ANDREIA ESTELA MOREIRA

Detecção e Caracterização Molecular do *Grapevine Virus A* e *Grapevine Virus B* em Videiras no Estado de São Paulo



1910001356

unesp
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
Programa de Pós-Graduação em Genética

ANDREIA ESTELA MOREIRA

Detecção e Caracterização Molecular do *Grapevine Virus A* e *Grapevine Virus B* em Videiras no Estado de São Paulo

Tese apresentada para obtenção do Título de Doutor em Genética.

Orientador: Prof. Dr. José Osmar Gaspar

São José do Rio Preto - SP

2004

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
Programa de Pós-Graduação em Genética

ANDREIA ESTELA MOREIRA

Detecção e Caracterização Molecular do *Grapevine Virus A* e *Grapevine Virus B* em Videiras no Estado de São Paulo

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto
T. 1356/05

Tese apresentada para obtenção do Título de Doutor em Genética.

Orientador: Prof. Dr. José Osmar Gaspar

São José do Rio Preto -SP

2004

†581.2
M838d

04/03/2005
Doação
R$ 24,00
Autor(a)
076/2005
70/05

50102010

Moreira, Andreia Estela .
Detecção e caracterização molecular do *Grapevine virus A* e *Grapevine virus B* em videiras no Estado de São Paulo / Andreia Estela Moreira – São José do Rio Preto: [s.n.], 2004
94 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: José Osmar Gaspar
Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Fitopatologia. 2. Vírus de plantas. 3. Vitivirus. 4. Grapevine virus. 5. Videiras – Vírus de plantas. 6. Proteína capsidial – Sequenciamento. I. Gaspar, José Osmar. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Faculdade de Letras. III. Título.

CDU – 581.2

Andreia Estela Moreira

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO *GRAPEVINE VIRUS A* E *GRAPEVINE VIRUS B* EM VIDEIRAS NO ESTADO DE SÃO PAULO

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

Presidente e Orientador. .....

2º Examinador.....

3º Examinador.....

4º Examinador.....

5º Examinador.....

São José do Rio Preto, 16 de dezembro de 2004.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fitovirologia, departamento de Zoologia e Botânica, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Ao meu querido Pedro, que com carinho e imensurável amor soube ser paciente e compreensivo, me incentivando em todos os momentos e encontrando em minha felicidade a sua própria felicidade.

A minha mãe Tereza, por compreender minhas ausências e apoiar meus sonhos. Sua força e amor foram a base para mais essa conquista.

A minha irmã Ângela, cuja perseverança e capacidade sempre me foram motivos de orgulho e inspiração.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu admirado orientador e mestre, Prof. Dr. José Osmar Gaspar, pela sua dedicação, disponibilidade, perseverança e profissionalismo. Por confiar no meu trabalho e investir tanto na minha formação. Impossível encontrar palavras para agradecer esses dez anos de convívio e aprendizado. Posso dizer apenas que foi uma grande honra ter sido sua orientada e, mais ainda, compartilhar da sua amizade.

Ao meu colaborador e grande amigo Hugo Kuniyuki, pela confiança, paciência, opoio e essencial auxílio na aprimoração desta Tese. Pela amizade que me dedicou desde nossa primeira conversa.

"Muitos são os professores, poucos são os mestres. Os professores ensinam por palavras em templos, com os mestres aprendemos por ação e exemplos".

Helena Pinheiro

AGRADECIMENTOS

Ao término desse trabalho, agradeço a todas as pessoas que me apoiaram, ajudaram e comemoraram a cada nova conquista. Em especial agradeço:

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, por ter me acolhido em todos esses anos. As alegrias vividas aqui sempre superaram as dificuldades.

Às professoras Drª Antonia dos Reis Figueira, Drª Addolorata Colarricio e Drª Paula Rahal Liberatore pela disponibilidade na composição da banca e pelos exemplos de profissionalismo que me servem de inspiração e estímulo. Agradeço as sugestões que contribuirão para a melhoria deste trabalho.

À Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, Profª. Drª. Maria Tercília Vilela de A. Oliveira, e a vice-coordenadora, Profª Drª Cláudia Bonini, pela disponibilidade e auxílio quanto aos problemas burocráticos.

A todos os professores, cujos ensinamentos e conduta muito contribuíram para a minha formação. Em especial agradeço aos Professores Doutores Carlos Ceron, Cláudia Carareto, Lilian Madi, Mary Itoyama, Neusa Ranga e Arif Cais.

Aos funcionários dos Departamentos de Zoologia-Botânica, Biologia, Química e Física, Biblioteca, Seção de Pós-Graduação e Ambulatório, em especial a Gislaine de Lourdes Carneiro, Josué R. dos Santos, Kikue Kamoi, Maria Helena Carabolante, Maria do Carmo Junqueira, Nanci Q. A. Pereira e Rosana M. G. Ferro, pela convivência agradável e auxílio na resolução dos problemas cotidianos.

Aos amigos do Laboratório de Fitovirologia, Aninha, Ana Cláudia, Lívia, Luciana, Priscila, Ricardo e Tadaiti. Obrigada pelas palavras de incentivo, por compartilharem os meus problemas ajudando a solucioná-los e por tornarem o ambiente de trabalho um local agradável. Gostaria de agradecer em especial a Priscila, pelas correções deste trabalho e por estar sempre disposta a me ajudar e elevar a minha auto-estima, auxiliando com os seus conselhos em tantos momentos de indecisão. É muito bom confiar nas pessoas com as quais trabalhamos e poder contar com elas nos momentos mais difíceis. Melhor ainda é poder chamá-las de amigos.

As minhas eternas amigas Fabiana, Michela e Tatiana, que mesmo a distância se fizeram presentes com palavras de incentivo, sempre compreendendo as minhas distrações e ausências.



Aos colegas das Faculdades Integradas de Jales pelo apoio, em especial a Alessandra, Carla e Flávia.

À Profª. Gema Prandi-Rosa, por abrir uma janela quando tantas portas se fecharam.

À Lucia Dalbello, amiga de todas as ocasiões, pelo apoio e confidências.

Ao meu irmão Aristides Júnior (in memorian), que me ensinou a olhar a vida com mais humor e alegria. Sua partida deixou saudades mas também a esperança de que a vida há de ressurgir, na infinita bênção do recomeço.

A minha irmã Adriana, que com simplicidade, bondade e muito zelo me acompanhou durante toda a minha infância. Devo a você muito do que hoje sou.

Ao meu querido sobrinho Guilherme, cuja luz do olhar e o sorriso sempre me fizeram esquecer dos maiores problemas.

Ao meu segundo pai Humberto, por cuidar muito bem de um dos maiores tesouros que possuo e encher a minha vida de alegria com suas brincadeiras.

A minha irmã Ângela, que me fez conhecer a importância de ter em um irmão um grande amigo e sentir a segurança de saber que alguém acredita e confia em você.

À Deus, por mais essa oportunidade de evolução.

"Lembremo-nos de que Deus pode tudo, mas reserva-nos algo para realizar por nós mesmos, de modo a sermos dignos de seu nome".

Emmanuel

"O que for a profundeza do teu ser, assim será seu desejo.
O que for o teu desejo, assim será tua vontade.
O que for a tua vontade, assim serão teus atos.
O que forem teus atos, assim será teu destino".

Deepack Chopra

RESUMO

MOREIRA, A.E. Detecção e caracterização molecular do *Grapevine virus A* e *Grapevine virus B* em videiras no Estado de São Paulo. São José do Rio Preto, 2004. 94p. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Neste trabalho, um isolado do *Grapevine virus A* (GVA) e dois isolados do *Grapevine virus B* (GVB), encontrados no Estado de São Paulo, foram estudados em relação a caracterização do gene da proteína capsidial e a detecção por hibridização com sondas moleculares. Os genes da proteína capsidial (CP) dos isolados comum (GVB-C-SP) e itália (GVB-I-SP) do GVB apresentaram 594 nucleotídeos e 197 aminoácidos deduzidos com massa molecular estimada em 21.600 Da. Na análise filogenética por parcimônia e nas porcentagens de identidade da seqüência da CP, o isolado GVB-C-SP apresentou maior proximidade com um isolado do GVB descrito na Itália, enquanto que o GVB-I-SP foi mais próximo ao isolado do GVB encontrado no Rio Grande do Sul. Os dois isolados paulistas do GVB foram diferenciados por digestão com a enzima de restrição *Eco*RI devido à presença de um sítio interno de restrição no GVB-C-SP ausente no isolado GVB-I-SP. O gene da CP do GVA-SP, após sequenciamento, mostrou 597 nucleotídeos codificando 198 aminoácidos com massa molecular estimada em 21.650 Da. A seqüência do GVA-SP apresentou maior identidade com isolados do GVA da Itália e África do Sul sendo agrupado com esse último isolado na análise filogenética por parcimônia. Sondas de cDNA marcadas com digoxigenina foram produzidas por RT-PCR e utilizadas para a detecção do GVA-SP e dos isolados do GVB em variedade de videiras e *Nicotiana occidentalis*. Foi verificado que os RNA extraídos de plantas consideradas infectadas, indexadas biologicamente, hibridizaram com as sondas não havendo reação com plantas sadias. A sonda também foi eficiente na detecção do GVB na hospedeira herbácea. A utilização de hibridização "dot-blot" com sondas de cDNA foi eficaz para a detecção dos vírus com especificidade e sensibilidade, ressaltando-se que, preferencialmente, folhas maduras e ramos dormentes devem ser utilizados nos testes diagnósticos para o GVB e apenas ramos dormentes nos testes para o GVA.

Palavras-chave: *Vitivirus,* videira, *Vitis* spp., fendilhamento cortical, acanaladura do lenho de Kober, complexo do lenho rugoso, sondas moleculares, proteína capsidial, sequenciamento, filogenia.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

ABSTRACT

MOREIRA, A.E. Detection and molecular characterization of *Grapevine virus A* and *Grapevine virus B* in grapevines in São Paulo State, Brazil. São José do Rio Preto, 2004. 94p. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

In this work an isolate of *Grapevine virus A* (GVA) and two isolates of *Grapevine virus B* (GVB) from São Paulo State were studied in relation to the characterization of the coat protein gene and detection by hybridization with molecular probes. The coat protein gene of isolates of GVB (GVB-C-SP and GVB-I-SP) showed 594 nucleotides and 197 deduced amino acids with a predicted Mr of 21,600 Da. In the phylogenetic analysis and identity percentage of coat protein gene the GVB-C-SP showed a greater identity with the Italian isolate, while the GVB-I-SP was similar to a Brazilian isolate described in the State of Rio Grande do Sul. The two isolates of GVB can be differentiated by digestion with the enzyme *Eco*RI, since this restriction site is present on the GVB-C-SP but absent on GVB-I-SP. In the sequence of coat protein gene of the GVA-SP 597 nucleotides were obtained coding 198 amino acids, with a predicted Mr of 21,650 Da. The GVA-SP sequence displayed greater identity with GVA isolates from Italy and Africa, being clustered with this last isolated in the phylogenetic analysis by parsimony. The digoxigenin-labeled cDNA probes were generated by RT-PCR and utilized for the detection of the GVA-SP and the isolates of GVB in grapevine varieties and *Nicotiana occidentalis*. The RNA extracted from infected plants tested by biological indexing reacted to the cDNA probes while there was no hybridization in healthy plants. The probe also was efficient in the detection of the GVB in herbaceous hosts. The use of hybridization with cDNA probes was proved to be efficient in detecting both GVA and GVB with high specificity and sensitivity. However, mature leaves and dormant cuttings should be preferably used in diagnostic tests of GVB and only dormant cuttings in tests of GVA.

Key words: *Vitivirus,* grapevine, *Vitis* spp., grapevine corky bark, Kober stem grooving, grapevine rugose wood, molecular probes, coat protein, sequencing, phylogeny.



LISTA DE VÍRUS CITADOS NO TEXTO

ABREVIAÇÃO	NOME DA ESPÉCIE	GÊNERO
ACLSV	*Apple chlorotic leaf spot virus*	*Trichovirus*
GFLV	*Grapevine fanleaf virus*	*Nepovirus*
GFkV	*Grapevine fleck virus*	*Maculavirus*
GLRaV	*Grapevine leafroll-associated virus*	*Ampelovirus*
GLRaV-2	*Grapevine leafroll-associated virus 2*	*Closterovirus*
GVA	*Grapevine virus A*	*Vitivirus*
GVB	*Grapevine virus B*	*Vitivirus*
GVC	*Grapevine virus C*	*Vitivirus*
GVD	*Grapevine virus D*	*Vitivirus*
GYPVd	*Grapevine yellow speckle viroid*	*Apscaviroid*
HLV	*Heracleum latent virus*	*Vitivirus*
RSPaV	*Rupestris stem pitting associated virus*	*Foveavirus*

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

SUMÁRIO

Capítulo 1- Introdução..... 13

I. Panorama da Viticultura Nacional..... 14

II. Viroses de Videira..... 16

II.1. Enrolamento da Folha da Videira..... 17

II.2. Mosaico das Nervuras da Videira..... 19

II.3. Folha em Leque ou Entrenós Curtos da Videira..... 20

II.4. Lenho Rugoso da Videira..... 21

III. Vitivirus Associados ao Complexo do Lenho Rugoso da Videira..... 24

IV. Diagnóstico de *Vitivirus*..... 31

V. Controle de *Vitivirus*..... 34

VI. Objetivos 37

Capítulo 2- Caracterização do Gene da Proteína Capsidial de Dois Isolados do Grapevine virus B no Estado de São Paulo..... 38

Capítulo 3- Caracterização do Gene da Proteína Capsidial do Grapevine virus A no Estado de São Paulo..... 46

Capítulo 4- Detecção do *Grapevine virus A* e *Grapevine virus B* por Hibridização "dot-blot" com Sondas Moleculares..... 52

Capítulo 5- Discussão..... 70

Capítulo 6- Conclusões..... 81

Referências Bibliográficas..... 83

INTRODUÇÃO

Capítulo Um

unesp

I. PANORAMA DA VITICULTURA NACIONAL

A videira é uma planta pertencente à família *Vitaceae*, cujas principais cultivares comerciais são do gênero *Vitis*, em especial das espécies *V. vinifera* e *V. labrusca* (Cronquist, 1981). A grande importância econômica dessa planta provém do fato de a uva constituir uma das frutas mais consumidas no mundo, tanto *in natura* como em suco, possuindo também um extenso mercado na indústria de vinhos e outros fermentos alcoólicos (Choudhury *et al.*, 2001). Seu cultivo existe há séculos e encontra-se distribuído por todos os continentes, concentrando-se nos países da Europa que detêm 50% da produção mundial de uvas de mesa (Gonçalves & Souza, 1998).

No Brasil, a viticultura é uma atividade comercial recente quando comparada com a dos tradicionais países produtores da Europa. Dados históricos revelam que a primeira introdução da videira no Brasil foi feita pelos colonizadores portugueses em 1532 na região da Capitania de São Vicente, hoje Estado de São Paulo. A partir desse ponto e através de introduções posteriores, a viticultura expandiu-se para outras regiões do sul e sudeste do país, notadamente nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. A viticultura tropical brasileira desenvolveu-se efetivamente somente a partir da década de 60, com o plantio de vinhedos comerciais de uva de mesa na região do Vale do Rio São Francisco, no nordeste semi-árido. Nos anos 70 surgiu o pólo vinícola do Norte do Estado do Paraná e na década de 80, o cultivo da videira estendeu-se às regiões do Noroeste do Estado de São Paulo e do Norte de Minas Gerais, sendo estas voltadas à produção de uvas finas para consumo *in natura* (Sousa, 1996).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Segundo o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), a área de vinhedos cultivada no Brasil no ano de 2002, foi de 65.381 hectares (ha), alcançando uma produção de 1.120.574 toneladas de uvas. O Estado do Rio Grande do Sul é o principal produtor, com 56,08% da área total cultivada no país e safra de 570.161 t de uvas destinadas principalmente à elaboração de vinhos, sucos e outros derivados. O segundo maior produtor é o Estado de São Paulo com safra de 231.775 t, principalmente de uvas de mesa (Mello, 2002).

O mercado brasileiro de uvas de mesa é, dentre os hortifrutícolas, o que mais cresce no país. O excesso de oferta em alguns meses do ano leva a uma significativa redução dos preços de mercado, proporcionando um aumento de consumo *per capita* e aquisição da fruta pela população de menor poder aquisitivo (Choudhury *et al.*, 2001).

Embora a produção brasileira esteja principalmente voltada para o mercado interno, observa-se um crescente aumento nas exportações de uvas de mesa e suco de uva. Com o mercado internacional consolidado, os produtores de uva do Brasil vêm procurando exportar produtos de alta qualidade, relacionada principalmente com a forma, coloração e tamanho dos frutos. A presença de patógenos infectando videiras pode interferir significativamente nessas e em outras qualidades, além de colocar em risco a segurança dos vinhedos com a morte da planta ou queda acentuada da produção (Mello, 2003). Vários tipos de patógenos podem ser encontrados infectando videiras. Entre esses podem ser citados os fungos, bactérias, nematóides e vírus (Lima, 2002).

unesp

II. VIROSES DA VIDEIRA

As doenças causadas por vírus representam um dos mais importantes problemas fitossanitários da viticultura mundial, ocorrendo em praticamente todas as regiões onde a videira é cultivada. Na última estimativa (Martelli, 2003), registrou-se a existência de 55 vírus de videira distribuídos em 20 gêneros. De modo geral, as doenças provocadas por esses vírus caracterizam-se por induzir lenta e gradual degenerescência da planta, causando constantes perdas na produção de uva, do ponto de vista quantitativo e qualitativo. Contudo, há casos em que as perdas são quase que totais, quando as variedades são bastante sensíveis à infecção por determinados vírus (Amorim & Kuniyuki, 1997).

No Brasil, o primeiro relato de virose em videiras foi em 1972 no Estado de São Paulo (Kuniyuki, 1972a). Atualmente, as principais doenças descritas em outros países já foram constatadas no Brasil. Em algumas variedades de copa e porta enxerto os vírus não induzem sintomas evidentes e, como conseqüência, as plantas são consideradas sadias e usadas como material de propagação (Amorim & Kuniyuki, 1997). A incidência e a propagação dessas viroses em um vinhedo variam segundo a relação entre patógeno, hospedeiro, vetor e meio ambiente (Lima, 2002).

Essas viroses são semelhantes às que ocorrem em outros países, indicando que os vírus causadores foram introduzidos no país pelas importações iniciais de material propagativo infectado de variedades de copa e de porta-enxerto (Amorim & Kuniyuki, 1997; Kuhn & Fajardo, 2004), realizadas principalmente entre as décadas de 50 e 60 (Sousa, 1996). Nessa época, os conhecimentos sobre as viroses

unesp

da videira eram escassos, e embora os vírus tenham sido identificados a partir da década de 50 nos países de viticultura mais avançada (Hewitt, 1954; Goheen *et al.*, 1959), somente a partir da década de 60 é que se iniciaram os estudos sobre etiologia, epidemiologia e controle das viroses (Belli, 1969).

No Brasil, as informações a esse respeito eram praticamente inexistentes, não havendo referência de constatação experimental de vírus em videira até 1972, ano em que foi demonstrada a ocorrência do enrolamento da folha da videira no Estado de São Paulo (Kuniyuki, 1972a). Por conseguinte, a propagação dos vírus pelas principais regiões produtoras resultou mais do desconhecimento sobre essas viroses do que da falta de cuidados durante as multiplicações iniciais (Kuniyuki & Costa, 1982).

As principais viroses da videira encontradas no Brasil são o enrolamento da folha ("Grapevine Leafroll", GLR) (Kuniyuki, 1978), mosaico das nervuras ("Grapevine Fleck Disease", GFkD) (Kuniyuki, 1989), folha em leque ou entrenós curtos ("Grapevine Fanleaf", GFL) (Kuniyuki *et al.*, 1994) e o complexo do lenho rugoso da videira ("Grapevine Rugose Wood", GRW) (Kuniyuki, 1972b; Kuniyuki & Costa, 1982; Kuhn, 1992; Kuniyuki *et al.*, 2001).

II.1. Enrolamento da Folha da Videira ("Grapevine Leafroll", GLR)

O enrolamento da folha da videira foi constatado no Brasil primeiramente em vinhedos do Estado de São Paulo. Sua incidência média é de 78,1% na maioria das variedades de copa e de 32,9% naquelas de porta-enxerto (Kuniyuki, 1978; Kuniyuki & Costa, 1987). O GLR, que possivelmente ocorre em todas as regiões

brasileiras onde a videira é cultivada, é uma importante virose devido à sua alta incidência e às perdas que causa na produção de uva. Em cultivares sensíveis, pode causar redução de 42% no número de cachos, 63% na produção de uva e de 2,7° Brix no teor de açúcar dos frutos (Kuhn, 1989). Os sintomas característicos dessa doença, mais evidentes em cultivares de *V. vinifera*, incluem enrolamento dos bordos foliares para baixo e coloração avermelhada ou amarelada das áreas internervais das folhas, com as nervuras principais e secundárias e áreas adjacentes do parênquima permanecendo verdes (Figura 1 A) (Martelli, 1986; Lima 2002).

O GLR é atribuído à pelo menos nove vírus, sorologicamente distintos, com partículas de 1400 a 2200 nm de comprimento, denominados vírus associados ao enrolamento da folha da videira (*Grapevine leafroll-associated viruses 1-9*, GLRaV-1 to GLRaV-9). Com exceção do GLRaV-2, mantido no gênero *Closterovirus*, os demais estão incluídos, como espécies ou possíveis espécies, no recém criado gênero *Ampelovirus*, da família *Closteroviridae* (Martelli *et al.*, 2002a; Gugerli, 2003). Os genomas de alguns desses vírus foram totalmente seqüenciados (Ling *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1998), permitindo a detecção do GLRaV por transcrição reversa e reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), de forma muito mais eficaz do que por testes sorológicos, cuja aplicação se restringe ao final do ciclo vegetativo (outono), quando a concentração do vírus na planta é maior (Amorim & Kuniyuki, 1997).

No Brasil, a identificação dessa doença ainda é feita por videiras indicadoras, mas alguns dos vírus são também detectados por testes sorológicos e moleculares (Kuniyuki & Costa, 1987; Kuhn *et al.*, 1997, Fajardo *et al.*, 2002).

unesp

II.2. Mosaico das Nervuras da Videira ("Grapevine Fleck Disease", GFkD)

O mosaico das nervuras da videira é uma doença de distribuição mundial, reconhecida no Brasil primeiramente em vinhedos de São Roque, SP (Kuniyuki, 1989). É também encontrado nos Estados do Rio Grande do Sul (Kuhn, 2002), Goiás, Minas Gerais, Santa Catarina, Paraná e no Vale do Rio São Francisco (Lima, 2002). Em São Paulo, o GFkD foi encontrado na maioria das variedades de copa e porta-enxerto economicamente importantes para o Estado, com incidência média de 58 e 18,1%, respectivamente (Kuniyuki & Costa, 1994).

Essa doença é causada por um vírus de partículas isométricas (~30 nm de diâmetro), denominado *Grapevine fleck virus* (GFkV), pertencente ao recém estabelecido gênero *Maculavirus*, família *Tymoviridae* (Martelli *et al.*, 2002b). Esse vírus possui RNA de fita simples e polaridade positiva, não é transmissível mecanicamente e é limitado ao floema da hospedeira.

O vírus causa infecção latente na maioria das variedades de videira de importância econômica no Brasil e em outros países. Nas variedades sensíveis induz sintomas de mosaico e clareamento das nervuras (Figura 1B), podendo alterar a intensidade de coloração dos frutos e reduzir o vigor da planta (Kuniyuki & Costa, 1994; Lima, 2002).

Em São Paulo, ocorrem quatro isolados do agente causador do mosaico das nervuras, que podem ser diferenciadas pela intensidade e pela presença ou ausência de sintomas em videiras indicadoras. Esses isolados possuem relacionamento sorológico com o GFkV, sugerindo que os mesmos pertencem ao complexo viral que causa o GFkD (Kuniyuki *et al.*, 2002). A detecção do vírus tem sido feita principalmente por testes de indexação biológica utilizando videiras

indicadoras, nos quais os sintomas podem demorar de 6 a 20 meses para aparecer, e por testes sorológicos e moleculares (Sabanadzovic *et al.*, 2000; Kuniyuki *et al.*, 2002).

II.3. Folha em Leque ou Entrenós Curtos da Videira ("Grapevine Fanleaf", GFL)

A folha em leque é uma das doenças mais antigas da videira (Amorim & Kuniyuki, 1997). No Brasil a doença foi detectada na década de 70 em vinhedos de Jundiaí, SP e denominada mosaico da videira 'Traviú' por ter sido relatada em plantas deste porta enxerto (Kuniyuki *et al.*, 1994) (Figura 1 C). No Rio Grande do Sul é conhecida como doença dos entrenós curtos da videira (Fajardo *et al.*, 2000) e apresenta baixa ocorrência no Estado. O nome da doença deriva de sintomas de malformação característicos nas folhas que ficam com aspecto de leque semi-aberto. As perdas na produção podem atingir 80% e os prejuízos em algumas variedades de uvas de mesa podem ser ainda mais significativos, quando ocorrem abortamento e má formação das bagas e, conseqüentemente, a depreciação do produto comercial (Martelli & Savino, 1994).

O vírus da folha em leque (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV) pertence ao gênero *Nepovirus,* família *Comoviridae*, e possui partículas isométricas com aproximadamente 30 nm de diâmetro, genoma bipartido com duas moléculas de RNA (RNA 1 e RNA 2) de fita simples e polaridade positiva, ambos necessários à infecção (Martelli & Savino, 1994). Segundo Martelli (2001), diferenças em sintomatologia permitem distinguir dois grupos de variantes biológicas do GFLV:

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

estirpes associadas com malformação das folhas e ramos ("fanleaf") e estirpes associadas com descolorações amarelas nas folhas ("yellow mosaic"). A doença conhecida por faixa das nervuras ("vein banding"), originalmente atribuída a uma estirpe específica do vírus, é hoje atribuída a uma reação sinergística entre o *Grapevine yellow speckle viroid* (GYPVd) e o GFLV (Martelli, 2001).

A identificação do GFLV é feita pelo uso de videiras indicadoras, métodos sorológicos e RT-PCR. Um isolado do vírus encontrado no Rio Grande do Sul foi parcialmente caracterizado mostrando-se similar aos vírus descritos no exterior (Fajardo *et al.*, 2000).

II.4. Lenho Rugoso da Videira ("Grapevine Rugose Wood", GRW)

Desde as primeiras descrições (Graniti & Ciccarone, 1961) o lenho rugoso da videira vem sendo considerado uma das mais preocupantes doenças infecciosas de videira. Atualmente o GRW é aceito como um complexo de doenças caracterizadas por induzir alterações no lenho de variedades sensíveis de videira (Figura 1D). É constituído por, pelo menos, quatro doenças distintas: fendilhamento cortical ("Grapevine Corky Bark"), cascudo ou lenho estriado ("Rupestris Stem Pitting"), acanaladura do lenho de Kober ("Kober Stem Grooving") e acanaladura do lenho de LN-33 ("LN-33 Stem Grooving") (Savino *et al.*, 1989; Minafra, 2000), sendo todas elas já constatadas no Brasil (Kuniyuki, 1972b; Kuhn, 1992; Kuniyuki *et al.*, 1997; Kuniyuki *et al.*, 2000; Kuhn *et al.*, 2002).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Os sintomas gerais das doenças do complexo do lenho rugoso da videira consistem em atraso na brotação de primavera, redução de vigor, baixa produção de uva, intumescência na região acima do ponto de enxertia com uma evidente diferença nos diâmetros do lenho da copa e do porta-enxerto. A casca torna-se espessa e corticosa, com textura esponjosa e caneluras ("pittings") e/ou acanaladuras ("groovings") no lenho, que correspondem a saliências na superfície cambial da casca. Essas alterações ocorrem em variedades de copa, porta-enxerto ou ambos e a intensidade dos sintomas parece depender dessa combinação. Não existem sintomas específicos nas folhas mas, em algumas variedades, elas tornam-se avermelhadas ou amareladas, com enrolamento dos bordos foliares. Variedades mais sensíveis apresentam declínio e morte após poucos anos de plantio e muitas apresentam infecção latente.

As doenças que compõem o complexo do lenho rugoso não podem ser facilmente distinguidas no campo, devido à ausência de sintomas específicos. Dessa forma, a identificação das doenças é feita usando três indicadoras diferenciais: 'Kober 5BB', 'LN-33' e *Vitis rupestris* (Amorim & Kuniyuki, 1997; Lima, 2002).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

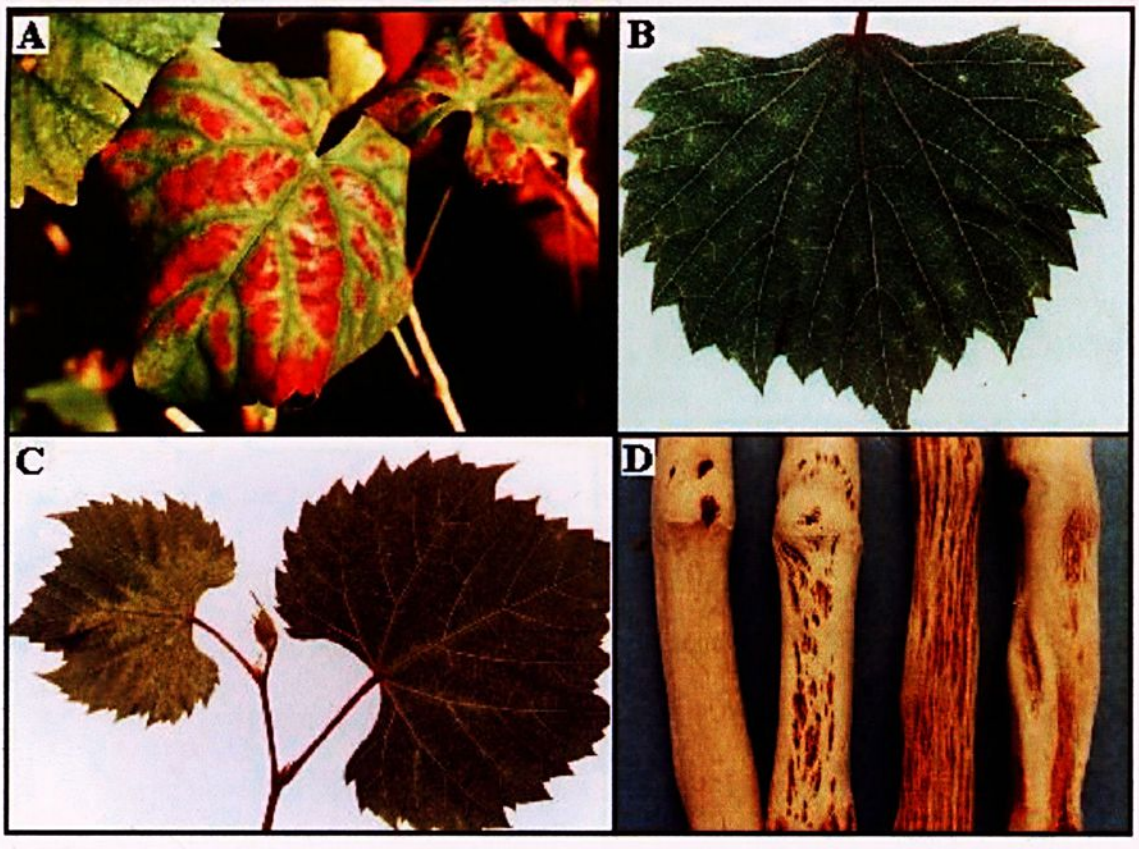


FIGURA 1. Sintomas característicos das principais viroses de videira que ocorrem no Brasil. **A.** Enrolamento da folha da videira em variedade LN-33. **B.** Mosaico das nervuras no porta-enxerto 'Rupestris du Lot'. **C.** Mosaico da videira Traviú ("grapevine fanleaf) no porta-enxerto de videira 'Riparia do Traviú'. **D.** Sintomas no lenho característicos das viroses do complexo do lenho rugoso da videira. Da esquerda para a direita: lenho sadio de 'Rupestris du Lot', lenho de 'Rupestris du Lot' com sintomas de lenho estriado de Rupestris, lenho de 'Kober 5BB' com sintomas de acanaladura do lenho de Kober, lenho de 'Rupestris du Lot' com sintomas de Fendilhamento cortical da videira (figuras fornecidas por Kuniyuki, H.).

III. *VITIVIRUS* ASSOCIADOS AO COMPLEXO DO LENHO RUGOSO DA VIDEIRA

Em 1997, Martelli *et al.* propuseram um novo gênero de vírus de plantas denominado *Vitivirus*, derivado do nome genérico da videira (*Vitis* spp), hospedeira natural da maioria das espécies que compõem o gênero. Recentemente, esse gênero foi incluído em uma nova família denominada *Flexiviridae*, que agrupa vírus com partículas filamentosas e flexuosas, com RNA de fita simples poliadenilados, como os componentes dos gêneros *Carlavirus*, *Potexvirus* e *Trichovirus*, entre outros (Adams *et al.*, 2004).

No gênero *Vitivirus* estão incluídas quatro espécies definitivas e uma experimental. São elas o vírus A da videira (*Grapevine virus A*, GVA, espécie tipo do gênero), vírus B da videira (*Grapevine virus B*, GVB), vírus C da videira (*Grapevine virus C*, GVC, espécie experimental no gênero), vírus D da videira (*Grapevine virus D*, GVD) e *Heracleum latent virus* (HLV) (Martelli *et al.*, 1997). Essas espécies eram, até recentemente, classificadas como *Trichovirus* (Martelli *et al.*, 1994), no entanto, diferenças biológicas e moleculares levaram a redefinição de suas posições taxonômicas e descrição do novo gênero.

GVA, GVB, GVC e GVD estão relacionados com a etiologia do complexo do lenho rugoso da videira, tendo como única hospedeira natural a videira e podendo ser transmitidos mecanicamente, com grande dificuldade, para espécies de *Nicotiana*. São perpetuados principalmente por multiplicação vegetativa e transmitidos por união de tecidos (Kuhn, 1992; Martelli *et al.*, 1997). GVA e GVB são também transmitidos, de maneira semipersistente, por cochonilhas de

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

diferentes espécies de pseudococcídeos dos gêneros *Pseudococcus* e *Planococcus* (Boscia *et al.*, 1997). A espécie *Neopulvinaria innumerabilis* (*Coccidae*) também é vetor para o GVA (Fortusini *et al.*, 1997).

Dentro do complexo do lenho rugoso, o vírus A da videira foi identificado como o agente causador da acanaladura do lenho de Kober (Kober Stem Grooving, KSG), que é identificada com base nos sintomas de acanaladuras ou sulcos longos no lenho de plantas afetadas da videira indicadora 'Kober 5BB' (figura 2A), não induzindo sintomas em *V. rupestris* e em 'LN-33' (Garau *et al.*, 1994; Choueiri *et al.*, 1997a).

No Brasil, a doença foi constatada, pela primeira vez em plantas de 'Niagara Rosada' em Jundiaí, SP (Kuniyuki & Costa, 1992) e, mais recentemente, a associação do GVA com essa doença foi reforçada pelo teste de ELISA (Kuniyuki *et al.*, 2001). Estima-se que o GVA apresenta incidência de 11% nos vinhedos do Estado de São Paulo (Kuniyuki *et al.*, 1997) e de 6,1 a 8,6% no Rio Grande do Sul (Fajardo *et al.*, 2003).

Na Itália, o KSG é responsável por perdas na produção de 5 a 22% em cultivares para vinho e declínio e morte de cultivares de uvas de mesa afetadas também pelo enrolamento da folha da videira (Martelli *et al.*, 2001). Em São Paulo, foi observado que plantas de Niagara Rosada infectadas são menos produtivas e menos vigorosas do que plantas sem o vírus (Kuniyuki & Costa, 1992).

O vírus B da videira é o agente etiológico da doença conhecida no Brasil como fendilhamento cortical ou intumescimento dos ramos da videira ("Grapevine Corky Bark", GCB) (Boscia *et al.*, 1993; Kuniyuki *et al.*, 2000).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Dentre as quatro doenças do complexo do lenho rugoso, o fendilhamento cortical da videira parece ser a mais comum. Esta virose, descrita pela primeira vez na Califórnia (Hewitt, 1954), também foi detectada na Itália (Goidanich & Canova, 1963), México (Teliz & Goheen, 1968), Iugoslávia (Beukman & Goheen, 1970), Brasil (Kuniyuki, 1975), Japão (Tanaka, 1976), França (Hevin *et al.,* 1978), Austrália (Habili & Symons, 2000) e Portugal (Santos, *et al.,* 2000). A principal característica da doença é a ocorrência de anormalidades no córtex que se torna excessivamente fendilhado e esponjoso (Figura 2B). Certas variedades de *V. vinifera* também podem apresentar avermelhamento nas folhas. As plantas mostram acentuada redução no vigor e podem morrer em poucos anos. Nas variedades Isabel, Niagara Rosada e Niagara Branca há uma queda progressiva na produtividade, sendo que a uva pode não completar a maturação (Hewitt, 1968; Kuniyuki & Costa, 1982; Kuhn, 1992; Amorim & Kuniyuki, 1997).

No Brasil, o GCB foi constatado pela primeira vez no Estado de São Paulo (Kuniyuki, 1975) e, posteriormente, no Rio Grande do Sul (Kuhn, 1992). Ocorre também em Santa Catarina e Submédio do Vale do Rio São Francisco (Lima, 2002). Atualmente, a incidência da virose em São Paulo é de 20% (Kuniyuki & Costa, 1982) e no Rio Grande do Sul, a porcentagem de incidência é superior a 60% em algumas plantações (Kuhn, 1992). Sua identificação é feita, principalmente, por videiras indicadoras e testes ELISA.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

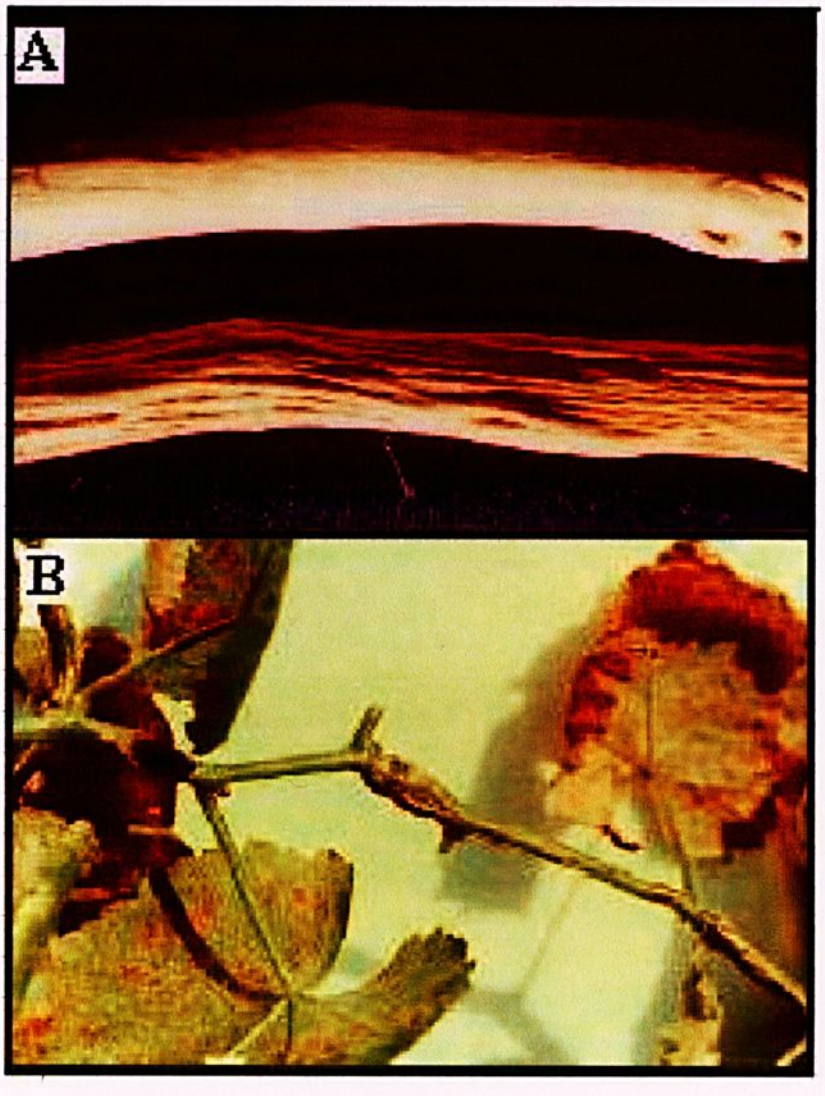


Figura 2. A. Acanaladura do lenho de Kober no porta-enxerto 'Kober 5BB' (sadio ao lado de um infectado). **B.** Fendilhamento cortical da videira na indicadora 'LN-33' (figuras fornecidas por Kuniyuki, H).

Nos vinhedos paulistas, dois isolados do GVB foram identificados. O isolado comum (GVB-C-SP) induz sintomas em 'LN-33' e em variedades americanas como 'Concord', 'Izabel' e 'Niagara'. Já o isolado Itália (GVB-I-SP), menos freqüente, causa reação mais forte em 'LN-33', mas é assintomático nessas variedades americanas. Foi determinado, mediante testes sorológicos, que esses dois isolados sintomatologicamente distintos são sorologicamente semelhantes (Kuniyuki *et al.*, 2000).

Os vírus C e D da videira foram isolados de videiras afetadas pelo fendilhamento cortical no Canadá (Monette & James, 1991) e Itália (Bonavia *et al.*, 1996), respectivamente. Entretanto, ainda há dúvidas se esses vírus estão relacionados à etiologia do GCB ou a alguma outra doença dentro do complexo do lenho rugoso (Boscia *et al.*, 1997; Abou-Ghanem *et al.*, 1997).

Um vírus específico ainda não foi associado à acanaladura do lenho de LN33, doença também relacionada ao complexo do lenho rugoso da videira (Martin *et al.*, 2000).

GVA, GVB, GVC e GVD estão restritos ao floema da videira. Nas células infectadas, os vírus induzem formação de evaginações vesiculares nos tonoplastos. Essas vesículas contêm material fibrilar possivelmente constituído por formas replicativas do RNA viral. No floema, as partículas virais acumulam-se no citoplasma em forma de agregados, porém, em hospedeiras herbáceas, partículas virais também são encontradas em células do parênquima (Boscia *et al.*, 1997; Faoro, 1997).

O comprimento das partículas virais varia entre 725 a 825 nm e o capsídio de todas as espécies é composto por um único tipo de polipeptídeo com massa

molecular de 20,5 a 23 kDa (Saldarelli, *et al.,* 1996; Abou-Ghanem *et al.*, 1997; Minafra *et al.*, 1998a). Os virions são pouco imunogênicos, sendo necessário a produção de anticorpos monoclonais para melhor eficiência nos diagnósticos (Boscia *et al.*, 1997). As espécies GVA, GVB e GVD têm uma relação sorológica distante, com poucos determinantes antigênicos internos denominados criptotopos (Goszczynski *et al.*, 1996; Choueiri *et al.,* 1997b).

Os genomas virais consistem em RNA de fita única e polaridade positiva com aproximadamente 7,6 Kb de tamanho e um "cap" na extremidade 5', sendo poliadenilado na extremidade 3'. As seqüências completas de nucleotídeos do GVA (acesso Genbank: X75433) e GVB (acesso: X75448) já foram obtidas e ambos possuem organização similar (Figura 3), apresentando cinco "open reading frames" (ORF) que se sobrepõem e codificam proteínas de 194 kDa (polipeptídeo com seqüências conservadas de proteínas relacionadas à replicação, que agrupam metiltransferase, helicase e RNA polimerase), 20 kDa (função desconhecida), 31-36 kDa (proteína do movimento, MP), 21-23 kDa (proteína capsidial, CP) e 10-14 kDa (proteína de ligação a nucleotídeos) (Saldarelli *et al.*, 1996; Minafra *et al.*, 1998a, Galliakparov *et al.*, 2003). O genoma do GVD foi parcialmente seqüenciado (acesso: Y15892) mostrando organização similar ao GVB e GVA, enquanto que a seqüência de nucleotídeos do GVC ainda não foi determinada.

unesp

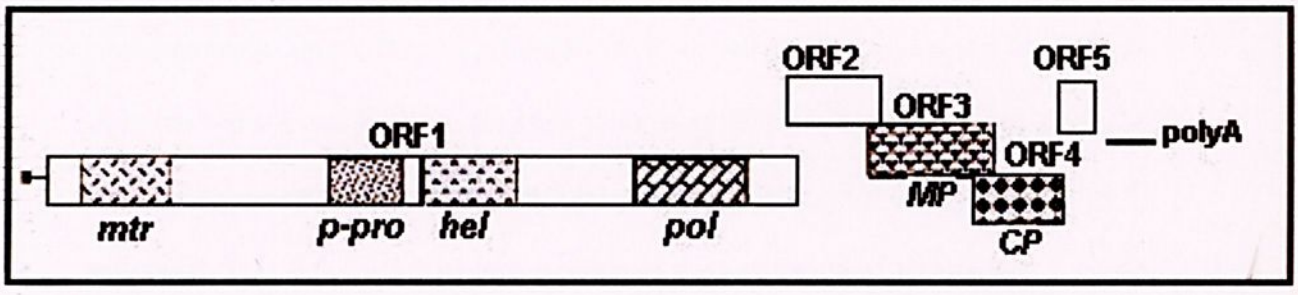


FIGURA 3. Organização genômica dos *Vitivirus*. *mtr,* metil transferase; *p-pro,* proteinase similar à papaína; *hel,* helicase; *pol,* RNA polimerase; *MP*, possível proteína do movimento; *CP,* proteína capsidial (esquema modificado de Martelli *et al.*, 1997).

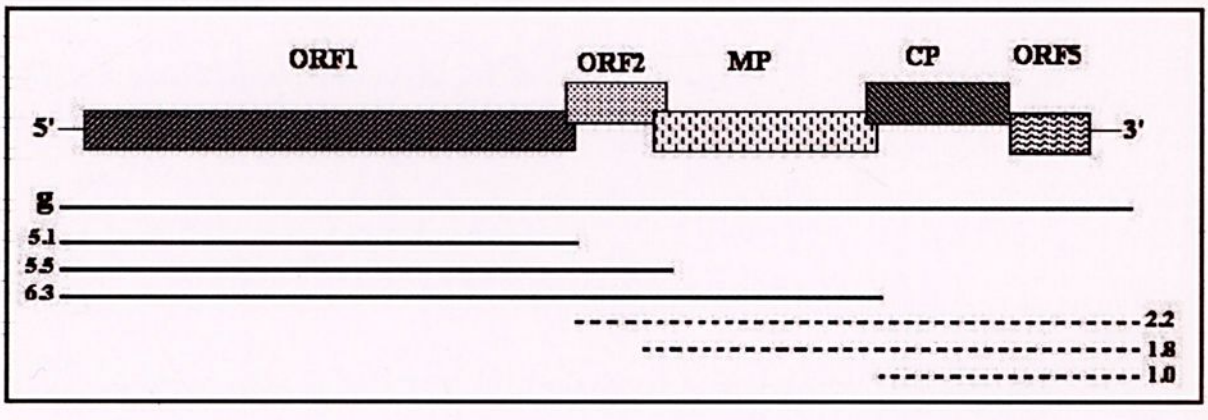


FIGURA 4. Diagrama esquemático da organização genômica dos sgRNA 5' terminais (linhas contínuas) e 3' terminais (linhas pontilhadas) do GVA. g, RNA genômico, MP, provável proteína do movimento, CP, proteína capsidial (esquema modificado de Galliakparov *et al.*, 2003).

Quanto às estratégias de expressão dos *Vitivirus*, provavelmente envolvem processamento proteolítico e produção de RNA subgenômicos (sgRNA). Estudos desenvolvidos com o GVA demonstraram a produção de duas classes de RNA subgenômicos em *Nicotiana* (Galliakparov *et al.*, 2003). Uma classe de sgRNA 5' terminais (6,3, 5,5 e 5,1 Kb) que contêm as seqüências das ORFs 1, 2 e 3 e uma de sgRNA 3' terminais (2,2, 1,8 e 1,0 Kb) que provavelmente têm a função de expressão das ORFs 2, 3 e 4 (Figura 4). Para todos os sgRNA foram detectadas tanto as cadeias de polaridade positiva como negativa. Provavelmente, a maioria desses sgRNA atua como um mRNA para a transcrição somente do gene 5'-proximal, mesmo quando contêm mais de uma ORF. No entanto, como nenhum sgRNA correspondente somente a ORF 5 foi detectado, sugere-se a expressão dessa ORF via um dos sgRNA 3' terminais que atua como um mRNA bi ou policistrônico (Galliakparov *et al.*, 2003).

IV. DIAGNÓSTICO DE *VITIVIRUS*

A observação de sintomas em vinhedos e posterior teste biológico pelo uso de enxertia em videiras indicadoras são métodos ainda amplamente usados para detecção das viroses do GRW, apesar do fato desses testes consumirem muito tempo (os sintomas podem levar de 6 a 48 meses para aparecer) e não serem totalmente confiáveis (Minafra, 2000).

Mais recentemente os métodos sorológicos, principalmente o ELISA ("Enzyme-Linked Immunorbent Assay") vêm sendo aplicados na detecção de vírus de videiras em geral e, embora permitam a obtenção de resultados em

poucos dias, nem sempre são reproduzíveis sob as mesmas condições, chegando a ser, em alguns casos, menos eficientes do que os testes de indexação biológica (Fazeli *et al.*, 1998; Routh *et al.,* 1998; Kuniyuki *et al.,* 2002). Os problemas na confiabilidade desses testes na detecção de *Vitivirus* são principalmente devidos à anti-soros de baixos títulos resultantes da pouca antigenicidade viral, ao fato dos *Vitivirus* estarem restritos ao floema com distribuição desigual na planta hospedeira e a variação do título viral nas diferentes estações (Boscia *et al.*, 1992; Minafra, 2000). Com o GVB, por exemplo, a melhor resposta em testes ELISA foi obtida com extratos de ramos maduros no outono. No entanto, quando as amostras de tecidos provêm de ramos coletados na primavera uma fraca reação é obtida e os resultados não podem ser considerados confiáveis (Bonavia *et al.,* 1996).

A produção e o uso de anticorpos monoclonais surgiu para tentar resolver o problema de baixa antigenicidade viral. Empresas como a Agritest (Itália) e a Bioreba (Suíça) têm produzido anticorpos comerciais para a detecção de alguns dos vírus mais comuns dos gêneros *Ampelovirus, Maculavirus* e *Vitivirus*. No entanto, a distribuição irregular e a baixa concentração viral na hospedeira ainda continuaram a dificultar a detecção (Boscia *et al.*, 1992; Bonavia *et al.,* 1996). Além disso, a alta especificidade e baixa sensibilidade de anticorpos monoclonais pode ser desvantajosa, pois plantas infectadas por vírus que diferem apenas em poucos aminoácidos na proteína capsidial podem ser consideradas sadias (Van Regenmortel, 1982; Pappu *et al.*, 1995).

Anticorpos policlonais para os vírus relacionados ao GRW também foram produzidos pela imunização de coelhos com proteínas recombinantes obtidas da

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

clonagem de genes estruturais (CP) e não estruturais (MP) em vetores de expressão bacterianos. No entanto, estes anticorpos são utilizados principalmente para detecção intracelular e tecidual do vírus em videiras, auxiliando na elucidação da interação com a hospedeira (Rubinson *et al.,* 1997; Saldarelli *et al.*, 1997).

Os métodos moleculares vêm se tornando de escolha para o diagnóstico das doenças do GRW, devido à maior especificidade e sensibilidade em relação aos métodos sorológicos. Alguns pesquisadores já vêm utilizando a técnica de PCR com sucesso para a detecção de *Vitivirus* em tecidos de herbáceas ou videiras infectadas (Minafra *et al.*, 1992a; Minafra & Hadidi, 1994; Chevalier *et al.*, 1995). A utilização de sondas de ácidos nucleicos para a detecção de *Vitivirus* é outra alternativa de diagnóstico molecular utilizada com sucesso. Sondas marcadas radioativamente (Minafra *et al.*, 1992b) ou com digoxigenina (Saldarelli *et al.*, 1994) mostraram-se eficientes e apresentaram boa sensibilidade na detecção.

Uma limitação das técnicas moleculares está no fato de que, tanto PCR como hibridização com sondas, possam ter interferência de substâncias inibidoras presentes na videira, principalmente polifenóis e polissacarídios, o que requer passos adicionais de purificação (Minafra & Hadidi, 1994; Zhang *et al.*, 1998). Métodos modificados de extração, como o método desenvolvido por Mackenzie *et al.* (1997) com a utilização de colunas de afinidade, oferecem uma solução com a eliminação dos inibidores, além de encurtar os longos procedimentos de extração para aproximadamente 60 a 90 minutos. Variações nas técnicas de PCR, como a imunocaptura acoplada a PCR (IC-RT-PCR), que consiste na captura das partículas virais com anticorpos específicos seguida de síntese de cDNA e

amplificação, constituem outra alternativa, dispensando as metodologias de extração e também eliminando as substâncias inibidoras (Chevalier *et al.*, 1995). Com esses e outros avanços, as técnicas moleculares devem, no futuro, constituir procedimentos rotineiros para a detecção dos *Vitivirus* e outros vírus limitados ao floema (Martelli, 2000).

V. CONTROLE DE *VITIVIRUS*

Sendo a videira planta de propagação vegetativa, o controle das viroses que as afeta já pressupõe a obtenção e utilização de material propagativo sadio de variedades de copa e de porta-enxerto. A estratégia de controle fundamenta-se em reduzir as fontes de inóculo pelo suprimento constante de material propagativo livre de vírus para plantio (Amorim & Kuniyuki, 1997).

A obtenção de material sadio consiste basicamente na seleção de plantas naturalmente livres de vírus através de testes de indexação e na adoção de tratamentos curativos como a termoterapia e cultura de meristema para variedades 100% infectadas (Goheen, 1977). No Brasil, a introdução de material propagativo sadio é uma alternativa de grande importância, por proporcionar considerável ganho de tempo, desde que feito de instituições especializadas (Amorim & Kuniyuki, 1997).

Em videira, o método mais utilizado de termoterapia é o baseado no condicionamento de plantas em câmara de crescimento a temperatura de 36-39 °C durante 60 a 90 dias, para posterior propagação dos ápices caulinares emitidos durante o período de tratamento (Martelli, 1986; Amorim & Kuniyuki, 1997). A cultura de meristema é outro método bastante empregado, possibilitando a

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

supressão de vírus resistentes a altas temperaturas, como é o caso do GVA e GVB (Auger & Arancibia, 1990). A associação de ambas as técnicas apresentam uma eficácia muito maior na obtenção de clones sadios de videira. Fragmentos de tecidos, principalmente do meristema apical, são cultivados *in vitro* após a termoterapia, obtendo-se uma alta porcentagem de sanidade (Barlass, 1987; Engelbrecht & Human, 1989).

O controle das doenças do complexo do lenho rugoso da videira tem, nos últimos anos, se voltado para a utilização da engenharia genética. Na ausência de genes naturais de resistência, videiras e *Nicotiana* spp. resistentes a vírus estão sendo obtidas por transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* com genes da capa proteica do GVA ou GVB (Minafra *et al.*, 1998b; Radian-Sade *et al.*, 2000).

Quando introduzidos no genoma de plantas, genes virais podem induzir resistência a um vírus em particular (Baulcombe, 1996; Lindbo *et al.*, 1993). O mecanismo de resistência não está totalmente claro. Entretanto, em alguns casos, o transgene não é expresso como uma proteína devido à degradação do RNA, uma situação referida como proteção mediada pelo RNA (Baulcombe, 1996). Um mecanismo similar foi verificado em espécies de *Nicotiana* transformadas com o gene da CP do GVA e GVB (Minafra *et al.*, 1998b; Radian-Sade *et al.*, 2000). Várias linhagens de videiras transgênicas também foram obtidas, no entanto essas plantas ainda estão sendo propagadas e testadas quanto à resistência ao GVA (Radian-Sade *et al.*, 2000).

No Brasil, os vírus causadores das doenças associadas ao GRW, embora assumam importância em algumas variedades de copa e de porta-enxerto de valor

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

econômico, não ocorrem com incidência de 100% na maioria delas (Kuniyuki & Costa, 1987; Kuhn. 1992; Kuniyuki & Costa, 1982; Kuniyuki *et al.*, 1997). Esses vírus são experimentalmente transmitidos por espécies de cochonilhas brancas da família Pseudococcidae (Martelli *et al.*, 1997), mas evidências de disseminação natural dos vitivírus nos vinhedos paulistas ainda não foram encontradas. Além disso, esses vírus não são transmitidos pela semente (Kuniyuki *et al.*, 1992). Assim sendo, pode-se concluir que a ocorrência das viroses resulta da perpetuação dos vírus pela propagação vegetativa de plantas inicialmente infectadas. Conseqüentemente, o controle das viroses pode ser feito de modo eficiente pela seleção e emprego de material propagativo sadio de variedades de copa e de porta-enxerto (Amorim & Kuniyuki, 1997).

A utilização de técnicas moleculares para, juntamente com os testes de indexação biológica, auxiliar na detecção dos vírus associados ao GRW é um avanço imprescindível para o programa de controle das viroses da videira no Brasil. Além disso, o fato de os isolados virais do GVA e GVB que ocorrem em vinhedos do Estado de São Paulo ainda não terem sido investigados em relação às suas características moleculares torna interessante um estudo nesse aspecto para que, no futuro, essas informações possam ser utilizadas para o diagnóstico e controle mais eficientes desses vírus.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

VI. OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho foi utilizar técnicas moleculares para a detecção, caracterização e diferenciação dos isolados do vírus A e do vírus B da videira encontrados em vinhedos do Estado de São Paulo. Dessa forma, foram objetivos específicos:

1 - Caracterizar o gene da proteína capsidial de dois isolados do *Grapevine virus B*;

2 - Caracterizar o gene da proteína capsidial de um isolado do *Grapevine virus A*;

3 - Detectar por hibridização com sonda molecular os isolados do *Grapevine virus A* e Grapevine *virus B*.

CARACTERIZAÇÃO DO GENE DA PROTEÍNA CAPSIDIAL DE DOIS ISOLADOS DO *Grapevine virus B* NO ESTADO DE SÃO PAULO

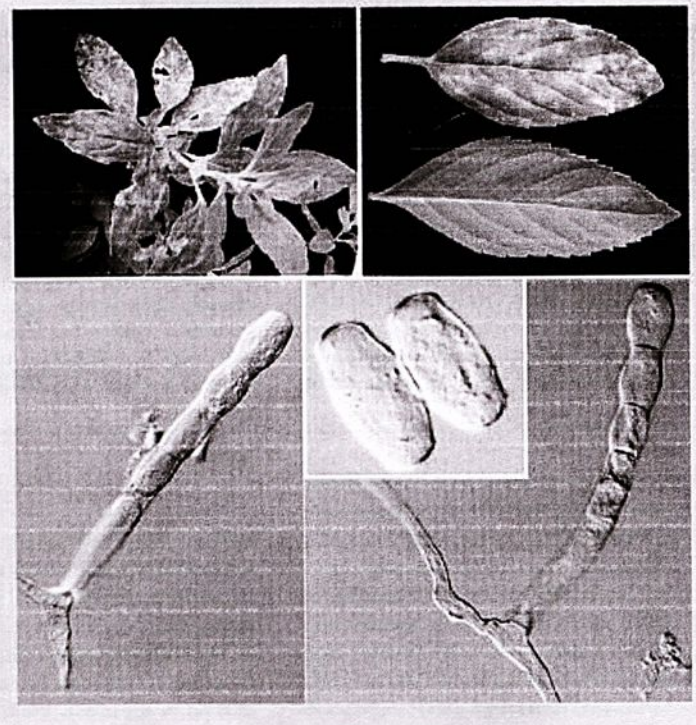
Capítulo Dois

FITOPATOLOGIA BRASILEIRA

BRAZILIAN PHYTOPATHOLOGY

Revista Oficial da Sociedade Brasileira de Fitopatologia

VOL. 29 Nº 1 JAN - FEV DE 2004 - ISSN 0100-4158



unesp

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*

Andreia E. Moreira[1], José O. Gaspar[1], Luís Eduardo A. Camargo[2] & Hugo Kuniyuki[3]****

[1]Departamento de Zoologia e Botânica, IBILCE-UNESP, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, SP, e-mail: gaspar@dzb.ibilce.unesp.br; [2] Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ-USP, Cx. Postal 9, CEP 13418-900, Piracicaba, SP; [3]IAC-Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade, CEP 13020-902, Campinas, SP

(Aceito para publicação em 10/10/2003)

Autor para correspondência: José Osmar Gaspar

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 29:075-080. 2004.

RESUMO

No presente trabalho, descreve-se a caracterização do gene codificador da proteína capsidial de dois isolados sintomatologicamente distintos do *Grapevine virus B* (GVB). Para isto, RNA totais foram extraídos de folhas e pecíolos de videiras (*Vitis* spp.) infetadas, cultivares Rubi (GVB-C^{SP}) e Itália (GVB-I^{SP}) e utilizados para amplificar, por RT/PCR, um fragmento entre as posições 6425 e 7118 (694 nucleotídeos, nt) do RNA do GVB ("GenBank", acesso X75448). O fragmento obtido inclui o gene da proteína capsidial (594 nt) codificando 197 aminoácidos com massa molecular estimada em aproximadamente 21.600 Da. A seqüência do GVB-C^{SP} apresentou maior similaridade de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos com o isolado italiano (acesso X75448), enquanto que o GVB-I^{SP} foi mais similar a um outro isolado brasileiro do GVB descrito no Rio Grande do Sul (GVB^{BR1}, acesso AF438410). Os dois isolados paulistas do GVB podem ser diferenciados por digestão com a enzima de restrição *Eco*RI, uma vez que há um sítio interno no GVB-C^{SP} que está ausente no isolado GVB-I^{SP}.

Palavras-chave adicionais: *Vitivirus*, *Vitis* spp., fendilhamento cortical, "grapevine corky bark", "grapevine rugose wood", complexo do lenho rugoso.

ABSTRACT

Characterization of the coat protein gene of two isolates, pathologically distinct and serologically similar, of *Grapevine virus B* in corky bark-affected grapevines in São Paulo State, Brazil

The present work describes the characterization of the coat protein gene of two isolates of *Grapevine virus B* (GVB), which can be differentiated by their biological behavior on some grape cultivars. The total RNA was extracted from leaves and petioles of infected grapevines (*Vitis* spp.) of the cultivars Rubi (GVB-C^{SP}) and Italy (GVB-I^{SP}) and used to amplify, by RT/PCR, a fragment between positions 6425 and 7118 (694 nucleotides, nt) of the genomic RNA (GenBank, access X75448). The fragment comprises the coat protein gene (594 nt) coding for 197 amino acids with a predicted Mr of 21,600 Da. The sequence of GVB-C^{SP} showed a greater similarity of nucleotides and deduced amino acids with the Italian isolate (access X74448), while the GVB-I^{SP} was similar to a Brazilian isolate described in the State of Rio Grande do Sul , Brazil (GVB^{BR1}, access AF438410). The isolates GVB-C^{SP} and GVB-I^{SP} can be differentiated by digestion with the enzyme *Eco*RI, since this restriction site is present on the GVB-C^{SP} but absent on GVB-I^{SP}.

INTRODUÇÃO

As principais viroses de videira (*Vitis* spp.) descritas em outros países já foram constatadas no Brasil, constituindo um dos mais importantes problemas fitossanitários da viticultura nacional por resultarem em um decréscimo na produção de uva ou mesmo perdas totais, dependendo da variedade envolvida e da doença em questão (Amorim & Kuniyuki, 1997). Dentre essas viroses, destacam-se aquelas constituintes do complexo do lenho rugoso, caracterizadas por alterações no cilindro do lenho das cultivares sensíveis de *Vitis* spp. (Savino *et al.*, 1989; Minafra, 2000).

Das quatro doenças do complexo do lenho rugoso, o fendilhamento cortical ("grapevine corky bark") parece ser a mais comum (Kuniyuki & Costa, 1982). Esta virose, descrita pela primeira vez na Califórnia (Hewitt, 1954), também foi detectada na Itália (Goidanich & Canova, 1963), México (Teliz & Goheen, 1968), Iugoslávia (Beukman & Goheen, 1970), Brasil (Kuniyuki, 1975), Japão (Tanaka, 1976), França (Hevin *et al.* 1978), Austrália (Habili & Symons, 2000) e Portugal (Santos *et al.*, 2000). As principais características da doença são anormalidades no córtex que se torna excessivamente fendilhado e

Apoio financeiro: FAPESP, CAPES
*Seqüências depositadas no GenBank com os números de acesso AY340582 e AY340583
**Bolsista do CNPq

esponjoso e certas cultivares tintas de *Vitis vinifera* L. também apresentam avermelhamento nas folhas. A severidade da doença varia bastante, pois algumas cultivares reagem fortemente a infecção e outras não apresentam sintomas definidos ou simplesmente não os exibem (Goheen, 1988). Segundo Tanne *et al.* (1990), a perda na produção de uva é proporcional à severidade dos sintomas e, dependendo do porta-enxerto, pode haver redução de até 93.3% em relação às sadias. Embora determinações experimentais não tivessem sido feitas no Brasil, as cultivares mais sensíveis de *V. labrusca*, como Niagara Branca e Niagara Rosada apresentam acentuada redução na produção de uva e quase nada produzem, se muito afetadas (Kuniyuki & Costa, 1982). O GVB ocorre simultaneamente com outros vírus da videira, mas a formação de complexos induzindo alterações sintomatológicas ou sinergismo ainda não é conhecida. O fendilhamento cortical é causado por um vírus de, aproximadamente, 800 nm de comprimento, denominado vírus B da videira (*Grapevine virus B*, GVB), gênero *Vitivirus* (Boscia *et al.*, 1993; Bonavia *et al.*, 1996; Martelli *et al.*, 1997).

O GVB é um vírus restrito ao floema de sua única hospedeira natural, a videira, sendo perpetuado por multiplicação vegetativa, estaquia, união de tecidos (Kuhn, 1992; Martelli, 2000), e também disseminado por cochonilhas brancas (*Pseudococcus* spp. e *Planococcus* spp.) (Boscia *et al.*, 1997). Pode ainda ser transmitido mecanicamente, com grande dificuldade, para espécies do gênero *Nicotiana*. O genoma do GVB consiste de um RNA de fita única com 7599 nucleotídeos e polaridade positiva com cinco "open reading frames" (ORF) codificando proteínas de 194 kDa (replicase), 20 kDa (função desconhecida), 31-36 kDa (movimento), 21-23 kDa (proteína capsidial) e 10-14 kDa (proteína de ligação ao RNA)(Saldarelli *et al.*, 1996).

No Brasil, o fendilhamento cortical foi constatado pela primeira vez no Estado de São Paulo (Kuniyuki, 1975) e posteriormente no Rio Grande do Sul (Kuhn, 1992), sendo sua identificação feita por videiras indicadoras, teste sorológico ELISA (Kuniyuki *et al.*, 2000) e no Rio Grande so Sul, recentemente, por sequenciamento do gene da proteína capsidial (Nickel *et al.*, 2002). No Estado de São Paulo, o fendilhamento cortical ocorre com incidência de até 20%, dependendo da cultivar (Kuniyuki & Costa, 1982), enquanto que no Rio Grande do Sul, algumas plantações apresentam incidência superior a 60% (Kuhn, 1992). Nos vinhedos paulistas, dois isolados do GVB foram identificados. O isolado comum (GVB-C^{SP}) induz sintomas na cultivar indicadora LN-33 e em cultivares americanas (*V. labrusca*) como Concord, Isabel e Niagara, e o isolado Itália (GVB-I^{SP}), menos freqüente, causa reação mais forte em LN-33, mas é assintomático nessas cultivares americanas. Foi determinado, mediante testes imunoenzimáticos, que estes dois isolados sintomatologicamente distintos são sorologicamente semelhantes (Kuniyuki *et al.*, 2000). No presente trabalho, descreve-se a caracterização do gene codificador da proteína capsidial dos isolados comum e Itália do GVB encontrados no Estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração de RNA total

Para a extração de RNA total, foram utilizadas plantas de *V. vinifera* cv. Itália infetada com o GVB-I^{SP} e cv. Rubi infetada com o GVB-C^{SP}, além de plantas não infetadas de ambas as cultivares que foram utilizadas como controle. Foram extraídos RNA totais dessas amostras utilizando-se o método de MacKenzie *et al.* (1997), que consiste no congelamento dos tecidos (1 g de nervuras e pecíolos) com N_2 líquido, trituração e extração com 5,0 ml de tampão (isotiocianato de guanidina 4 M, acetato de sódio 0,2 M pH 5,0, EDTA 25 mM e PVP-40 2,5%), 0,5 ml de sarcosil 20% e 0,05 ml de β-mercaptoetanol. Essa mistura foi aquecida a 70 °C por 10 min, resfriada a temperatura ambiente e aplicada em uma coluna do kit "RNAeasy Plant Mini", conforme especificação do fabricante (Qiagen).

RT/PCR ("Polymerase Chain Reaction")

A partir dos RNA totais obtidos, procedeu-se a síntese do DNA complementar (cDNA) utilizando-se os oligonucleotídeos CN47, CN54 e CN55 (Pappu *et al.*, 1993), complementares à região 3' terminal de RNA virais poliadenilados. A reação (20 µl) envolveu uma desnaturação inicial do RNA total (200 ng) e dos oligonucleotídeos (10 µg/ml cada) a 95 °C por 5 min com posterior resfriamento em mistura gelo/álcool. Em seguida, adicionaram-se os outros componentes da reação: tampão (Tris-HCl 50 mM pH 8,3 e KCl 5 mM), DTT 10 mM, $MgCl_2$ 3 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 1 unidade de inibidor de RNAse e 200 unidades de transcriptase reversa (Superscript II RNAse H; Gibco-BRL). Para a síntese do cDNA, essa mistura foi incubada a 42 °C por 2 h.

Um par de oligonucleotídeos foi desenhado com o auxílio dos programas Primer-3 e Oligo-4 utilizando como molde a seqüência do isolado italiano (Saldarelli *et al.*, 1996), visando a clonagem do gene amplificado em plasmídeo para posterior sequenciamento. As seqüências dos oligonucleotídeos desenhados são: 5'CAAGCAATTCCCCGAGAGT3' (senso) e 5'TTTAGCCGCACTCCTTGACT3' (antisenso). Este par de oligonucleotídeos flanqueia um fragmento de 694 nucleotídeos (nt 6425 ao 7118) que inclui o gene codificador da proteína capsidial (594 nt).

Na reação da PCR, para um volume final de 50 µl, foram misturados 5 µl de tampão (Tris-HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM); 3,5 mM de $MgCl_2$; 0,2 mM de cada dNTP; 10 µg/ml de cada oligonucleotídeos (senso e antisenso), 2 µl da reação de cDNA e 3 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen). As condições para o ciclo da PCR incluiram uma desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, seguida de 30 ciclos a 94 °C por 1 min, 45 °C por 1 min e 72 °C por 2 min, com uma extensão final a 72 °C por 10 min. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1% ao lado do marcador 100 pb DNA Ladder (Gibco-BRL) corados com brometo de etídeo (1µg/ml) sob luz ultravioleta.

Clonagem e Seqüenciamento

Os fragmentos obtidos foram clonados em vetor

utilizando-se o kit "TOPO TA Cloning", segundo instruções do fabricante (Invitrogen). Após confirmação dos clones positivos por PCR, o plasmídeo recombinante foi extraído utilizando-se o kit "Concert Rapid Plasmid Miniprep System" (Gibco-BRL), seguindo-se digestão enzimática com *Eco*RI para comprovar novamente a formação do recombinante.

Os plasmídeos recombinantes foram sequenciados nos dois sentidos de leitura utilizando os oligonucleotídeos universais M13F e M13R e o kit "DNA sequencing Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" (Perkin Elmer) no sequenciador ABI Prism 377 (Applied Biosystems Inc.). As seqüências obtidas foram inicialmente analisadas pelo algoritmo BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), seguido do alinhamento das seqüências consenso pelo programa Multalin (http://www.prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html). Para dedução da seqüência de aminoácidos da proteína capsidial foi utilizado o programa Translate (http://www.expasy.org/tolls/dna.html) e as relações filogenéticas foram estabelecidas por parcimônia com o auxílio do programa PAUP v.4.0b10, com análise de "bootstrap" de 500 réplicas. A construção gráfica da árvore foi feita pelo programa Tree View 1.6.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um fragmento de DNA de tamanho esperado (694 pb), que inclui o gene codificador da proteína capsidial (CP) do GVB, foi amplificado via RT/PCR a partir de videiras com sintomas de fendilhamento cortical infetadas por um dos isolados GVB-C^{SP} ou GVB-I^{SP}. Não foram observados fragmentos de tamanhos inespecíficos e nem produtos amplificados a partir da amostra de plantas não infetadas (dados não mostrados). Esses resultados comprovam a relação de ambos os isolados com a doença fendilhamento cortical e evidenciam que a técnica de RT/PCR pode ser utilizada de forma confiável para o diagnóstico do GVB em substituição a testes de menor sensibilidade.

Problemas, por exemplo, na confiabilidade de testes sorológicos, tais como o ELISA para a detecção dos vírus do gênero *Vitivirus* são principalmente devidos a anti-soros com baixo título resultantes da baixa antigenicidade viral, a distribuição irregular do vírus na planta hospedeira e a variação do título viral nas diferentes estações do ano (Boscia *et al.*, 1992; Minafra, 2000). Quanto a PCR, alguns pesquisadores já vêm utilizando essa técnica ou variações desta, como a immunocaptura acoplada a PCR (IC/RT/PCR), com sucesso para a detecção de Vitivirus em tecidos de hospedeiras herbáceas ou videiras infetadas (Minafra *et al.*, 1992; Minafra & Hadidi, 1994; Minafra, 2000).

Visando a identificação e a caracterização dos dois isolados do GVB, os fragmentos de DNA amplificados foram clonados para o sequenciamento. Para a comprovação da formação do plasmídeo recombinante, o DNA plasmidial das colônias selecionadas foi extraído e digerido com a enzima *Eco*RI para a liberação do fragmento inserido. Essa metodologia padrão veio, entretanto, acrescentar resultados interessantes e não esperados devido à diferenciação no padrão de digestão enzimática entre os dois isolados. Dois fragmentos de aproximadamente 550 e 150 pb foram liberados dos plasmídeos recombinantes obtidos para o GVB-C^{SP}, indicando a provável presença de um sítio interno de restrição para *Eco*RI no fragmento amplificado desse isolado. O sítio de restrição provavelmente estava ausente nos fragmentos obtidos do GVB-I^{SP}, pois houve a liberação do fragmento clonado inteiro (694 pb) (Figura 1). Pela análise de seqüências depositadas no "GenBank", dos outros isolados do GVB e de outros membros do gênero *Vitivirus*, verificou-se que o sítio de restrição também está presente no gene da CP do isolado italiano do GVB (GVB^{It}, acesso X75448) e do *Heracleum latent virus* (HLV, acesso X79270). Por outro lado, assim como no GVB-I^{SP}, o sítio de corte para *Eco*RI está ausente em um outro isolado brasileiro descrito no Rio Grande do Sul (GVB^{BR1}, acesso AF438410), no isolado do Japão (GVB^{Jp}, acesso AB039842), no vírus A da videira (*Grapevine virus A*, GVA, acesso X75433) e no vírus D da videira (*Grapevine virus D*, GVD, acesso Y07764). Dessa forma, um procedimento de digestão com *Eco*RI de fragmentos amplificados contendo o gene da CP pode ser útil para a identificação dos isolados do GVB.

A partir do sequenciamento dos fragmentos clonados, obteve-se uma seqüência com 694 nucleotídeos para ambos isolados, dos quais 594 correspondem ao gene codificador da CP do GVB (Figura 2) com 197 aminoácidos deduzidos e massa molecular estimada em 21,600 Da para a proteína, valor similar aos descritos para os outros isolados já sequenciados (Martelli *et al.*, 1997). A presença do sítio de digestão para *Eco*RI foi confirmada na seqüência do gene da CP do GVB-C^{SP}, entre os nucleotídeos 510 e 515 (Figura 2, sublinhado), estando alterado, como esperado, no GVB-I^{SP}.

A comparação da seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos dos isolados paulistas com a de outros isolados do GVB descritos em outras regiões geográficas revelou que o GVB-C^{SP} apresenta uma similaridade muito alta com o isolado italiano (GVB^{It}), tanto em relação à seqüência de nucleotídeos (98,7%) quanto à de aminoácidos (99,0%),

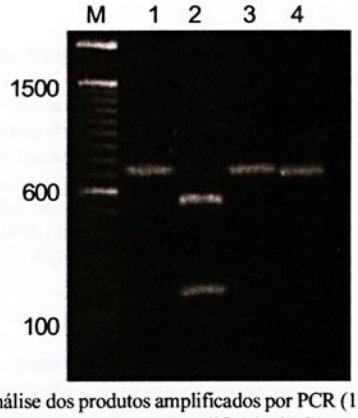


FIG. 1 - Análise dos produtos amplificados por PCR (1 e 3) e do corte enzimático com *Eco*RI do DNA amplificado do *Grapevine virus B* (2 e 4) em gel de agarose a 1%. 1 e 2: GVB-C^{SP}, 3 e 4: GVB-I^{SP}. M: marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen).

GVB-C

```
          10         20         30         40         50         60
001 atggaaaatatatcccggatggcaaagataaggagcaacatttcggaactcctgtgcgca
     M  E  N  I  S  R  M  A  K  I  R  S  N  I  S  E  L  L  C  A  020
061 ggggtgaccttcgtaactgatgccagagagactggctttgaccgcccatgtacttcagg
     G  V  T  F  V  T  D  A  R  E  T  G  F  D  R  P  M  Y  F  R  040
121 accctctttgggtacattgcgttaacgggacgtctgcaaaagcccaacactatgagaat
     T  L  F  G  Y  I  A  L  T  G  T  S  A  K  A  Q  H  Y  E  N  060
181 gtagatattataggtgataaggtagggcagaaggtatagatagtagggtaccatcaat
     V  D  I  I  G  D  K  V  G  A  E  G  I  D  S  R  G  T  I  N  080
241 atctctgagcaggtaaagaagatgatgggttattcaagagcagtaccatctggcgtctgc
     I  S  E  Q  V  K  K  M  M  G  Y  S  R  A  V  P  S  G  V  C  100
301 aaaggtttaacccttcgtcaaatgtgtgagccttcgccgaggaggcaagagactgttta
     K  G  L  T  L  R  Q  M  C  E  P  F  A  E  E  A  R  D  C  L  120
361 accattctggctaccttgagggtgtatagcaggttggcttcaaaaatggctaagttaggt
     T  I  L  A  T  L  R  V  Y  S  R  L  A  S  K  M  A  K  L  G  140
421 caaaaggaacctcaagtgatgtttgacttcaactctggtcttaatctgttaaccttgtcg
     Q  K  E  P  Q  V  M  F  D  F  N  S  G  L  N  L  L  T  L  S  160
481 gccactgaagcttcagctatacaatcattgaattctaggctctttcggacagagggtgct
     A  T  E  A  S  A  I  Q  S  L  N  S  R  L  F  R  T  E  G  A  180
541 aagaacgtcttcacagcacaagccagcgtgggtgagcagtctgtgagatatag
     K  N  V  F  T  A  Q  A  S  V  G  E  Q  S  V  E  I  stop      197
```

GVB-1

```
          10         20         30         40         50         60
001 atggaaaatatatcccggatggcaaagataaggcgaaatatctccgagctcctgtgcgcg
     M  E  N  I  S  R  M  A  K  I  R  R  N  I  S  E  L  L  C  A  020
061 ggagtcacatttgtaactgatgcccgagagactgggttcgaccgtcccatgtacttcagg
     G  V  T  F  V  T  D  A  R  E  T  G  F  D  R  P  M  Y  F  R  040
121 accctattcgggtacattgctttaactgggacgtcagcaaaagcacagcactacgagaat
     T  L  F  G  Y  I  A  L  T  G  T  S  A  K  A  Q  H  Y  E  N  060
181 gtagatattataggtgataaggtaggagcagagggtctagattgtaggggactatcaat
     V  D  I  I  G  D  K  V  G  A  E  G  L  D  C  R  G  T  I  N  080
241 atctcggaacaggtgaagaggatgatgggttactctcgagcagtaccatctggtgtgtgt
     I  S  E  Q  V  K  R  M  M  G  Y  S  R  A  V  P  S  G  V  C  100
301 aagggccttacctctgaggcaaatgtgtgagccttttgctgaagaagctaaggattgcctg
     K  G  L  T  L  R  Q  M  C  E  P  F  A  E  E  A  K  D  C  L  120
361 accattctggcgacactgggagtgtatagcaggctcgcatctaagatgggccaaactgggg
     T  I  L  A  T  L  G  V  Y  S  R  L  A  L  K  M  A  K  L  G  140
421 cagaaggaacccccaagtcatgttcgatttaacttctggtcttgatctgctcgccttatct
     Q  K  E  P  Q  V  M  F  D  F  N  S  G  L  D  L  L  A  L  S  160
481 gctaccgaggcatctgctatacaatctttaaactcaaggctctttcgaactgagggtgct
     A  T  E  A  S  A  I  Q  S  L  N  S  R  L  F  R  T  E  G  A  180
541 aagaacgtattcacagcacaagccagcgtgggtgagcagtctgtgagatatag
     K  N  V  F     A  Q  A  S  V  G  E  Q  S  V  E  I  stop      197
```

FIG. 2 - Seqüência de nucleotídeos (superior) e aminoácidos deduzidos (inferior) do gene da proteína capsidial dos isolados do *Grapevine virus B*, GVB-C^{SP} e GVB-I^{SP}. Seqüência sublinhada: sítio de restrição para *Eco*RI

TABELA 1 - Comparação (similaridade em porcentagem) entre seqüências de nucleotídeos (abaixo da diagonal, em cinza) e aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) da proteína capsidial dos isolados paulistas do do *Grapevine virus B* (GVB) (GVB-C^{SP} e GVB-I^{SP}) e outros isolados depositados no GenBank*

	GVB-C^{SP}	GVB-I^{SP}	GVB^{It}	GVB^{BR1}	GVB^{Jp}
GVB-C^{SP}	---	94,9	99,0	97,5	94,4
GVB-I^{SP}	83,2	---	94,9	95,9	91,9
GVB^{It}	98,7	82,2	---	97,5	94,4
GVB^{BR1}	82,2	92,4	81,1	---	94,9
GVB^{Jp}	82,0	81,6	82,0	81,5	---

*Os números de acesso ao GenBank estão indicados entre parênteses. GVB-C^{SP} (AY340582); GVB-I^{SP} (AY340583); GVB^{It} (X75448); GVB^{BR1} (AF438410); GVB^{Jp} (AB039842).

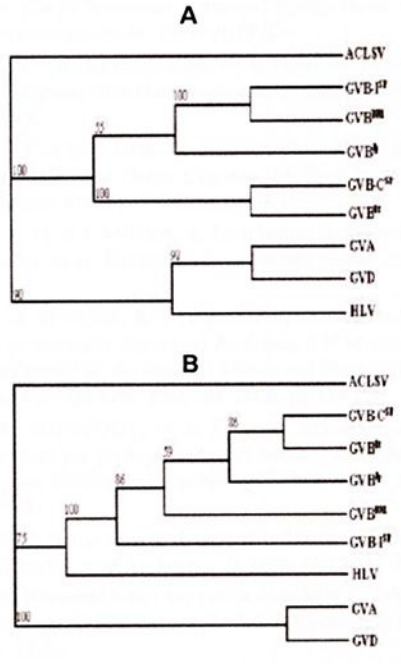


FIG. 3 - Dendogramas obtidos a partir da análise filogenética por parcimônia com base na seqüência completa de nucleotídeos (A) e de aminoácidos deduzidos (B) da proteína capsidial dos isolados do do *Grapevine virus B* (GVB) e de outros membros do gênero *Vitivirus*. ACLSV pertence ao gênero *Trichovirus* e representa um grupo externo no dendograma. Os números de acesso ao GenBank para os vírus citados acima são: GVB-C^{SP} (AY340582), GVBI^{SP} (AY340583), GVB^{It} (X75448), GVB^{BR1} (AF438410), GVB^{Jp} (AB039842), HLV (X79270), GVA (X75433), GVD (Y07764), ACLSV (NC001409)

enquanto que o GVB-I^{SP} é mais próximo ao isolado GVB^{BR1}, com similaridades, respectivamente, de 92,4% e 95,9% na seqüência de nucleotídeos e aminoácidos (Tabela 1). O isolado japonês (GVB^{JP}) foi o menos similar em relação aos isolados paulistas. Apesar das variações mais acentuadas na seqüência de nucleotídeos, a seqüência deduzida de aminoácidos não mostra grandes alterações entre os isolados das diferentes regiões, com similaridades entre 91,9% a 99,0%, o que evidencia que a maioria das trocas de nucleotídeos não leva a mudanças no aminoácido especificado (substituições sinônimas). Como a proteína em questão é estrutural e provavelmente exerce um papel importante na especificidade em relação à única hospedeira natural, essas observações eram esperadas já que variações acentuadas na proteína capsidial poderiam ser deletérias para a espécie (Russo, 2001).

Na análise filogenética por parcimônia, foram utilizadas as seqüências de nucleotídeos (Figura 3A) e aminoácidos deduzidos (Figura 3B) da CP dos isolados do GVB e de outras espécies do gênero *Vitivirus* (GVA, GVD e HLV) que já haviam sido sequenciadas, além do *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) gênero *Trichovirus,* utilizado como grupo externo. Em relação à seqüência de nucleotídeos (Figura 3A), o GVB-C^{SP} foi agrupado junto com o isolado italiano e o GVB-I^{SP} junto

com o isolado GVB^{BR1}, ambos em 100% das réplicas, confirmando os resultados anteriores de similaridade na seqüência de nucleotídeos (Tabela 1). Vale ressaltar que os isolados GVB-C^{SP} e GVB^{It} são os que possuem o sítio interno de restrição para *Eco*RI, podendo ser diferenciados dos demais por produzir dois fragmentos quando o gene da CP é submetido a corte com essa enzima. Já nos isolados GVB^{JP}, GVB^{BR1} e GVB-I^{SP}, que foram agrupados em um mesmo ramo, este sítio está alterado. Como observado anteriormente em relação aos outros membros do gênero, a espécie GVA é agrupada junto com o GVD em um número significativo de réplicas, enquanto o HLV é colocado em um ramo mais externo, embora um relacionamento sorológico distante entre o GVA e o GVD foi relatado por Choueiri et al. (1997).

Considerando-se a filogenia relativa à seqüência de aminoácidos, um padrão similar de agrupamento foi observado (Figura 3B), embora não tão marcante devido às menores diferenças encontradas na seqüência da proteína capsidial nos isolados do GVB. O que pode ser observado, é que todos os isolados de GVB constituem um grupo monofilético em 100% das réplicas, o que denota ancestralidade comum.

A viticultura nacional é resultante da multiplicação de clones de cultivares tradicionais de copa e porta-enxerto, cujos materiais propagativos foram importados, há muitos anos, de países produtores, principalmente da Itália (Amorim & Kuniyuki, 1997). Atualmente, a importação de mudas de videiras pelo Brasil ainda é praticada, porém, atendendo às exigências fitossanitárias. A análise conjunta das duas árvores filogenéticas mostra maior proximidade do GVB-C^{SP} com o isolado oriundo da Itália, sendo que ambos induzem sintomas semelhantes em diversas cultivares de *Vitis* spp. (Amorim & Kuniyuki,1997). Esses dados parecem indicar a introdução do GVB-C^{SP} no Brasil a partir de material propagativo importado da Itália.

O fato de o isolado paulista GVB-I^{SP} ter maior proximidade com o isolado do Rio Grande do Sul pode indicar intercâmbio de material entre os dois Estados ou origem comum do material propagativo importado para estes Estados. Embora a similaridade de ambos com o isolado japonês seja menor do que em relação ao isolado italiano, os três primeiros são agrupados em um mesmo ramo na árvore filogenética de nucleotídeos, também inferindo origem comum (Figura 3A).

Embora estas conclusões sejam apenas especulativas, o fato do GVB-I^{SP} ser assintomático em algumas cultivares americanas de *Vitis* spp., diferente dos isolados conhecidos até então, torna interessante um estudo mais abrangente sobre ele no que diz respeito aos outros genes virais e a ultraestrutura dos tecidos infectados para um melhor conhecimento da interação do vírus com a planta hospedeira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, L. & KUNIYUKI, H. Doenças da videira. In: Kimati, H., Amorin, L., Bergamin, A., Aranha, L.E.A. & Rezende, J.A.M. (Eds) Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas. Vol.2. São Paulo. Agronômica Ceres. 1997. pp.736-757.

BEUKMAN, E.F. & GOHEEN, A.C. Grape corky bark. In: Frazier, N.W. (Ed) Virus diseases of small fruits and grapevines. Berkeley. University of California/ Division Agricultural Sciences. 1970. pp.207-209.

BONAVIA, M., DIGIARO, M., BOSCIA, D., BOARI, A. & BOTTALICO, G. Studies on "corky rugose wood" of grapevine and on the diagnosis of grapevine virus B. Vitis 35:53-58. 1996.

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 127:185-194. 1992.

BOSCIA, D., SAVINO, V., MINAFRA, A., NAMBA, S. & ELICIO, V. Properties of a filamentous virus isolated from grapevines affected by corky bark. Archives of Virology 130:109-120. 1993.

BOSCIA, D., MINAFRA, A. & MARTELLI, G.P. Filamentous viruses of the grapevine: Putative trichovirus and capilloviruses. In: Monette, P.L. (Ed.) Filamentous Viruses of Woody Plants. Research Signpost. Trivandrum, India. 1997. pp.19-28.

CHOUEIRI, E., ABOU-GHANEM, N. & BOSCIA, D. Grapevine virus A and grapevine virus D are serologically distantly related. Vitis 36:39-41. 1997.

GOHEEN, A.C. Corky Bark. In: Pearson, R.C. & Goheen, A.C. (Eds.). Compendium of Grape Diseases. St. Paul.The American Phytopathological Society. 1988. pp.52-53.

GOIDANICH, G. & CANOVA, A. La suberose corticale della vite. Una malatia da virus. Phytopathology Mediterranean 2:295-297. 1963.

HABILI, N. & SYMONS, R.H. Grapevine viruses detected by Wait diagnostics in Australia. Extended Abstracts, 13th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine. Adelaide, Australia. 2000. pp.124-126.

HEVIN, M., MOUTOUS, G. & FOS, A. Transmission de la Flavescence doree par greffage en vert et presence du "Corky Bark" sur cepage corse (Nielluccio). Connaissance de la Vigne et du Vin 12:79-86. 1978.

HEWITT, W.B. Some virus and virus-like diseases of grapevines. California Department of Agriculture Bulletin 43:47-64. 1954.

KUHN, G.B. Intumescimento dos ramos da videira ("Corky bark"), doença constatada no Rio Grande do Sul. Fitopatologia Brasileira 17:399-406. 1992.

KUNIYUKI, H. Identificação do fendilhamento cortical (corky bark) em vinhedos do Estado de São Paulo. Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia 6:153-154. 1975.

KUNIYUKI, H. & COSTA, A.S. Estudos sobre a virose fendilhamento cortical da videira em São Paulo. Fitopatologia Brasileira 7:71-81. 1982.

KUNIYUKI, H., REZENDE, J.A.M., KITAJIMA, E.W. & BETTI, J.A. Detecção do *Grapevine virus B* em videiras com a doença de fendilhamento cortical. Fitopatologia Brasileira 25:443. 2000.

MACKENZIE, D.J., MCLEAN, M.A., MUKERJI, S. & GREEN, M. Improved RNA extraction for woody plants for the detection of viral pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. Plant Disease 81:222-226. 1997.

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

MARTELLI, G.P. Grapevine virology highlights 1997-1999. Extended

Abstracts, 13th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine. Adelaide, Australia. 2000. pp.1-5.

MINAFRA, A. Rugose wood grapevines. Extended Abstracts 13th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine. Adelaide, Australia. 2000. pp.30-34.

MINAFRA, A., HADIDI, A. & MARTELLI, G.P. Detection of grapevine closterovirus A in infected grapevine tissues by reverse transcription-polymerase chain reaction. Vitis 31: 221-227. 1992.

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 46:175-188. 1994.

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

PAPPU, S.S., BRAND, R. & PAPPU, H.R. A polymerase chain reaction method adapted for selective amplification and cloning of 3'sequences of potyviral genomes: application to dasheen mosaic virus. Journal of Virological Methods 41:9-20. 1993.

RUSSO, C.A.M. Como escolher genes para problemas filogenéticos específicos. In: Matioli, S.R. (Ed) Biologia Molecular e Evolução. Holos Editora.2001. pp.130-136.

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

SANTOS, M.T., MANSINHO, A., CORREIA, P.K., SEQUEIRA, O.A. & NOLASCO, G. Multiple detection of grapevine filamentous viruses in Portugal, by RT-PCR from dsRNA templates. Extended Abstracts 13th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine. Adelaide, Australia. 2000. p.129.

SAVINO, V., BOSCIA, D. & MARTELLI, G.P. Rugose wood complex of grapevine: can grafting to Vitis indicators discriminate between diseases? In: 9th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine, Kiryat Anavim, 1989. pp.91-94.

TANAKA, S. Indexing grapes in Japan for viruses. Annals of the Phytopathological Society of Japan 42:192-196. 1976.

TANNE, E., DUBITSKY, E. & BAZAK, H. Preliminary data on the effect of corky bark disease on Thompson Seedless vines grafted onvarious rootstocks. In: 10th Meeting of International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine, Volos, 1990. pp.386-389.

TELIZ, D. & GOHEEN, A.C. Diseases of grapevines in Mexico. Plant Disease Reporter 52:372-373. 1968.

03059

CARACTERIZAÇÃO DO GENE DA PROTEÍNA CAPSIDIAL DO *Grapevine virus A* NO ESTADO DE SÃO PAULO

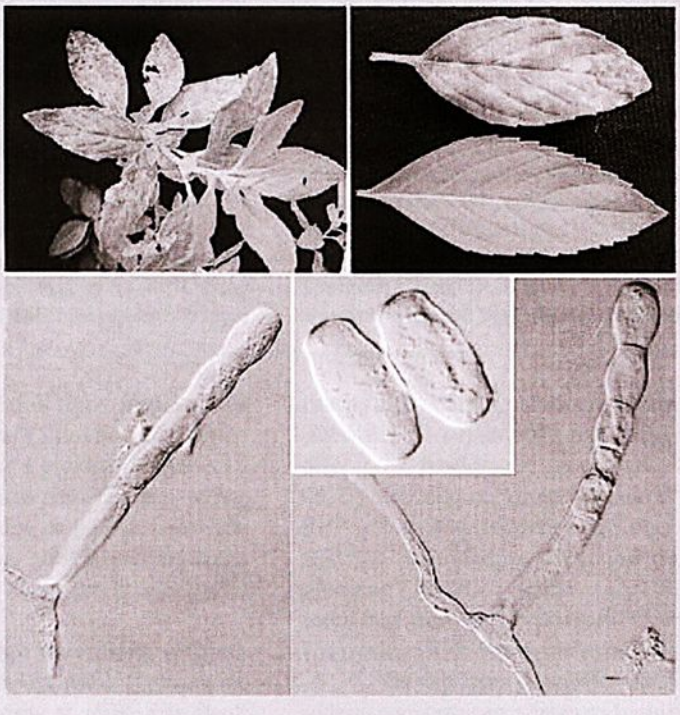
Capítulo Três

FITOPATOLOGIA BRASILEIRA

BRAZILIAN PHYTOPATHOLOGY

Revista Oficial da Sociedade Brasileira de Fitopatologia

VOL. 29 nº 2 MAR - ABR DE 2004 - ISSN 0100-4158



Caracterização do Gene da Proteína Capsidial do *Grapevine virus A* em Videiras Afetadas pela Acanaladura do Lenho de Kober no Estado de São Paulo*

Andreia E. Moreira[1], José O. Gaspar[1], Luis E. A. Camargo[2] & Hugo Kuniyuki[3]****

[1]Departamento de Zoologia e Botânica, IBILCE-UNESP, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, SP, e-mail: gaspar@dzb.ibilce.unesp.br; [2] Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ-USP, Cx. Postal 9, CEP 13418-900, Piracicaba, SP; [3]IAC-Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade, CEP 13020-902, Campinas, SP

(Aceito para publicação em 06/01/2004)

Autor para correspondência: José Osmar Gaspar

MOREIRA, A.E., GASPAR, J.O., CAMARGO, L.E.A. & KUNIYUKI, H. Caracterização do gene da proteína capsidial do *Grapevine virus A* em videiras afetadas pela acanaladura do lenho de Kober no Estado de São Paulo. Fitopatologia Brasileira 29:205-208. 2004.

RESUMO

O presente trabalho caracteriza o gene codificador da proteína capsidial do isolado do *Grapevine virus A* (GVA) encontrado no Estado de São Paulo (GVA-SP). RNA total foi extraído de folhas e pecíolos de plantas de videira (*Vitis* spp.) da variedade 'Kober 5BB' e submetido a RT-PCR usando oligonucleotídeos desenhados para amplificar um fragmento entre as posições 6409 e 7175 do RNA do GVA ("GenBank", acesso X75433). Foi obtido um fragmento de tamanho esperado (767 nt) que inclui o gene da proteína capsidial, codificando 198 aminoácidos. A seqüência do GVA-SP apresentou similaridade de nucleotídeos e aminoácidos de, respectivamente, 86-92,3% e 94,5-98% com isolados do GVA da Europa, África e Japão (Acessos X75433, AF441234, AF007415, AB039841) e da região Sul do Brasil (Acesso AF494187), sendo, entretanto, mais similar aos isolados africano e italiano.

Palavras-chave adicionais: GVA, *Vitivirus*, *Vitis* spp., "Kober stem grooving", complexo do lenho rugoso, seqüenciamento, filogenia.

ABSTRACT

Characterization of the coat protein gene of *Grapevine virus A* from Kober stem grooving-affected grapevines in the State of São Paulo, Brazil

We report the characterization of the coat protein gene of a Brazilian isolate of *Grapevine virus A* (GVA-SP). Total RNA was extracted from leaves and petioles of GVA infected plants of the grape (*Vitis* spp.) variety 'Kober 5BB' and subjected to RT-PCR using primers designed to amplify a fragment between positions 6409 and 7175 of the GVA RNA (GenBank Accession X75433). A fragment of the expected size (767 nt) was obtained which included the coat protein gene coding for 198 amino acids. The GVA-SP sequence displayed nucleotide and amino acid similarity of, respectively, 86-92.3% and 94.5-98% with GVA isolates from Europe, Africa and Japan (Accessions X75433, AF441234, AF007415, AB039841) and Southern Brazil (Accession AF494187). The highest identity, however, was with the African and Italian isolates.

As viroses representam um dos mais importantes problemas fitossanitários da viticultura mundial, ocorrendo em praticamente todas as regiões onde a videira (*Vitis* spp.) é cultivada. De modo geral, essas doenças caracterizam-se por induzir lenta e gradual degenerescência da planta, causando constantes perdas na produção de uva, que chegam a perdas totais em variedades mais sensíveis (Amorim & Kuniyuki, 1997).

No Brasil, as principais viroses da videira já foram constatadas, tais como o enrolamento da folha ("grapevine leafroll", GLR), mosaico das nervuras ("grapevine fleck disease", GFkD), folha em leque ("grapevine fanleaf", GFL) e o complexo do lenho rugoso ("grapevine rugose wood", GRW) (Amorim & Kuniyuki, 1997). O GRW é um termo usado para designar um grupo de doenças caracterizadas por causar alterações no lenho de plantas afetadas de variedades sensíveis. É constituído por, pelo menos, quatro doenças diferentes: fendilhamento cortical ("grapevine corky bark", GCB), cascudo ou lenho estriado ("Rupestris stem pitting", RSP), acanaladura do lenho de Kober ("Kober stem grooving", KSG) e acanaladura do lenho de LN-33 ("LN-33 stem grooving", LNSG) (Savino *et al.*, 1989; Minafra, 2000), sendo todas elas constatadas no Brasil (Kuniyuki, 1972; Amorim & Kuniyuki, 1997; Kuniyuki *et al.*, 2001; Kuhn *et al.*,2002).

Os sintomas gerais do complexo do lenho rugoso da videira consistem em atraso na brotação de primavera, redução de vigor, baixa produção de uva, intumescência na região acima do ponto de enxertia e uma evidente diferença nos diâmetros do lenho da copa e do porta-enxerto, casca espessa e corticosa, com textura esponjosa e caneluras ("pittings") e/ou acanaladuras ("groovings") no lenho, que correspondem a saliências na superfície cambial da casca. Essas alterações ocorrem em variedades de copa, porta-enxerto ou ambos. A

*Apoio financeiro: FAPESP e CAPES. Seqüência depositada no GenBank com o número de acesso AY340581

**Bolsistas de produtividade do CNPq

intensidade desses sintomas, principalmente no lenho, parece depender da combinação copa/porta-enxerto. Não existem sintomas específicos nas folhas, mas, em algumas variedades, elas tornam-se avermelhadas ou amareladas e com enrolamento dos bordos foliares. Algumas variedades mais sensíveis apresentam declínio e morte, depois de poucos anos após o plantio. Muitas variedades produtoras de uva e de porta-enxerto apresentam infecção latente dos agentes causais do complexo. As doenças que compõem o complexo do lenho rugoso não podem ser facilmente distinguidas no campo, devido à ausência de sintomas específicos. A identificação das doenças é feita usando três indicadoras diferenciais, que são Kober 5BB, LN-33 e *V. rupestris* (Amorim & Kuniyuki, 1997).

O "Kober stem grooving" (KSG) é identificado apenas com base nos sintomas de acanaladuras ou sulcos longos no lenho de plantas afetadas da videira indicadora Kober 5BB, não apresentando sintomas em *V. rupestris* e em LN-33. O KSG é atribuído ao vírus A da videira (*Grapevine virus A*, GVA) (Garau *et al*., 1994; Choueiri *et al*., 1997). No Brasil, a doença foi constatada, pela primeira vez, em 1992, em plantas com declínio de 'Niagara Rosada' em Jundiaí, SP (Kuniyuki & Costa, 1992) e, mais recentemente, a associação do GVA com essa doença foi reforçada pelo teste de ELISA (Kuniyuki *et al*, 2001).

O GVA, espécie tipo do gênero *Vitivirus* (Martelli *et al*., 1997), apresenta partículas filamentosas de aproximadamente 800 nm de comprimento e genoma constituído por uma molécula de RNA de fita única e polaridade positiva com 5 "open reading frames" (ORF) (Minafra *et al*., 1994). O vírus tem a videira como única hospedeira natural, estando restrito ao floema desta. É perpetuado principalmente através de multiplicação vegetativa, por estaquia ou união de tecidos e transmitido naturalmente por espécies de cochonilhas brancas (*Pseudococcus* e *Planococcus*). Pode ser transmitido mecanicamente, com grande dificuldade, para algumas espécies de *Nicotiana* (Martelli *et al*., 1997).

No presente trabalho, descreve-se a caracterização do gene codificador da proteína capsidial de um isolado do GVA encontrado no Estado de São Paulo (GVA-SP). Esse isolado foi inicialmente obtido de uma planta da variedade Niagara Rosada da região de Jundiaí, SP (Kuniyuki & Costa, 1992) e que, por ter induzido sintomas característicos do KSG em 'Kober 5BB', vem sendo mantido nesse porta-enxerto indicador, em canteiro, no Instituto Agronômico de Campinas.

A extração de RNA totais foi feita a partir do porta-enxerto 'Kober 5BB' (*V. berlandieri x V. riparia*), infetado pelo GVA e com sintomas de acanalamento do lenho, utilizando-se o método de MacKenzie *et al*. (1997). Em linhas gerais, amostras de tecido (1g de nervuras e pecíolos) foram congeladas com N_2 líquido, trituradas a pó e extraídas com 5,0 ml de tampão (guanidina 4 M, acetato de sódio 0,2 M pH 5,0, EDTA 25 mM e PVP-40 2,5%), 0,5 ml de Sarcosil 20% e 0,05 ml de 2β-Mercaptoetanol. A mistura foi aquecida a 70 °C por 10 min, resfriada à temperatura ambiente e aplicada à coluna do "RNeasy Plant Mini Kit" conforme especificação do fabricante (Qiagen).

Para a síntese de DNA complementar (cDNA) foram utilizados os oligonucleotídeos CN47, CN54 e CN55, contendo 21 timinas antecedidas, respectivamente, por A, C ou G (Pappu *et al*., 1993) complementares à cauda poliadenilada da região 3' terminal do RNA viral. Na reação (20 µl), inicialmente foi feita a desnaturação do RNA total (200 ng) e dos oligonucleotídeos (10 µg/ml cada) por aquecimento a 95 °C por 5 min e posterior resfriamento em gelo/álcool. Em seguida, foram adicionados os demais componentes: tampão (Tris-HCl 50 mM pH 8,3 e KCl 5 mM), DTT 10 mM, $MgCl_2$ 3 mM, 0,2 mM de cada dNTP (dCTP, dGTP, dATP e dTTP), uma unidade de inibidor de RNAse e 200 unid. de transcriptase reversa (Superscript II RNAse H; Gibco-BRL). A mistura foi incubada a 42 °C por 2 h.

Com base na seqüência do isolado italiano do GVA (Minafra *et al*., 1994), dois pares de oligonucleotídeos foram desenhados utilizando os programas Primer-3 e Oligo-4. Juntos, estes dois pares incluem todo o gene codificador da proteína capsidial (597 nucleotídeos). O par denominado **GVA1** amplifica uma seqüência de 430 nucleotídeos (nt 6409 ao 6839) (sense: 5' GACAAATGGCACACTAGG 3', anti-sense: 5' AAGCCTGACCTAGTCATCTTGG 3') e o par denominado **GVA2** amplifica uma seqüência de 391 nucleotídeos (nt 6784 ao 7175) (sense: 5'GGCTGAAATGGGCACA TACT3'; anti-sense: 5'CCCTCTTTCACGAACCGTAA3').

Para a amplificação pela reação em cadeia pela polimerase ("Polymerase Chain Reaction", PCR) utilizou-se um volume de 50 µl consistindo de tampão (Tris-HCl 20mM pH 8,4; KCl 50 mM), 3,5 mM de $MgCl_2$; 0,2 mM cada dCTP, dGTP, dATP e dTTP, 10 µg/ml de cada oligonucleotídeo (sense e anti-sense), 2 µl da mistura da reação de cDNA e três unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen). O ciclo da PCR envolveu uma desnaturação inicial a 94 °C por 4 min e 30 ciclos com 1 min de desnaturação a 94 °C, 1 min de anelamento dos oligonucleotídeos a 53 °C e 2 min de extensão a 72 °C. Após os 30 ciclos, seguiu-se uma extensão final por 10 min a 72 °C. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (1 µg/ml) sob luz ultravioleta.

A clonagem dos fragmentos obtidos foi feita utilizando-se o "TOPO TA Cloning Kit" segundo instruções do fabricante (Invitrogen) e a extração do plasmídeo recombinante realizada utilizando-se o "Concert Rapid Plasmid Miniprep System Kit" (Gibco-BRL). Após a extração do DNA plasmidial das células selecionadas, foram feitas digestões enzimáticas para a comprovação da formação do recombinante. O seqüenciamento em ambas as direções foi feito utilizando-se os oligonucleotídeos universais M13 e o "DNA sequencing Kit Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" (Perkin Elmer) em um sequenciador ABI Prism 377 (Applied Biosystems, Inc). A análise comparativa das seqüências foi feita através do algoritmo BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) e o alinhamento das seqüências consenso pelo programa Multalin (http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html). A seqüência de aminoácidos deduzidos da proteína capsidial foi

determinada pelo programa Translate (http://www.expasy.org/tolls/dna.html). As relações filogenéticas foram determinadas por parcimônia com auxílio do software PAUP v.4.0b10 com análise de "bootstrap" de 500 réplicas. A construção gráfica da árvore foi feita pelo programa Tree View 1.6.1.

Os RNA extraídos de videiras infetadas pelo GVA-SP permitiram a amplificação de fragmentos de tamanhos esperados (GVA1: ~ 430 pb; GVA2: ~ 391 pb), não havendo amplificação a partir de plantas não infetadas (dados não mostrados). Os fragmentos amplificados foram clonados e seqüenciados. A seqüência obtida apresentou 767 nucleotídeos, dos quais 597 correspondiam ao gene codificador da proteína capsidial (CP) do GVA-SP (Figura 1). A seqüência deduzida de aminoácidos para essa proteína constou de 198 resíduos e massa molecular estimada em 21.650 Da, valor similar a outros isolados do GVA (Minafra *et al.* 1994; Fajardo *et al.*, 2003).

A seqüência de nucleotídeos da CP do GVA-SP, quando comparada com isolados de outras regiões geográficas (Tabela 1), revelou maior identidade com um isolado da África do Sul (GVA-AF, 92,3%) e da Itália (GVA-IT, 92%) e menor identidade com um isolado de Israel (GVA-IS, 86%). Em relação ao outro isolado brasileiro do Rio Grande do Sul (GVA-RS), a identidade foi de 88%. No entanto, quando foi comparada a seqüência deduzida de aminoácidos do GVA-SP com a dos outros isolados, a identidade variou de 94,5% a 98% (Tabela 1) indicando que a maioria das trocas de nucleotídeos observadas são sinônimas, não envolvendo mudanças no aminoácido especificado e, portanto, não alterando significativamente a proteína codificada.

Foram realizadas análises filogenéticas por parcimônia para a seqüência de nucleotídeos (Figura 2A) e aminoácidos (Figura 2B) dos isolados do GVA e outras espécies do recém criado gênero *Vitivirus*, cujas proteínas capsidiais já haviam sido seqüenciadas. A análise conjunta das duas árvores permite concluir que a espécie que apresenta maior similaridade com o GVA dentro do gênero é o vírus D da videira (*Grapevine virus D*, GVD), sendo ambos agrupados em um mesmo ramo ("bootstrap" =100). Essa proximidade genética entre GVA e GVD já havia sido relatada em outros trabalhos (Choueiri *et al.*, 1997; Fajardo *et al.*, 2003), em oposição aos testes que revelaram uma fraca reação sorológica entre esses dois vírus (Martelli, 1997). As outras duas espécies analisadas, vírus B da videira (*Grapevine virus B*, GVB) e *Heracleum latent virus* (HLV), ocupam posições mais distantes na árvore em relação ao GVA.

Em relação à análise filogenética da seqüência de nucleotídeos, os isolados do GVA formam um grupo monofilético no qual GVA-SP e GVA-AF são agrupados em um mesmo ramo indicando origem comum. Em seguida situam-se os isolados do Rio Grande do Sul e da Itália, que estão bem próximos entre si confirmando dados anteriormente publicados (Fajardo *et al.* 2003). Já os isolados GVA-JP e GVA-IS são os que mais se distanciam do isolado paulista. Na análise filogenética da seqüência deduzida de aminoácidos da CP, todos os isolados são agrupadas em um mesmo ramo o que

```
          10         20         30         40         50         60
001 atggcacactacgccaagagggtcgagataagggcgataatagaagagttggtgctggcg
     M  A  H  Y  A  K  R  V  E  I  R  A  I  I  E  E  L  V  L  A  020
061 aaagcccaaccagctgaagacgcctctgagagcggctacgaccgaaatatgtacctgaat
     K  A  Q  P  A  E  D  A  S  E  S  G  Y  D  R  N  M  Y  L  N  040
121 actctcttcgggtacatcgccttggtcggtacaagcaaaaaggcggtccactatggggag
     T  L  F  G  Y  I  A  L  V  G  T  S  K  K  A  V  H  Y  G  E  060
181 gtagatatagtaggtcctaaagctagcaaaaagacagggatagacccaagggaaagttg
     V  D  I  V  G  P  K  A  S  K  K  T  G  I  D  P  R  G  K  L  080
241 gtcgtgtcagaactggtgggcaggatgcgcacgctgagtgttgcagtgagcgagggacca
     V  V  S  E  L  V  G  R  M  R  T  L  S  V  A  V  S  E  G  P  100
301 gtcaagggcgcaaccctgaggcagatgtgcgaacctttagcacaaaacgcctatgacttc
     V  K  G  A  T  L  R  Q  M  C  E  P  L  A  Q  N  A  Y  D  F  120
361 ctcgtcctgatggctgagatgggcacatattcacagttagcaaccaagatgaccaggtca
     L  V  L  M  A  E  M  G  T  Y  S  Q  L  A  T  K  M  T  R  S  140
421 ggcttcaaagagccacaggttatgttcgactttgcgtcgggcttagatctgaaagcactg
     G  F  K  E  P  Q  V  M  F  D  F  A  S  G  L  D  L  K  A  L  160
481 acacttcaggaagctactgtgatacaggcaatgcactcccgcctctttcgtacggaaggt
     T  L  Q  E  A  T  V  I  Q  A  M  H  S  R  L  F  R  T  E  G  180
541 gcaaaaggagtattcaacgcccagtcatcagtcggcgagcaggctgtcgagata tag
```

FIG. 1 - Seqüência de nucleotídeos (superior) e aminoácidos deduzidos (inferior) do gene da proteína capsidial do *Grapevine virus A* (GVA-SP).

leva novamente a inferir que, apesar das variações mais acentuadas na seqüência de nucleotídeos, a proteína capsidial parece apresentar pouca variação entre os isolados de regiões geográficas distintas. Considerando ser essa uma proteína estrutural, fatores evolutivos poderiam estar restringindo as variações que seriam deletérias para a espécie. Alterações na proteína capsidial poderiam, por exemplo, levar à perda de interação com a hospedeira e o fato do GVA ter como única hospedeira natural a videira, estaria restringindo ainda mais essas alterações.

A viticultura brasileira resulta da introdução de variedades de copa e porta-enxerto oriundas principalmente de países como Estados Unidos, França e Itália (Sousa, 1996). Contudo, nas regiões dos Estados Unidos, onde são cultivadas variedades e híbridos de *Vitis labrusca* L. (Concord, Isabel, Niagara), a incidência de viroses tem sido limitada, pois essas são de cultivo mais recente do que as viníferas. Assim sendo, pode-se inferir que os vírus constatados até o presente no Brasil foram introduzidos daqueles países europeus e, por

TABELA 1 - Comparação (similaridade em porcentagem) entre seqüências de nucleotídeos (abaixo da diagonal, em cinza) e aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) da proteína capsidial do isolado paulista do *Grapevine virus A* (GVA-SP, AY340581) e outros isolados depositados no GenBank*

	GVA-SP	GVA-IT (1)	GVA-AF (2)	GVA-RS (3)	GVA-JP (4)	GVA-IS (5)
GVA-SP	---	97	98	94,5	97	97
GVA-IT(1)	92	---	97,5	95,5	97	97
GVA-AF(2)	92,3	91,3	---	94,9	98	96,5
GVA-RS(3)	88	90	89,1	---	95,5	95,5
GVA-JP(4)	88	89	87,1	85	---	98
GVA-IS(5)	86	88	86,4	85	85	---

(1) Isolado da Itália (X75433.1); (2) Isolado da África do Sul (AF441234); (3) Isolado do Rio Grande do Sul (AF494187.1); (4) Isolado do Japão (AB039841.1); (5) Isolado de Israel (AF007415).*Os códigos de acesso no GenBank estão indicados entre parênteses.

Biociências, Letras e Ciências Exatas BIBLIOTECA T 1356/05

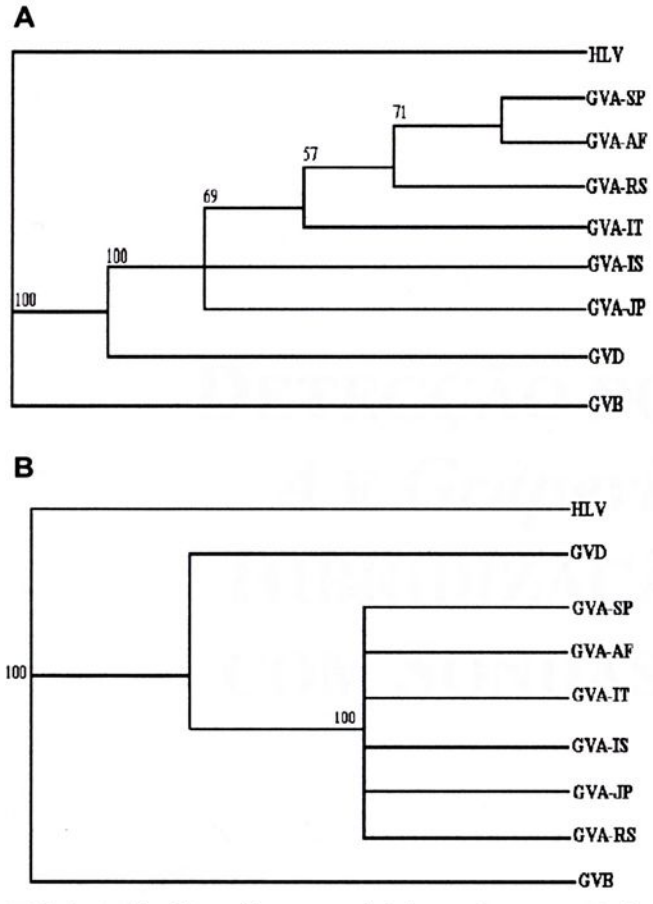


FIG. 2 - Análise filogenética por parcimônia com base na seqüência completa de nucleotídeos (A) e aminoácidos deduzidos (B) da proteína capsidial dos isolados do *Grapevine virus A* (GVA) e de outras espécies do gênero *Vitivirus*. Os números de acesso ao GenBank para os vírus citados acima são: GVA-SP (AY340581), GVA-IT (X75433.1), GVA-AF (AF441234), GVA-RS (AF494187.1), GVA-JP (AB039841.1), GVA-IS (AF007415), GVD (Y07764), HLV (X79270), GVB (AY340582).

conseguinte, é possível afirmar que GVA-SP e GVA-RS possuem origem semelhante.

Na África do Sul, a incidência de vírus é próxima aos 100%, sendo explicada pela utilização de porta-enxertos de origem européia a partir do século vinte (Sousa, 1996). A alta identidade observada entre os isolados do GVA de São Paulo e da África do Sul parece indicar uma possível origem comum entre eles, decorrente da introdução de material propagativo infetado, provavelmente oriundo da Itália, devido a identidade de ambos com o GVA-IT.

É importante ainda ressaltar que, nos testes efetuados neste trabalho, a técnica de RT/PCR permitiu uma rápida e sensível detecção do GVA, podendo ser utilizada como técnica alternativa para futuros diagnósticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, L. & KUNIYUKI, H. Doenças da videira. In: Kimati, H., Amorim, L., Bergamin, A., Camargo, L.E.A., Rezende & J.A.M. (Eds) Manual de Fitopatologia, vol.2: Doenças de plantas cultivadas. São Paulo. Agronômica Ceres. 1997. pp.736-757.

CHOUEIRI, E., DIGIARO, M. & SAVINO, V. Further evidence that Grapevine virus A is the agent of Kober stem grooving. Extended Abstracts, 12th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), Lisboa, Portugal. 1997. p.39.

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

GARAU, R., FROTA, V. A., PIREDDA, A., BOSCIA, D. & PROTA, U. On the possible relationship between Kober stem grooving and grapevine virus A. Vitis 33:161-163. 1994.

KUHN, G. B., FAJARDO, T.V.M. & NICKEL, O. Detecção biológica de três vírus do complexo rugoso da videira causadores de caneluras. Fitopatologia Brasileira 27:207. 2002 (Resumo).

KUNIYUKI, H. Nota sobre a ocorrência do "cascudo", moléstia semelhante ao "legno riccio" em São Paulo. Revista Brasileira de Fitopatologia 5:137. 1972 (Resumo).

KUNIYUKI, H. & COSTA, A. S. Caneluras no porta-enxerto Kober 5BB são provavelmente causadas por um novo isolado do vírus do cascudo da videira. Summa Phytopathologica 18:13. 1992 (Resumo).

KUNIYUKI, H., REZENDE, J.A.M, YUKI, V.A. & BETTI, J.A. Detecção serológica do *Grapevine virus A* em vinhedos do Estado de São Paulo. Summa Phytopathologica 27:116-117. 2001 (Resumo).

MACKENZIE, D.J., MCLEAN, M.A., MUKERJI, S. & GREEN, M. Improved RNA extraction for woody plants for the detection of viral pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. Plant Disease 81:222-226. 1997.

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

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

MINAFRA, A. Rugose wood of grapevines. Extended Abstracts, 13th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), Adelaide, Australia. 2000. pp 30-34.

PAPPU, S.S., BRAND, R. & PAPPU, H.R. A polymerase chain reaction method adapted for selective amplification and cloning of 3'sequences of potyviral genomes: application to dasheen mosaic virus. Journal Virological Methods 41:9-20, 1993.

SAVINO, V., BOSCIA, D. & MARTELLI, G.P. Rugose wood complex of grapevine: can grafting to *Vitis* indicators discriminate between diseases? Proceedings, 9th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), Kiryat Anavim, Israel. 1989. pp.91-94.

SOUSA, J.S.I. Uvas para o Brasil. FEALQ, v.1.1996.

03024

DETECÇÃO DO *Grapevine virus A* E *Grapevine virus B* POR HIBRIDIZAÇÃO "DOT-BLOT" COM SONDAS MOLECULARES

Capítulo Quatro

Detecção do *Grapevine virus A* e *Grapevine virus B* por Hibridização "Dot-Blot" com Sondas Moleculares Não Radioativas*

Andreia E. Moreira[1], José O. Gaspar[1] & Hugo Kuniyuki[2**]**

[1]Departamento de Zoologia e Botânica, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-Universidade Estadual Paulista (IBILCE-UNESP), CEP 15054-000, São José do Rio Preto, SP, e-mail: gaspar@dzb.ibilce.unesp.br; [2] Intituto Agronômico de Campinas (IAC) -Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade, CEP 13020-902, Campinas, SP.

(Aceito para publicação em / /2004)

Autor para correspondência: José Osmar Gaspar

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

*** Artigo submetido à publicação na Fitopatologia Brasileira, ISSN 0100-4158**

(*) Apoio FAPESP

(**) Bolsista do CNPq

RESUMO

O vírus A da videira (*Grapevine virus A*, GVA) e o vírus B da videira (*Grapevine virus B,* GVB) estão associados a acanaladura do lenho de Kober ("Kober stem grooving") e ao fendilhamento cortical da videira ("grapevine corky bark"), respectivamente. Este trabalho descreve o uso de sondas moleculares de cDNA na detecção de isolados do GVA (GVA-SP) e do GVB (GVB-C-SP e GVB-I-SP) em videiras e fumo. As sondas marcadas com digoxigenina foram produzidas por RT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para os genes da proteína capsidial. Os RNA totais foram extraídos de 45 plantas de diversas variedades de videira e de 13 plantas de *Nicotiana occidentalis* inoculadas mecanicamente com o GVB. Os RNA extraídos das plantas infectadas, indexadas biologicamente, hibridizaram com as sondas, não se verificando reação com plantas sadias. Para confirmar os resultados de hibridização, foram também feitos testes de RT-PCR. A utilização de hibridização "dot-blot" com sondas de cDNA mostrou-se eficaz na detecção dos vírus com especificidade e sensibilidade, ressaltando-se que, preferencialmente, folhas maduras e ramos dormentes devem ser utilizados nos testes diagnósticos para o GVB e GVA, respectivamente.

Palavras-chave adicionais: *Vitis, Vitivirus*, fendilhamento cortical da videira, "grapevine cork barky", acanaladura do lenho de Kober, "Kober stem grooving".

ABSTRACT

Detection of *Grapevine virus A* and *Grapevine virus B* by dot blot hybridization with non-radioactive molecular probes

Grapevine virus A (GVA) and *Grapevine virus B* (GVB) are involved in the Kober stem grooving and grapevine corky bark diseases, respectively. This work reports the molecular detection of isolates of GVA (GVA-SP) and GVB (GVB-C-SP and GVB-I-SP) in grapevines and tobacco by non-radioactive molecular probes. The digoxigenin-labeled probes were generated by RT-PCR using specific primers to the coat protein genes. Total RNA was extracted from 45 plants of several grapevine varieties and from 13 plants of *Nicotiana occidentalis* mechanically inoculated with GVB. The RNA extracted from infected plants, biological indexing, reacted to the cDNA probes while there was no hybridization with healthy plants. These results were also confirmed by RT-PCR experiments. The use of the cDNA probes hybridization was proved to be efficient in detecting both GVA and GVB with high specificity and sensitivity. However, mature leaves and dormant cuttings should be preferably used in diagnostic tests of GVB and GVA, respectively.

Entre as principais viroses da videira que ocorrem no Brasil, destaca-se o complexo do lenho rugoso ("grapevine rugose wood complex"), termo usado para descrever um grupo de doenças caracterizadas por alterações no lenho de variedades sensíveis de *Vitis* (Minafra, 2000). Incluídos nesse complexo, encontram-se o fendilhamento cortical ou intumescimento dos ramos ("Grapevine Corky Bark", GCB) e a acanaladura do lenho de Kober ("Kober Stem Grooving", KSG) (Kuniyuki & Costa, 1982; Kuhn, 1992), duas viroses de ampla distribuição, encontradas em quase todos os países que cultivam a videira (Martelli *et al.*, 1997).

As principais características do GCB são fendilhamento no córtex, avermelhamento das folhas de variedades tintas de *V. vinifera*, redução no vigor e produção escassa ou nula dependendo da variedade (Kuniyuki & Costa, 1982; Kuhn, 1992). O agente etiológico do GCB tem aproximadamente 800 nm de comprimento e é denominado vírus B da videira (*Grapevine virus B*, GVB, gênero *Vitivirus*, família *Flexiviridae*) (Martelli *et al.*, 1997; Adams *et al.*, 2004). No Brasil, o GVB ocorre com incidência de até 20% nos vinhedos do Estado de São Paulo (Kuniyuki & Costa, 1982) e superior a 60% em algumas plantações no Rio Grande do Sul (Kuhn, 1992). Nos vinhedos de São Paulo dois isolados desse vírus foram identificados: o isolado comum (GVB-C-SP) e o isolado Itália (GVB-I-SP) que são sorologicamente relacionados, mas apresentam sintomas distintos (Kuniyuki *et al.*, 2000), estando o gene da proteína capsidial de ambos já seqüenciado (Moreira *et al.*, 2004a).

No KSG, os sintomas consistem em acanaladuras ou longos sulcos no lenho da variedade de porta-enxerto Kober 5BB. A maioria das variedades de

copa e de porta-enxerto de videira não apresenta sintomas visíveis da infecção, podendo a doença ser identificada pela enxertia nesse porta-enxerto indicador. A doença é atribuída ao vírus A da videira (*Grapevine virus A*, GVA, gênero *Vitivirus*, família *Flexiviridae*) (Adams *et al.*, 2004), com partículas filamentosas de cerca de 800 nm de comprimento. No Brasil, o GVA ocorre com incidência de 6,1% a 8,6% no Rio Grande do Sul (Fajardo *et al.*, 2004) e em torno de 11% nos vinhedos paulistas (Kuniyuki *et al.* 1997). O gene da proteína capsidial do isolado paulista do GVA (GVA-SP) já foi seqüenciado mostrando alta identidade com isolados da África do Sul e Itália (Moreira *et al.,* 2004b).

Tanto o GVA como o GVB são vírus restritos ao floema da videira, única hospedeira natural, apresentam distribuição irregular nos tecidos e uma concentração que aumenta durante o período vegetativo, atingindo o máximo no outono, sendo ainda baixa a ponto de dificultar a detecção por métodos de laboratório (Minafra, 2000). Estas características, associadas ao fato de serem pouco imunogênicos, dificultam a detecção por métodos sorológicos. Testes biológicos de indexação, como a enxertia em videiras indicadoras, são demasiadamente demorados uma vez que a manifestação dos sintomas ocorre entre 6 e 24 meses para o GCB e entre 36 e 48 meses para o KSG (Amorim & Kuniyuki, 1997).

Os métodos moleculares vêm se tornando de escolha para a detecção dos vírus associados ao complexo do lenho rugoso da videira, devido à maior especificidade e sensibilidade em relação aos métodos sorológicos. A técnica de PCR já foi utilizada com sucesso para a detecção de *Vitivirus* em tecidos de herbáceas ou videiras infectadas (Minafra *et al.*, 1992a). A utilização de sondas de

ácidos nucleicos para a detecção de *Vitivirus* constitui outra alternativa de diagnóstico molecular. Sondas marcadas radioativamente (Minafra *et al.*, 1992b) ou com digoxigenina (Saldarelli *et al.*, 1994) mostraram-se eficientes e apresentaram boa sensibilidade na detecção. Apesar disto, a utilização de técnicas moleculares para detecção de vírus de videira no Brasil é ainda incipiente (Fajardo *et al.*, 2004), sendo a enxertia com videiras indicadoras o método mais freqüentemente utilizado (Kuniyuki & Costa, 1982; Kuniyuki, *et al.*, 1997; Kuhn, 1992; Amorim & Kuniyuki, 1997).

O objetivo deste trabalho foi testar a hibridização "dot-blot" com sondas não radioativas de cDNA como técnica alternativa para a detecção do GVA e GVB em videiras e em plantas de fumo inoculadas mecanicamente.

As amostras avaliadas consistiram de 45 plantas de diversas variedades de videiras provenientes do IAC (Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade, Setor de Virologia), das quais 35 foram testadas quanto à presença do GVB e 10 quanto à presença do GVA. Essas plantas haviam sido previamente submetidas a testes de indexação biológica empregando-se as variedades LN-33 e Niagara Rosada como indicadora para o fendilhamento cortical e a variedade Kober 5BB como indicadora para a acanaladura do lenho de Kober. Cinco plantas foram consideradas suspeitas ou possivelmente infectadas pelo fato de as indicadoras não terem apresentado sintomas típicos do fendilhamento cortical no primeiro ciclo vegetativo. As amostras foram constituídas por folhas novas e maduras coletadas de videiras em fase adiantada do ciclo vegetativo (março) e por ramos dormentes ou próximos da dormência (julho). Além disto, também foram testadas 13 plantas de *Nicotiana occidentalis* inoculadas mecanicamente com o

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

isolado GVB-C-SP, mediante fricção de extratos de pecíolos e nervuras de folhas de videiras infectadas em presença de tampão fosfato pH 7,0 contendo 2,5% (v/v) de nicotina.

De todas as amostras foi extraído RNA total utilizando-se o método de MacKenzie *et al.* (1997). Os tecidos (1g) foram congelados em N_2 líquido, triturados a pó e misturados com 5,0 ml de tampão (isotiocianato de guanidina 4 M, acetato de sódio 0,2 M pH 5,0, EDTA 25 mM e PVP-40 2,5%), 0,5 ml de Sarcosil 20% (p/v) e 0,05 ml de 2-mercaptoetanol. A mistura foi aquecida a 70 °C por 10 min, resfriada à temperatura ambiente e centrifugada a 10.000 g/15 min com coleta do sobrenadante e adição de igual volume de isopropanol para precipitação dos ácidos nucleicos. Após incubação por 10 min a temperatura ambiente, o RNA total foi recuperado por centrifugação a 10.000 g/10 min e ressuspendido em 100 µl de tampão desnaturante (MOPS 0,02 M, formamida 67% (v/v) e formaldeído 2,5 M).

As sondas não radioativas de DNA foram produzidas por RT-PCR com incorporação ao acaso do esteróide digoxigenina (DIG-dUTP; Boehringer Mannheim) e utilizando oligonucleotídeos complementares ao RNA do GVB ou GVA cujas seqüências são as seguintes: GVB: 5' CAAGCAATTCCCCGAGAGT 3' (senso) e 5' TTTAGCCGCACTCCTTGACT 3' (antisenso) (nucleotídeo 6425 ao 7118) (acesso GenBank: X754480); GVA: 5' GACAAATGGCACACTAGG 3' (senso) e 5' AAGCCTGACCTAGTCATCTTGG 3' (antisenso) (nucleotídeo 6409 ao 6839) (acesso GenBank: X75433). A PCR constou de uma desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, seguida de 30 ciclos com desnaturação a 94 °C por 1

min, anelamento a 45 ºC (GVB) ou 53 ºC (GVA) por 1 min e extensão a 72 ºC por 2 minutos, com uma extensão final a 72 ºC por 10 min.

Para a hibridização "dot-blot", os RNA extraídos (1g/100 µl) foram desnaturados (55 ºC por 10 min e resfriamento imediato em gelo/álcool por 5 min) e aplicados em membrana de náilon (Hybond-N+; Amersham Biosciences) com a utilização do aparelho "Bio-dot" conforme especificação do fabricante (Bio-Rad). A pré-hibridização foi conduzida a 50 ºC por 1 hora em solução contendo SDS 7% (p/v), fosfato de sódio 0,05 M pH 7,0, formamida 50% (v/v), reagente bloqueador 2% (p/v) (Boehringer Mannhein), SSC 5X (SSC 1X= citrato de sódio 0,03 M pH 7,0; NaCl 0,3 M) e N-lauroylsarcosina 0,1% (p/v). Em seguida, procedeu-se a hibridização com as respectivas sondas diluídas na solução de pré-hibridização a 50 ºC por 20 h. Seguiram-se lavagens com SSC 2X contendo SDS 0,1% (2 x 5 min/temperatura ambiente) e SSC 1X contendo SDS 0,1% (2 x 15 min/68 ºC). A detecção foi feita com anti-soro anti-digoxigenina conjugado com fosfatase alcalina, substrato quimioluminescente (CDP-Star, Amersham-Pharmacia) e exposição em filme de raio X por 20 minutos.

Foram usados como controles positivos plasmídeos recombinantes contendo fragmentos amplificados do genoma do GVA ou GVB (região da proteína capsidial) (Moreira *et al.*, 2004a, b).

Oito amostras (quatro para o GVA e quatro para o GVB) também foram testadas por RT-PCR, seguindo-se as condições descritas por Moreira *et al.* (2004a, b) e com os mesmos oligonucleotídeos utilizados para a produção da sonda.



Os resultados da hibridização "dot-blot" estão apresentados na Figura 1. Para avaliar a especificidade das sondas, foram feitos testes de hibridização utilizando a sonda produzida para o GVA com ácidos nucleicos de planta infectada com o GVA (videira 2*: 'Kober 5BB'/'Niagara'), com o GVB (videira 2: 'Niagara Branca') e com o vírus associado ao lenho estriado de Rupestris (*"Rupestris stem pitting associated virus"*, RSPaV, gênero *Foveavirus*) (variedade Brasil). Um "dot-blot" similar foi hibridizado com a sonda produzida para o GVB. As sondas mostraram-se específicas, hibridizando somente com o respectivo RNA complementar (Figura 1A e 1B).

Para o GVB, observou-se que quando as amostras de tecidos utilizadas para extração de RNA foram obtidas de folhas maduras de videira, a hibridização foi verificada em um número maior de amostras (Figura 1C) e os dados foram concordantes com os resultados da indexação biológica (Tabela 1). No entanto, quando folhas novas das mesmas plantas foram utilizadas, houve hibridização em poucas amostras sugerindo uma baixa concentração viral ou ausência do vírus em folhas jovens de videira (dados não mostrados). Também foram realizados testes para a detecção do GVB com tecidos dos ramos, sendo obtidos resultados similares aos de hibridização utilizando folhas maduras (dados não mostrados).

Nos testes para o GVA, a utilização de amostras de tecidos de folhas, tanto novas quanto maduras, não foi eficiente para a detecção do vírus (dados não mostrados). Somente quando foram utilizadas amostras de tecidos dos ramos (região do floema) é que se obteve hibridização detectável (Figura 1D).

Esses resultados podem ser explicados em função da baixa concentração e distribuição irregular de ambos os vírus nos tecidos da planta, sendo estas

características ainda mais acentuadas em relação ao GVA (Minafra, 2000). Dessa forma, para otimizar os testes de detecção por sonda, deve-se utilizar, preferencialmente, folhas maduras para a detecção do GVB e ramos dormentes ou próximos da dormência para a detecção do GVA. Em períodos de dormência da videira, os ramos também podem ser utilizados para a detecção do GVB com eficiência comparável às folhas maduras.

Os resultados de hibridização com as sondas foram, em geral, concordantes com aqueles fornecidos pela indexação biológica (Tabelas 1 e 2), sendo possível detectar os dois isolados do GVB e o GVA e também determinar o estado fitossanitário das cinco plantas suspeitas de infecção. As amostras 17 e 25, que foram determinadas como possivelmente infectadas por GVB no teste biológico não produziram hibridização. Além disso, um dado discordante foi observado: a videira 9* (Kober 5BB/SR 01), considerada sadia por meio dos testes da indexação biológica, apresentou hibridização "dot-blot" com a sonda para o GVA. Para confirmar alguns resultados de hibridização, foram realizadas reações por RT-PCR com essa amostra discordante e com outras amostras selecionadas aleatoriamente, totalizando oito amostras, quatro testadas para a presença do GVA e quatro para o GVB (Figura 1C e 1D). Os resultados do RT-PCR confirmaram aqueles da hibridização, mostrando a eficácia da sonda na detecção viral. A videira 9* apresentou amplificação por RT-PCR, concordando com os dados obtidos nos testes de hibridização e confirmando a infecção da planta pelo GVA. Essa planta esta sendo observada e, provavelmente, virá manifestar os sintomas da doença nos próximos ciclos vegetativos.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

A sonda também foi eficiente para a detecção viral em *N. occidentalis* inoculada mecanicamente com o GVB-C-SP, sendo o vírus detectado em 11 das 13 plantas inoculadas, não havendo reação com a planta sadia utilizada como controle (Figura 1E). Assim sendo, das 13 plantas inoculadas duas não foram infectadas (E4 e E6). Isso permite que a sonda também possa ser utilizada para testar e selecionar plantas herbáceas infectadas mecanicamente.

A utilização de sondas de ácidos nucleicos para a detecção de *Vitivirus* já havia sido relatada com sucesso (Minafra *et al.*, 1992b; Saldarelli, 1994). No entanto, em ambos os casos, foram verificados a interferência de substâncias inibidoras presentes na videira, como os taninos, o que requeria passos adicionais de purificação dos ácidos nucleicos. A metodologia para a detecção por sondas, apresentada nesse trabalho, dispensou o uso de colunas de afinidade que poderiam elevar os custos de aplicação da sonda na análise de um grande número de amostras e, mesmo sem o uso dessas colunas, não foram verificadas interferências das substâncias inibidoras na reação.

Os métodos biológicos, com transmissão por enxertia em variedades indicadoras (Kober 5BB, Niagara Rosada e LN33), têm grande importância em programas para produzir, manter e propagar material básico livre de vírus. Entretanto, a manifestação de sintomas característicos de infecção viral pode ocorrer somente dois anos após a enxertia (Minafra, 2000; Kuniyuki & Costa, 1982; Amorim & Kuniyuki, 1997), o que torna o teste bastante demorado. Associado a esses programas é premente a implantação de métodos de diagnóstico rápidos e confiáveis das viroses da videira no Brasil.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

As sondas produzidas apresentaram especificidade e sensibilidade na detecção do GVA e do GVB, podendo ser utilizadas como alternativa aos testes sorológicos para identificação desses vírus e para as triagens iniciais de material de videira destinado à propagação, desde que amostras adequadas sejam escolhidas para análise. A técnica de hibridização "dot-blot" utilizando essas sondas poderá ser empregada concomitante aos testes de indexação biológica por enxertia, que são ainda imprescindível nos programas de obtenção de material propagativo sadio de videira.

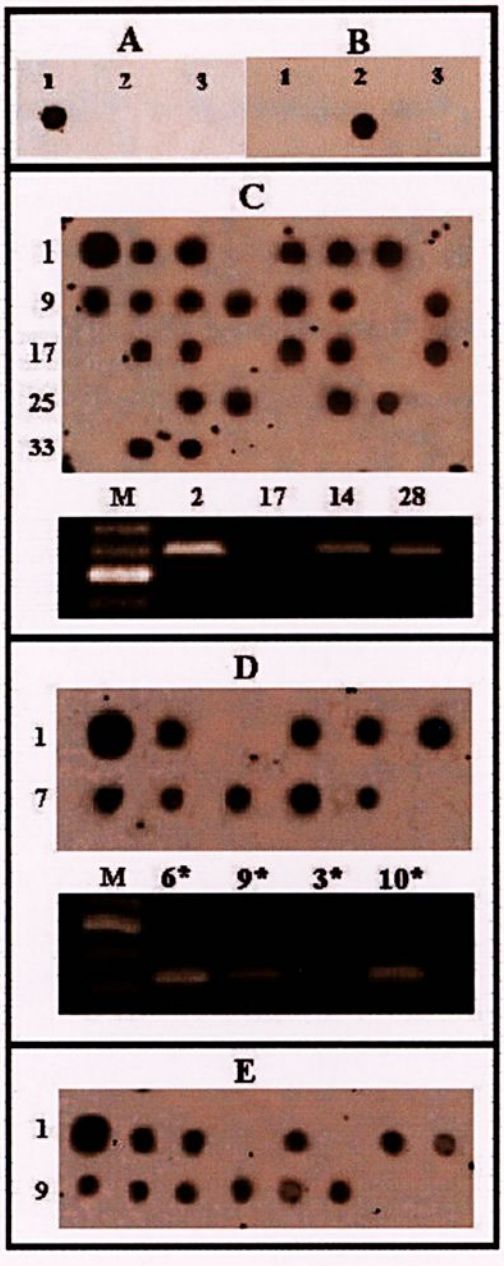


FIG.1- Hibridização "dot-blot" com sonda para o GVA (A) e GVB (B) em RNA total extraído de videira infectada com GVA (1), GVB (2) e RSPaV (3). C: Hibridização "dot blot" (sonda para o GVB) com RNA total extraído de folhas maduras de videira e análise dos produtos amplificados por RT-PCR (abaixo do "dot"). D: Hibridização "dot blot" (sonda para o GVA) com RNA total extraído de ramos dormentes de videira e análise dos produtos amplificados por RT-PCR (abaixo do "dot"). Os números das figuras C e D referem-se às variedades listadas nas tabelas 1 e 2. E: Hibridização "dot-blot" de *N. occidentalis* inoculadas mecanicamente com o GVB, 1: controle positivo, amostra 15: planta sadia.

TABELA 1 - Detecção do *Grapevine virus B* (GVB) por hibridização em amostras indexadas para o fendilhamento cortical (GCB) por teste biológico.

Nº	Variedades	Indexação Biológica*	Hibridização
1	Controle positivo: gene da CP	___	+
2	Niagara Branca (22.7954)	GCB-C	+
3	Niagara Branca (22.7953)	GCB-C	+
4	Niagara Branca (AG 1264)	Sadia	-
5	Rubi (22.7349)	GCB-C	+
6	Seibel 2 (SR 1644)	GCB-C	+
7	Seibel 2 (SR 1642)	GCB-C	+
8	Rupestris du Lot (VT 13)	Sadia	-
9	Niagara Rosada (17.1044)	GCB-C	+
10	Niagara Rosada (22.7951)	Possivelmente infectada	+
11	Niagara Branca (22.6354)	GCB-C	+
12	Cardinal (17.1038)	Possivelmente infectada	+
13	Itália (22.7352)	GCB-C	+
14	IAC 313 (VT 1766)	GCB-C	+
15	LN-33 (VT 1969-01)	Sadia	-
16	Rubi (17.1034)	GCB-C	+
17	Cardinal (Mo 1792a)	Possivelmente infectada	-
18	Rupestris du Lot (22.7242)	GCB-C	+
19	Itália (22.7353)	GCB-I	+
20	Isabel (SR 541)	Sadia	-
21	Rupestris du Lot (22.7238)	GCB-C	+
22	IAC 313 (22.7406)	GCB-C	+
23	IAC 313 (VT 1767)	Sadia	-
24	Isabel (22.6363)	GCB-I	+
25	Brasil (TP 1780)	Possivelmente infectada	-
26	Rubi (08.1178)	Sadia	-
27	Isabel (22.6364)	GCB-I	+
28	Niagara Rosada (17.1044)	Possivelmente infectada	+
29	Kober 5BB (AG 1267)	Sadia	-
30	Rupestris du Lot/Itália (22.6276)	GCB-I	+
31	Rupestris du Lot/Itália (22.6277)	GCB-I	+
32	LN-33 (08.2565)	Sadia	-
33	Itália (seedling 01/96)	Sadia	-
34	Rupestris du Lot/Rubi (22.7369)	GCB-I	+
35	Rupestris du Lot/Brasil (22.7368)	GCB-I	+
36	Brasil (seedling 01/03)	Sadia	-

*GCB-C: infectada pelo isolado comum; GCB-I: infectada pelo isolado Itália, +: presença de hibridização, -: ausência de hibridização.



TABELA 2- Detecção do *Grapevine virus A* (GVA) por hibridização em amostras indexadas para a acanaladura do lenho de Kober (KSG) por teste biológico.

Nº	Variedades	Indexação Biológica	Hibridização
1*	Controle positivo: gene da CP	___	+
2*	Kober 5BB/Niagara Rosada (22.6398)	KSG	+
3*	Kober 5BB (AC 1267)	Sadia	-
4*	Kober 5BB/Niagara Rosada (22.6403)	KSG	+
5*	Kober 5BB/Niagara Rosada (22.6833)	KSG	+
6*	Kober 5BB/Niagara Rosada (22.6857)	KSG	+
7*	Kober 5BB/Niagara Rosada (22.6858)	KSG	+
8*	Kober 5BB/Niagara Rosada (22.6866)	KSG	+
9*	Kober 5BB (SR 01)	Sadia	+
10*	Kober 5BB/Niagara Rosada (22.6875)	KSG	+
11*	IAC 766/Niagara Rosada (22.7093)	KSG	+

+:presença de hibridização, -: ausência de hibridização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 *Flexiviridade* and assessment of molecular criteria for species demarcation. Archives of Virology 149:1045-1060. 2004.

AMORIM, L. & KUNIYUKI, H. Doenças da videira. In: Kimati, H., Amorim, L., Bergamin, A., Camargo, L.E.A., Rezende, J.A.M. (Eds) Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas. São Paulo. Agronômica Ceres. 1997. pp. 736-757.

FAJARDO, T.V.M., SCHENATO, P.G., NICKEL, O. & KUHN, G.B. Detecção de três vírus em videiras com sondas não radioativas. Fitopatologia Brasileira 29:S94. 2004 (resumo).

KUHN, G.B. Intumescimento dos ramos da videira ("Corky Barky"), doença constatada no Rio Grande do Sul. Fitopatologia Brasileira 17:399-406. 1992.

KUNIYUKI, H. & COSTA, A.S. Estudos sobre a virose fendilhamento cortical da videira em São Paulo. Fitopatologia Brasileira 7:71-81. 1982.

KUNIYUKI, H., YUKI, V.A. & BETTI, J. A. Incidência da acanaladura do lenho de Kober em vinhedos no Estado de São Paulo. Fitopatologia Brasileira 22: 337. 1997 (Resumo).

KUNIYUKI, H., REZENDE, J.A.M., KITAJIMA, E.W. & BETTI, J. A. Detecção do *Grapevine virus B* em videiras com a doença de fendilhamento cortical. Fitopatologia Brasileira 25: 443. 2000 (Resumo).

MACKENZIE, D.J., MCLEAN, M.A., MUKERJI, S. & GREEN, M. Improved RNA extraction for woody plants for the detection of viral pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. Plant Disease 81:222-226. 1997.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

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

MINAFRA, A., HADIDI, A. & MARTELLI, G.P; Detection of grapevine closterovirus A in infected grapevine tissue by reverse transcription polymerase chain reaction. Vitis 31: 221-227. 1992a.

MINAFRA, A., RUSSO, M. & MARTELLI, G.P. Further studies on the use of molecular probes to grapevine closterovirus A. Vitis: 31, 87-93. 1992b.

MINAFRA, A. Rugose wood grapevines. Extended Abstracts, 13th ICVG Conference, Adelaide, Australia, 2000, pp. 30-34.

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 G*rapevine virus B* em videiras no Estado de São Paulo. Fitopatologia Brasileira 29:75-80. 2004a.

MOREIRA, A.E., GASPAR, J.O., CAMARGO, L.E.A. & KUNIYUKI, H. Caracterização do gene da proteína capsidial do *Grapevine virus A* em videiras afetadas pela acanaladura do lenho de Kober no Estado de São Paulo. Fitopatologia Brasileira 29:205-208. 2004b.

SALDARELLI, P., GUGLIELMI-MONTANO, H. & MARTELLI, G.P. Detection of three grapevine closterolike viruses by non-radioactive molecular probes. Vitis 33:157-170. 1994.

DISCUSSÃO

Capítulo Cinco

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

Atualmente, é conhecida a ocorrência de pelo menos sete importantes viroses nos vinhedos de São Paulo. São elas o enrolamento da folha, o mosaico das nervuras, a folha em leque e as viroses do complexo do lenho rugoso da videira que incluem a acanaladura do lenho de Kober, o fendilhamento cortical, o lenho estriado de Rupestris e a acanaladura do lenho de LN33 (Kuniyuki, 1978; Kuniyuki & Costa, 1982; Kuniyuki, 1989; Kuniyuki *et al.*, 1994; Kuniyuki *et al.*, 2001).

Os vírus causadores dessas doenças podem apresentar alta incidência em variedades tradicionais de copa e de porta-enxerto mais importantes para a viticultura de São Paulo (Kuniyuki & Costa, 1987). Essa incidência é conseqüência da perpetuação dos vírus pela propagação vegetativa das plantas inicialmente infectadas e, conseqüentemente, o controle das viroses pode ser feito de modo eficiente pelo emprego constante de material propagativo sadio (Amorim & Kuniyuki, 1997).

Para impedir a propagação dos vírus nos vinhedos, testes de sanidade devem ser feitos antes da utilização das mudas. No Brasil, a principal forma de diagnóstico utilizada são os testes biológicos com enxertia em videiras indicadoras (Kuniyuki, 1975; Kuniyuki & Costa, 1987; Kuhn, 1992; Kuhn, 1994; Kuniyuki & Costa, 1994; Kuniyuki *et al.*, 1997), cuja obtenção de resultados pode levar até dois anos, tornando esses testes bastante demorados.

Dessa forma, métodos alternativos de detecção de vírus em videiras que possam oferecer resultados rápidos e ao mesmo tempo confiáveis nas triagens iniciais do material de propagação seriam de grande interesse para a diminuição da incidência dos vírus nos vinhedos. Além disso, o fato de a maioria dos isolados

virais que ocorrem no Estado de São Paulo ainda não terem sido investigados em relação às suas características moleculares, torna interessante um estudo neste aspecto para que, no futuro, essas informações possam ser utilizadas para melhorar o controle das viroses de videira no Brasil.

Com o objetivo de contribuir para a resolução de alguns desses problemas, foram realizados os trabalhos descritos nesta Tese de Doutorado. A acanaladura do lenho de Kober e o fendilhamento cortical da videira, que constituem duas preocupantes viroses do complexo do lenho rugoso que ocorrem em vinhedos de São Paulo, foram escolhidos como tema central desta pesquisa. Foram, então, propostos a caracterização molecular dos vírus causadores dessas doenças e o desenvolvimento de um método molecular de diagnóstico mais rápido e seguro, aspectos importantes nos programas de seleção e produção de material propagativo livre de vírus de videira.

Nos dois primeiros artigos apresentados são relatados os resultados da caracterização do gene da proteína capsidial (CP) dos isolados comum (GVB-C-SP) e itália (GVB-I-SP) do GVB (primeiro artigo) e do isolado do GVA (segundo artigo) detectados no Estado de São Paulo com o objetivo de iniciar a caracterização molecular desses vírus.

Em ambos os trabalhos foram obtidos fragmentos amplificados via transcrição reversa (RT) seguida de PCR somente de videiras que apresentavam sintomas característicos de fendilhamento cortical ou de acanaladura do lenho, comprovando as relações do GVB e GVA com as respectivas doenças, relações estas já mostradas anteriormente por testes sorológicos (Kuniyuki *et al.*, 2000; Kuniyuki *et al.*, 2001).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

Pela metodologia padrão de clonagem, que envolve corte com enzima de restrição para seleção dos plasmídeos recombinantes, e com o posterior sequenciamento dos genes da CP dos isolados do GVB, pode-se notar a presença de um sítio interno de restrição para a enzima *Eco*RI no GVB-C-SP, sítio este ausente no gene do GVB-I-SP. A presença desse sítio de restrição não deve ser responsável pelas diferenças sintomatológicas observadas entre os isolados, uma vez que nessa região as trocas de nucleotídeos não levaram a mudanças nos aminoácidos especificados. No entanto, isso constitui um dado importante para a diferenciação dos dois isolados, que pode ser feita por um procedimento de digestão enzimática de amplificados do gene da proteína capsidial, sem haver a necessidade de sequenciamento.

Analisando as seqüências contidas no "GenBank" de outros isolados do GVB e de outras espécies de *Vitivirus*, verificou-se que esse mesmo sítio de restrição estava presente no isolado italiano do GVB (GVB-IT) e no *Heracleum latent virus* (HLV), estando alterado nos outros isolados do GVB, no GVA e no GVD. Comparando esses dados com os de filogenia, nota-se que correspondem com a proximidade observada entre os isolados do GVB e espécies do gênero.

Tanto para o GVB como para o GVA foram observadas variações mais acentuadas nas comparações da seqüência de nucleotídeos do que na seqüência de aminoácidos deduzidos entre isolados de diferentes regiões. Isso provêm do fato de que, para ambas as espécies virais, a maioria das trocas de nucleotídeos consistiram em alterações silenciosas, ou seja, que não levaram a mudanças no aminoácido especificado.

É conhecido que a taxa de evolução das seqüências de aminoácidos, em geral, é mais lenta do que a das seqüências de nucleotídeos (Russo, 2001). Além disso, o fato de a videira ser a única hospedeira natural tanto para o GVA como para o GVB (Martelli, 2000) deve limitar as variações mais acentuadas na seqüência de aminoácidos que poderiam alterar a estrutura da proteína capsidial e ocasionar perdas da especificidade com a hospedeira ou com o vetor.

A análise conjunta das árvores filogenéticas por parcimônia permite concluir que as espécies que apresentam maior similaridade dentro do gênero *Vitivirus* são GVA e GVD. A proximidade entre os dois vírus já havia sido relatada em outros trabalhos, tanto em relação à sorologia (Choueiri *et al.*, 1997b), como em relação a comparações na proteína capsidial (Fajardo *et al.*, 2003).

Uma regra geral estabelecida para a família *Flexiviridae* considera espécies distintas aquelas que possuem identidade de nucleotídeos e aminoácidos da proteína capsidial menor do que 72 e 80%, respectivamente. Dentro do gênero *Vitivirus,* esse mínimo é de 72,5% de identidade de nucleotídeos e 85,5% de aminoácidos para o referido gene (Adams *et al.*, 2004). Em ambos os trabalhos, os isolados do GVA e GVB analisados apresentaram valores maiores de identidade, inferindo tratar-se de isolados da mesma espécies.

As comparações das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos, bem como as análises filogenéticas, revelaram que o GVB-C-SP apresenta maior proximidade com o isolado do GVB descrito na Itália (GVB-IT), tanto no que diz respeito aos nucleotídeos como aos aminoácidos. Esses dois isolados apresentam sintomatologia bastante comum, ambos induzindo sintomas em diversas variedades de *Vitis* spp (Goidanich & Canova, 1963; Saldarelli *et al.*, 1996;

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

Kuniyuki *et al.*, 2000). Já o GVB-I-SP, apresentou maior valor de identidade com o isolado brasileiro descrito no Rio Grande do Sul (GVB-BR1), embora esses pareçam apresentar diferenças na sintomatologia (Kuhn, 1992; Kuniyuki, *et al.*, 2000; Nickel *et al.*, 2002). A proximidade observada entre esses isolados provavelmente indica intercâmbio de material entre os dois Estados ou origem comum do material propagativo estrangeiro.

Entre o GVB-C-SP e GVB-I-SP, houve alteração em oito dos 197 aminoácidos deduzidos da seqüência do gene da proteína capsidial. No entanto, não é possível afirmar que essas trocas de aminoácidos são responsáveis pelas diferenças sintomatológicas observadas entre os isolados. É necessário um estudo mais abrangente quanto à caracterização dos outros genes virais para esclarecer o fato do isolado GVB-I-SP ser assintomático nas variedades de *Vitis labrusca*.

O isolado do Japão (GVB-JP) foi o que apresentou menor identidade com os isolados paulistas, embora, na topologia de consenso, todos os isolados do GVB constituam um grupo monofilético em 100% das réplicas (*bootstrap* = 100), o que indica ancestralidade comum. O valor de *bootstrap,* apresentados nos ramos das árvores, refere-se a porcentagem de vezes que o mesmo grupamento apareceu nas árvores réplicas. Portanto, *booststrap* igual ou próximo a 100 revela a consistência dos dados analisados (Russo, 2001).

Quanto as análises do sequenciamento da CP do GVA-SP, esse também apresentou uma alta identidade com o isolado da Itália (GVA-IT) sendo, entretanto, mais similar a um isolado da África do Sul (GVA-AF). Já em relação ao isolado do Rio Grande do Sul (GVA-RS), os valores de identidade de nucleotídeos e aminoácidos da proteína capsidial foram os menores verificados,

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

indicando que os isolados brasileiros são menos relacionados entre si do que com os isolados do GVA de outros países.

A proximidade dos isolados do GVA e GVB encontrados em São Paulo com os respectivos isolados da Itália era um dado esperado, uma vez que as variedades iniciais de videira introduzidas no Brasil foram, em geral, oriundas desse país e através delas as viroses se propagaram nos vinhedos (Amorim & Kuniyuki, 1997). Na África do Sul também há uma alta incidência de viroses de videira devido à utilização de porta-enxerto de origem européia a partir do século vinte. A proximidade verificada entre o GVA-SP e GVA-AF provavelmente resulta da origem comum de material propagativo estrangeiro, oriundo da Itália, dado a identidade de ambos com o GVA-IT.

Nesses dois trabalhos foi verificado que a técnica de RT-PCR permitiu uma rápida e sensível detecção do GVA e GVB em videiras. No entanto, a necessidade de colunas de afinidade para eliminar as substâncias inibidoras presentes na videira torna a prática inviável para aplicação em grande número de amostras, embora essa possa ser uma ferramenta importante para exame de material inicial de propagação.

O terceiro trabalho apresentado teve como objetivo propor uma metodologia de detecção do GVA e GVB. As dificuldades na detecção desses e dos outros *Vitivirus* que infectam a videira, relacionam-se ao fato de serem latentes em muitas variedades comerciais, estarem restritos ao floema da videira, apresentarem distribuição irregular nos tecidos da hospedeira e uma concentração variável com as épocas do ano (Boscia *et al.*, 1992; Minafra, 2000). Em geral, o título viral nas células da planta aumenta gradativamente com o período

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

vegetativo e atinge o máximo no outono, sendo ainda bastante baixo (Bonavia *et al.*, Minafra, 2000). A associação dessas características com a baixa antigenicidade viral, dificultam a detecção por métodos sorológicos, principalmente nas épocas em que a concentração viral está abaixo do limite de detecção ou mesmo com a natureza do tecido utilizado (Bonavia *et al.*, 1996; Fazeli *et al.*, 1998; Routh *et al.*, 1998).

Os métodos biológicos, com transmissão por enxertia em variedades indicadoras ('Kober 5BB', 'Niagara Rosada' e 'LN33'), têm grande importância em programas para produzir, manter e propagar material básico livre de vírus. Entretanto, a manifestação de sintomas característicos de infecção viral pode ocorre somente entre 6 e 24 meses para o fendilhamento cortical e entre 36 e 48 meses para a acanaladura do lenho de Kober (Minafra, 2000; Kuniyuki & Costa, 1982; Amorim & Kuniyuki, 1997), o que torna o teste bastante demorado. Apesar disso, a utilização de outras técnicas para a detecção de vírus de videira no Brasil é ainda incipiente (Fajardo *et al.*, 2004).

Com base nesses conhecimentos, foi utilizada a hibridização "dot-blot" com sondas moleculares não radioativas de cDNA como técnica alternativa para detecção do GVA e GVB em videiras e em plantas de fumo inoculadas mecanicamente.

Inicialmente foram realizados testes de especificidade das sondas com o RNA complementar e com RNA de outros vírus. Ambas as sondas mostraram-se específicas, hibridizando somente com o seu RNA complementar e permitindo a continuidade dos experimentos.

Para averiguar a eficiência da sonda produzida na detecção do GVA e GVB, utilizaram-se amostras de diversas variedades de videiras previamente submetidas aos testes de indexação biológica. Algumas dessas eram consideradas suspeitas ou possivelmente infectadas pelo fato de não terem apresentado sintomas definidos no primeiro ciclo vegetativo.

Foram testados folhas novas, maduras e ramos dormentes ou próximos á dormência com o intuito de avaliar a melhor resposta obtida na metodologia de diagnóstico. Esta resposta foi variável nas duas espécies virais. Quanto ao GVB, a obtenção de melhores resultados em amostras de folhas maduras de videira e ramos dormentes sugere uma boa concentração viral nesses tecidos. Nos testes para o GVA, somente quando foram utilizadas amostras de tecidos dos ramos (região do floema) é que se obteve hibridização correspondente aos resultados da indexação, mostrando que a concentração do vírus é baixa nas folhas.

Com esses resultados, conclui-se que nos testes de diagnóstico por hibridização com sonda, devem ser utilizados, de preferência, folhas maduras para a detecção do GVB e ramos dormentes ou próximos da dormência para a detecção do GVA. Em períodos de dormência, os ramos também podem ser utilizados para a detecção do GVB com eficiência comparável à das folhas maduras. Folhas novas ou em brotação não devem ser utilizadas, pois ao que tudo indica, a concentração viral nessas é baixa, tanto para o GVB como para o GVA, ficando os vírus concentrados no floema dos ramos. O vírus provavelmente só se acumula nas folhas quando há um aumento acentuado na concentração viral. Essas observações concordam com outras realizadas em testes de ELISA, nos quais as melhores respostas na detecção do GVB foram obtidas com a utilização de ramos

maduros coletados no outono, estação em que a planta esta no final de seu ciclo vegetativo e os vírus atingem o máximo de concentração (Bonavia *et al.*, 1996).

De modo geral, os resultados de hibridização foram concordantes com aqueles fornecidos pela indexação biológica e pelas amplificações por RT-PCR realizados com algumas das amostras, comprovando a eficácia da sonda na detecção viral, quando o tecido adequado é utilizado.

A detecção do vírus em *N. occidentalis* inoculada mecanicamente com o GVB-C-SP mostrou que a sonda também pode ser utilizada para testar e selecionar plantas herbáceas infectadas mecanicamente.

A utilização de sondas de ácidos nucleicos para a detecção de *Vitivirus* já havia sido relatada com sucesso (Minafra *et al.*, 1992b; Saldarelli 1994). No entanto, em ambos os casos, foram verificadas interferências de substâncias inibidoras presentes na videira, como os taninos, o que requeria passos adicionais de purificação. A metodologia para a detecção por sondas apresentada nesta Tese dispensou o uso de colunas de afinidade que poderiam elevar os custos da aplicação da sonda na análise de um grande número de amostras e, mesmo sem o uso dessas colunas, não foram verificadas interferências das substâncias inibidoras na reação. Embora sejam menos sensíveis do que a PCR, a utilização de sondas de DNA é um procedimento molecular mais viável para a detecção em larga escala.

Os tradicionais países produtores de uva há muito estabeleceram sistemas de limpeza clonal e distribuição de material propagativo livre de vírus. No Brasil, instituições como o Instituto Agronômico de Campinas e a Embrapa/CNPUV (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho), vêm à cerca de 20 anos desenvolvendo um programa de produção e

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

comercialização de material propagativo e matrizes de videira livre de vírus. Associado a esses programas é premente a implantação de métodos de diagnóstico rápidos e confiáveis dessas viroses no Brasil.

As sondas moleculares produzidas mostraram especificidade e sensibilidade na detecção do GVA e do GVB, podendo ser utilizadas como alternativa aos testes sorológicos para identificação desses vírus e para as triagens iniciais de material de videira destinado à propagação, desde que amostras adequadas sejam escolhidas para análise. Essas sondas poderão ser empregadas concomitantemente com os testes de indexação biológica por enxertia, que são ainda imprescindíveis nos programas de obtenção de material propagativo sadio de videira.

É importante ainda ressaltar que vários isolados virais de videira que ocorrem no Brasil ainda aguardam elucidação de suas características moleculares. À medida que os dados de caracterização desses isolados continuem a ser acumulados, provavelmente haverá condições para o desenvolvimento de técnicas de detecção mais rápidas e mais sensíveis, contribuindo sobremaneira para a melhor execução de programas de controle de viroses da videira e, conseqüentemente, para melhor racionalização fitossanitária da viticultura paulista e de outras áreas vinícolas do país.

CONCLUSÕES

Capítulo Seis

O presente trabalho permitiu concluir que:

1- Os isolados comum (GVB-C-SP) e itália (GVB-I-SP) do *Grapevine virus B* encontrados no Estado de São Paulo estão associados com a doença fendilhamento cortical da videira ("grapevine corky bark"), enquanto que o isolado do *Grapevine virus A* (GVA-SP) está associado á acanaladura do lenho de Kober ("Kober stem grooving");

2- Os isolados GVB-C-SP e GVB-I-SP podem ser distinguidos por digestão com enzima de restrição *Eco*-RI no gene da proteína capsidial;

3- Em relação ao gene da proteína capsidial, o isolado GVB-C-SP apresenta maior identidade com um isolado do GVB descrito na Itália, enquanto que o GVB-I-SP é mais próximo ao isolado do Rio Grande do Sul;

4- Quanto à seqüência da proteína capsidial, o GVA-SP apresenta maior identidade com os isolados da África do Sul e Itália;

5- A hibridização "dot-blot" com sondas moleculares não radioativas é um método eficaz de diagnóstico quando ramos dormentes ou folhas maduras de videira são utilizados para a detecção do GVB e apenas ramos dormentes de videiras para a detecção do GVA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-GHANEM, N.; SADARELLI, P.; MINAFRA, A.; CASTELLANO, M. A.; MARTELLI, G. P. Properties of grapevine virus D, a novel putative trichovirus. **Journal of Plant Pathology**, v. 79, p. 1-11, 1997.

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 *Flexiviridade* and assessment of molecular criteria for species demarcation. **Archives of Virology,** v.149, p.1045-1060, 2004.

AMORIM, L.; KUNIYUKI, H. Doenças da videira. In: **Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas, (**Kimati H., Amorim L., Bergamin A., Aranha L.E.A., Rezende J.A.M., eds). São Paulo. Agronômica Ceres. 1997. pp. 736-757.

AUGER, J.; ARANCIBIA, R. Selective elimination by heat treatment and meristem culture of closterovirus associated with leafroll in grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Black Seedless. **Proceedings 10 th Meeting of ICVG, Volos,** p. 325-335, 1990.

BARLASS, M. Elimination of stem pitting and corky bark diseases from grapevine by fragmented shoot apex culture. **Annals of applied Biology**, v.110, p. 653-656, 1987.

BAULCOMBE, D. C. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. **Plant Cell**, v.8, p.1833-1844, 1996.

BELLI, G. Rassegna della ricerche sulle virose della vite. **Rivista di Patología Vegetale**, v. V, p. 17-36, 1969.

BEUKMAN, E. F.; GOHEEN, A. C. Grape corky bark. In: **Virus diseases of small fruits and grapevines**. Berkeley, University of California/ Division Agricultural Sciences. 1970. p. 207-209.

BONAVIA, M.; DIGIARO, M.; BOSCIA, D.; BOARI, A.; BOTTALICO, G. Studies on "corky rugose wood" of grapevine and on the diagnosis of grapevine virus B. **Vitis**, v. 35, p. 53-58, 1996.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

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, p.185-194, 1992.

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

BOSCIA, D.; MINAFRA, A.; MARTELLI, G. P. Filamentous viruses of the grapevine: Putative trichovirus and capilloviruses. In: **Filamentous Viruses of Woody Plants** (Monette P.L., ed.), Research Signpost, Trivandrum, India, pp. 19-28, 1997.

CHEVALIER, S.; GREIF, C.; CLAUZEL J. M.; WALTER, B.; FRITSCH, C. Use of an immunocapture-polymerase chain reaction procedure for the detection of grapevine virus A in Kober stem grooving-infected grapevines. **Journal of Phytopathology**, v. 143, p. 369-373, 1995.

CHOUDHURY, M. M.; COSTA, T. S.; ARAÚJO, J. L. P. Agronegócio de uvas de mesa. In: **Uvas de Mesa Pós-Colheita** (CHOUDHURY M.M., ed.) Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF, p. 9-16, 2001.

CHOUEIRI, E.; DIGIARO, M.; SAVINO, V. Further evidence that Grapevine virus A is the agent of Kober stem grooving. **Extended Abstracts, 12th Meeting of the ICVG**, Lisboa, Portugal, p. 39, 1997a.

CHOUEIRI, E.; ABOU-GHANEM, N.; BOSCIA, D. Grapevine virus A and grapevine virus D are serologically distantly related. **Vitis**, v. 36, p. 39-41, 1997b.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants.** Columbia University Press, New York, 1981. 1262p.

ENGELBRECHT, D. J.; HUMAN, R. Absence of grapevine virus A correlated with elimination of leafroll disease. **Proceedings 9 th Meeting of ICVG**, Kiryat Anavim, p. 159-163, 1989.

FAJARDO, T. V. M.; KUHN, G. B.; EIRAS, M.; NICKEL, O. Caracterização parcial de um isolado do *Grapevine fanleaf virus*. **Fitopatologia brasileira**, v. 25, 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, p. 58-64, 2002.

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

FAJARDO, T.V.M.; SCHENATO, P.G.; NICKEL, O.; KUHN, G.B. Detecção de três vírus em videiras com sondas não radioativas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. S94. 2004.

FAORO, F. Cytopathology of closteroviruses and trichoviruses infecting grapevines. In: **Filamentous viruses of woody plants** (Monette P.L., ed). Reserch Signpost, Trivandrum, 1997.

FAZELI, C. F.; NUREDIN, H.; 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.

FORTUSINI, A.; SCATTINI, G.; PRATI, S.; CINQUANTA, S.; BELLI, G. Transmission of grapevine leafroll virus 1 (GLRV-1) and grapevine virus A (GVA) by scale insects. **Extended Abstracts 12 th Meeting of ICVG**, Lisbon, p. 121-122, 1997.

GALLIAKPAROV, N.; GOSZCZYNSKI, D. E.; CHE, X.; BATUMAN, O.; BAR-JOSEPH, M.; MAWASSI, M. Two classes of subgenomic RNA of grapevine virus A produced by internal controller elements. **Virology**, v. 312, p. 434-448, 2003.

GARAU, R.; FROTA, V. A.; PIREDDA, A.; BOSCIA, D.; PROTA, U. On the possible relationship between Kober stem grooving and grapevine virus A. **Vitis**, v. 33, p.161-163, 1994.

GOHEEN, A. C.; HEWITT, W. B.; ALLEY, C. J. Studies of grape leafroll in California. **Am. Journal Enol. Vitic.** v.10, p. 78-84, 1959.

GOHEEN, A. C. Virus and viruslike diseases of the grapes. **Hortscience**, v.12, p.465-469, 1977.

GOIDANICH, G.; CANOVA, A. La suberose corticale della vite. Una malatia da virus. **Phytopathology Mediterranean,** v. 2, p. 295-297, 1963.

GONÇALVES, J. S.; SOUZA, S. A. Por que o Chile exporta mais frutas frescas que o Brasil? **Informações econômicas**, v. 28, p. 54-57, 1998.

GOSZCZYNSKI, D. E.; KASDORF, G. G. F.; PIETERSEN, G. Western blots reveal that grapevine viruses A and B are serologically related. **Journal of Phytopathology**, v. 144, p. 581-583, 1996.

GRANITI, A.; CICCARONE, A. Observazioni su alterazioni virosiche e virus-simili della vite in Puglia. **Notiziario Sulle Malattie Delle Piante**, v. 55, p. 99-102, 1961.

GUGERLI, P. Grapevine leafroll and related viruses. In: **Extended Abstracts 14 th Meetong ICVG,** Locorotondo (Bari), Italy, p.25-31, 2003.

HABILI, N.; SYMONS, R. H. Grapevine viruses detected by Wait diagnostics in Australia. In: **Extended Abstracts 13 th Meeting ICVG**, Adelaide, Australia, p. 124-126, 2000.

HEVIN, M.; MOUTOUS, G.; FOS, A. Transmission de la Flavescence doree par greffage en vert et presence du "Corky Bark" sur cepage corse (Nielluccio). **Connaissance de la Vigne et du Vin,** v. 12, p. 79-86, 1978.

HEWITT, W. B. Some virus and virus-like diseases of grapevines. California **Department of Agriculture Bulletin,** v. 43, p.47-64, 1954.

HEWITT, W. B. Viruses and virus diseases of the grapevine. **Review of Applied Mycology**, v. 47, p. 433-455, 1968

KUHN, G. B; Efeitos causados pelo vírus do enrolamento da folha da videira no cultivar Cabernet Franc. **Fitopatologia Brasileira**, v. 14, p. 280-283, 1989.

KUHN, G. B. Intumescimento dos ramos da videira ("Corky Bark"), doença constatada no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, p. 399-406, 1992.

KUHN, G. B. Manchas das nervuras da folha da videira (*Vitis* spp.), doença constatada no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 639-643, 2002.

KUHN, G. B; FAJARDO, T.V.M. **Viroses da Videira no Brasil**, 2004. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/viticultura/complrug.html>. Acesso em 10 out. 2004.

KUHN, G. B; FAJARDO, T.V.M.; NICKEL, O. Detecção serológica do vírus do enrolamento da folha da videira (GLRaV) 1 e 3. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 35, 1997.

KUHN, G. B.; FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O. Detecção biológica de três vírus do complexo rugoso da videira causador de caneluras. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. S207, 2002.

KUNIYUKI, H. Evidência preliminar de transmissão do enrolamento (vermelhão ou amarelo) da videira em São Paulo. Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, v.5, p.165-166, 1972a.

KUNIYUKI, H. Nota sobre a ocorrência do "cascudo", moléstia semelhante ao "legno riccio" em São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, v. 5, p.137, 1972b.

KUNIYUKI, H. Identificação do fendilhamento cortical (corky bark) em vinhedos do Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, v. 6, p. 153-154, 1975.

KUNIYUKI, H. **Estudos sobre a virose enrolamento da folha da videira no Estado de São Paulo.** Piracicaba, 1978. 74 f. Dissertação (Mestrado) – ESALQ/USP.

KUNIYUKI, H. **Vírus do mosaico das nervuras da videira no Estado de São Paulo.** Piracicaba, 1989. 96 f. Tese (Doutorado) – ESALQ/USP.

KUNIYUKI, H.; COSTA, A. S. Estudos sobre a virose fendilhamento cortical da videira em São Paulo. **Fitopatologia Brasileira,** v. 7, p. 71-81, 1982.

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

KUNIYUKI, H.; COSTA, A. S. Caneluras no porta-enxerto Kober 5BB são provavelmente causadas por um novo isolado do vírus do cascudo da videira. **Summa Phytopathologica,** v. 18, p. 13, 1992.

KUNIYUKI, H.; COSTA, A. S. Mosaico das nervuras, uma virose da videira em São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 20, p. 152-157, 1994.

KUNIYUKI, H.; MARTINS, F. P.; TERRA, M. M.; PIRES, E. J. P. Não-transmissibilidade de quatro vírus da videira através da semente. **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, p. 278-281, 1992.

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

KUNIYUKI, H.; YUKI, V.A.; BETTI, J. A. Incidência da acanaladura do lenho de Kober em vinhedos no Estado de São Paulo. **Fitopatologia brasileira ,** v. 22, p.333, 1997.

KUNIYUKI, H.; RESENDE, J. A. M.; KITAJIMA, E. W.; BETTI, J. A. Detecção do *Grapevine virus B* em videiras com a doença de fendilhamento cortical. **Fitopatologia brasileira**, v. 25, p. 443, 2000.

KUNIYUKI, H.; REZENDE, J. A. M; YUKI, V. A.; BETTI, J. A. Detecção serológica do *Grapevine virus A* em vinhedos do Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 27, p. 116-117, 2001.

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

LIMA, M. F. Principais viroses de videira. In: **Uvas de Mesa: Fitossanidade** (Lima M.F., ed). Brasília. Embrapa Informação Tecnológica, p. 35-44, 2002.

LINDBO, J. A.; SILVA-ROSALES, L.; PROEBSTING, W .M.; DOUGHERTY, W. G. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. **Plant Cell**, v.5, p. 1749-1759, 1993.

LING, K. S.; ZHU, H. Y.; DRONG, R. F.; SLIGHTOM, J. L.; MCFERSON, J. R.; GONSALVES, D. Nucleotide sequence of the 3'terminal two-thirds of the grapevine leafroll-associated virus 3 genome reveals a typical monopartite closterovirus. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 1299-1307, 1998.

MACKENZIE, D. J.; MCLEAN, M. A.; MUKERJI, S.; GREEN, M. Improved RNA extraction for woody plants for the detection of viral pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. **Plant Disease**, v. 81, p. 222-226, 1997.

MARTELLI, G. P. Virus and virus-like diseases of the grapevines in a Mediterranean areas. **FAO Plant Protection Bulletin**, v. 34, p. 25-42, 1986.

MARTELLI, G. P. Grapevine virology highlights 1997-1999. **Extended Abstracts. 13 th Meeting of ICVG**, Adelaide, Australia, p. 1-5, 2000.

MARTELLI, G.P. Grapevine fanleaf virus. In: **Descriptions of Plant Viruses** (Jones, T., Robinson D.; Boonham, N.; Munford, R., eds.). N° 385. 2001. Disponível em: <http://www3.res.bbsrc.ac.uk/webdpv/web/adpv.asp?dpvnum=385>. Acesso em abril de 2003.

MARTELLI, G.P. Grapevine virology highlights 2000-2003. **Extended Abstracts. 14 th Meeting of ICVG**, Locorotondo, Italy, p. 03-10, 2003.

MARTELLI, G. P.; SAVINO, V. Fanleaf degeneration. In: **Compendium of grape diseases,** (Pearson R.G. & Goheen A.C., eds.), St Paul: APS Press, p. 48-49, 1994.

MARTELLI, G. P.; CANDRESSE, T.; NAMBA, S. Trichovirus, a new genus of plant viruses. **Archives of Virology**, v. 134, p. 451-455, 1994.

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

MARTELLI, G. P.; CONTI, M.; MINAFRA, A. Grapevine virus A. In: **Descriptions of Plant Viruses** (Jones T., Robinson D., Boonham N. & Munford R, eds.). N°. 383. 2001. Disponível em: <http://www3.res. bbsrc.ac.uk/ webdpv /web/ adpv.asp?dpvnum=383>. Acesso em abril de 2003.

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

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

MARTIN, R. R.; JAMES, D.; LÉVESQUE, C. A. Impact of molecular diagnostic technologies on plant disease management. **Annual Rev. Phytopatology**, v. 38, p. 207-239, 2000.

MELLO, L. M. R. **Atuação do Brasil no Mercado Internacional de Uvas e Vinhos: Panorama 2002**, 2002. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/>. Acesso em abril de 2003.

MELLO, L. M. R. **Atuação do Brasil no Mercado Internacional de Uvas e Vinhos: Panorama 2003**, 2003. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/>. Acesso em junho de 2004.

MINAFRA, A. Rugose wood grapevines. In: **Extended Abstracts 13 th ICVG Conference,** Adelaide, Australia, 30-34, 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. 46, p. 175-188, 1994.

MINAFRA, A.; HADIDI, A.; MARTELLI, G. P; Detection of grapevine closterovirus A in infected grapevine tissue by reverse transcription polymerase chain reaction. **Vitis,** v. 31, p. 221-227, 1992a.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

MINAFRA, A.; RUSSO, M.; MARTELLI, G. P. Further studies on the use of molecular probes to grapevine closterovirus A. **Vitis**, v. 31, p. 87-93, 1992b.

MINAFRA, A.; SALDARELLI, P.; MARTELLI, G. P. Grapevine virus A: nucleotide sequence, genome organization, and relationship in the Trichovirus genus. **Archives of Virology,** v. 142, p. 417-423, 1998a.

MINAFRA, A.; SALDARELLI, P.; DA CAMARA MACHADO, A.; BUZKAN, N.; SAVINO, V.; MARTELLI, G. P.; KATINGER, H.; LAIMER DA CAMARA MACHADO, M. Expression of the coat protein genes of grapevine virus A and B in *Nicotiana* species and evaluation of a resistance conferred on transgenic plants. **Journal of Plant Pathology**, v. 80, p. 197-202, 1998b.

MONETTE, P. L.; JAMES, D. Detection of a closteroviruslike particle from a corky bark- affected grapevine cultivar. **Vitis**, v.30, p. 37-43, 1991.

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

PAPPU, H. R.; PAPPU, S. S.; KANO, T.; KOIZUMI, M.; CAMBRA, M.; MORENO, P.; SU, H. J.; GARNSY, S. M.; LEE, R. F.; NIBLETT, C. L.; Mutagenic analysis and localization of a highly conserved epitope near the amino terminal end of the citrus tristeza closterovirus capsid protein. **Phytopathology**, v. 85, p. 1311-1315, 1995.

RADIAN-SADE, S.; PERL, A.; EDELBAUM, O.; KUZNETSOVA, L.; GAFNY, R.; SELA, I.; TANNE, E. Transgenic *Nicotiana benthamiana* and grapevine plants transformed with Grapevine virus A (GVA) sequences. **Phytoparasitica**, v. 28, p. 1-8, 2000.

ROUTH, G. R.; ZHANG, Y. P.; SALDARELLI, P.; ROSWHANI, A. Use of degenerate primers for partial sequencing and RT-PCR-based assays of grapevine leafroll-associated viruses 4 and 5. **Phytopathology**, v. 88, p. 1238-1243, 1998.

RUBINSON, E.; GALIAKPAROV, N. RADIAN, S.; SELA, I.; TANNE, E.; GAFNY, R. Serologycal detection of grapevine virus A using antiserum to a non-

structural protein, the putative movement protein. **Phytopathology**, v. 87, p.1041-1045, 1997.

RUSSO, C. A. M. Como escolher genes para problemas filogenéticos específicos. In: Matioli, S.R. (Ed) **Bilogia Molecular e Evolução.** Holos Editora, 2001. pp.130-136.

SABANADZOVIC, S.; ABOU-GHANEM, P.; SALDARELLI, P.; MARTELLI, G. P. *Grapevine fleck virus* as the type species of a possible new genus of plant viruses. **Extended Abstracts 13 th ICVG**, Adelaide, p.70, 2000.

SALDARELLI, P.; GUGLIELMI-MONTANO, H.; MARTELLI, G. P. Detection of three grapevine closterolike viruses by non-radioactive molecular probes. **Vitis,** v. 33, p. 157-170, 1994.

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

SALDARELLI, P.; MINAFRA, A.; MARTINELLI, D; COSTA, M. A.; CASTELLANO, E.; POZNANSKI, E. Putative movement proteins of grapevine viruses A and B: immunodetection in vivo and use for transformation of Nicotiana plants. **Extended Abstracts 12th Meeting of ICVG**, Lisbon, p. 145, 1997.

SANTOS, M. T.; MANSINHO, A.; CORREIA, P. K.; SEQUEIRA, O. A.; NOLASCO, G. Multiple detection of grapevine filamentous viruses in Portugal, by RT-PCR from dsRNA templates. **Extended Abstracts 13th ICVG**, Adelaide, Australia, p. 129, 2000.

SAVINO, V.; BOSCIA, D.; MARTELLI, G. P. Rugose wood complex of grapevine: can grafting to Vitis indicators discriminate between diseases? **Proceedings, 9th Meeting of the ICVG,** Kiryat Anavim, p. 91-94, 1989.

SOUSA, J. S. I. **Uvas para o Brasil**. FEALQ, v.1.1996, pp. 791.

TANAKA, S. Indexing grapes in Japan for viruses. **Annals of the Phytopathological Society, Japan**, v. 42, p. 192-196, 1976.

TELIZ, D.; GOHEEN, A. C. Diseases of grapevines in Mexico. **Plant Disease Reporter**, v. 52, p. 372-373, 1968.

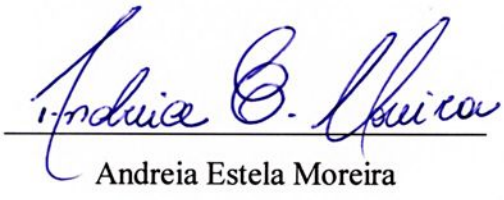
VAN REGENMORTEL, M. H. V. **Serology and immunochemistry of plant viruses**. Academic Press, New York, 1982.

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

ZHU, H. Y.; LING, K. S.; GOSZCZYNSKI, D. E.; MCFERSON, J. R.; GONSALVES, D. Nucleotide sequence and genome organization of grapevine lefroll-associated virus 2 are similar to beet yellows virus, the closterovirus type member. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 1289-1298, 1998.

Autorizo a reprodução deste trabalho

São José do Rio Preto, 09/11/2004



Andreia Estela Moreira

