercial (anti-His C-terminal/AP Ab, Invitrogen) contra a cauda de seis histidinas da proteína expressada. A quantificação da proteína purificada foi realizada por espectrofotometria, a partir de leituras de absorvâncias em comprimento de onda de 280 nm. A proteína purificada foi dialisada em tampão fosfato 10 mM, pH 7,4, acrescido de 0,425% de NaCl (p/v).

Imunizações e sangrias do coelho: Após purificada e quantificada, a proteína foi injetada em um coelho branco da raça Nova Zelândia com aproximadamente 35 dias de idade. Foram realizadas cinco aplicações intramusculares (na coxa), a primeira delas com adjuvante completo de Freund (Sigma) e as demais com adjuvante incompleto (1:1 v/v), a intervalos semanais, com dosagens de 250, 350, 500, 650 e 800 µg de proteína por imunização. Uma semana após a última imunização, iniciaram-se as nove coletas de sangue (25-30 ml/sangria), realizadas a intervalos também semanais. O sangue coletado foi incubado a 37°C por uma hora e a seguir por 30 minutos a 4°C. O anti-soro recolhido foi centrifugado a 3000 g por 10 minutos, aliquoteado e armazenado a -20 °C.

Purificação do anti-soro: A purificação da fração globulina G (imunogamaglobulina G), a partir do anti-soro obtido, foi realizada por cromatografia de troca iônica. Procedeu-se à diluição de 2 ml de anti-soro em 18 ml de água destilada. Desta solução, foi obtido o precipitado das proteínas pela adição de igual volume de sulfato de amônia saturado, permanecendo em repouso por uma hora a temperatura ambiente. A solução foi centrifugada a

3000 g por 10 minutos, o sedimento foi ressuspenso em 2 ml de tampão 1/2 PBS e dialisado por 12 horas a 4°C neste mesmo tampão.

A fração globulina foi separada da solução por eluição em coluna de DEAE-SEPHACEL (Sigma) equilibrada com tampão acetato de sódio 25 mM (pH 5,2). A concentração da IgG foi estimada mediante a leitura de absorbância no comprimento de onda de 280 nm, preservando-se as frações com valores de absorbância superiores a 1,0. Após a diálise em 1/2 PBS por 12 horas, a fração globulina foi recolhida e armazenada a -20 °C.

Avaliações da especificidade do anti-soro: Em ensaios preliminares, visando-se a determinação do título do anti-soro pelo teste ELISA indireto (ALMEIDA & LIMA, 2001) e utilizando-se como antígeno a proteína capsidial purificada (1:250 e 1:500 v/v), a fração globulina (IgG) foi avaliada nas concentrações de 1, 2 e 4 µg/ml, utilizando-se, para cada uma das concentrações, o conjugado geral (IgG anti-coelho produzido em cabra, Sigma) na diluição 1:1000 (v/v).

A sensibilidade e a especificidade dos anti-soros coletados, nas diferentes sangrias, foram avaliadas em *Western blot* e ELISA indireto com a proteína expressa e/ou amostras de videiras sadias e infectadas pelo RSPaV.

O anti-soro produzido foi inicialmente testado em *Western blot*, com alíquotas (5 µl) da proteína expressada que foram aplicadas. As amostras foram preparadas em tampão de carga SDS-PAGE 2X [Tris-HCl 250 mM, pH 6,8, 2% SDS (p/v), 0,025% azul de bromofenol (p/v), 5% glicerol (v/v), 1% β-mercaptoetanol (v/v) e 5 M de uréia] e fervidas por 5 minutos. A transferência das proteínas à membrana de nitrocelulose foi realizada com auxílio de aparelho para eletro-transferência a “semi-seco”, durante 1,5 horas a 2 mA/cm² de membrana em tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM). Após a transferência, a membrana foi bloqueada por uma hora em solução TBS (Tris-HCl 0,02 M, NaCl 0,5 M, pH 7,5) acrescida de 2% de leite em pó desnatado. Em seguida, adicionou-se o anticorpo contra a proteína capsidial, incubando-se por 12h sob agitação lenta. Na sequência, as membranas foram lavadas três vezes com T-TBS (TBS + 0,05% Tween), adicionando-se o conjugado geral (IgG anti-coelho, Sigma), diluído 1:1000 em tampão TBS procedido de incubação a temperatura ambiente sob agitação por 1 hora. Após nova lavagem, procedeu-se à revelação com adição de substrato BCIP/NBT (5 mg/ml, Sigma).

Para o teste de ELISA indireto, placas de poliestireno foram carregadas com 200 µl de cada amostra de extrato da planta, diluída 1:3 (p/v) em tampão de revestimento (carbonato de

sódio 0,05 M, pH 9,6), incubando-se por 12h a 4°C. Após lavagens (3 vezes com tampão PBS-T, pH 7,4 em intervalos de 5 minutos), foi adicionado o IgG produzido, diluído (2 e 4 µg/ml de IgG) em tampão de conjugado [PBS-T, pH 7,4, 2% de PVP 40.000 (p/v) e 0,2% de BSA (p/v)]. Após incubação por 3 horas a 37°C seguida de nova lavagem, adicionaram-se 200 µl de conjugado geral (IgG anti-coelho, Sigma) diluído 1:1000 em tampão de conjugado, incubando-se, novamente, a 37°C por 3 horas. Após lavagem das placas, adicionou-se o substrato da enzima (4-nitrofenil-fosfato dissódico hexahidratado, Sigma), diluído (1 mg/ml) em tampão de dietanolamina a 10%, pH 9,8.

As amostras consistiram de nervuras e/ou pecíolos de videiras sadias e infectadas com o RSPaV, coletadas em casa de vegetação, as quais foram trituradas em almofariz na presença de nitrogênio líquido e diluídas 1:3 (p/v) em tampão de revestimento.

As leituras de absorbância a 405 nm foram registradas em um leitor de placas (Anthos 2020). As amostras foram consideradas positivas quando o valor da absorbância foi duas vezes superior ao valor da absorbância da amostra sadia. As leituras foram realizadas em média 1 a 5 horas após a adição do substrato, com a incubação realizada no escuro a temperatura ambiente. Folhas e ramos de videiras sadias, obtidas por cultura de tecidos, foram utilizadas como controle negativo, e videiras infectadas por diferentes isolados de RSPaV, alguns previamente caracterizados por Radaelli et al. (2009), utilizadas como controle positivo nas avaliações da eficiência do anti-soro produzido.

Visando obter mais informações sobre a eficiência de detecção de diferentes isolados de RSPaV com o anti-soro produzido contra o isolado CF207, realizou-se um estudo da influência de variabilidade genética na detecção sorológica, incluindo aqueles isolados para os quais a sequência de nucleotídeos do gene da CP encontrava-se disponível.

3.4 Resultados e discussão

Uma das formas mais simples de diagnóstico de viroses em videiras é o emprego dos testes biológicos com enxertia em videiras indicadoras. No entanto, a obtenção dos resultados pode levar até dois anos, situação inadequada quando se quer rapidez na indexação (NICKEL et al., 2004). Métodos alternativos de detecção, tais como as técnicas moleculares (RT-PCR ou hibridação com sondas) oferecem resultados mais rápidos e sensíveis. Entretanto, o emprego destes em indexagens em larga escala, por exemplo, em levantamento de ocorrência da virose, não é plenamente adequado, em função principalmente dos custos, relativa

complexidade e pelo fato de requererem equipamentos mais sofisticados. Tradicionalmente, as técnicas sorológicas, em especial o teste ELISA, têm sido utilizadas para a detecção e diagnóstico de vírus de plantas em maior número de amostras, por reunir sensibilidade e praticidade.

Para muitos dos vírus que infectam a videira, métodos imunológicos de detecção têm sido executados com a utilização de anti-soros comerciais, que normalmente são importados a custo bastante elevado, havendo a possibilidade de não promoverem a detecção dos isolados locais. Assim, a produção de anti-soro contra um isolado local de RSPaV reveste-se de particular importância.

A estirpe BL21:DE3 de *E. coli*, transformada com o vetor pRSET-B/CP RSPaV (Figura 13), inserido em fase para permitir a tradução e a expressão da proteína capsidial, foi induzida uma vez em cultura de 100 ml e três vezes em cultura de 200 ml por meio da adição de IPTG, resultando na obtenção de 2,55; 3,10; 3,38 e 3,12 mg de proteína capsidial recombinante do RSPaV em cada procedimento, totalizando 12,15 mg de proteína, com rendimento médio de 17,35 µg/ml de meio de cultura. As quatro induções de culturas de *E. coli* foram realizadas para se obter quantidade suficiente de proteína para a imunização de outro animal, caso fosse necessário. Radaelli et al. (2008) obtiveram rendimento médio da proteína capsidial do *Grapevine virus B* e do *Grapevine leafroll-associated virus 2* de 5,625 e 6,875 µg de proteína por ml de cultura, respectivamente, e Fajardo et al. (2007a), ao expressarem a proteína capsidial do *Grapevine leafroll-associated virus 3*, obtiveram rendimento médio de 10,6 µg/ml de cultura.

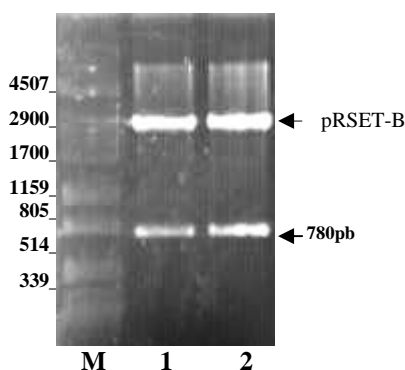


Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose do plasmídeo recombinante pRSET-B/CP RSPaV (780 pb) digerido com enzima de restrição *EcoRI*; (M) Marcador DNA/*PstI*, (1) e (2) clones de *E. coli* estirpe BL21:DE3 transformadas com o plasmídeo pRSET-B/CP RSPaV.

Após a extração e a purificação da CP, a expressão foi confirmada em SDS-PAGE, onde foi possível observar a presença de uma banda com massa molecular de aproximadamente 31 kDa, valor esperado para a proteína de fusão (Figura 14). A tradução do vetor recombinante resultou em uma proteína de fusão com cerca de 28 kDa, correspondente à CP do RSPaV, acrescido de aproximadamente 3 kDa, advindos dos aminoácidos ligados ao N-terminal da CP que constituem a “cauda” de seis histidinas, que permite a retenção da proteína de fusão em coluna de Ni-NTA no processo de sua purificação.

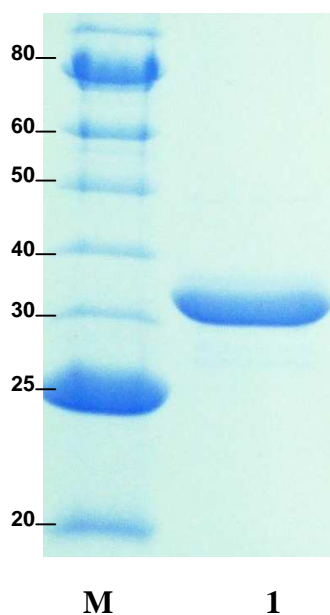


Figura 14 - Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% corado com *Coomassie blue*; (M) Marcador de massa molecular em kDa, (1) Alíquota (5 µl) de uma fração da proteína expressada em *Escherichia coli* transformada com a construção pRSET-B CP/RSPaV e purificada em coluna Ni-NTA.

Após a indução da expressão com IPTG, não se verificou a presença da proteína de fusão em SDS-PAGE (Figura 15A, poço 1) ou *Western blot* (Figura 15B, poço 1) quando se analisou o extrato de proteínas totais de *E. coli* transformada apenas com o vetor de expressão pRSET vazio (sem o gene da proteína capsidial). A identidade da proteína expressada também foi confirmada por meio de *Western blot*, utilizando-se anti-soro comercial contra histidina (anti-His C-terminal/AP Ab, Sigma) (Figura 15B).

O anti-soro produzido nas diferentes sangrias foi inicialmente testado para se verificar o reconhecimento específico da CP expressa do RSPaV em *Western blot*. Em todos os testes, que incluiu o anti-soro coletado, nas diferentes sangrias, o anti-soro produzido reagiu

marcando a proteína expressa com cerca de 31 kDa, demonstrando assim o sucesso no processo de imunização do animal (Figura 16).

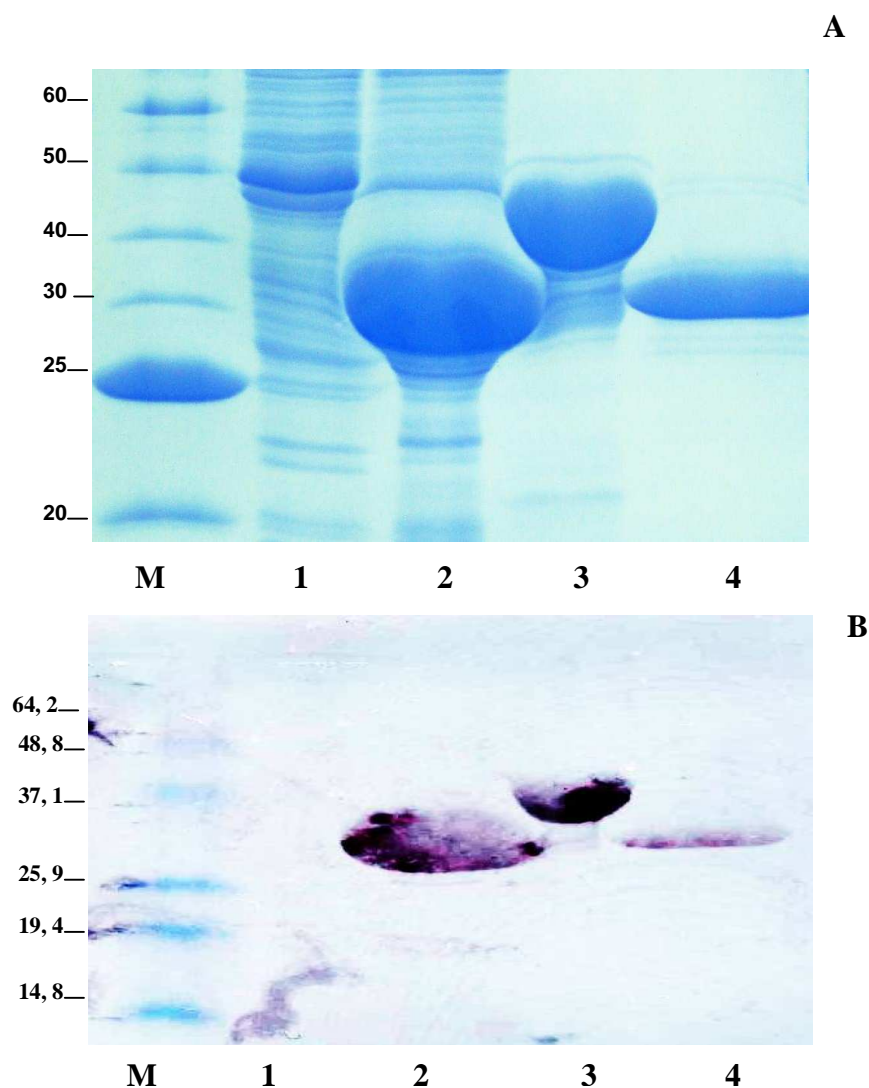


Figura 15 - A. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% corado com *Coomassie blue*; **B.** *Western blot* utilizando anti-soro comercial anti-histidina (1:1000, Invitrogen). Amostras: (M) Marcador de massa molecular em kDa, (1) alíquota (2,5 μ l) do extrato de proteínas totais de *E. coli* induzida após a transformação com o vetor de expressão pRSET vazio, (2) alíquota (5 μ l) do extrato de proteína totais não purificada de *E. coli* transformada e induzida com o vetor pRSET-B/CP RSPaV, (3) alíquota (10 μ l) do extrato de proteína total purificada de *E. coli* induzida com o vetor pRSET-C/CP GLRaV-3 (controle positivo, FAJARDO et al., 2007a), (4) alíquota de 2,5 μ l da CP de RSPaV após a purificação do extrato de proteínas totais de *E. coli* (fração do poço 2 purificada).

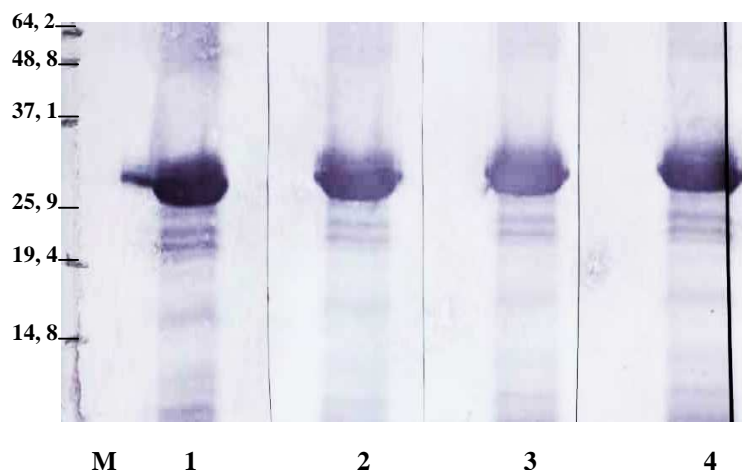


Figura 16 - *Western blot* utilizando anti-soro produzido contra a CP do RSPaV, expressa e purificada a partir de *E. coli*; (M) Marcador de massa molecular em kDa, (1 a 4) anti-soro produzido nas 3^a, 4^a, 5^a e 6^a sangrias do coelho (1:250 v/v), respectivamente. Poços 1 a 4 carregados com 2,5 μ l da proteína CP do RSPaV expressada e purificada.

Após a purificação da IgG a partir do anti-soro produzido, esta foi quantificada apresentando concentração de 1939 μ g de IgG/ml. Em ELISA indireto, o anti-soro obtido reagiu com a CP do RSPaV expressa nas três concentrações testadas, selecionando-se as concentrações de 2 e 4 μ g/ml de IgG, por proporcionarem valores de absorção mais constantes para as amostras positivas e negativas, reflexo do bom título e especificidade do anti-soro.

Os resultados dos testes de ELISA indireto realizados demonstraram que o anti-soro produzido a partir da proteína expressa é altamente específico na detecção do RSPaV, pois foram verificadas reações homólogas com extratos de plantas infectadas com diferentes isolados de RSPaV, alguns inclusive previamente caracterizados com base na sequência de nucleotídeos do gene CP. A ausência de reação do anti-soro produzido com plantas saudáveis evidencia a especificidade do mesmo (Tabela 20).

Tabela 20 - Resultados do teste ELISA indireto com amostras de videiras infectadas com RSPaV, utilizando-se o anti-soro produzido contra a CP do RSPaV, expressa e purificada a partir de células de *E. coli*. Valores das leituras de absorbância, no comprimento de onda de 405 nm, aproximadamente, 2 horas após a adição de substrato. Conjugado geral diluído 1:1000 (v/v).

Amostra	Isolado / código da sequência de nucleotídeos do gene CP no GenBank	Absorbância (405 nm)	
		IgG (µg/ml)	
		2	4
Rupestris du Lot (sadia)	Rupestris / -	0,158 (-)	0,314 (-)
Cabernet Franc (Q5 P207)	CF207 / EF636804 ⁽¹⁾	0,487 (+)	0,925 (+)
420A	420A / EU040204 ⁽¹⁾	0,517 (+)	0,821 (+)
Cabernet Franc (Q5 P213)	CF213 / -	0,640 (+)	1,203 (+)
Cabernet Franc (Q5 P152)	CF152 / -	0,628 (+)	0,864 (+)
Moscato Giallo	MG / EF690380 ⁽¹⁾	0,796 (+)	1,025 (+)
Cabernet Franc (Q5 P210)	CF210 / EF690384 ⁽¹⁾	0,653 (+)	0,848 (+)
Cabernet Franc (Q5 P195)	CF195 / EF636803 ⁽¹⁾	0,691 (+)	0,919 (+)
Cabernet Franc (Q5 P210-2)	CF210-2 / -	0,471 (+)	0,691 (+)
Trebbiano Toscano	TT / -	0,713 (+)	1,121 (+)
Pinot Nero	PN / EF690381 ⁽¹⁾	1,093 (+)	1,710 (+)
Cabernet Sauvignon (planta 1)	CS1 / GU166289 ⁽²⁾	n.d.	1,724 (+)
Isabel (planta 2)	IS2a/ GU166290 ⁽²⁾	n.d.	1,097 (+)
Isabel (planta 3)	IS3/ HM130524 ⁽²⁾	n.d.	0,665 (+)

n.d. = não determinado; ⁽¹⁾ Radaelli et al. (2009); ⁽²⁾ isolados estudados no Capítulo I deste trabalho.

Minafra et al. (2000) expressaram o gene da proteína capsidial de um isolado italiano de RSPaV e produziram anti-soro contra a proteína recombinante. Entretanto, este não reconheceu a proteína CP viral nativa em tecidos infectados quando foram utilizados os testes de DAS-ELISA e ELISA indireto. Meng et al. (2003) também expressaram o gene da proteína capsidial de outro isolado do RSPaV e produziram o anti-soro correspondente, o qual se mostrou eficiente em ELISA indireto e *Western blot*, porém não apresentando resultados satisfatórios em ELISA direto. Petrovic et al. (2003) e Terlizzi et al. (2010) utilizaram anti-soros produzidos contra a CP recombinante do RSPaV para a detecção deste vírus por microscopia eletrônica com imunoadsorção (ISEM - *Immunosorbent Electron Microscopy*). Por fim, Pereira (2008) também expressou a proteína capsidial recombinante de um isolado de RSPaV, obtido em vinhedos de São Paulo (DQ443732) e produziu um anti-soro, porém não obteve resultados promissores no teste ELISA, realizando a detecção do RSPaV com este anti-

soro apenas em *Western blot*.

O teste ELISA indireto foi selecionado neste trabalho como o método para a determinação da eficiência do anti-soro produzido, em virtude de ser o mais amplamente utilizado, de baixo custo, confiável e apresentar praticidade para o diagnóstico viral em larga escala (ALMEIDA & LIMA, 2001). Entretanto, anticorpos produzidos contra antígenos recombinantes podem não ser funcionais quando avaliados em procedimentos não desnaturantes (ex. ELISA), conforme verificado por Minafra et al. (2000), apresentando maior possibilidade de serem funcionais quando avaliados em sistemas desnaturantes (ex. *Western blot*) (NICKEL et al., 2004). Possivelmente, a estrutura antigênica da proteína capsidial expressada em bactéria sofre modificações conformacionais, assim o anti-soro resultante poderia apresentar menor eficiência no reconhecimento desta proteína na forma nativa, presente em amostras vegetais (MINAFRA et al., 2000). Contudo, os resultados alcançados neste trabalho demonstraram que os anticorpos produzidos foram funcionais contra a CP nativa do RSPaV em sistema não desnaturante, isto é, extrato vegetal em ELISA indireto.

Anti-soros produzidos a partir da expressão da proteína capsidial *in vitro* tendem a ser mais específicos, minimizando a ocorrência de reações heterólogas. Segundo Barbieri et al. (2004), um anti-soro produzido a partir da proteína capsidial expressa do potyvírus *Watermelon mosaic virus* (WMV) mostrou-se mais específico, comparativamente a outro produzido a partir de partículas virais purificadas, o qual apresentou reação sorológica cruzada com outro potyvírus, *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV).

Infecções múltiplas em videiras são observadas com grande frequência em condições naturais (FAJARDO et al., 2002 e 2005). Isto torna muito difícil a diagnose baseada na sintomatologia, devido a mudanças no quadro sintomatológico típico de cada vírus. A detecção e a correta identificação do(s) vírus presente(s) em amostras provenientes de campo ou plantas matrizes são essenciais para que medidas de controle ou manejo adequadas possam ser recomendadas, mas para isto é necessário se dispor de ferramentas de diagnóstico eficientes e confiáveis, a exemplo do anti-soro produzido neste trabalho.

Diferenças observadas nas sequências de nucleotídeos (nt) ou de aminoácidos deduzidos (aad) do gene da proteína capsidial podem ter efeito sobre todas as funções desta proteína, incluindo seu relacionamento sorológico (BERTAZZON & ANGELINI, 2004). Portanto, a variabilidade do gene da proteína capsidial deve ser considerada, uma vez que alguns epitopos na proteína capsidial são a base para que os anticorpos os reconheçam e possam reagir em ELISA (FAJARDO et al., 2007a).

Recentemente, Radaelli et al. (2009) caracterizaram o gene da proteína capsidial de nove isolados “brasileiros” de RSPaV incluindo o isolado CF207, cujo gene da proteína capsidial foi expresso neste trabalho, e observaram a formação de quatro grupos distintos.

Neste trabalho, o anti-soro produzido foi avaliado por ELISA indireto para a eficiência de detecção de seis isolados de RSPaV, caracterizados por Radaelli et al. (2009) e outros três isolados deste mesmo vírus, caracterizados no Capítulo I deste trabalho, além de quatro isolados não caracterizados (Tabela 20). O RSPaV foi detectado em todas as 13 amostras infectadas que foram avaliadas por ELISA indireto (Tabela 20).

A análise de identidade das sequências de nt e aad correspondente ao gene da proteína capsidial do isolado CF207 e sequências homólogas de outros isolados deste vírus, previamente caracterizados por Radaelli et al. (2009) e neste trabalho (Capítulo I), demonstrou que o isolado CF207 apresentou identidades de nucleotídeos variando de 84,6% (CF195) até 96,8% (RSPaV-1), e de aminoácidos deduzidos variando de 88% (CS1) até 98,4% (RSPaV-1), com a formação de pelo menos dois grupos, com o isolado CF207 no grupo I (o mais numeroso em isolados) (Tabela 21 e Figura 17). Contudo, esta variabilidade não chegou a afetar a detecção destes isolados com o anti-soro produzido a partir do isolado CF207 (Tabela 20).

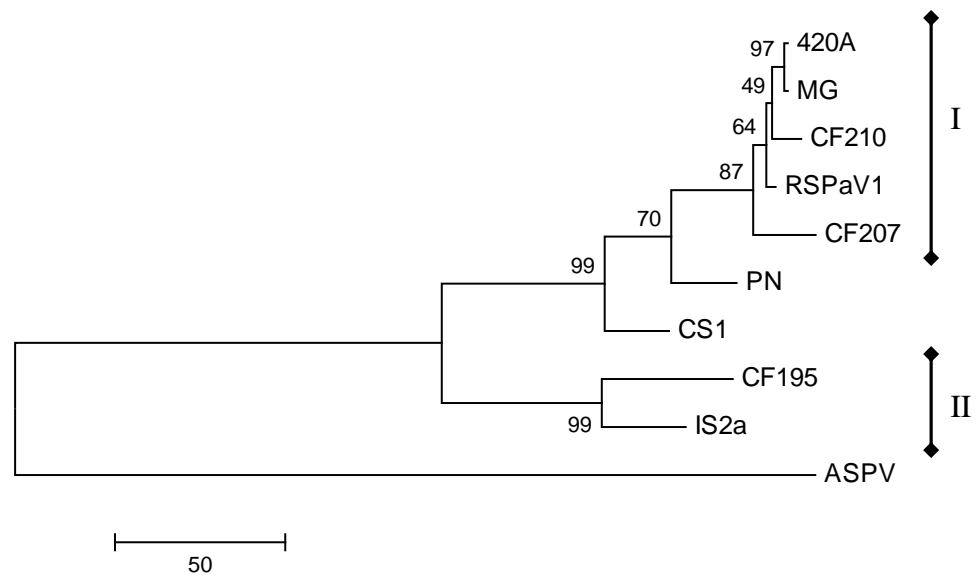


Figura 17 - Árvore filogenética por parcimônia (“bootstrap” com 2000 replicações), não enraizada, obtida com o programa MEGA 4.1, baseada nas sequências completas (780 pb) de nucleotídeos do gene da proteína capsidial de isolados de *Rupestris stem pitting-associated virus*. Valores percentuais de “bootstrap” são mostrados nos ramos. As barras indicam número de substituições de nucleotídeos por sítio (50 = 0,05). Códigos no GenBank dos isolados brasileiros caracterizados e detectados pelo anti-soro policlonal produzido neste trabalho: CF207 (EF636804), 420A (EU040204), MG (EF690380), CF210 (EF690384), CF195 (EF636803), PN (EF690381), CS1 (GU166289), IS2 (GU166290). Na análise filogenética foram incluídas o isolado RSPaV1 (NC_001948), isolado tipo da espécie e, para o grupo externo da árvore, a espécie tipo do gênero: *Apple stem pitting virus* (ASPV, *Foveavirus*, NC_003462).

Como o teste ELISA se baseia na especificidade da interação entre o anticorpo e a proteína capsidial do vírus, a ocorrência de variações na sequência de aminoácidos desta proteína poderia interferir na eficiência de detecção sorológica do RSPaV. Assim, o anti-soro produzido neste estudo poderia não ter a capacidade de reconhecer diferentes isolados e estirpes do RSPaV, o que justifica a importância de se produzir de anti-soros contra isolados virais locais. Entretanto, isto não foi verificado neste trabalho, pois o anti-soro produzido contra a CP expressa do RSPaV, isolado CF207, reagiu com outros isolados deste vírus, incluindo até isolados mais distantes filogeneticamente (CF195, IS2a, CS1, PN) (Tabela 21, Figura 17), conferindo confiabilidade nos resultados obtidos com o anti-soro produzido.

Tabela 21 - Identidade (%) das sequências de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) dos genes da proteína capsidial de diferentes isolados de RSPaV, previamente caracterizados e detectados por ELISA indireto com o anti-soro policlonal produzido.

	RSPaV-1	CF207	420A	MG	CF210	CF195	PN	CS1	IS2a
RSPaV-1	-	98,4	99,6	99,6	96,9	91,8	94,5	89,5	89,5
CF207	96,8	-	98,1	98,1	95,3	92,6	93,1	88,0	89,5
420A	98,9	96,5	-	99,2	96,5	91,5	94,2	89,1	89,1
MG	98,9	96,5	99,7	-	96,5	91,5	94,2	89,1	89,5
CF210	98,3	96,1	98,3	98,3	-	90,3	93,8	87,6	88,0
CF195	82,5	84,6	81,9	81,9	81,7	-	88,0	84,9	92,2
PN	93,9	92,1	93,5	93,5	93,9	82,0	-	87,2	85,3
CS1	91,6	89,7	90,6	90,6	90,6	83,8	93,2	-	81,8
IS2a	84,7	85,1	84,1	84,1	83,7	91,6	83,4	84,7	-

RSPaV-1 (NC_001948, isolado tipo da espécie), CF207 (EF636804), 420A (EU040204), MG (EF690380), CF210 (EF690384), CF195 (EF636803), PN (EF690381), CS1 (GU166289), IS2a (GU166290).

Resultados semelhantes foram obtidos por Radaelli et al. (2008), ao avaliarem anti-soros produzidos contra a proteína capsidial recombinante do GLRaV-2. Os autores verificaram reações positivas contra diferentes isolados deste vírus que apresentavam significativa variabilidade genética. Contudo, Bertazzon & Angelini (2004) verificaram também que os isolados detectados sorologicamente não eram detectados com alguns oligonucleotídeos específicos para determinado isolado de GLRaV-2.

Os isolados IS2a e IS3 (Tabela 16), molecularmente caracterizados no Capítulo I, foram provenientes de videiras cv. Isabel, com infecção múltipla de RSPaV estirpe típica e RSPaV-SY (estirpe Syrah). Tais amostras foram testadas por ELISA indireto com o anti-soro produzido neste trabalho, com resultados positivos (Tabela 20), entretanto não é possível identificar qual (is) estirpe (s) viral (is) o anti-soro estaria reconhecendo.

Conclui-se que a metodologia de expressão de proteína *in vitro* em *E. coli* representa grande potencial para a diagnose sorológica de vírus em plantas perenes (semi-) lenhosas como a videira. Grande quantidade da proteína CP de RSPaV pôde ser produzida em *E. coli*, portanto eliminando a necessidade da ineficiente e trabalhosa purificação viral. A CP do RSPaV purificada por este sistema é pura e livre de contaminantes da planta, e o título do anti-soro obtido tenderá a ser maior do que aqueles produzidos contra partículas virais purificadas.

O anti-soro produzido contra o RSPaV detectou diferentes isolados “brasileiros” que apresentavam variabilidade expressiva, conferindo, assim, maior confiabilidade aos testes sorológicos.

3.5 Anexos

Anexo 1- Sequência de nucleotídeos (linha superior) e de aminoácidos deduzidos (linha inferior) do gene completo (780 pb) da proteína capsidial do *Rupestris stem pitting-associated virus*, isolado CF207 (EF636804), utilizado para a produção do anti-soro policlonal.

```
atggcaagtcaaattgggaaactccccggtgaatcaaatgaggcttttgaagcccgcta
M A S Q I G K L P G E S N E A F E A R L
aaatcgctggagtttagctagagctcaaaagcagccggaaggttctaatgcaccacactact
K S L E L A R A Q K Q P E G S N A P P T
ctcagtggtcattcttgcacaacgcaagaggattatagagaatgcactttcaaagcggtg
L S G I L A K R K R I I E N A L S K T V
gacatgaggggaggttttgaaacacgaaacgggtggtgatttccccaaatgtcatggatgaa
D M R E V L K H E T V V I S P N V M D E
ggtgcaatagacgagctgattcgtgcatttgggtgaatctggcatagctgaaagcgtgcaa
G A I D E L I R A F G E S G I A E S V Q
tttgatggtggtatagatatagcacgtcactgctctgatgttggtagctcccagaggtca
F D V A I D I A R H C S D V G S S Q R S
accctgataggcaagagtcattttgtgacctaaacagatcagaaatagctgggattata
T L I G K S P F C D L N R S E I A G I I
agggaggtgaccacattacgcagattttgcagtgactatgcaaaaatcgtgtggaacatc
R E V T T L R R F C M Y Y A K I V W N I
catctggagacggggataccaccagctaactgggccaagaaggatattaatgagaatgaa
H L E T G I P P A N W A K K G F N E N E
aagtttgagcctttgatttttcttggagtcacagatgagagtgcgcttgagcctaag
K F A A F D F F L G V T D E S A L E P K
ggtggtgttaaagagctccacgaaaagctgagatggtcgctaataatcgctcttttgag
G G V K R A P R K A E M V A N I A S F E
gtccaagtgctcagacagactatggctgaaggaaagcggagctccaatcttgagaaatt
V Q V L R Q T M A E G K R S S N L G E I
agtggtggaacggctggggcgcttatcaacaaccctttgcaaatgtcacgcatgaatga
S G G T A G A L I N N P F A N V T H E -
```

4 CAPÍTULO III: Fisiologia foliar e qualidade enológica da uva em videiras infectadas por vírus

4.1 Resumo

Os vírus são capazes de induzir desordens metabólicas e estruturais nas células vegetais, as quais podem variar com a espécie viral e a suscetibilidade da planta. Neste enfoque, videiras (*Vitis vinifera*) com e sem sintomas de infecção viral, das cvs. Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon, em dois vinhedos comerciais, foram avaliadas comparativamente quanto ao potencial fotossintético (fotossíntese de saturação luminosa, radiação de saturação, ponto de compensação de luz, taxa de respiração no escuro, rendimento quântico aparente, clorofilas total, *a* e *b*), quanto ao metabolismo de carbono foliar (açúcares solúveis totais e amido) e quanto a qualidade enológica da uva produzida (sólidos solúveis totais - °Brix, densidade, pH e acidez total titulável no mosto - ATT; intensidade total da cor e índice de polifenóis totais na casca). Nas plantas sintomáticas foram detectados o *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2) e o *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV) pelo teste ELISA para seis vírus, os quais provocaram reduções significativas na clorofila e no potencial fotossintético, em ambas cultivares. As folhas de plantas infectadas também apresentaram acúmulos significativos de carboidratos, caracterizando um bloqueio no transporte de carbono desses órgãos. Quanto à qualidade enológica da uva, no momento da colheita as plantas infectadas apresentaram uvas com nível de maturação significativamente menor, considerando todos parâmetros tecnológicos do mosto (°Brix, densidade, pH, ATT e polifenóis). De modo geral, destaca-se que estes vírus podem comprometer diretamente a capacidade produtiva e a qualidade da produção destas cultivares.

Palavras-chave: *Vitis*, RSPaV, GLRaV-2, fotossíntese, açúcares, uva

4.2 Introdução

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios e, uma vez estabelecida a compatibilidade com a planta hospedeira, se replicam exclusivamente pela utilização de constituintes químicos das células hospedeiras. Assim, colonizam as células que compõem os diferentes tecidos da hospedeira e comprometem a integridade do organismo infectado em todos os níveis (BAILISS, 1970). Em decorrência, ocorrem várias alterações bioquímicas,

fisiológicas e morfológicas, através da ativação e/ou bloqueio de determinadas atividades celulares nas plantas infectadas. Dependendo da interação vírus-hospedeira, uma grande diversidade de sintomas pode ser observada, geralmente, associada à alterações citológicas na estrutura e função dos cloroplastos (ARIAS et al., 2003; SAMPOL et al., 2003; BERTAMINI et al., 2004; GONÇALVES et al., 2005; DOMICIANO et al., 2009). De modo geral, as infecções virais são capazes de induzir desordens na célula vegetal, que incluem alterações na fotossíntese, na respiração, nas atividades enzimáticas, no transporte de fotoassimilados e no balanço hormonal (SAMPOL et al., 2003; BAEBLER et al., 2009; JAMESON & CLARKE, 2002). Acontece uma verdadeira "batalha" metabólica e, nas plantas suscetíveis, os vírus passam a controlar parte do metabolismo da célula parasitada. Todo esse processo infeccioso resultará em queda de produtividade da cultura, resultando em efeitos negativos na quantidade e também na qualidade da produção, incluindo-se a videira (AUGER et al., 1992; DOMICIANO et al., 2009; CRETAZZO et al., 2010; BERTAZZON et al., 2009).

Apesar de alguns avanços pontuais, ainda existem poucos trabalhos direcionados para a compreensão dos efeitos da infecção viral sobre a fisiologia das plantas hospedeiras (ARIAS et al., 2003). Os estudos que consideram a avaliação das alterações fisiológicas, bioquímicas e citológicas na hospedeira ainda são reduzidos comparativamente às pesquisas voltadas aos estudos de genômica e proteômica dos vírus de plantas, que visam determinar a estrutura, a organização, a replicação e o movimento viral. Os mecanismos da interação vírus/planta hospedeira que induzem as perturbações metabólicas e o desenvolvimento de sintomas advindos da infecção viral também são pouco entendidos, pois o acompanhamento da evolução dos processos infecciosos por patógenos apresenta dificuldade em função das consequências fisiológicas serem bastante variáveis.

Alguns estudos demonstraram, como resultado de infecções virais, redução da síntese de pigmentos fotossintéticos, correlacionando níveis de clorofila com taxa fotossintética (NAIDU et al., 1984; FUNAYAMA et al., 1997). Auger et al. (1992) também verificaram que plantas infectadas por vírus apresentaram uma redução de 66,5% na taxa de assimilação líquida de CO₂, em comparação às plantas sadias. Outros trabalhos já demonstraram que a proteína capsidial viral pode se acumular nos cloroplastos e nas membranas dos tilacóides de plantas infectadas, sugerindo, desta forma, que esta poderia induzir a inibição do transporte de elétrons no fotossistema II (FSII) (TÉCSI et al., 1994 e 1996; SAMPOL et al., 2003).

O movimento viral célula-a-célula ocorre através dos plasmodesmas, mediado pela proteína de movimento viral (MP), que interage com os plasmodesmas. Este fato, aliado à

replicação e à concentração dos vírus da videira, preferencialmente nos tecidos do floema, poderia resultar em desorganização e alterações destes tecidos, com efeitos negativos sobre a translocação de fotoassimilados, levando ao acúmulo de amido nas folhas (LALONDE et al., 2003; GONÇALVES et al., 2005). Este acúmulo de amido e açúcares nas folhas pode desencadear decréscimos significativos nas taxas fotossintéticas, via mecanismo de retro-inibição metabólica da fotossíntese (BERGER et al., 2007; PÉREZ-BUENO et al., 2006). Embora trabalhos científicos já tenham demonstrado a diminuição da taxa fotossintética induzida por vírus, os alvos específicos (sítios e rotas metabólicas da planta) que são afetados pela ação viral neste processo são desconhecidos ou não completamente compreendidos até o momento.

Entender e tentar controlar os efeitos do processo infeccioso na hospedeira constitui uns dos objetivos da fisiologia do parasitismo (SANTOS et al., 2005). O conhecimento da maneira pela qual um fitopatógeno mobiliza e altera a fisiologia e o crescimento da planta hospedeira pode, ao mesmo tempo, auxiliar no estabelecimento das bases de controle ou manejo das doenças e permitir a supressão ou diminuição dos danos causados às culturas. O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações fisiológicas foliares ocasionadas por vírus em duas cultivares de videira (*V. vinifera*), correlacionando tais alterações com variáveis que expressam a qualidade enológica da uva.

4.3 Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos em dois vinhedos comerciais das cultivares Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon localizados no município de Bento Gonçalves (RS). O vinhedo da cv. C. Franc, enxertada no porta-enxerto SO4, foi implantado em 1990 e conduzido em espaldeira, já o vinhedo da cv. C. Sauvignon, enxertada no porta-enxerto P1103, foi implantado em 1997 e conduzido em latada.

As plantas do experimento foram identificadas no início do período de maturação da uva, selecionando-se, para cada cultivar, 10 plantas exibindo sintomas foliares típicos de infecção viral e outras 10 plantas que não exibiam tais sintomas. Nesta identificação, os sintomas predominantes observados no vinhedo da cultivar C. Franc foram folhas com textura e aparência alteradas, apresentando-se coriáceas e com bolhosidades, enrolamento dos bordos foliares para baixo e coloração avermelhada, permanecendo verdes as nervuras principais (Figura 18). No vinhedo da cv. C. Sauvignon os sintomas predominantes foram o

avermelhamento total da folha e a formação de tecido corticento na região de inserção do ramo do ano (Figuras 18 e 19).

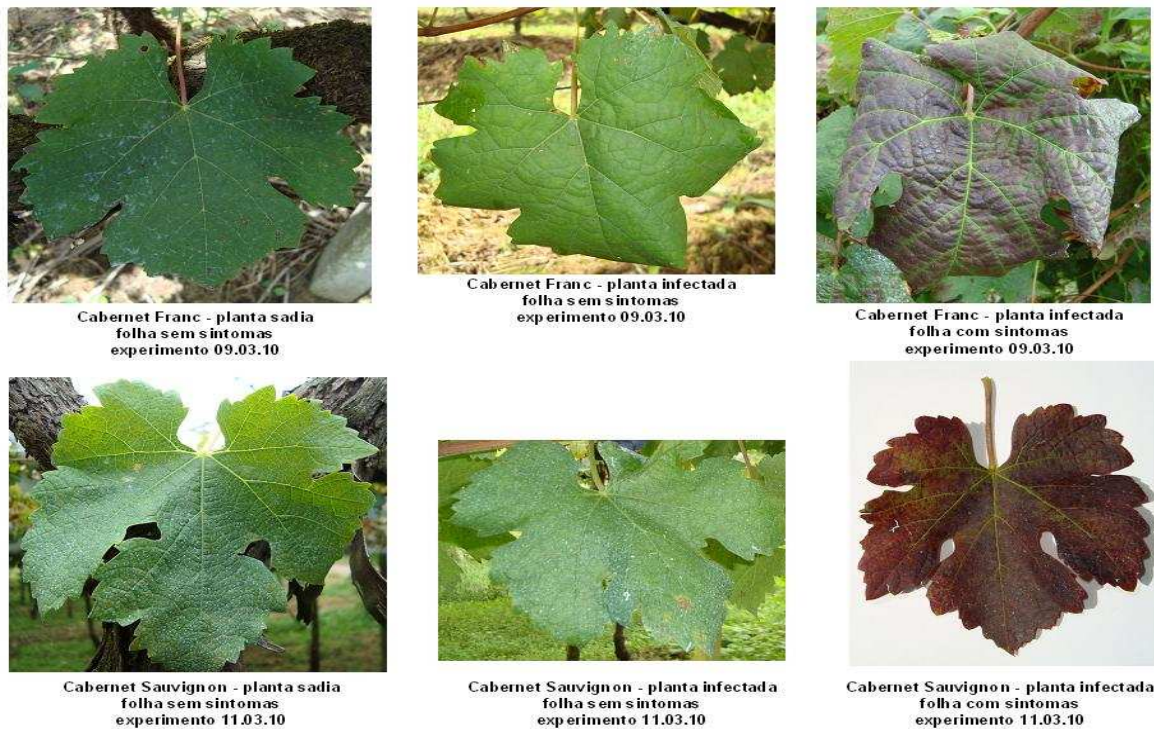


Figura 18 - Sintomas foliares de infecção viral nas cvs. Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon, no início, meio e final do ciclo vegetativo, observados a campo nas plantas avaliadas.

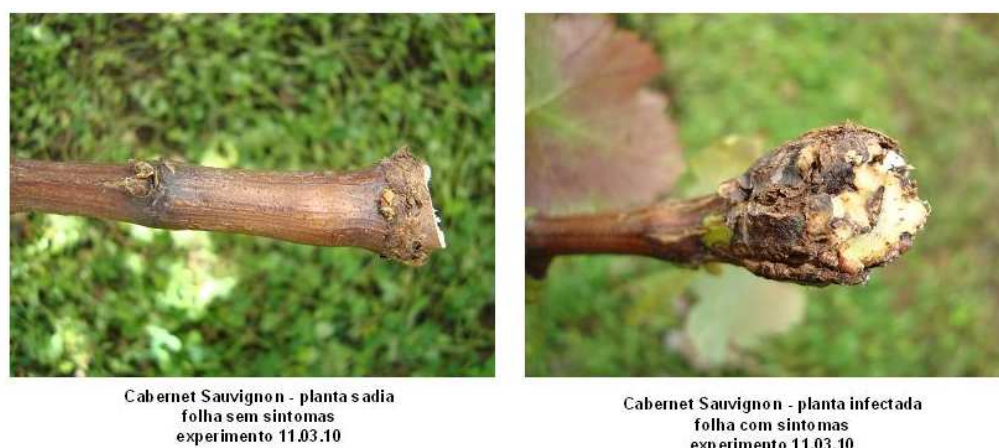


Figura 19 - Formação de tecido corticento (foto a direita) na região de inserção do ramo do ano na cv. C. Sauvignon, verificado a campo nas plantas avaliadas.

As plantas infectadas também apresentavam vigor reduzido, decréscimos no número de brotos e de cachos/planta e cachos desuniformes e com amadurecimento irregular (Figura 20).



Cabernet Franc – Planta sadia



Cabernet Franc – Planta infectada



Cabernet Sauvignon – Planta sadia



Cabernet Sauvignon – Planta infectada

Figura 20 - Videiras das cvs. Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon, plantas saudáveis e infectadas, evidenciando os sintomas de infecção viral nas folhas de plantas infectadas.

Testes sorológicos: Todas as plantas sintomáticas, de ambas cultivares, foram avaliadas visando identificar as espécies virais responsáveis pelos sintomas observados. Em duas repetições, foram realizados o teste sorológico ELISA indireto utilizando-se anti-soros policlonais contra *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2), *Grapevine virus B* (GVB) e *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV), produzidos no Laboratório de Virologia da Embrapa Uva e Vinho e, também, o teste sorológico ELISA direto para a detecção dos vírus *Grapevine leafroll-associated virus 1* e *3* (GLRaV-1 e -3) e *Grapevine virus A* (GVA), utilizando-se anti-soros comerciais (Agritest, Bari-Valenzano, Itália).

Para os testes de ELISA indireto e direto foram conduzidos conforme descrito no Capítulo I e II deste trabalho e as amostras das plantas consistiram de ramos e/ou pecíolos e nervuras foliares, as quais foram triturados em almofariz na presença de nitrogênio líquido. Amostras comprovadamente infectadas com os respectivos vírus foram utilizadas como controles positivos e extrato de folhas de videira sadia como controle negativo.

Avaliação do potencial fotossintético e dos teores de clorofila: Das dez plantas sintomáticas, de cada cultivar, foram selecionadas quatro plantas infectadas, nas quais foram escolhidas, em cada uma das plantas selecionadas, uma folha sintomática e outra assintomática, situadas na posição intermediária do ramo do ano para corresponder ao mesmo estágio de desenvolvimento. Para as dez plantas assintomáticas, de cada cultivar, também foram selecionadas quatro plantas sadias e em cada uma delas, uma folha para proceder as análises foliares.

As folhas selecionadas para as análises, de ambas as cultivares e grupos de plantas (sintomáticas e assintomáticas), se encontravam expostas à radiação solar (não sombreadas pelo dossel de folhas). Estas foram submetidas a determinação de curvas de taxa de assimilação líquida de CO₂ (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) em resposta à densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativo (DFFFA), com valores de 1500, 800, 600, 400, 200, 100 e 0 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, utilizando-se o analisador de gás por infravermelho (IRGA) portátil, marca Li-Cor, modelo LI-6400, operando em sistema aberto, equipado com fonte de luz modelo LI-6400-02B. Previamente às avaliações, o equipamento foi calibrado retirando-se o CO₂ e o vapor de água do ar circulante no aparelho com óxido de cálcio e drierite, respectivamente. Todas as medidas foram realizadas no mesmo dia, no período de 10 as 14 h, o qual correspondeu ao período de máxima atividade fotossintética na planta (observações prévias utilizando o mesmo equipamento). Durante as análises, utilizou-se o CO₂ do ambiente, o qual se manteve, em média, na concentração de 367 $\mu\text{mol.mol}^{-1}$. As temperaturas do ar e da folha mantiveram-se entre 25 e 30°C e a velocidade do fluxo de ar empregado foi de 500 $\mu\text{mol.s}^{-1}$ com umidade relativa do ar de 45%.

Na curva de resposta de A em função da DFFFA foi ajustada uma função hiperbólica, conforme descrito por Mota et al. (2009), com a qual determinou-se a fotossíntese (A) máxima ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), radiação de saturação (μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), ponto de compensação de luz (correspondente ao valor de DFFFA em que A é igual a zero, em μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), taxa de respiração no escuro (correspondente ao valor negativo de A quando

DFFFA é igual a zero, em $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e rendimento quântico aparente (Φ_a ; $\text{nmol CO}_2/\mu\text{mol fótons}$). A Φ_a foi estimada ajustando-se uma equação linear na faixa em que a variação de A em função da DFFFA era linear, conforme descrito por Mota et al. (2009).

As mesmas folhas utilizadas para a determinação do potencial fotossintético também foram usadas para avaliar os teores totais e individuais de clorofila (clorofila *a* e *b*), sendo a medição feita com o auxílio de um clorofilômetro ótico portátil, utilizando-se a frequência de luz em que a clorofila melhor processa a fotossíntese. O medidor eletrônico de clorofila ClorofiLOG (Falker, CFL 1030) é um sensor comercial que analisa três faixas de frequência de luz na medição e, através de relações de absorção em diferentes frequências, determina um índice de clorofila (Índice de clorofila Falker, ICF), levando em consideração a presença das clorofilas *a* e *b*. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas através do teste Tukey a 5% e 1% de probabilidade de erro.

Determinações de açúcares solúveis totais e amido em folhas: Nas mesmas plantas selecionadas, foram coletadas separadamente, folhas sintomáticas e assintomáticas das plantas infectadas e também folhas de plantas saudáveis, as quais foram secadas em estufa durante 48 h a 60°C e, posteriormente, pulverizadas em almofariz. Inicialmente as amostras foram submetidas a uma extração alcoólica de açúcares solúveis totais, conforme metodologia descrita por Amaral et al. (2007), utilizando-se 300 mg de peso seco, 3 ml de etanol 80% e incubando-se em banho-maria a 80°C por 20 min com agitações a cada 10 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13400 g por 5 min em temperatura ambiente, repetindo-se estas etapas quatro vezes, e coletando-se as frações dos sobrenadantes. Para a quantificação dos açúcares solúveis totais, conforme a metodologia descrita por Dubois et al. (1956), utilizaram-se 10 μl de amostra acrescidos de 490 μl de água destilada, 500 μl de fenol 5% e 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado, seguido de leitura espectrofotométrica em 490 nm. Para o cálculo da concentração de açúcares nas amostras avaliadas, efetuou-se uma análise de regressão entre a absorbância e a concentração conhecida de glicose, com uma solução padrão de glicose na concentração de 1 mg.ml^{-1} .

Para a quantificação de amido, conforme metodologia descrita por Amaral et al. (2007), o resíduo precipitado da extração alcoólica dos açúcares solúveis totais foi mantido em estufa a 60°C por 12 h para a evaporação do etanol. Posteriormente, as amostras foram ressuspendidas em 500 μl de água destilada e mantidas a 4°C por 12 h para a reidratação. Na sequência foram adicionados 100 μl de enzima α -amilase (3000 U/ml, Megazyme) por

amostra, incubando-se em banho-maria a 80°C por 1 h, sob agitação, a cada 20 min. Após incubação, adicionaram-se 500 µl de solução de acetato de sódio 0,03 M, pH 4,8, e 30 µl de amiloglucosidase (3260 U/ml, Megazyme), incubando-se em banho-maria a 50°C por 30 min sob agitação. Na etapa seguinte, foram adicionados 500 µl de ácido perclórico 0,8 M, agitando-se vigorosamente e centrifugando-se a 13400 g por 5 min em temperatura ambiente. A partir dos sobrenadantes, foi determinada a concentração de glicose proveniente da degradação enzimática do amido, utilizando-se 4 µl de amostra acrescidos de 16 µl de água destilada e de 150 µl de GOD POD (Glicose PAP Liquiform). Cada mistura foi depositada em microplaca de poliestireno, incubada a 30°C por 15 min e submetida a leitura da absorbância em 490 nm. Conforme descrito por Arêas & Lajolo (1980), a concentração de glicose obtida em cada amostra foi multiplicada por 0,9 para obtenção da concentração de amido. Para cada variável analisada, realizaram-se três repetições para cada amostra.

Análises enoquímicas: Em cada um dos vinhedos estudados e para cada planta previamente marcada (10 sintomáticas e 10 assintomáticas) foram colhidos, aproximadamente, dois kg de uva por planta, sendo os cachos acondicionados em sacos plásticos e mantidos a 4°C até o processamento das análises, ocorrido no mesmo dia da coleta. Cada amostra de uva foi submetida a uma prensagem manual para a extração do mosto, no qual foram determinados o teor de sólidos solúveis totais (SST, °Brix), com o auxílio de um refratômetro digital de bancada (ABBE Refractometer, American Optical Corporation) calibrado a 20°C; densidade a 20°C ($\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), com densímetro digital (PAAR DMA 45, Anton Paar); pH, com medidor digital (pH METER 125, Corning); e acidez total titulável ($\text{meq}\cdot\text{l}^{-1}$), com titulador potenciométrico digital (Tritoline Easy, Schott Geräte) usando solução de NaOH 0,1 N e azul de bromotimol como indicador.

Nas cascas, foram determinados a intensidade total de cor (ITC) e o índice de polifenóis totais (IPT), seguindo metodologia descrita por Rizzon et al. (2000). As cascas (sem a polpa) de 100 bagas de uva, de cada amostra, foram separadas e imersas em solução hidro-alcoólica a 12% (12% de etanol, 0,03 M de ácido tartárico, pH 3,2), mantidas, sob agitação constante, durante 24 h, no escuro a $22\pm 2^\circ\text{C}$. A fase líquida foi separada por centrifugação e efetuaram-se as análises com o sobrenadante obtido. As leituras de absorbância do extrato de cascas foram realizadas em espectrofotômetro de luz ultravioleta (Evolution 60, Thermo Scientific) nos comprimentos de onda de 420, 520 e 620 nm para análise de ITC e a 280 nm para análise do IPT, neste último caso com as amostras diluídas

1:100 em solução hidro-alcoólica. O índice ITC foi calculado pelo somatório das leituras de absorvância nos três comprimentos de onda. Para cada variável destas análises enoquímicas, realizaram-se três repetições para cada amostra analisada. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas através do teste t a 5% e 1% de probabilidade de erro.

4.4 Resultados e discussões

Detecção viral nas amostras experimentais: As videiras dos experimentos foram avaliadas pelo teste ELISA com anti-soros contra GVA, GVB, GLRaV-1, -2, -3 e RSPaV. Foram constatadas infecções com GLRaV-2 e RSPaV em todas as plantas sintomáticas avaliadas das cultivares C. Franc e C. Sauvignon. Entretanto, destaca-se que, os sintomas típicos do enrolamento da folha predominaram apenas no vinhedo de C. Franc, enquanto que os sintomas relacionados à virose do lenho rugoso (caneluras), da qual o RSPaV faz parte, se sobressaíram nas plantas de C. Sauvignon infectadas (Figuras 18 e 19). Nenhum dos seis vírus testados foi encontrado nas plantas assintomáticas, nomeadas a partir deste ponto como "plantas sadias".

Dentre as principais espécies virais que infectam a videira, em todo o mundo, incluem-se o GLRaV-2 e o RSPaV. O GLRaV-2 pertence a família *Closteroviridae*, gênero *Closterovirus*, enquanto que o RSPaV faz parte da família *Betaflexiviridae*, gênero *Foveavirus* (RADAELLI et al., 2009). Por meio de um estudo de variabilidade genética, diferentes isolados destas duas espécies virais, encontrados em vinhedos brasileiros, foram caracterizados molecularmente por Radaelli et al. (2009). Os isolados de RSPaV e GLRaV-2 foram reunidos em quatro e dois grupos pela análise filogenética das sequências obtidas com valores de identidade de nucleotídeos variando de 81 a 99% e 88 a 99%, respectivamente.

Potencial fotossintético e determinação dos teores de clorofila, açúcares solúveis totais e amido: Na análise do potencial fotossintético de ambas as cultivares, destaca-se que os limites máximos de fotossíntese das plantas sadias foram maiores em folhas de C. Franc em relação a C. Sauvignon (Figura 21A e 21B). De acordo com Regina & Carbonneau (1999), a fotossíntese máxima de C. Sauvignon pode atingir limite máximo em torno de $11 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Portanto, essa cultivar pode estar apresentando outras limitações fisiológicas, tais como estresse nutricional, que podem limitar a performance fotossintética. Além disso, estas diferenças entre cultivares podem também refletir contrastes do estágio em que se encontrava

a infecção viral, do tipo e da severidade dos sintomas observados, da presença de estirpes virais específicas e de fatores inerentes a própria cultivar ou determinados pelas condições ambientais. Com isto, na comparação de plantas infectadas e sadias de C. Sauvignon, este contraste fisiológico não possibilitou a diferença de fotossíntese entre folhas assintomáticas de plantas infectadas e plantas sadias (Figura 21B), o que ficou evidente em folhas da C. Franc (Figura 21A).

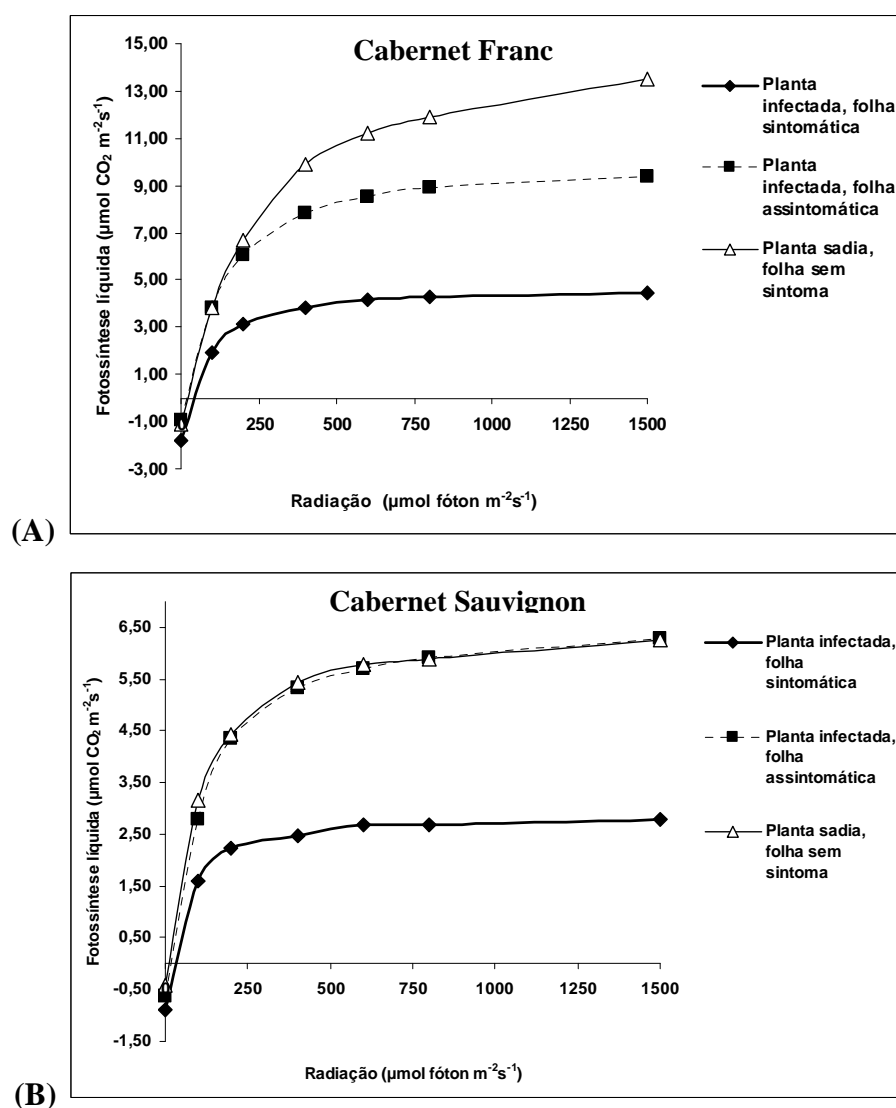


Figura 21 - Curvas com valores médios de fotossíntese líquida ou taxa de assimilação líquida de CO_2 em resposta à densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativo (Radiação). (A) videira cv. Cabernet Franc e (B) videira cv. Cabernet Sauvignon; folhas de plantas infectadas sintomáticas e assintomáticas e folhas de plantas sadias. Sintomas avaliados visualmente e plantas infectadas com RSPaV e GLRaV-2.

Em ambas as cultivares as folhas sintomáticas de plantas infectadas foram significativamente restritas em todos os parâmetros do potencial fotossintético (Tabela 22). Em plantas da cv. C. Franc infectadas verificou-se que a restrição da fotossíntese máxima foi mais evidente (-68%) entre folhas sintomáticas e sadias, em comparação as folhas de C. Sauvignon (-56%). Estes resultados estão de acordo com Sampol et al. (2003), os quais verificaram reduções de 30 a 50% na taxa fotossintética de folhas de videira infectadas por vírus. No detalhamento dessas restrições fotossintéticas pela infecção viral, observa-se que a radiação de saturação destas folhas sintomáticas atingiu uma redução média de 38%, sendo mais acentuada em C. Franc (-41%). Palliotti et al. (2000) encontraram radiação de saturação em valores de DFFFA de 698 e 689 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em videiras ‘Cabernet Franc’ e ‘Trebiano Toscano’, respectivamente. Segundo Larcher (2003), em plantas decíduas, a saturação de luz ocorre entre valores de DFFFA de 600 e 800 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Abaixo destes valores, o incremento na fotossíntese é limitado pelas reações fotoquímicas (capacidade de conversão de energia luminosa em energia química), enquanto que acima destes limites a limitação é em capacidade enzimática para carboxilação (BERNACCHI et al., 2005). Portanto, com a redução desse limite de saturação pode-se supor que esses vírus estão limitando o "turnover" proteico/acúmulo de enzimas relacionadas com a etapa de carboxilação na fotossíntese destas cultivares.

Tabela 22 - Valores de fotossíntese máxima, radiação de saturação, ponto de compensação de luz, taxa de respiração no escuro e rendimento quântico aparente de folhas de videiras (*Vitis vinifera*) cvs. Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon sadias e infectadas (folhas sintomáticas e assintomáticas) com *Rupestris stem pitting-associated virus* e *Grapevine leafroll-associated virus 2*.

Tratamento	Fotossíntese máxima ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)		Radiação de saturação (μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)		Ponto de compensação de luz (μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)		Taxa de respiração no escuro ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)		Rendimento quântico aparente Φ_a (nmol $\text{CO}_2/\mu\text{mol}$ fótons)	
	C.	C.	C.	C.	C.	C.	C.	C.	C.	C.
	Franc	Sauvignon	Franc	Sauvignon	Franc	Sauvignon	Franc	Sauvignon	Franc	Sauvignon
Planta infectada, folha sintomática	4,34 B	2,66 b	383,18 B	234,44 b	37,22 A	29,19 a	1,77 a	0,88 a	37,02 b	23,15 b
Planta infectada, folha assintomática	9,22 AB	6,01 a	421,28 B	345,51 ab	17,70 B	17,56 ab	0,89 b	0,58 a	47,20 a	34,36 a
Planta sadia, folha sem sintoma	13,56 A	6,04 a	646,00 A	369,28 a	20,64 B	8,32 b	1,13 b	0,38 a	49,00 a	35,84 a
CV (%)	21,59	26,62	11,36	19,57	15,88	44,95	22,09	52,63	11,07	15,54

Sintomas avaliados visualmente. Letras diferentes na coluna, para a mesma variável, indicam diferença significativa pelo teste Tukey (letras minúsculas, $P < 0,05$; letras maiúsculas, $P < 0,01$).

As infecções virais foram ainda mais restritivas nos parâmetros relacionados com a etapa fotoquímica da fotossíntese, como ponto de compensação e rendimento quântico aparente. O ponto de compensação de folhas sintomáticas teve incrementos da ordem de 80% e 250%, em relação as folhas de plantas saudas, respectivamente para C. Franc e C. Sauvignon (Tabela 22). Em contrapartida, o rendimento quântico aparente de ambas as cultivares foi reduzida na ordem de 24% e 35%, em relação as folhas de plantas saudas, respectivamente para C. Franc e C. Sauvignon (Tabela 22). Considerando que a taxa de respiração no escuro não teve grandes variações, sendo significativa apenas em C. Franc, estas variações no ponto de compensação e no rendimento quântico aparente podem ser diretamente relacionadas com a capacidade fotoquímica dessas folhas, resultando em maior exigência de radiação para viabilizar a fixação de CO₂ (LARCHER, 2003). O aumento da respiração no escuro em C. Franc pode também influenciar o rendimento quântico das folhas desta cultivar e tem sido relacionado à ativação de mecanismos de defesa por parte da hospedeira, frente ao ataque do patógeno (AUGER et al., 1992; SAMPOL et al., 2003). De acordo com Auger et al. (1992) e Sampol et al. (2003), a redução na taxa fotossintética em folhas infectadas pode ser principalmente atribuída aos danos diretos que os vírus podem exercer sobre os cloroplastos. Esses efeitos vão desde a interação da proteína capsidial do vírus com o fotossistema II (FSII) até reduções nas concentrações de clorofila e de proteína solúvel total e redução na atividade da enzima Rubisco (BERTAMINI et al., 2004). Reinero & Beachy (1989) demonstraram que a CP viral acumula-se nos cloroplastos e nas membranas dos tilacóides de plantas infectadas, sugerindo, desta forma, que esta pode induzir inibição do transporte de elétrons no FSII. Gonçalves et al. (2005) também observaram que plantas de cana-de-açúcar infectadas por vírus apresentaram redução na eficiência quântica fotoquímica potencial do FSII, alterações no preenchimento do "pool" de plastoquinona e, principalmente, redução nas taxas de troca líquida de CO₂, provavelmente em consequência desta redução na eficiência quântica.

Nas avaliações de teores de clorofila, verificou-se, em ambas cvs, que folhas sintomáticas de plantas infectadas apresentaram menores teores de clorofilas total, *a* e *b*, em relação a folhas assintomáticas de plantas infectadas e folhas de plantas saudas (Tabela 23). Na comparação dos teores de clorofila obtidos para folhas de plantas saudas e folhas assintomáticas de plantas infectadas não se observou diferença significativa (Tabela 23), o que pode ser atribuído a um nível mínimo de dano induzido pela infecção viral mais recente nas folhas assintomáticas. Arias et al. (2003) também não conseguiram observar diferenças na

taxa fotossintética entre plantas infectadas assintomáticas e sadias. Em plantas infectadas por vírus, Naidu et al. (1984) verificaram que as baixas taxas fotossintéticas seriam resultantes da redução nos níveis de clorofila, especificamente a clorofila *a* e Almási et al. (2000) observaram que a infecção viral acelera a senescência das plantas e inibe ou retarda a biossíntese de clorofila, alterando assim, algumas características fisiológicas da planta hospedeira.

Tabela 23 - Teores totais e individuais de clorofila (*a* e *b*) em folhas de videiras (*Vitis vinifera*) cv. Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon, sadias e infectadas (folhas sintomáticas e assintomáticas) com *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV) e *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2).

Tratamento	Teor de clorofila					
	Clorofila total (ICF)		Clorofila <i>a</i> (ICF)		Clorofila <i>b</i> (ICF)	
	Cabernet Franc	Cabernet Sauvignon	Cabernet Franc	Cabernet Sauvignon	Cabernet Franc	Cabernet Sauvignon
Planta infectada, folha sintomática	36,5 B	34,6 B	28,9 B	26,8 B	7,6 B	7,8 b
Planta infectada, folha assintomática	49,0 AB	45,9 A	37,7 AB	35,1 A	11,3 AB	10,9 a
Planta sadia, folha sem sintoma	54,3 A	44,7 A	41,0 A	34,3 A	13,3 A	10,4 a
CV (%)	10,81	7,19	10,28	6,57	13,44	10,72

Sintomas avaliados visualmente. ICF: Índice de clorofila Falker. Letras diferentes na coluna, para a mesma variável, indicam diferença significativa pelo teste Tukey (letras minúsculas, $P < 0,05$; letras maiúsculas, $P < 0,01$).

Para Auger et al. (1992) a diminuição nos teores de clorofila e de aminoácidos, como comumente verificado em plantas infectadas por vírus, são alguns dos fatores que contribuem para a redução do potencial fotossintético em plantas infectadas, além de exibirem aumento na atividade de enzimas responsáveis pela respiração celular. Outros fatores também são mencionados, para explicar o menor potencial fotossintético verificado em plantas infectadas por vírus, a exemplo da menor área foliar exposta das plantas infectadas, acentuando-se a diferença, em relação a plantas sadias, no final do ciclo vegetativo (MANNINI et al., 2006a e 2006b; MALOSSINI et al., 2009a e 2009b) e do aumento da concentração de antocianinas (avermelhamento) comumente verificado em determinadas hospedeiras, em folhas sintomáticas (BRAR et al., 2008). Gonçalves et al. (2005) também verificaram reduções nos conteúdos de pigmentos fotossintéticos foliares e na razão clorofila *a/b* e aumento no conteúdo de açúcares nas folhas, como um efeito secundário da infecção viral.

Na análise de folhas assintomáticas de plantas infectadas, pode-se observar que as viroses podem provocar alterações no potencial fotossintético antes de se manifestarem as diferenças em pigmentos. Portanto, com base nestes resultados, pode-se supor que a redução no potencial fotossintético se apresenta como uma consequência e não especificamente a causa da redução do crescimento e do potencial de produção, também observado em outros trabalhos com infecção viral.

Dentre as causas da redução do potencial fotossintético, destaca-se a possibilidade de inibição metabólica pelo acúmulo do produto final, ou retro-inibição (TAIZ & ZEIGER, 2009). Corroborando essa possibilidade, observou-se que as folhas sintomáticas e assintomáticas das plantas infectadas, de ambas cultivares, apresentaram maiores teores de açúcares solúveis totais e acúmulo de amido quando comparadas com folhas de plantas sadias (Tabela 24).

Tabela 24 - Teores de açúcares solúveis totais e de amido em folhas de videiras (*Vitis vinifera*) cv. Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon, sadias e infectadas (folhas sintomáticas e assintomáticas) com *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV) e *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2).

Tratamento	Açúcares solúveis totais		Amido	
	(mg/100mg de massa seca)		(mg/100mg de massa seca)	
	Cabernet Franc	Cabernet Sauvignon	Cabernet Franc	Cabernet Sauvignon
Planta infectada, folha sintomática	5,18 a	6,39 a	1,90 a	0,60 A
Planta infectada, folha assintomática	4,61 a	5,17ab	1,60 a	0,30 AB
Planta sadia, folha sem sintoma	2,53 b	4,10b	0,19 b	0,03 B
CV (%)	23,0	21,22	47,3	52,16

Sintomas avaliados visualmente. Letras diferentes na coluna, para a mesma variável, indicam diferença significativa pelo teste Tukey (P<0,05).

Estes resultados demonstraram que, apesar da restrição fotossintética foliar, o processo infeccioso viral nestas cultivares favoreceu o acúmulo de açúcares solúveis e amido tanto em tecidos onde a infecção viral encontra-se mais avançada (folhas sintomáticas), quanto em tecidos onde a infecção é mais recente (folhas assintomáticas). Destaca-se que o incremento de amido foliar é consequência do acúmulo de açúcares solúveis redutores, com o intuito de manter o equilíbrio no potencial redox do citoplasma celular (BUCKERIDGE et al., 2004). Portanto, a redução na atividade fotossintética, observada neste trabalho, pode estar

relacionada, de modo indireto, com o bloqueio da "drenagem" (saída) de carboidratos das folhas infectadas. Os vírus ao se concentrarem no floema podem desorganizar os tecidos condutores, interferindo em seu funcionamento normal (carregamento), resultando em acúmulo de fotoassimilados nas folhas infectadas. Este bloqueio no transporte de carboidratos pode interferir no metabolismo foliar através dos princípios da teoria do "sugar sensing" (JANG & SHEEN, 1994), os quais correlacionam níveis de açúcares solúveis no citoplasma com o controle da expressão de genes relacionados com a fotossíntese. Neste sentido, Pompe-Novak et al. (2006) observaram, em plantas infectadas, mudanças na expressão de genes relacionados à fotossíntese, sendo que folhas sintomáticas apresentaram expressão reduzida da maioria dos genes relacionados à fotossíntese, ao metabolismo de pigmentos e à fotorrespiração. Gonçalves et al. (2005) e Berger et al. (2007) também relataram que altas concentrações de açúcares nas folhas podem causar decréscimos na taxa fotossintética, via mecanismo de retro-inibição metabólica da fotossíntese.

O RSPaV e o GLRaV-2 são vírus que invadem, replicam-se e se concentram nos tecidos do floema. Na replicação viral, o vírus codifica a proteína de movimento viral (MP), que ao interagir com os plasmodesmas para promover o movimento viral célula-a-célula, pode alterar, mesmo que temporariamente, a funcionalidade dos plasmodesmas, interferindo no fluxo de fotoassimilados para o floema (LALONDE et al, 2003; GONÇALVES et al., 2005; BALACHANDRAN et al., 1997) e, conseqüentemente, para os órgãos-dreno da planta, como ramos, raízes e frutos.

Os impactos sobre o potencial fotossintético das folhas, de ambas as cultivares, potencialmente restringem o acúmulo de reservas e a capacidade de crescimento, refletindo, conseqüentemente, em queda de qualidade da produção e produtividade. Cabaleiro et al. (1999) mencionaram que, embora o desenvolvimento de videiras durante os primeiros anos de cultivo não tenha sido afetado pela infecção viral, a menor taxa fotossintética líquida, apresentada pelas plantas infectadas por vírus, pode comprometer a produção ao longo dos anos.

Análises enoquímicas: O aspecto geral das uvas colhidas, de plantas sadias e infectadas, das duas cultivares e submetidas às análises enoquímicas, evidenciou o amadurecimento irregular e incompleto das uvas provenientes das plantas infectadas (Figura 22).



Cabernet Franc – Planta sadia



Cabernet Franc – Planta infectada



Cabernet Sauvignon – Planta sadia



Cabernet Sauvignon – Planta Infectada

Figura 22 - Amostras de uva colhidas em videiras sadias e infectadas das cvs. Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon, podendo-se observar maturação irregular nas amostras provenientes de plantas infectadas.

As uvas colhidas de plantas infectadas, de ambas cultivares analisadas, apresentaram resultados que se diferiram estatisticamente das plantas sadias, em cinco das seis variáveis analisadas (pH apenas para a cv. Cabernet Franc) sempre com resultados favoráveis as plantas sadias (Tabela 25).

Tabela 25 - Resultados da avaliação da qualidade enológica de uvas colhidas de videiras cvs. Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon infectadas com *Rupestris stem pitting-associated virus* e *Grapevine leafroll-associated virus 2* e sadias. Média de 10 plantas.

Variável	Cabernet Franc		Cabernet Sauvignon	
	Plantas infectada	Plantas sadia	Plantas infectada	Plantas sadia
Sólidos solúveis totais (SST) (°Brix)	15,35 a	17,88 b	13,38 A	16,10 B
Densidade a 20°C (g.ml ⁻¹)	1,0665 a	1,0759 b	1,0594 A	1,0697 B
pH	3,30 a	3,38 b	3,21 a	3,26 a
Acidez titulável (meq.l ⁻¹)	95,09 a	100,28 a	142,81 a	126,58 a
Intensidade total da cor (ITC) (g.l ⁻¹)	2,572 a	3,044 b	1,383 A	2,126 B
Índice de polifenóis totais (IPT) (g.l ⁻¹)	0,062 A	0,101 B	0,040 A	0,061 B

Letras diferentes na mesma linha, para a mesma cultivar, indicam diferença significativa pelo teste t (letras minúsculas, P<0,05; letras maiúsculas, P<0,01).

As uvas colhidas de plantas infectadas apresentaram reduções de sólidos solúveis totais (SST) de 2,53 (C. Franc) e 2,72 °Brix (C. Sauvignon), quando comparadas às uvas colhidas de plantas sadias (Tabela 25). A variação observada para a densidade reflete diretamente a variação obtida em relação aos SST. Esta variação em acúmulo de açúcares na uva corrobora as reduções observadas no potencial fotossintético e as restrições no transporte de carboidratos entre órgãos (folha e fruto) em plantas infectadas, discutido anteriormente.

Considerando-se que, na fermentação alcoólica, 2° Brix produzem aproximadamente 1 °GL, seria hipoteticamente necessário compensar esta redução de SST com a adição de sacarose ao mosto, conseqüentemente, depreciando a qualidade do vinho e aumentando os custos de produção. Em termos econômicos, Kuhn & Protas (1988) determinaram reduções, advindas de plantas infectadas por vírus de até 63% na produção e de até 70% na receita auferida, pois na comercialização da uva com maior °Brix se obtém melhor preço. Resultados semelhantes foram obtidos por Manini et al. (1996) e Komar et al. (2007) que, ao avaliarem as características enológicas de uvas provenientes de plantas infectadas por vírus, observaram reduções nos teores de sólidos solúveis totais e na intensidade da cor. Efeitos negativos mais acentuados podem ser observados em plantas apresentando infecções virais múltiplas (GOLINO et al., 2009a e 2009b) ou em vinhedos mais antigos (MAGALHÃNES et al., 1997; AKBAS et al., 2009).

O acúmulo de açúcares nas folhas (Tabela 24) e o bloqueio do transporte desses para órgãos de reserva acarretam a insuficiente mobilização de amido em órgãos de reserva, afetando o vigor da planta na estação de crescimento seguinte (MANNINI et al., 1998 e 2006a). As maiores consequências da infecção viral em videira são o amadurecimento irregular dos cachos, a redução da produtividade (REYNOLDS et al., 1997; CABALEIRO et al., 1999; KOMAR et al., 2010) e a diminuição da cor em uvas tintas (LEGORBURU et al., 2009). O amadurecimento irregular dos cachos pode ocasionar aumento da acidez total titulável do mosto da uva (CABALEIRO et al., 1999), entretanto este efeito não foi significativo nas avaliações realizadas (Tabela 25). De maneira geral, estudos mostram que o mosto da uva de plantas infectadas tendem a apresentar menor pH quando comparadas com o de plantas saudáveis (CREDI & BABINI, 1997; CABALEIRO et al., 1999; GUIDONI et al. 1997 e 2000; KOVACS et al. 2001), mas esse parâmetro apresentou diferença significativa apenas na C. Franc, possivelmente pelas diferenças em infecções virais e respostas fisiológicas desta cultivar.

Uvas provenientes de plantas infectadas também apresentaram menor intensidade total de cor (ITC) e menor índice de polifenóis totais (IPT). As expressivas reduções verificadas na ITC foram de 15,5% (C. Franc) e 34,9% (C. Sauvignon) e no IPT foram de 38,6% (C. Franc) e 34,4% (C. Sauvignon) (Tabela 25). Em se tratando de uvas viníferas, esses efeitos negativos têm consequências importantíssimas para a qualidade final de vinhos finos. De modo geral, as viroses podem afetar os teores de taninos (polifenóis) e de antocianinas (responsáveis pela cor), além dos compostos aromáticos, não avaliados neste trabalho (MANNINI et al., 2006a e 2009; BRAR et al., 2008; LEE & MARTIN, 2009), os quais comprometem diretamente a qualidade potencial do vinho produzido.

Os resultados apresentados demonstraram que a infecção dupla dos vírus GLRaV-2 e RSPaV afetou negativamente, de forma direta e indireta, diversas variáveis relacionadas à fisiologia foliar e à distribuição de fotoassimilados na videira, os quais proporcionaram reflexos significativos sobre a qualidade enológica da uva.

4.5 Anexos

Tabela 26 - Valores de fotossíntese de saturação, radiação de saturação, fotossíntese máxima, ponto de compensação, taxa de respiração no escuro e rendimento quântico aparente de folhas de videiras (*Vitis vinifera*) cv. Cabernet Franc sadias e infectadas (folhas sintomáticas e assintomáticas) com *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV) e *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2).

Planta	Fotossíntese de saturação ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Radiação de saturação ($\mu\text{mol fóton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Fotossíntese máxima ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Ponto de compensação ($\mu\text{mol fóton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Taxa de respiração no escuro ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Rendimento quântico aparente Φ_a (nmol $\text{CO}_2/\mu\text{mol fóton}$)
CF1IS	3,85	421,74	4,50	35,56	2,24	41,00
CF4IS	3,11	330,56	3,47	44,58	1,80	33,10
CF5IS	4,30	386,65	4,80	35,62	1,52	36,10
CF10IS	4,50	393,78	4,60	33,12	1,54	37,90
Média	3,94 C	383,18 B	4,34 B	37,22 A	1,77 a	37,02 b
CF1IA	10,50	392,30	13,50	22,20	1,18	54,70
CF4IA	6,78	469,75	7,65	15,42	0,67	40,58
CF5IA	7,68	462,29	7,98	15,54	0,85	44,40
CF10IA	6,91	360,80	7,75	17,64	0,87	49,11
Média	7,97 B	421,28 B	9,22 AB	17,70 B	0,89 b	47,20 a
CF11SD	11,80	744,66	13,05	18,15	1,05	52,70
CF15SD	12,92	639,96	16,10	21,67	1,51	53,50
CF16SD	10,48	609,15	12,50	18,39	0,84	43,20
CF17SD	10,62	590,23	12,60	24,35	1,15	46,60
Média	11,45 A	646,00 A	13,56 A	20,64 B	1,13 b	49,00 a
CV (%)	16,06	11,36	21,59	15,88	22,09	11,07

CF1, 4, 5 e 10, plantas de Cabernet Franc infectadas; IS, folha infectada e com sintomas e IA, folha infectada sem sintomas. CF11, 15, 16 e 17, plantas de C. Franc sadias; SD, folha sadia. Sintomas avaliados visualmente. Letras diferentes na coluna, para a mesma variável, indicam diferença significativa pelo teste Tukey (letras minúsculas, $P < 0,05$; letras maiúsculas, $P < 0,01$).

Tabela 27 - Valores de fotossíntese de saturação, radiação de saturação, fotossíntese máxima, ponto de compensação, taxa de respiração no escuro e rendimento quântico aparente de folhas de videiras (*Vitis vinifera*) cv. Cabernet Sauvignon sadias e infectadas (folhas sintomáticas e assintomáticas) com *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV) e *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2).

Planta	Fotossíntese de saturação ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Radiação de saturação ($\mu\text{mol fóton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Fotossíntese máxima ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Ponto de compensação ($\mu\text{mol fóton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Taxa de respiração no escuro ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Rendimento quântico aparente Φ_a (nmol $\text{CO}_2/\mu\text{mol fóton}$)
CS1IS	1,92	238,48	2,00	30,46	0,80	14,72
CS6IS	3,25	293,34	3,68	33,91	0,84	26,51
CS7IS	3,06	245,87	3,29	13,49	0,55	26,90
CS8IS	1,46	160,10	1,68	38,92	1,36	24,50
Média	2,42 b	234,44 b	2,66 b	29,19 a	0,88 a	23,15 b
CS1IA	4,02	268,00	4,47	21,35	0,33	28,90
CS6IA	7,12	435,17	8,29	24,28	1,00	36,50
CS7IA	5,25	313,57	5,82	6,05	0,25	34,76
CS8IA	5,03	365,31	5,43	18,59	0,75	37,30
Média	5,35 a	345,51 ab	6,01 a	17,56 ab	0,58 a	34,36 a
CS15SD	5,37	354,51	5,99	6,96	0,27	33,00
CS16SD	3,93	329,37	4,49	6,10	0,36	30,83
CS19SD	6,81	454,08	7,50	5,54	0,13	38,15
CS20SD	5,70	339,15	6,20	14,70	0,77	41,39
Média	5,45 a	369,28 a	6,04 a	8,32 b	0,38 a	35,84 a
CV (%)	25,64	19,57	26,62	44,95	52,63	15,54

CS1, 6, 7 e 8, plantas de Cabernet Sauvignon infectadas; IS, folha infectada e com sintomas e IA, folha infectada sem sintomas. CS15, 16, 19 e 20, plantas de Cabernet Sauvignon sadias; SD, folha sadia. Sintomas avaliados visualmente. Letras diferentes na coluna, para a mesma variável, indicam diferença significativa pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 28 - Teores totais e individuais de clorofila (*a* e *b*) em folhas de videiras (*Vitis vinifera*) cv. Cabernet Sauvignon sadias e infectadas (folhas sintomáticas e assintomáticas) com *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV) e *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2).

Planta	Teor de clorofila		
	Clorofila total (ICF*)	Clorofila <i>a</i> (ICF)	Clorofila <i>b</i> (ICF)
CS1IS	33,3	25,5	7,8
CS6IS	34,1	26,9	7,2
CS7IS	37,0	28,4	8,6
CS8IS	33,8	26,3	7,5
Média	34,6 B	26,8 B	7,8 b
CS1IA	42,6	32,4	10,2
CS6IA	49,8	37,5	12,3
CS7IA	49,8	38,3	11,5
CS8IA	41,5	32,0	9,5
Média	45,9 A	35,1 A	10,9 a
CS15SD	42,9	33,2	9,7
CS16SD	43,5	34,0	9,5
CS19SD	47,4	35,4	12,0
CS20SD	44,9	34,5	10,4
Média	44,7 A	34,3 A	10,4 a
CV (%)	7,19	6,57	10,72

CS1, 6, 7 e 8, plantas de Cabernet Sauvignon infectadas; IS, folha infectada e com sintomas e IA, folha infectada sem sintomas. CS15, 16, 19 e 20, plantas de Cabernet Sauvignon sadias; SD, folha sadia. Sintomas avaliados visualmente. * ICF: Índice de clorofila Falker. Letras diferentes na coluna, para a mesma variável, indicam diferença significativa pelo teste Tukey (letras minúsculas, P<0,05; letras maiúsculas, P<0,01).

Tabela 29 - Teores totais e individuais de clorofila (*a* e *b*) em folhas de videiras (*Vitis vinifera*) cv. Cabernet Franc sadias e infectadas (folhas sintomáticas e assintomáticas) com *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV) e *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2).

Planta	Teor de clorofila		
	Clorofila total (ICF*)	Clorofila <i>a</i> (ICF)	Clorofila <i>b</i> (ICF)
CF1IS	42,0	33,1	8,9
CF4IS	34,4	27,8	6,6
CF5IS	28,2	22,7	5,5
CF10IS	41,3	32,0	9,3
Média	36,5 B	28,9 B	7,6 B
CF1IA	54,7	41,7	13,0
CF4IA	43,0	32,9	10,1
CF5IA	46,9	37,0	9,9
CF10IA	51,4	39,1	12,3
Média	49,0 AB	37,7 AB	11,3 AB
CF11SD	57,9	43,9	14,0
CF15SD	54,8	41,0	13,8
CF16SD	51,5	38,8	12,7
CF17SD	52,9	40,2	12,7
Média	54,3 A	41,0 A	13,3 A
CV (%)	10,81	10,28	13,44

CF1, 4, 5 e 10, plantas de Cabernet Franc infectadas; IS, folha infectada e com sintomas e IA, folha infectada sem sintomas. CF11, 15, 16 e 17 plantas de C. Franc sadias; SD, folha sadia. Sintomas avaliados visualmente. * ICF: Índice de clorofila Falker. Letras diferentes na coluna, para a mesma variável, indicam diferença significativa pelo teste Tukey ($P < 0,01$).

Tabela 30 - Teores de açúcares solúveis totais e amido em folhas de videiras (*Vitis vinifera*) cv. Cabernet Franc sadias e infectadas (folhas sintomáticas e assintomáticas) com *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV) e *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2).

	Açúcares solúveis totais (mg/100mg de massa seca)	Amido (mg/100mg de massa seca)
CF1IS	3,82	2,96
CF4IS	6,16	1,35
CF5IS	4,98	1,27
CF10IS	5,75	2,01
Média	5,18 a	1,90 a
CF1IA	4,62	2,27
CF4IA	3,12	1,44
CF5IA	4,85	0,82
CF10IA	5,85	1,87
Média	4,61 a	1,60 a
CF11SD	2,30	0,21
CF15SD	2,28	0,03
CF16SD	2,12	0,35
CF17SD	3,43	0,15
Média	2,53 b	0,19 b
CV(%)	23,1	47,3

CF1, 4, 5 e 10, plantas de Cabernet Franc infectadas; IS, folha infectada e com sintomas e IA, folha infectada sem sintomas. CF11, 15, 16 e 17, plantas de Cabernet Franc sadias; SD, folha sadia. Sintomas avaliados visualmente. Letras diferentes na coluna, para a mesma variável, indicam diferença significativa pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 31 - Teores de açúcares solúveis totais e amido em folhas de videiras (*Vitis vinifera*) cv. Cabernet Sauvignon sadias e infectadas (folhas sintomáticas e assintomáticas) com *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV) e *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2).

	Açúcares solúveis totais (mg/100mg de massa seca)	Amido (mg/100mg de massa seca)
CS1IS	4,9	0,37
CS6IS	7,42	0,77
CS7IS	7,57	0,72
CS8IS	5,67	0,55
Média	6,39 a	0,60 A
CS1IA	6,01	0,20
CS6IA	5,27	0,59
CS7IA	5,76	0,10
CS8IA	3,63	0,30
Média	5,17ab	0,30 AB
CS15SD	3,21	0,03
CS16SD	5,28	0,03
CS19SD	3,65	0,02
CS20SD	4,25	0,02
Média	4,10b	0,03 B
CV(%)	21,2	52,16

CS1, 6, 7 e 8, plantas de Cabernet Sauvignon infectadas; IS, folha infectada e com sintomas e IA, folha infectada sem sintomas. CS15, 16, 19 e 20, plantas de Cabernet Sauvignon sadias; SD, folha sadia. Sintomas avaliados visualmente. Letras diferentes na coluna, para a mesma variável, indicam diferença significativa pelo teste Tukey (P<0,05).

Tabela 32 - Resultados da avaliação da qualidade enológica das uvas provenientes de videiras da cv. Cabernet Franc infectadas com *Grapevine leafroll-associated virus 2* e *Rupestris stem pitting-associated virus* ou de plantas sadias.

Planta	°Brix	Densidade	pH	Acidez total (meq/l)	Cor A420 nm	Cor A520 nm	Cor A620 nm	Intensidade total da cor	IPT (280 nm)*
CF1	17,0	1,0715	3,31	98,81	0,586	1,090	0,129	1,805	0,024
CF2	18,6	1,0788	3,42	73,92	1,199	1,090	0,305	2,594	0,065
CF3	15,5	1,0655	3,27	114,04	1,055	1,899	0,270	3,224	0,058
CF4	17,9	1,0765	3,45	69,46	1,272	1,913	0,327	3,512	0,091
CF5	15,6	1,0673	3,33	78,38	1,016	1,505	0,235	2,756	0,048
CF6	16,1	1,0698	3,25	96,21	0,806	1,350	0,190	2,346	0,077
CF7	15,0	1,0647	3,28	93,42	0,978	1,515	0,235	2,728	0,085
CF8	16,4	1,0714	3,34	79,49	0,900	1,444	0,212	2,556	0,040
CF9	9,1	1,0447	3,12	149,14	0,846	0,928	0,191	1,965	0,072
CF10	12,3	1,0544	3,19	98,07	0,884	1,133	0,216	2,233	0,062
Média	15,35 a	1,0665 a	3,30 a	95,09 a	0,954	1,387	0,231	2,572 a	0,062 A
CF11	17,2	1,0723	3,47	107,35	1,286	2,106	0,335	3,727	0,101
CF12	17,8	1,0782	3,42	113,30	1,156	1,816	0,280	3,252	0,098
CF13	18,0	1,0752	3,34	96,21	1,010	1,383	0,240	2,633	0,113
CF14	18,2	1,0778	3,45	88,59	1,229	2,163	0,327	3,719	0,107
CF15	19,0	1,0809	3,45	111,44	1,217	1,792	0,278	3,287	0,121
CF16	17,0	1,0725	3,31	86,18	1,005	1,348	0,234	2,587	0,097
CF17	17,6	1,0749	3,38	99,18	1,067	1,613	0,268	2,948	0,103
CF18	17,8	1,0745	3,36	101,22	1,044	1,466	0,259	2,769	0,099
CF19	17,4	1,0779	3,32	88,96	1,065	1,678	0,256	2,999	0,107
CF20	18,8	1,0747	3,28	110,32	0,905	1,363	0,250	2,518	0,068
Média	17,88 a	1,0759 b	3,38 b	100,28 a	1,098	1,673	0,273	3,044 b	0,101 B

CF1 a 10, plantas da cv. Cabernet Franc infectadas; CF11 a 20, plantas da cv. Cabernet Franc sadias.

*: amostras diluídas 1:100 (v/v) em solução hidro-alcoólica. Letras diferentes na mesma coluna, para o mesmo parâmetro, indicam diferença significativa pelo teste t (letras minúsculas, $P < 0,05$; letras maiúsculas, $P < 0,01$).

Tabela 33 - Resultados da avaliação da qualidade enológica das uvas provenientes de videiras cv. Cabernet Sauvignon infectadas com *Grapevine leafroll-associated virus 2* e *Rupestris stem pitting-associated virus* ou de plantas sadias.

Planta	°Brix	Densidade	pH	Acidez total (meq/l)	Cor A420 nm	Cor A520 nm	Cor A620 nm	Intensidade IPT (280 nm)* total da cor	
CS1	11,8	1,0491	3,06	176,82	0,332	0,461	0,093	0,886	0,033
CS2	13,8	1,0631	3,15	153,23	0,334	0,561	0,084	0,979	0,032
CS3	11,3	1,0520	3,12	169,76	0,474	0,773	0,135	1,382	0,031
CS4	12,5	1,0551	3,27	124,44	0,373	0,611	0,100	1,084	0,020
CS5	14,5	1,0663	3,30	117,38	0,408	0,693	0,096	1,197	0,041
CS6	11,4	1,0503	3,11	165,30	0,465	0,810	0,127	1,402	0,045
CS7	13,5	1,0606	3,15	162,52	0,587	1,144	0,151	1,882	0,052
CS8	15,6	1,0651	3,27	122,58	0,582	1,135	0,144	1,861	0,057
CS9	15,3	1,0696	3,43	109,77	0,517	0,885	0,135	1,537	0,039
CS10	14,1	1,0629	3,25	126,30	0,519	0,968	0,135	1,622	0,045
Média	13,38 A	1,0594 A	3,21 a	142,81 a	0,459	0,804	0,120	1,383 A	0,040 A
CS11	16,1	1,0703	3,23	129,08	0,612	1,193	0,154	1,959	0,060
CS12	17,7	1,0754	3,31	106,61	1,077	2,380	0,253	3,710	0,092
CS13	16,2	1,0708	3,23	135,21	0,519	1,062	0,121	1,702	0,048
CS14	13,8	1,0582	3,12	170,88	0,562	1,072	0,148	1,782	0,052
CS15	16,7	1,0692	3,33	115,90	0,563	1,077	0,144	1,784	0,041
CS16	16,2	1,0688	3,24	136,51	0,568	1,103	0,137	1,808	0,055
CS17	15,8	1,0711	3,30	120,54	0,624	1,146	0,149	1,919	0,058
CS18	16,5	1,0708	3,26	143,76	0,507	0,974	0,122	1,603	0,053
CS19	15,9	1,0711	3,31	112,92	0,734	1,442	0,199	2,375	0,070
CS20	16,1	1,0712	3,29	94,35	0,808	1,587	0,219	2,614	0,076
Média	16,10 B	1,0697 B	3,26 a	126,58 a	0,657	1,304	0,165	2,126 B	0,061 B

CS1 a 10, plantas da cv. Cabernet Sauvignon infectadas; CS11 a 20, plantas da cv. Cabernet Sauvignon sadias.

*: amostras diluídas 1:100 (v/v) em solução hidro-alcoólica. Letras diferentes na mesma coluna, para o mesmo parâmetro, indicam diferença significativa pelo teste t (letras minúsculas, P<0,05; letras maiúsculas, P<0,01).

4.6 Referências bibliográficas

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

ABOU GHANEM-SABANADZOVIC, N.; SABANADZOVIC, S.; GURGELI, P.; ROWHANI, A. Molecular characterization of *Grapevine leafroll-associated Viruses -4* and *-6*. **Extended Abstracts, 15th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine**, Stellenbosch, South Africa, p. 30-31, 2006.

ABOU-GHANEM, N.; SABANADZOVIC, S.; MINAFRA, A.; SILDARELLI, 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, n. 1, p. 37-46, 1998.

ABOU-GHANEM, N.; SILDARELLI, 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, n. 1, p. 15-25, 1997.

ACHECHE, H.; FATTOUCH, S.; M'HIRSI, S.; MARZOUKI, N.; MARRAKCHI, M. Use of optimised PCR methods for the detection of GLRaV-3: A *Closterovirus* associated with grapevine leafroll in Tunisian grapevine plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 17, n. 1, p. 31-42, 1999.

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, n. 5, p. 1045-1060, 2004.

AKBAS, B.; KUNTER, B.; ILHAN, D. Influence of leafroll on local grapevine cultivars in agroecological conditions of Central Anatolia region. **Horticultural Science** (Prague), v. 36, n. 3, p. 97-104, 2009.

ALABI, J. A.; MARTIN, R. R.; NAIDU, R. A. Sequence diversity, population genetics and potential recombination events in *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* in Pacific North-West vineyards. **Journal of General Virology**, v. 91, n. 1, p. 265-276, 2010.

ALMÁSI, A.; APATINI, D.; BÓKA, K.; BODDI, B.; GABORJÁNYI, R. BSMV infection inhibits chlorophyll biosynthesis in barley plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 56, p. 227-233, 2000.

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

ALRWAHNIH, M.; DAUBERT, S.; GOLINO, D.; ROWHANI, A. Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. **Virology**, v. 387, n. 2, p. 395-401, 2009.

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.

AMARAL, L. I. V.; GASPAR, M.; COSTA, P. M. F.; AIDAR, M. P. M.; BUCKERIDGE, M. S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, v. 34, n. 4, p. 425-431, 2007.

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, n. 3, p. 183-1952, 2004.

ARÊAS, J. A. G.; LAJOLO, F. M. Determinação enzimática específica de amido, glicose, frutose e sacarose em bananas pré-climáticas e climatéricas. **Anais de Farmácia e Química de São Paulo**, v. 20, p. 307-318, 1980.

ARIAS, M. C.; LENARDON, S.; TALEISNIK, E. Carbon metabolism alterations in sunflower plants infected with the *Sunflower chlorotic mottle virus*. **Journal of Phytopathology**, v. 151, n. 5, p. 267-273, 2003.

AUGER, J. S.; ABALLAY, E. E.; PINTO, M. C.; PASTENES, C. V. Efecto del virus de la hoja en abanico (VHA) en el desarrollo y productividad de plantas de vid cv. Thompson Seedless. **Fitopatología**, v. 27, p. 85-89. 1992.

BAEBLER, S.; KRECIC-STRES, H.; ROTTER, A.; KOGOVSEK, P.; CANKAR, K.; KOK, E. J.; GRUDEN, K.; KOVAC, M.; ZEL, J.; POMPE-NOVAK, M.; RAVNIKAR, M. PVY^{NTN} elicits a diverse gene expression response in different potato genotypes in the first 12h after inoculation. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, n. 2, p. 263-275, 2009.

BAILISS, K. W. Infection of cucumber cotyledons by *Cucumber mosaic virus* and the participation of chlorophyllase in the development of chlorotic lesions. **Annals of Botany**, v. 34, n. 3, p. 647-655, 1970.

BALACHANDRAN, S.; HULL, R. J.; MARTINS, R. A.; VAADIA, Y.; LUCAS, W. J. Influence of environmental stress on biomass partitioning in transgenic tobacco plants expressing the movement protein of *Tobacco mosaic virus*. **Plant Physiology**, v. 114, p. 475-481, 1997.

BARBIERI, M. R.; CARVALHO, M. G.; ZAMBOLIM, E. M.; ZERBINI, F. M. Expressão em *Escherichia coli* da proteína capsidial do *Watermelon mosaic virus* e produção de anti-soro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 215-219, 2004.

BASHIR, N. S.; HAJIZADEH, M. Survey for *Grapevine fanleaf virus* in vineyards of north-west Iran and genetic diversity of isolates. **Australasian Plant Pathology**, v. 36, n. 1, p. 46-52, 2007.

BERGER, S.; SINHA, A. K.; ROITSCH, T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 15-16, p. 4019-4026, 2007.

BERNACCHI, C. J.; MORGAN, P. B.; ORT, D. R.; LONG, S. P. The growth of soybean under free air [CO₂] enrichment (FACE) stimulates photosynthesis while decreasing *in vivo* Rubisco capacity. **Planta**, v. 220, n. 3, p. 434-446, 2005.

BERTAMINI, M.; MUTHUCHELIAN, K.; NEDUNCHEZHIAN, N. Effect of *Grapevine leafroll* on the photosynthesis of field grown grapevine plants (*Vitis vinifera* L. cv. Lagrein). **Journal of Phytopathology**, v. 152, n. 3, p. 145-152, 2004.

BERTAZZON, N.; ANGELINI, E. Advances in the detection of *Grapevine leafroll-associated virus 2* variants. **Journal of Plant Pathology**, v. 86, n. 4, p. 283-290, 2004.

BERTAZZON, N.; REPETTO, O.; DE ROSSO, M.; FLAMINI, R.; ANGELINI, E.; BORGIO, M. Leafroll symptoms caused by GLRaV-3 are associated with an increase of resveratrol in grapevine leaves. **Extended abstracts 16th Meeting of International Council of Viruses and Virus Diseases of Grapevine**, Dijon, France, p. 252-253, 2009.

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, n. 2, p. 117-124, 2007.

BONFIGLIOLI, R.; EDWARDS, F.; HOSKINS, N.; PANTALEO, A. Graft incompatibility syndrome in New Zealand Merlot vines involves another possible variant of GLRaV-2. **The Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker**, v. 476, p. 50-54, 2003.

BOSCIA, D.; ASLOUJ, E.; ELICIO, V.; SAVINO, V.; CASTELLANO, M. A.; MARTELLI, G. P. Production characterization and use of monoclonal antibodies to *Grapevine virus A*. **Archives of Virology**, v. 127, n. 1-4, p. 185-194, 1992.

BOTTON, M.; FAJARDO, T. V. M.; MORANDI FILHO, W. J.; GRUTZMACHER, A. D.; PRADO, E. Vektor encoberto, cochonilhas algodonosas em uva. **Revista Cultivar Hortaliças e Frutas**, Pelotas, v. 7, p. 28-29, 2003.

BRAR, H. S.; SINGH, Z.; SWINNY, E.; CAMERON, I. *Girdling* and *Grapevine leafroll associated viruses* affect berry weight, colour development and accumulation of anthocyanins in 'Crimson Seedless' grapes during maturation and ripening. **Plant Science**, v. 175, n. 6, p. 885-897, 2008.

BUCKERIDGE, M. S.; AIDAR, M. P. M.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S. Acúmulo de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). *Germinação - do Básico ao Aplicado*. 1^{ed}. Porto Alegre: **Artmed Editora**. p. 31-50, 2004.

CABALEIRO, C.; SEGURA, A. Field transmission of *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3) by the mealybug *Planococcus citri*. **Plant Disease**, v. 81, n. 3, p. 283-287, 1997.

CABALEIRO, C.; SEGURA, A. Temporal analysis of *Grapevine leafroll-associated virus 3* epidemics. **European Journal of Plant Pathology**, v. 114, n. 4, p. 441-446, 2006.

CABALEIRO, C.; SEGURA, A.; GÁRCIA-BERRIOS, J. J. Effects of *Grapevine leafroll-associated virus 3* on the physiology and must of *Vitis vinifera* L. cv. Albarifio following contamination in the field. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 50, n. 1, p. 40-44, 1999.

CHARLES, J. G.; COHEN, D.; WALKER, J. T. S.; FORGIE, S. A.; BELL, V. A.; BREEN, K. C. A review of the ecology of *Grapevine leafroll-associated virus* type 3 (GLRaV-3). **New Zealand Plant Protection**, v. 59, p. 330-337, 2006.

CID, M.; PEREIRA, S.; CABALEIRO, C.; FAORO, F.; SEGURA, N. Presence of *Grapevine leafroll-associated virus 3* in primary salivary glands of the mealybug vector *Planococcus citri* suggests a circulative transmission mechanism. **European Journal of Plant Pathology**, v. 118, n. 1, p. 23-30, 2007.

CORRÊA, L. S.; BOLIANI, A. C.; FRACARO, A. A. Panorama do cultivo de uvas rústicas e propagação. In: CORRÊA, L. S.; BOLIANI, A. C.; FRACARO, A. A (Eds.). Uvas rústicas: Cultivo e processamento em regiões tropicais. Jales, [s.n], **Editora Gráfica Universitária**, p. 1-29, 2008.

CREDI, R. Characterization of grapevine rugose wood disease sources from Italy. **Plant Disease**, v. 82, n. 11, p. 1288-1292, 1997.

CREDI, R.; BABINI, A. R. Effects of virus and virus-like infections on growth, yield, and fruit quality of Albana and Trebbiano Romagnolo grapevines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 48, n. 1, p. 7-12, 1997.

CRETAZZO, E.; PADILHA, C.; CARAMBULA, C.; HITA, I.; SALMERÓN, E.; CIFRE, J. Comparison of the effects of different virus infections on performance of three Majorcan grapevine cultivars in field conditions. **Annals of Applied Biology**, v. 156, p. 1-12, 2010.

DIANESE, E. C.; RAMALHO, E. D.; CERQUEIRA, D. M.; LOPES, D. B.; FAJARDO, T. V. M., FERREIRA, M. A. S. V.; MARTINS, C. R. F. Variability of the 3' terminal of the polymerase gene of *Grapevine leafroll-associated virus-3* isolates from Vale do São Francisco, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 173-176, 2005.

DIGIARO, M.; ELBEAINO, T.; MARTELLI, G. Development of degenerate and species-specific primers for the differential and simultaneous RT-PCR detection of grapevine-infecting nepoviruses of subgroups A, B and C. **Journal of Virological Methods**, v. 141, p. 34-40, 2007.

DOMICIANO, G. P.; RESENDE, R. S.; RODRIGUES, F. A.; DA MATTA, F. M. Alterações na fotossíntese de plantas infectadas por patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 17, p. 305-339, 2009.

DOVAS, C. I.; KATIS, N. I. A spot nested RT-PCR method for the simultaneous detection of members of the *Vitivirus* and *Foveavirus* genera in grapevine. **Journal of Virological Methods**, v. 170, p. 99-106, 2003.

DUBOIS, M.; GILES, K. A.; HAMILTON, J. K. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

Embrapa Uva e Vinho. Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2009. **Artigos Técnicos on line**. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/prodvit2009vf.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2010a.

Embrapa Uva e Vinho. Viroses da videira no Brasil. **Artigos Técnicos on line**. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/viticultura/viroses.html>>. Acesso em: 13 fev. 2010b.

ESPINHA, L. M.; GASPAR, J. O.; KUNIYUKI, H.; CAMARGO, L. E. A. Molecular detection of *Rupestris stem pitting-associated virus* in grapevines in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 206, 2003.

FAJARDO, T. V. M.; BARROS, D. R.; NICKEL, O.; KUHN, G. B.; ZERBINI, F. M. Expression of *Grapevine leafroll-associated virus 3* coat protein gene in *Escherichia coli* and production of polyclonal antibodies. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 6, p. 496-500, 2007a.

FAJARDO, T. V. M.; DIANESE, E. C.; EIRAS, M.; CERQUEIRA, D. M.; LOPES, D. B.; FERREIRA, M. A. S. V.; MARTINS, C. R. F. Variability of the coat protein gene of *Grapevine leafroll-associated virus 3* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 335-340, 2007b.

FAJARDO, T. V. M.; EIRAS, M.; SANTOS, H. P.; NICKEL, O.; KUHN, G. B. Detecção e caracterização biológica e molecular de *Rupestris stem-pitting associated virus* e seu efeito na fotossíntese de videiras. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 209-214, 2004a.

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

FAJARDO, T. V. M.; KUHN, G. B.; EIRAS, M.; NICKEL, O. Detecção de *Closterovirus* em videira e caracterização parcial de um isolado do *Grapevine leafroll-associated virus 3*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 58-64, 2002.

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 de um isolado de *Grapevine virus A* e caracterização do gene da proteína capsidial. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 5, p. 521-527, 2003b.

FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O.; EIRAS, M.; KUHN, G. B.; SCHENATO, P. G. Avaliação da variabilidade do *Grapevine leafroll-associated virus 1* e *3* por análise de sequências de nucleotídeos de polimorfismo conformacional de fita simples. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 177-182, 2005.

FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O.; EIRAS, M.; KUHN, G. B.; SCHENATO, P. G. Detecção e caracterização molecular parcial do *Grapevine fleck virus* em videiras. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, N. 4, p. 460, 2004b.

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. London. **Elsevier Academic Press**, 2005, 1162p.

FAZELI, C. F.; HABIL, N.; REZAIAN, M. A. Efficient cloning of cDNA from *Grapevine leafroll-associated virus 4* and demonstration of probe specificity by the viral antibody. **Journal of Virological Methods**, v. 70, p. 201-211, 1998.

FUCHS, M.; MARSELLA-HERRICK, P.; LOEB, G. M.; MARTINSON, T. E.; HOCH, H. C. Diversity of *Ampelovirus* in Mealybugs and soft scale vectors and in grapevine hosts from leafroll-affected vineyards. **Virology**, v. 99, n. 10, p. 1177-1184, 2009.

FUNAYAMA, S.; HIKOSAKA, K.; YAHARA, T. Effects of virus infection and growth irradiance on fitness components and photosynthetic properties of *Eupatorium makinoi* (*Compositae*). **American Journal of Botany**, v. 84, n. 6, p. 823-829, 1997.

GARAU, R.; PROTA, V. A.; BOSCIA, D.; FIORI, M.; PROTA, U. *Pseudococcus affinis* Mask., a new vector of *Grapevine trichoviruses A* and *B*. **Vitis**, v. 34, n. 1, p. 67-68, 1995.

GARRIDO, L. R.; BOTTON, M.; MELO, G. W. B.; FAJARDO, T. V. M.; NAVES, R. L. Manual de identificação e controle de doenças, pragas e deficiências nutricionais da videira. **Embrapa Uva e Vinho**, Bento Gonçalves, RS, 1th ed., v. 1, 78p., 2008.

GIOVANNINI, E. Produção de uvas para vinho, suco e mesa. **Porto Alegre: Renascença**, 3th ed., 368p., 2008.

GOLINO, D. A.; SIM, S. T.; ROWHANI, A. Transmission studies of *Grapevine leafroll-associated virus* and *Grapevine corky bark* associated virus by the obscure mealybug. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 46, n. 3, p. 408, 1995.

GOLINO, D. A.; WOLPERT, J.; SIM, S. T.; BENZ, J.; ANDERSON, M.; ROWHANI, A. Virus effects on vine growth and fruit components of three California 'Heritage' clones of Cabernet Sauvignon. **Extended abstracts 16th Meeting of International Council of Viruses and Virus Diseases of Grapevine**, Dijon, France, p. 243-244, 2009a.

GOLINO, D. A.; WOLPERT, J.; SIM, S. T.; BENZ, J.; ANDERSON, M.; ROWHANI, A. Virus effects on vine growth and fruit components of Cabernet Sauvignon on six rootstocks. **Extended abstracts 16th Meeting of International Council of Viruses and Virus Diseases of Grapevine**, Dijon, France, p. 245-246, 2009b.

GONÇALVES, M. C.; VEGA, J.; OLIVEIRA, J. G.; GOMES, M. M. A. *Sugarcane yellow leaf virus* infection leads to alterations in photosynthetic efficiency and carbohydrate accumulation in sugarcane leaves. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 10-16, 2005.

GOSZCZYNSKI, D. E.; JOOSTE, A. E. C. Identification of divergent variants of *Grapevine virus A*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, n. 4, p. 397-403, 2003.

GUIDONI, S.; MANNINI, F.; FERRANDINO, A.; ARGAMANTE, N.; DI STEFANO, R. The effect of *Grapevine leafroll* and Rugose wood sanitation on agronomic performance and berry and leaf phenolic content of a Nebbiolo Clone (*Vitis vinifera* L.). **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 48, n. 4, p. 438-442, 1997.

GUIDONI, S.; MANNINI, F.; FERRANDINO, A.; ARGAMANTE, N.; DI STEFANO, R. Effects of virus status on leaf and berry phenolic compounds in two wine grapevine *Vitis vinifera* cultivars. **Acta Horticulture**, v. 526, p. 445-452, 2000.

HABIL, N.; FARROKHI, N.; LIMA, M. F.; NICHOLAS, P.; RANGLES, J. W. Distribution of *Rupestris stem pitting-associated virus* variants in two Australian vineyards showing different symptoms. **Annals of Applied Biology**, v. 148, n. 1, p. 91-96, 2006.

JAMESON, P. E.; CLARKE, S. F. Hormone-virus interaction in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, n. 3, p. 205-28, 2002.

JANG, J. C.; SHEEN, J. Sugar sensing in higher plants. **The Plant Cell**, v. 6, n. 11, p. 1665-1679, 1994.

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

KOMAR, V.; VIGNE, E.; DEMANGEAT, G.; FUCHS, M. Beneficial effect of selective virus elimination on the performance of *Vitis vinifera* cv. Chardonnay. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 58, n. 2, p. 202-210, 2007.

KOMAR, V.; VIGNE, E.; DEMANGEAT, G.; LEMAIRE, O.; FUCHS, M. Comparative performance of virus-infected *Vitis vinifera* cv. Savagnin rose grafted onto three rootstocks. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 61, n. 1, p. 68-73, 2010.

KOMÍNEK, P.; GLASA, M.; BRYXIOVÁ, M. Analysis of the molecular variability of *Grapevine leafroll-associated virus 1* reveals the presence of two distinct virus groups and their mixed occurrence in grapevines. **Virus Genes**, v. 31, n. 3, p. 247-255, 2005.

KOVACS, L. G.; HANAMI, H.; FORTENBERRY, M.; KAPS, M. L. Latent infection by leafroll agent GLRaV-3 is linked to lower fruit quality in French-American hybrid grapevines Vidal blanc and St. Vincent. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 52, n. 3, p. 254-259, 2001.

KUHN, G. B.; PROTAS, J. F. S. Perdas causadas pela virose do enrolamento da folha na cultivar Cabernet Franc. **Comunicado Técnico EMBRAPA**, n. 7, p. 1-3, 1988.

KUNIYUKI, H.; GASPAR, J. O.; REZENDE, J. A. M. Ocorrência do *Grapevine leafroll-associated virus 6* em vinhedos do Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 29, n. 3, 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, 2006.

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-Tozzetti (Hemiptera: Pseudococcidae). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 31, n. 1, p. 65-68, 2005.

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, n. 6, p. 635-638, 2002.

LA NOTTE, P.; BUZKAN, N.; CHOUERI, 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.

LAIMER, M.; LEMAIRE, O.; HERRBACH, E.; GOLDSCHIMIDT, V.; MINAFRA, A.; BIANCO, P.; WETZEL, T. Resistance to viruses, Phytoplasmas and their vectors in the grapevine in Europe: A review. **Journal Plant Pathology**, v. 91, n. 1, p. 7-23, 2009.

LALONDE, S.; TEGEDER, M.; THRONE-HOLST, M.; FROMMER, W. B.; PATRICK, J. W. Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. **Plant Cell & Environment**, v. 26, n. 1, p. 37-56, 2003.

LARCHER, W. Physiological plant ecology. Berlin: **Springer-Verlag**, 2003, 513p.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. *Clustal W* and *Clustal X* version 2.0. **Bioinformatics Applications Note**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.

LEE, J.; MARTIN, R. R. Influence of *Grapevine leafroll-associated viruses* (GLRaV-2 and -3) on the fruit composition of Oregon *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir: Phenolics. **Food Chemistry**, v. 112, p. 889-896, 2009.

LEGORBURU, F. J.; RECIO, E.; LÓPEZ, E.; BAIGORRI, J.; LARREINA, M.; REMESAL, A.; CIBRIÁIN, J. F.; CAMINERO, L.; SUBERVIOLA, J.; AGUIRREZÁBAL, F. Effect of *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) and *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3) on red wine quality. **Extended abstracts 16th Meeting of International Council of Viruses and Virus Diseases of Grapevine**, Dijon, France, p. 251, 2009.

LIMA, M. F.; Detecção e controle de viroses em videiras. **Circular Técnica**, n. 90, p. 1-9, 2009.

LIMA, M. F.; ALKOWANI, R.; UYEMOTO, J. K.; GOLINO, D.; OSMAN, F.; ROWHANI, A. Molecular analysis of a California strain of *Rupestris stem pitting associated virus* isolated from declining Syrah grapevines. **Archives of Virology**, v. 151, n. 9, p. 1889-1894, 2006a.

LIMA, M. F.; ROSA, C.; GOLINO, D. A.; ROWHANI, A. Detection of *Rupestris stem pitting-associated virus* in seedlings of virus-infected maternal grapevine plants. **Extended abstracts 15th Meeting of International Council of Viruses and Virus Diseases of Grapevine**, Stellenbosch, South Africa, p. 244-245, 2006b.

LIMA, M. F.; ALKOWANI, R.; UYEMOTO, J. K.; ROWHANI, A. Genomic study and detection of a new variant of *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* in declining California Pinot Noir grapevines. **Journal of Plant Pathology**, v. 91, n. 1, p. 155-162, 2009.

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, n. 6, p. 1101-1116, 1997.

LING, K. S.; ZHU, H. Y.; PETROVIC, N.; GONSALVES, D. Comparative effectiveness of ELISA and RT-PCR for detecting *Grapevine leafroll-associated closterovirus 3* in field samples. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 52, n. 1, p. 21-27, 2001.

LITTLE, A.; FAZELI, C. F.; REZAIAN, M. A. Hypervariable genes in *Grapevine leafroll-associated virus 1*. **Virus Research**, v. 80, n. 1-2, p. 109-116, 2001.

MAGALHÃNES, N.; OLIVEIRA, A.; CARVALHO, J. B.; TOSCANO, E.; CORREIA M. J.; PEREIRA, A. - M.; CARNEIRO, L. C.; MARTINS, A. Evolution of leafroll (GLRaV-3) effect on grapevine yield and potential ethanol. **Extended Abstracts of the 12th Meeting of International Council of Viruses and Virus Diseases of Grapevine**, Lisboa, Portugal, p. 175-76, 1997.

MALOSSINI, U.; ZULINI, L.; NICOLINI, G.; VECCHIONE, A.; DECARLI, E.; BIANCHEDI, P.; MOSCON, R. Effects of GLRaV-1 elimination on physiological, agronomic and oenological characteristics of two cv. Marzemino clones. **Extended abstracts 16th Meeting of International Council of Viruses and Virus Diseases of Grapevine**, Dijon, France, p. 256-257, 2009a.

MALOSSINI, U.; ZULINI, L.; VECCHIONE, A.; DECARLI, E.; BIANCHEDI, P.; MOSCON, R.; NICOLINI, G. Effects of GVA elimination on physiological, agronomic and oenological characteristics of a *V. Vinifera* Marzemino clone. **Extended abstracts 16th Meeting of International Council of Viruses and Virus Diseases of Grapevine**, Dijon, France, p. 254-255, 2009b.

MANNINI, F.; ARGAMANTE, I. N.; CUOZZO, D.; CREDI, C. Modification in field behaviour and grape quality, with focus on terpenes, after GLRaV-3 eradication in a clone of white Muscat (*Vitis vinifera* L.). **Extended abstracts 15th Meeting of International Council of Viruses and Virus Diseases of Grapevine**, Stellenbosch, South Africa, p. 136-138, 2006a.

MANNINI, F.; ARGAMANTE, N.; CREDI, R. Improvements in the quality of grapevine Nebbiolo clones obtained sanitation. **Acta Horticulture**, v. 427, p. 319-324, 1996.

MANNINI, F.; GERBI, V.; CREDI, R. Heat-treated virus-infected grapevine clones: Agronomical and enological modifications. **Acta Horticulturae**, v. 473, p. 155-163, 1998.

MANNINI, F.; GOBETTO, M.; LOVISOLO, C.; RICCI, F. Physiological and agronomic modifications induced by phloem-limited virus eradication in a clone of Albarola (*Vitis vinifera* L.). **Extended abstracts 15th Meeting of International Council of Viruses and Virus Diseases of Grapevine**, Stellenbosch, South Africa, p. 228-230, 2006b.

MANNINI, F.; MOLLO, A.; CUOZZO, D.; CREDI, R. Field performances and wine quality modification in a clone of Dolcetto (*Vitis vinifera* L.) after GLRaV-3 elimination. **Extended abstracts 16th Meeting of International Council of Viruses and Virus Diseases of Grapevine**, Dijon, France, p. 234-236, 2009.

MARTELLI, G. P. Grapevine virology highlights 2006-09. **Extended abstracts 16th Meeting of International Council of Viruses and Virus Diseases of Grapevine**, Dijon, France, p. 15-23, 2009.

MARTELLI, G. P. Rugose wood complex. In: MARTELLI, G. P. (Ed.). Graft-transmissible disease of grapevines: Handbook for detection and diagnosis. Rome: **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, p. 45-53, 1993, 263p.

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, 2002.

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. **Options Méditerranéennes**, série B, n. 55, 2006, 194p.

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**. p. 985-989, 2000.

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

MENG, B.; CREDI, R.; PETROVIC, N.; TOMAZIC, I.; GONSALVES, D. Antiserum to recombinant virus coat protein detects *Rupestris stem pitting associated virus* in grapevine. **Plant Disease**, v. 87, n. 5, p. 515-522, 2003.

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, n. 2, 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, n. 1, p. 31-41, 2005b.

MENG, B.; LIN, C.; WANG, W.; GOSZCZYNSKI, D.; GONSALVES, D. Complete genome sequences of two new variants of *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* and comparative analyses. **Journal of General Virology**, v. 86, n. 5, p. 1555-1560, 2005a.

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, n. 8, p. 2059-2069, 1998.

MENG, B.; REBELO, A. R.; FISHER, H. Genetic diversity analyses of *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* reveal distinct population structures in scion versus rootstock varieties. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 6, p. 1725-1733, 2006.

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, n. 3, p. 115-118, 2000.

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.

MONIS, J. Propagation de la enfermedad del enrollamiento de la hoja en el viñedo: Estrategias para prueba, gestión y control de la enfermedad. **Revista Enología**, n. 3, Año V, p. 1-5, 2008.

MONIS, J.; CONSTABLE, F.; HABIL, N. Avances en el estudio de enfermedades de la vid provocadas por virus. **Revista Enología**, Año VII, p. 1-8, 2010.

MOREIRA, A. E.; GASPAR, J. O.; CAMARGO, L. E. A.; KUNIYUKI, H. Caracterização do gene da proteína capsidial de dois isolados, patologicamente distintos e sorologicamente semelhantes, do *Grapevine virus B* em videiras no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 75-80, 2004.

MOREIRA, A. E.; GASPAR, J. O.; KUNIYUKI, H. Detecção do *Grapevine virus A* e *Grapevine virus B* por hibridização "dot-blot" com sondas moleculares não radioativas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 538-542, 2005.

MOTA, C. S.; AMARANTE, C. V. T.; SANTOS, H. P.; ALBUQUERQUE, J. A. Disponibilidade hídrica, radiação solar e fotossíntese em videiras 'Cabernet Sauvignon' sob cultivo protegido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 432-439, 2009.

NAIDU, R. A.; KRISHNAN, M.; NAYUDU, M. Y.; GNANAMA, A. Studies on *Peanut green mosaic virus* infected peanut (*Arachis hypogaea* L.) leaves. II. Chlorophyll-protein complexes and polypeptide composition of thylakoid membranes. **Physiology Plant Pathology**, v. 25, n. 2, p. 191-198, 1984.

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, n. 2, p. 156-163, 2008.

NICKEL, O.; TARGON, M. L. N. P.; FAJARDO, T. V. M.; MACHADO, M. A.; TRIVILIN, A. P. Polyclonal antibodies to the coat protein of *Apple stem grooving virus* expressed in *Escherichia coli*: production and use in immunodiagnosis. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 596-600, 2004.

NOLASCO, G.; MANSINHO, A.; TEIXEIRA SANTOS, M.; SOARES, C.; SEQUEIRA, Z.; CORREIA, P. K.; SEQUEIRA, O. A. Large scale evaluation of primers for diagnosis of *Rupestris stem pitting-associated virus 1*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 106, n. 4, p. 311-318, 2000.

NOLASCO, G.; SANTOS, C.; PETROVIC, N.; SANTOS, M. T.; CORTEZ, I.; FONSECA, F.; BOBEN, J.; NAZARÉ, PEREIRA, A. M.; SEQUEIRA, O. *Rupestris stem pitting-associated virus* isolates are composed by mixtures of genomic variants which share a highly conserved coat protein. **Archives of Virology**, v. 151, n. 1, p. 83-96, 2006.

NOUEIRY, A. O.; LUCAS, W. J.; GILBERTSON, R. L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. **Cell**, v. 76, n. 5, p. 925-932, 1994.

PALLIOTTI, A.; CARTECHINI, A.; FERRANTI, F. Morpho-anatomical and physiological characteristics of primary and lateral shoot leaves of 'Cabernet Franc' and 'Trebiano Toscano' grapevines under two irradiance regimes. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 51, n. 2, p. 122-130, 2000.

PEREIRA, A. C. B. **Proteína capsidial do *Rupestris stem pitting-associated virus*: sequenciamento do gene, expressão em *Escherichia coli*, purificação e produção de anti-soro policlonal**. 66f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, São Paulo, 2008.

PÉREZ-BUENO, M. L.; CISCATO, M.; VANDEVEN, M.; GARCÍA-LUQUE, I.; VALCKE, R.; BÁRON, M. Imaging viral infection: studies on *Nicotiana benthamiana* plants infected with the *Pepper mild mottle tobamovirus*. **Photosynthetica Research**, v. 90, n. 2, p. 111-123, 2006.

PETROVIC, N.; MENG, B.; RAVNIKAR, M.; MAVRIC, I.; GONSALVES, D. First detection of *Rupestris stem pitting associated virus* particles by antibody to a recombinant coat protein. **Plant Disease**, v. 87, n. 5, p. 510-514, 2003.

POMPE-NOVAK, M.; GRUDEN, M.; BAEBLER, S.; KRECIC-STRES, H.; KOVAC, M.; JONGSMA, M.; RAVNIKAR, M. *Potato virus Y* induced changes in the gene expression of potato (*Solanum tuberosum* L.) **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 67, n. 3, p. 237-247, 2006.

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, n. 1-2, p. 151-159, 2007.

RADAELLI, P. **Variabilidade genética e desenvolvimento de ferramentas sorológicas e moleculares para identificação de vírus em videira**. 109f. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 2009.

RADAELLI, P.; FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O.; EIRAS, M.; PIO-RIBEIRO, G. Variabilidade do gene da proteína capsidial de três espécies virais que infectam videiras no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 5, p. 297-305, 2009.

RADAELLI, P.; FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O.; EIRAS, M.; PIO-RIBEIRO, G. Production of polyclonal antisera using recombinant coat proteins of *Grapevine leafroll-associated virus 2* and *Grapevine virus B*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 10, p. 1405-1411, 2008.

REGINA, M. A.; CARBONNEAU, A. Trocas gasosas em *Vitis vinifera* sob regime de estresse hídrico. II. Fotorrespiração e Comportamento Varietal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 1, p. 37-44, 1999.

REINERO, A.; BEACHY, R. N. Reduced photosystem II activity and accumulation of viral coat protein in chloroplasts of leaves infected with *Tobacco mosaic virus*. **Plant Physiology**, v. 89, p. 111-116, 1989.

REYNOLDS, A. G.; LANTERMAN, W. S.; WARDLE, D. A. Yield and berry composition of five *Vitis* cultivars as affected by *Rupestris stem pitting virus*. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 48, n. 4, p. 449-458, 1997.

RIZZON, L. A.; MIELE, A.; MENEGUZZO, J. Avaliação da uva cv. Isabel para a elaboração de vinho tinto. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 115-121, 2000.

ROBERTO, S. R.; PEREIRA, F. M.; BOLIANI, A. C.; DA SILVA, A. C. C. Origem, botânica e biologia da videira. In: CORRÊA, L. S.; BOLIANI, A. C.; FRACARO, A. A. (Eds.) *Uvas rústicas: Cultivo e processamento em regiões tropicais*. Jales, [s.n], **Editora Gráfica Universitária**, p. 30-50, 2008.

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.

- ROWHANI, A.; ZHANG, Y. P.; GOLINO, D. A.; UYEMOTO, J. K. Isolation and characterization of a new *Closterovirus* from grapevine. **Phytopathology**, v. 92, (supplement to n° 6), S71, 2002.
- SABANADZOVIC, S.; ABOU GHANEM-SABANADZOVIC, N.; GORBALENYA, A. E. Permutation of the active site of putative RNA-dependent RNA polymerase in a newly identified species of plant alpha-like virus. **Virology**, v. 394, n. 1, p. 1-7, 2009.
- SALAMI, S. A.; ABADI, A.; ZAMANI, Z.; HABIBI, M. K. Distribution of GFLV in Iranian vineyards and improvements to sanitation protocols for production of virus-free grapevines. **Acta Horticulture**, v. 829, p. 389-393, 2010.
- SALDARELLI, P.; MINAFRA, A.; MARTELLI, G. P. The nucleotide sequence and genomic organization of *Grapevine virus B*. **Journal of General Virology**, v. 77, n. 10, p. 2645-2652, 1996.
- SALDARELLI, P.; ROWHANI, A.; ROUTH, G.; MINAFRA, A.; DIGIARO, M. Use of degenerate primers in a RT-PCR assay for the identification and analysis of some filamentous viruses, with special reference to clostero- and vitiviruses of the grapevine. **European Journal of Plant Pathology**, v. 104, n. 9, p. 945-950, 1998.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Third edition. New York. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001.
- SAMPOL, T.; BOTA, J.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. Analysis of the virus-induced inhibition of photosynthesis in malmsey grapevines. **New Phytologist**, v. 160, p. 403-412, 2003.
- SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S.; FAJARDO, T. V. M. Níveis de carboidratos em folhas de videiras infectadas por *Grapevine virus A*, *Grapevine virus B* e *Grapevine leafroll-associated virus 3*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 93, 2005.
- STEWART, S.; NASSUTH, A. RT-PCR based detection of *Rupestris stem pitting associated virus* within field-grown grapevines throughout the year. **Plant Disease**, v. 85, n. 6, p. 617-620, 2001.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 4^{ed}. Porto Alegre: Artmed, 2009, 820p.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.
- TARGON, M. L. P. N.; NIKOLAEVA, O.; MANJUNATH, K. L.; LEE, R. F.; MULLER, G. W.; MACHADO, M. A. Coat protein gene of a Brazilian isolate of the *Citrus tristeza virus*: cloning, expression in *E. coli* and production of polyclonal antiserum. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 99-102, 1997.

TÉCSI, C. I.; MAULE, A. J.; SMITH, A. M.; LEEGOOD, R. C. Metabolic alterations in cotyledons of *Cucurbita pepo* infected by *Cucumber mosaic virus*. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, n. 11, p. 1541-1551, 1994.

TÉCSI, L. I.; SMITH, A. M.; MAULE, A. J.; LEEGOOD, R. C. A spatial analysis of physiology changes associated with infection of cotyledons of marrow plants with *Cucumber mosaic virus*. **Plant Physiology**, v. 111, n. 4, p. 975-985, 1996.

TEIXEIRA, A. H. C.; de SOUZA, R. A.; RIBEIRO, P. H. B. Aptidão agroclimática da cultura da videira no Estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiente**, v. 6, n. 1, p. 107-111, 2002.

TERLIZZI, F.; RATTI, C.; FILIPPINI, G.; PISI, A.; CREDI, R. Detection and molecular characterization of Italian *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* isolates. **Plant Pathology**, v. 59, p. 48-58, 2010.

TIAN, T.; KLAASSEN, V. A.; SOONG, J.; WISLER, G.; DUFFUS, J. E.; FALK, B. W. Generation of cDNAs specific to *Lettuce infectious yellows Closterovirus* and other whitefly-transmitted viruses by RT-PCR and degenerate oligonucleotide primers corresponding to the closterovirus gene encoding the heat shock protein 70 homology. **Phytopathology**, v. 86, n. 11, p. 1167-1173, 1996.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

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 of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine**, Adelaide, Australia, p. 17-18. 2000.

VALAT, L.; BURRUS, M.; FUCHS, M.; MAURO, M-C. Review of techniques to inoculate grapevines with *Grapevine fanleaf virus*: Lessons and perspectives. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 54, n. 4, p. 279-285, 2003.

VALVERDE, R. A.; NAMETH, S. T.; JORDAN, R. L. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. **Plant Disease**, v. 74, p. 255-258, 1990.

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

WOERNER, R. P. **Estudo sistemático dos Pseudococcideos (Hom., Pseudococcidae) no Rio Grande do Sul, Brasil.** 128f. 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, n. 11, p. 1231-1237, 1998.

ZIMMERMANN, D.; BASS, P.; LEGIN, R.; WALTER, B. Characterization and serological detection of four closterovirus-like particles associated with leafroll disease on grapevine. **Journal of Phytopathology**, v. 130, n. 3, p. 205-218, 1990.