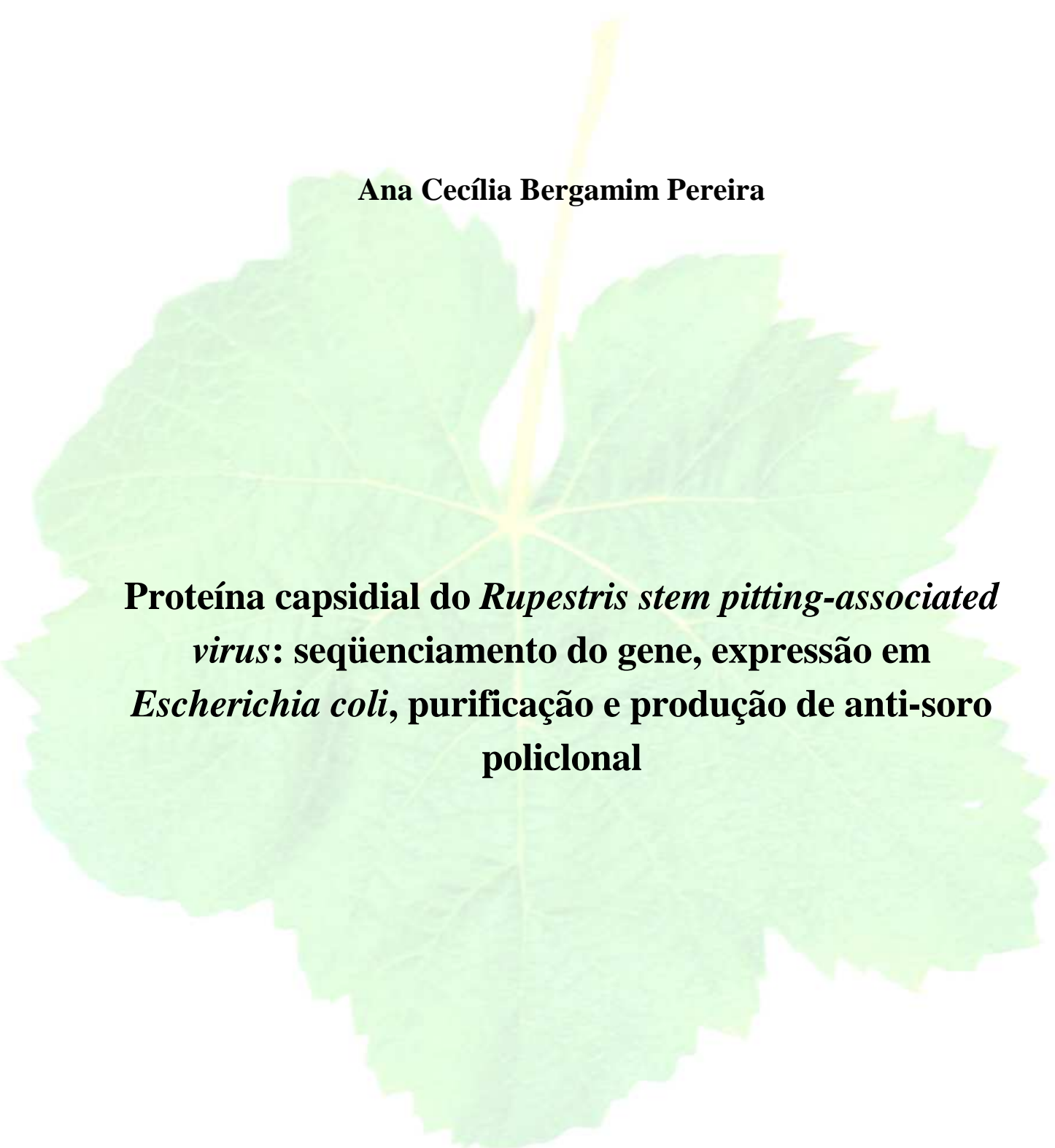


Ana Cecília Bergamim Pereira



Proteína capsidial do *Rupestris stem pitting-associated virus*: seqüenciamento do gene, expressão em *Escherichia coli*, purificação e produção de anti-soro policlonal

Ana Cecília Bergamim Pereira

Proteína capsidial do *Rupestris stem pitting-associated virus*: seqüenciamento do gene, expressão em *Escherichia coli*, purificação e produção de anti-soro policlonal

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto, para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. José Osmar Gaspar

Pereira, Ana Cecília Bergamim.

Proteína capsial do *Rupestris stem pitting-associated virus* :
sequenciamento do gene, expressão em *Escherichia coli*, purificação e
produção de anti-soro policlonal / Ana Cecília Bergamim Pereira - São
José do Rio Preto : [s.n.], 2008.

66 f. : il ; 30 cm.

Orientador: José Osmar Gaspar
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biotecnologia, Letras e Ciências Exatas

1. Fitopatologia. 2. Vírus de plantas. 3. Videira. 4. Lenho estriado
de rupestris ou cascudo. 5. *Rupestris stem pitting-associated virus*. 6.
Proteína capsial - sequenciamento - anti-soro policlonal. I. Gaspar,
José Osmar. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biotecnologia,
Letras e Ciências Exatas. III. Título

CDU -581.2

Ana Cecília Bergamim Pereira

Proteína capsial do *Rupestris stem pitting-associated virus*: seqüenciamento do gene, expressão em *Escherichia coli*, purificação e produção de anti-soro policlonal

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de Virologia junto ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Osmar Gaspar
Professor Assistente Efetivo
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Hugo Kuniyuki
Pesquisador Científico VI
Instituto Agrônômico de Campinas

Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza
Professora Colaboradora
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 13 de março de 2008.

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 “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Ao término deste trabalho volto meus olhos a Deus, Autor e Conservador de toda a vida, a Ele agradeço por ter cuidado, abençoado e dirigido a minha vida durante todos estes anos de muito aprendizado, colocando pessoas tão especiais ao meu lado.

"Com efeito, grandes cousas fez o Senhor por nós, por isso estamos alegres."

Salmo 126:3

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador e mestre, Prof. Dr. José Osmar Gaspar, pelo incentivo e conselhos que me foram tão importantes e pela paciência e confiança para investir na minha formação. Por ter sido tão compreensivo nos meus momentos de dúvidas e angústias, pelo carinho em compartilhar as suas experiências e mais ainda, a sua amizade durante estes 7 anos de convivência.

Ao nosso colaborador e amigo, o Prof. Dr. Hugo Kuniyuki, que sempre esteve à disposição para me auxiliar no desenvolvimento deste trabalho. Pela atenção, confiança e amizade que dedicou desde o nosso primeiro contato.

AGRADECIMENTOS

À minha família que esteve distante fisicamente, mas tão presente em meu coração. Aos meus amados pais Ricardo José e Maria Cecília por todo amor, ensinamentos e sábios conselhos. Vocês são exemplos de vida e perseverança. Aos meus irmãos Ricardo Jr. e Elza Cecília e sua família pelo incentivo, amor e carinho. Amo muito todos vocês.

Aos meus avós Arlindo (*in memoriam*) e Olga pelo apoio, amor e atenção que a mim dedicaram durante todos os anos da minha graduação. O apoio deles foi fundamental para mais esta conquista.

Ao meu querido Juan Carlos, que tão distante a maior parte do tempo, soube ser paciente e compreensivo, incentivando as minhas escolhas e me esperando com muito amor.

Aos meus amigos do Laboratório de Fitovirologia: Ana Cláudia, Andréia, Lívia, Luciana, Priscila, Ricardo e Tadaiti. Obrigada pelos conselhos, apoio, amizade e por compartilhar as minhas alegrias e também os meus problemas. Em especial, agradeço a Priscila, por estar sempre disposta a me ajudar com seus conselhos em tantos momentos de indecisão.

À minha amiga Ana Paula por todo apoio, carinho e atenção.

À minha amiga Lívia Botta pela convivência e amizade.

Aos meus amigos da graduação e do mestrado pela convivência, confidências, riso farto e cumplicidade.

À direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas pelo ensino, pesquisa e apoio para a realização deste trabalho.

A todos os professores do curso de Graduação em Ciências Biológicas deste instituto, pelos ensinamentos, auxílio e amizade.

Ao curso de Pós Graduação em Microbiologia do IBILCE/Unesp, especialmente à Profa. Dra. Paula Rahal, pela coordenação e dedicação que desprende ao curso de Pós Graduação a cada dia e pela amizade a mim dedicada.

A todos os funcionários deste instituto pela convivência agradável e auxílio na resolução dos problemas cotidianos. Em especial, a Maria Helena Carabolante, pela dedicação e auxílio nas horas de dificuldade.

Aos professores Dr. Hugo Kuniyuki e Dra. Fátima Pereira de Souza, pela disponibilidade na composição da banca. Agradeço as sugestões que contribuirão sobremaneira para a melhoria deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jorge A. M. Rezende, pelo auxílio na produção do anti-soro e pela colaboração para realização dos testes de ELISA.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo suporte financeiro.

RESUMO

PEREIRA, A.C.B. Proteína capsial do *Rupestris stem pitting-associated virus*: seqüenciamento do gene, expressão em *Escherichia coli*, purificação e produção de anti-soro policlonal. São José do Rio Preto, 2008. 66p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

O lenho estriado de rupestris ou cascudo (*Rupestris stem pitting* – RSP), um dos componentes do Complexo do lenho rugoso (“Rugose wood” - RW), é considerado uma das doenças de videira transmitidas por enxertia de grande relevância econômica para a viticultura. O *Rupestris stem pitting associated virus* – RSPaV foi associado com a doença do lenho estriado ou cascudo, sendo classificado como espécie do gênero *Foveavirus*, pertencente a família *Flexiviridae*. No presente trabalho, descrevem-se o seqüenciamento do gene da proteína capsial (CP) de um isolado brasileiro do RSPaV (RSPaV-SP), sua expressão em *Escherichia coli*, purificação da proteína capsial recombinante e a produção de anti-soro policlonal em coelho. O seqüenciamento do gene resultou em uma seqüência de 780 nucleotídeos e 259 aminoácidos deduzidos com massa molecular estimada de 28 kDa. A análise filogenética, entre a seqüência correspondente à CP do RSPaV-SP e outras variantes do mesmo vírus, evidenciou a formação de 4 grupos distintos, sendo o isolado brasileiro incluído no grupo da variante BS do RSPaV. A proteína capsial recombinante foi purificada em coluna de afinidade e apresentou massa molecular estimada de 32kDa (4kDa da seqüência do vetor e 28kD da CP do RSPaV-SP). O anti-soro produzido apresentou-se específico na detecção da proteína capsial recombinante purificada por “Western-blot”, sem reação com proteína heteróloga a partir da diluição 1:4000. Nesta diluição, o anti-soro foi efetivo na detecção do vírus em extratos de plantas infectadas, sendo que nenhuma reação foi observada com extratos de plantas sadias. Considerando-se que este vírus apresenta variações de concentração na planta durante as estações do ano, e que, os testes sorológicos foram realizados durante a estação de baixa concentração do vírus, os resultados obtidos até o momento foram altamente satisfatórios. Métodos sorológicos são vantajosos em relação aqueles de indexação biológica, uma vez que apresentam custos mais baixos e os anti-soros específicos podem ser utilizados em testes de larga escala, como o ELISA. Experimentos que utilizam a técnica ELISA não apresentaram resultados satisfatórios. A purificação da proteína recombinante em condições nativas para a produção de anti-soro poderá ser uma alternativa para a detecção mais efetiva do vírus utilizando-se esta técnica.

Palavras-chave: Videira, Lenho estriado de rupestris ou cascudo, *Foveavirus*, proteína capsial, seqüenciamento, expressão em *E. coli*, anti-soro policlonal, “Western-blot”.

ABSTRACT

PEREIRA, A.C.B. Capsid protein of *Rupestris stem pitting-associated virus*: sequencing of the gene, expression in *E. coli*, purification and production of polyclonal antiserum. São José do Rio Preto, 2008. 66p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Rupestris stem pitting (RSP), a component of the rugose wood (RW) complex, is one of the most graft-transmissible grapevine virus diseases with great economic importance for viticulture. *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV), genus *Foveavirus* within the family *Flexiviridae*, has been associated with this disease. This work reports the sequencing of the coat protein (CP) gene of a Brazilian isolate of RSPaV (RSPaV-SP), its expression in *Escherichia coli*, purification of the recombinant coat protein and production of a polyclonal antiserum in rabbit. CP gene was found to be 780nt long, with a 256 deduced amino acid sequence encoding a predicted protein of 28 kDa. In filogenetic analysis, with RSPaV-SP and other variants of the virus, four groups were found and the sequence of RSPaV-SP showed the highest identity with the variant RSPaV-BS. The recombinant coat protein was purified by affinity chromatography and showed a molecular weight of 32kDa (4 kDa from a small vector sequence plus 28 kDa for the CP of RSPaV-SP). The antiserum proved specific for detection of the recombinant protein by Western Blot, and did not react with heterologous proteins starting at a dilution of 1:4000. At this dilution, the antiserum was effective in the virus detection of leaf extracts of infected plants and no reaction was observed with extracts from healthy grapevines. Considering that the virus is found at low concentrations in the plants during the seasons of the year, the results obtained so far were highly satisfactory for RSPaV detection. Serological methods have advantages over the biological indexing method, since they are cheaper and can be used in large-scale tests such as ELISA. Experiments using the ELISA technique were not successful. Purification of the native recombinant protein would be an alternative more effective to detect the virus using these technique.

Key words: Grapevine, *Rupestris stem pitting*, *Foveavirus*, capsid protein, sequencing, expression in *E. coli*, polyclonal antiserum, Western-blot.

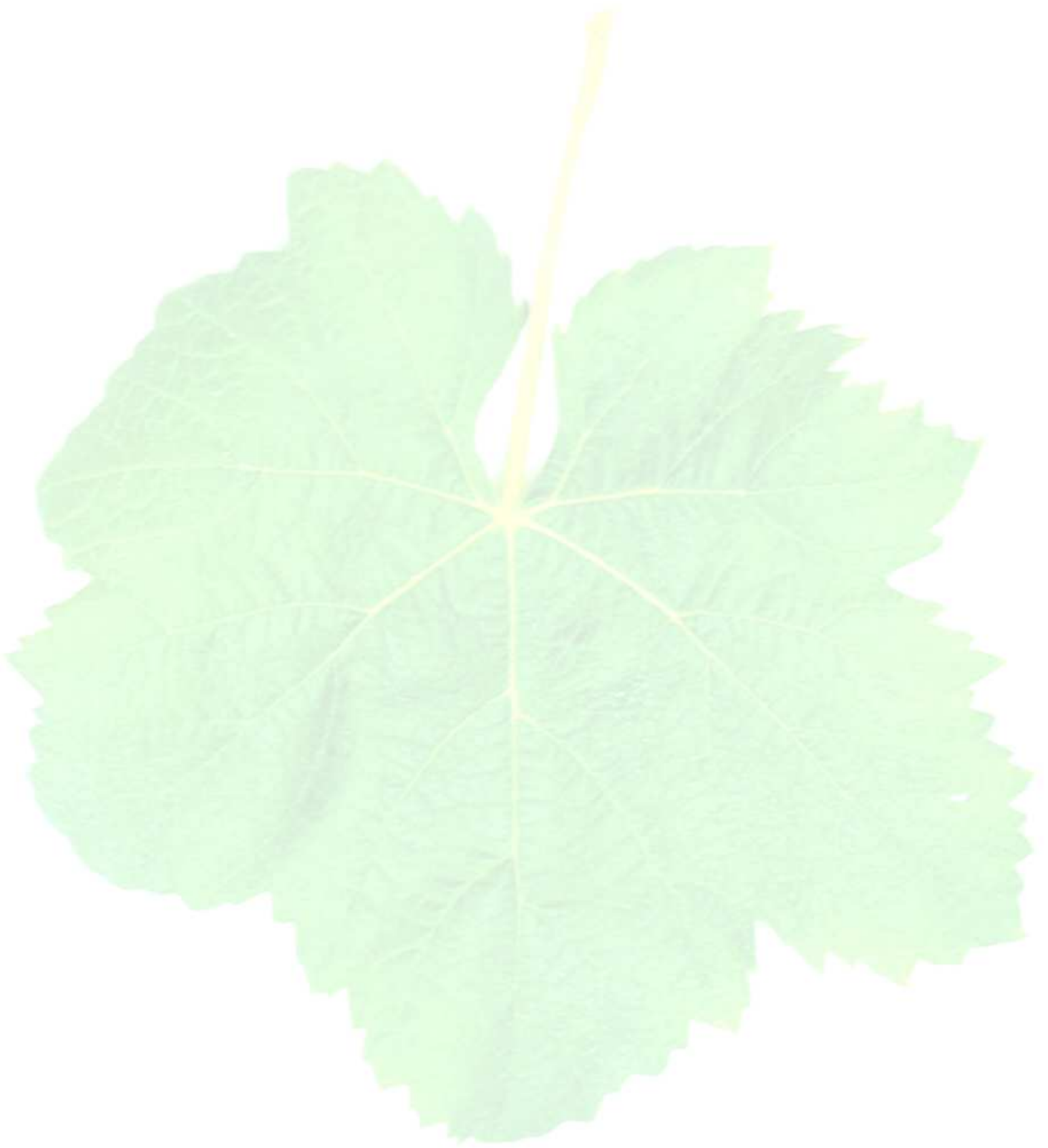
LISTA DE VÍRUS CITADOS NO TEXTO

ABREVIACÃO	NOME DA ESPÉCIE	GÊNERO
APLV	<i>Apricot latent virus</i>	<i>Foveavirus</i>
ASPV	<i>Apple stem pitting virus</i>	<i>Foveavirus</i>
GFkV	<i>Grapevine fleck virus</i>	<i>Maculavirus</i>
GFLV	<i>Grapevine fanleaf virus</i>	<i>Nepovirus</i>
GLRaV	<i>Grapevine leafroll associated virus</i>	<i>Ampelovirus</i>
GLRaV-2	<i>Grapevine leafroll associated virus 2</i>	<i>Closterovirus</i>
GVA	<i>Grapevine virus A</i>	<i>Vitivirus</i>
GVB	<i>Grapevine virus B</i>	<i>Vitivirus</i>
PVM	<i>Potato virus M</i>	<i>Carlavirus</i>
PVX	<i>Potato virus X</i>	<i>Potexvirus</i>
RSPaV	<i>Rupestris stem pitting-associated virus</i>	<i>Foveavirus</i>

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	13
I CULTURA DA VIDEIRA	14
II VIROSES DE VIDEIRA.....	15
II.1 Enrolamento da folha da videira (“Grapevine Leafroll” – GLR)	17
II.2 Mosaico das nervuras (“Grapevine fleck disease” – GFkD).....	17
II.3 Mosaico da videira traviú (“Grapevine fanleaf” – GFL).....	18
II.4 Lenho rugoso da videira (“Grapevine Rugose Wood” – GRW).....	19
II.4.1 Fendilhamento cortical (“Grapevine corky bark”).....	19
II.4.2 Acanaladura do lenho de kober (“Kober stem grooving”).....	20
II.4.3 Acanaladura do lenho de LN-33 (“LN-33 stem grooving”)	20
II.4.4 Lenho estriado de rupestris ou cascudo (“Rupestris stem pitting”)	21
III RUPESTRIS STEM PITTING-ASSOCIATED VIRUS (RSPaV)	23
IV OBJETIVOS	26
CAPÍTULO II – MATERIAL E MÉTODOS	27
II.1 Vírus/Planta.....	28
II.2 Extração de RNA	28
II.3 Construção de Oligonucleotídeos.....	28
II.4 Síntese de cDNA	29
II.5 Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (“Polimerase Chain Reaction” – PCR)	29
II.6 Purificação do DNA amplificado por PCR.....	29
II.7 Clonagem do gene para seqüenciamento	30
II.7.1 Reação de ligação em vetor de seqüenciamento (TOPO-TA).....	30
II.7.2 Transformação em célula competente	30
II.8 Seqüenciamento do gene em vetor TOPO TA.....	31
II.9 Análise Filogenética.....	31
II.10 Clonagem do gene para expressão	32
II.10.1 Clonagem no vetor pGEM – T Easy.....	32
II.10.2 Digestão enzimática com BamHI e HindIII.....	32
II.10.3 Digestão enzimática e defosforilação do vetor de expressão (pET 28a)	32
II.10.4 Ligação do inserto no vetor pET 28a.....	32
II.10.5 Transformação em célula competente	33
II.11 Seqüenciamento do gene em vetor de expressão (pET 28a).....	33
II.12 Testes de expressão	33
II.13 Análise em gel desnaturante de poliácridamida (SDS-PAGE) 12%.....	33
II.14 Expressão de proteínas para purificação	34
II.15 Purificação da proteína recombinante em coluna de afinidade.....	34
II.16 Produção de anti-soro policlonal.....	34
II.17 Pré-adsorção do anti-soro policlonal.....	35
II.18 Extração de proteínas totais	35
II.19 “Western-blot”	35
II.20 “Plate Trapped Antigen – Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (PTA-ELISA)..	36
CAPÍTULO III – RESULTADOS	37
III.1 Clonagem e seqüenciamento do gene da proteína capsidial do RSPaV-SP	38

III.1.1 Amplificação por RT/PCR	38
III.1.2 Digestão enzimática do vetor de seqüenciamento (TOPO TA)	39
III.1.3 Seqüenciamento automatizado do gene.....	40
III.1.4 Alinhamento e análise filogenética das seqüências.....	41
III.2 Clonagem e expressão do gene da proteína capsial do RSPaV-SP	43
III.2.1 Digestão enzimática do vetor de expressão (pET 28a).....	43
III.2.2 Expressão em E. coli e purificação da proteína capsial recombinante do RSPaV-SP em coluna de afinidade	44
III.2.3 Detecção da proteína recombinante por “Western-blot”	45
CAPÍTULO IV - DISCUSSÃO	47
CAPÍTULO V – CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55



I CULTURA DA VIDEIRA

A videira é uma das mais importantes espécies frutíferas cultivadas no mundo e pertence à família Vitaceae, cujos principais cultivares são do gênero *Vitis* (Cronquist, 1981). Sua importância econômica está relacionada ao fato de a uva ser uma das frutas mais consumidas mundialmente, tanto *in natura* como em suco, possuindo também um extenso mercado na indústria de vinhos e outros fermentos alcoólicos (Choudhury *et al.*, 2001). Cultivada há séculos, a videira encontra-se distribuída por todos os continentes, sendo que 45% da superfície vitícola mundial encontra-se na Europa, que representa 65% da produção mundial. O Brasil no cenário internacional é o 21º país em área cultivada e o 14º país em produção de uva, sendo a uva de mesa o principal produto, tanto para o setor vinícola como para o de frutas (Mello, 2006a).

De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (Mello, 2006b) a área de vinhedos plantada no Brasil no ano de 2006 foi de 87.792 hectares, atingindo uma produção nacional de 1.228.390 toneladas, sendo o estado do Rio Grande do Sul responsável por 50% desta produção. O segundo maior produtor é o estado de São Paulo, com uma produção de aproximadamente 194.000 toneladas de uva de mesa, tanto no que se refere a uvas comuns de mesa ('Niagara' rosada e branca) como uvas finas de mesa ('Itália', 'Rubi', 'Benitaka' e 'Brasil') (Mello, 2006b).

A produção de uvas no Brasil tem apresentado uma tendência crescente e além da produção voltada para o mercado interno, observa-se um aumento nas exportações brasileiras de uva de mesa e suco de uva (Mello, 2006a). Com mercado internacional consolidado, os produtores de uva do Brasil têm procurado exportar produtos de alta qualidade, relacionada principalmente com a forma, coloração e tamanho dos frutos. A presença de patógenos infectando videiras pode interferir significativamente nestas qualidades, além de colocar em risco a segurança dos vinhedos com a morte da planta ou a queda acentuada da produção (Mello, 2003). Vários tipos de patógenos podem ser encontrados infectando videiras, como fungos, bactérias, nematóides e vírus (Lima, 2002).

II VIROSES DE Videira

Doenças causadas por vírus têm sido mencionadas nos países de tradição vitícola há mais de um século, sendo que o estudo dos patógenos envolvidos nestas doenças evoluiu nos últimos 40 anos (Kuhn & Fajardo, 2006). No Brasil, o primeiro relato de virose em videira foi em 1972 no estado de São Paulo (Kuniyuki, 1972a) e, atualmente, as principais doenças descritas em outros países já foram constatadas em território nacional (Amorim & Kuniyuki, 1997). Isto se deve ao fato de a viticultura nacional resultar da multiplicação de clones de variedades tradicionais de copa e de porta-enxerto, cujos materiais propagativos foram, há muitos anos, introduzidos de regiões que enfrentam esse problema (Amorim & Kuniyuki, 1997).

As doenças causadas por vírus afetam a produção e a qualidade da uva, podendo causar a morte da planta quando as variedades são sensíveis à infecção por determinados vírus (Amorim & Kuniyuki, 1997). Estes prejuízos têm sido verificados em diversos países, sendo que as perdas podem chegar a 70% na produção de uva (Kuhn, 2006).

A propagação vegetativa da videira por estacas ou pela enxertia facilita a disseminação das viroses. A produção da muda pelo viticultor, utilizando material vegetativo do seu próprio vinhedo ou de vizinhos, sem o conhecimento do estado sanitário (presença ou não de vírus), tem favorecido a disseminação dessas doenças e, com muita frequência, o acúmulo de mais de um tipo de virose na mesma planta (Maia *et al.*, 2003).

Cerca de 55 vírus, distribuídos em 20 gêneros, são conhecidos como causadores de doenças em videiras (Martelli, 2003). Outras, embora consideradas viroses, não têm ainda uma definição exata da natureza do patógeno, se vírus, fitoplasma ou viróide. Sabe-se apenas que são perpetuadas pelo material vegetativo e por enxertia, condição mínima para que uma doença seja incluída no grupo das viroses (Kuhn & Fajardo, 2006).

As principais viroses da videira encontradas no Brasil (Figura 1) são o enrolamento da folha (“Grapevine Leafroll”, GLR) (Kuniyuki, 1978), mosaico das nervuras (“Grapevine Fleck Disease”, GFkD) (Kuniyuki, 1989), mosaico da videira Traviú (“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).

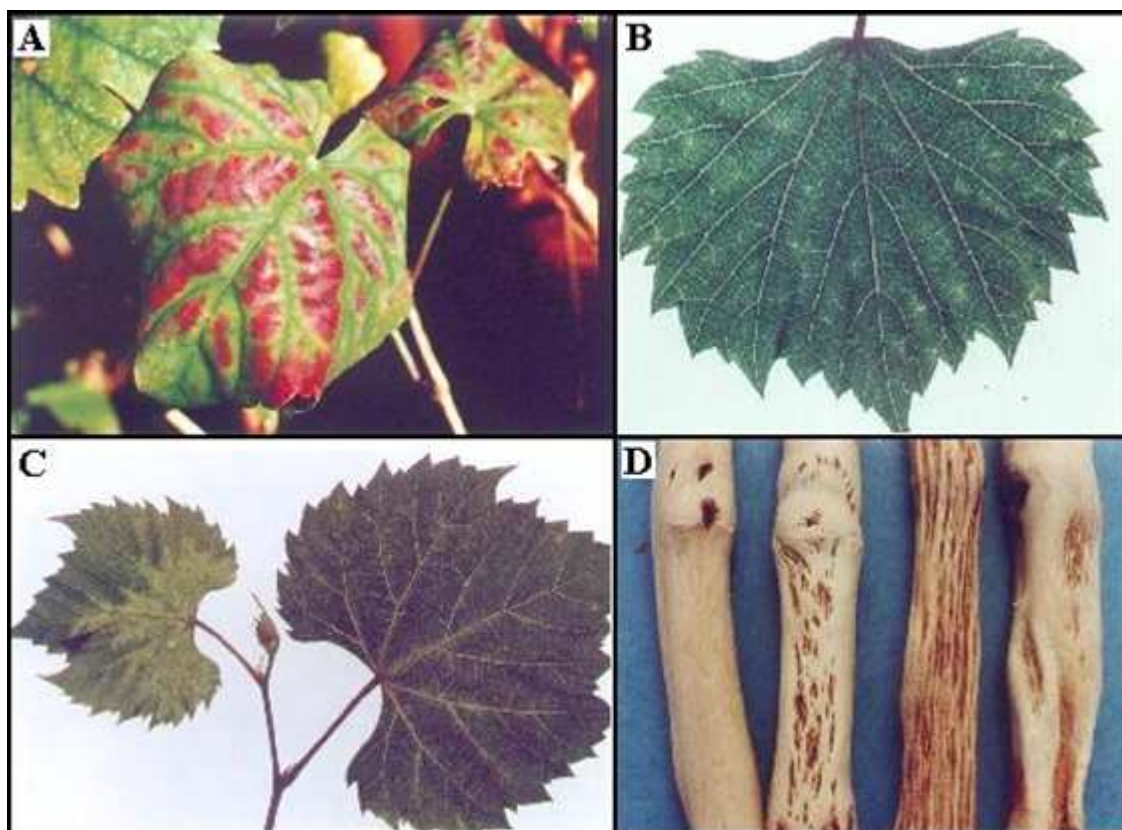


Figura 1. Sintomas característicos das principais viroses de videira que ocorrem no Brasil. **A.** Enrolamento da folha da videira em variedade LN-33. **B.** Mosaico das nervuras no porta-enxerto ‘Rupestris du Lot’. **C.** Mosaico da videira Traviú (“grapevine fanleaf”) no porta-enxerto de videira ‘Riparia 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. Imagens fornecidas pelo Dr. Hugo Kuniyuki, do Instituto Agronômico de Campinas.

II.1 Enrolamento da folha da videira ("Grapevine Leafroll" – GLR)

O enrolamento da folha da videira foi constatado pela primeira vez no Brasil em vinhedos do estado de São Paulo, ocorrendo, entretanto, em quase todas as regiões brasileiras onde a videira é cultivada (Kuniyuki, 1978; Kuhn, 1989). Trata-se de uma das mais importantes viroses da videira, seja pela alta incidência seja pelas perdas que causa à produção da uva.

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 1A) (Martelli, 1986; Lima 2002).

Hoje está bem estabelecido que essa doença está associada à pelo menos nove vírus, sorologicamente distintos, com partículas de 1400 a 2200 nm de comprimento (Namba *et al.*, 1979; Boscia *et al.*, 1995), denominados *Grapevine leafroll associated virus 1-9* (GLRaV-1 a GLRaV-9). Com exceção do GLRaV-2, mantido no gênero *Closterovirus*, os demais estão incluídos, como espécies ou sub-espécies, no gênero *Ampelovirus*, da família *Closteroviridae* (Gugerli, 2003). Os genomas dos GLRaV-2 e GLRaV-3 já foram totalmente seqüenciados (Ling *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1998), permitindo a síntese de "primers" utilizados na detecção desses vírus pela técnica de IC-RT-PCR (imunocaptura-transcriptase reversa-reação em cadeia pela polimerase).

No Brasil, a existência do GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-5 e GLRaV-6 já foi demonstrada, sendo sua identificação feita pela utilização de videiras indicadoras (por exemplo, *Vitis vinifera* 'Cabernet Franc', 'Cabernet Sauvignon' e 'Pinot Noir') e por técnicas imunológicas (Scagliusi, 1995, Kuhn *et al.*, 1999; Kuniyuki *et al.*, 2002; Kuniyuki *et al.*, 2003; Kuniyuki *et al.*, 2006).

II.2 Mosaico das nervuras ("Grapevine fleck disease" – GFkD)

Trata-se de uma doença de distribuição mundial e que no Brasil foi primeiramente detectada em vinhedos de São Roque, SP (Kuniyuki, 1989) e posteriormente no Rio Grande do Sul (Kuhn, 1992). 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).

O mosaico das nervuras é causado por um vírus de partículas isométricas (aproximadamente 30nm de diâmetro), denominado *Grapevine fleck virus* (GFkV), pertencente ao gênero *Maculavirus*, da família *Tymoviridae*, não transmissível mecanicamente e limitado ao floema da hospedeira (Martelli *et al.*, 2002). O vírus possui RNA de fita simples e polaridade positiva com cerca de 7500 nucleotídeos.

A detecção do GFkV tem sido feita principalmente através do teste biológico com a indicadora ‘Rupestris du Lot’, na qual as reações são observadas de 6 a 20 meses após a enxertia. Testes imunológicos (Schieber *et al.*, 1997) e PCR (Sabanadzovic *et al.*, 2000) têm também sido utilizados na detecção do GFkV. No estado de São Paulo, foi demonstrado por ELISA que o vírus do mosaico das nervuras é proximamente relacionado ao GFkV e que os quatro isolados do vírus, que podem ser separados através da sintomatologia, são sorologicamente relacionados (Kuniyuki *et al.*, 2000b). Mais recentemente, um isolado do GFkV encontrado no Rio Grande do Sul foi detectado por RT-PCR e parcialmente caracterizado (Fajardo *et al.*, 2004b).

II.3 Mosaico da videira traviú ("*Grapevine fanleaf*" – GFL)

Esta doença, conhecida internacionalmente como "grapevine fanleaf" (folha em leque da videira), ocorre nos principais países vitícolas e é considerada a virose mais importante dentro da viticultura mundial, pela alta incidência e pelas grandes perdas que ocasiona à produção da uva (Amorin & Kuniyuki, 1997). No Brasil, essa doença foi inicialmente detectada em vinhedos de Jundiaí, SP e denominada mosaico da videira ‘Traviú’ por ter sido primeiramente encontrada em plantas do porta-enxerto ‘Traviú’ ou ‘Riparia do Traviú’ (Kuniyuki *et al.*, 1994). O nome da doença deriva de sintomas (Figura 1C) de malformação característicos nas folhas que ficam com aspecto de leque semi-aberto (Martelli & Savino, 1994).

O mosaico da videira Traviú é causado por um vírus isométrico (30 nm de diâmetro) denominado *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), pertencente ao gênero *Nepovirus*. O GFLV possui genoma bipartido (RNA 1 e RNA 2) de fita simples e polaridade positiva, ambos necessários à infecção (Murphy *et al.*, 1995). A identificação do GFLV é feita através da utilização da videira indicadora ‘Rupestris du Lot’, métodos imunológicos e PCR. Um isolado do vírus encontrado em vinhedos do Rio Grande do Sul foi parcialmente caracterizado mostrando seqüência de nucleotídeos com alta homologia (aproximadamente 93%) com outros isolados do vírus descritos no exterior (Fajardo *et al.*, 2000).

II.4 Lenho rugoso da videira (“*Grapevine Rugose Wood*” – GRW)

O lenho rugoso da videira é o nome dado a um complexo de doenças que apresenta grande relevância econômica para a viticultura, razão pela qual é objeto de constante atenção nos programas de seleção sanitária dos diversos países vitícolas (Kuhn & Fajardo, 2006). Desde as primeiras descrições (Graniti & Ciccarone, 1961) o lenho rugoso da videira vem sendo considerado um dos mais preocupantes complexos de doenças infecciosas da videira.

Este complexo é caracterizado por induzir alterações no lenho de variedades sensíveis de videira e que ocorre na maioria dos países vitícolas (Martelli, 1993; Krake *et al.*, 1999). Os sintomas gerais constituem no atraso da brotação de primavera, redução de vigor, baixa produção de uva, intumescência na região acima do ponto de enxertia, casca espessa e corticosa e com textura esponjosa e caneluras (“pittings”) e acanaladuras (“groovings”) no lenho (Figura 1D). Estas alterações ocorrem em variedades de copa, porta-enxerto ou ambos (Amorim & Kuniyuki, 1997).

Este complexo é constituído por pelo menos quatro doenças distintas. São elas: fendilhamento cortical (“*Grapevine Corky Bark*”), acanaladura do lenho de Krober (“*Krober Stem Grooving*”), acanaladura do lenho de LN-33 (“*LN-33 Stem Grooving*”) e lenho estriado de rupestris ou cascudo (“*Rupestris Stem Pitting*”) (Savino *et al.*, 1989; Minafra, 2000; Minafra & Boscia, 2003), sendo todas elas já constatadas no Brasil (Kuniyuki, 1972b; Kuhn, 1992; Kuniyuki *et al.*, 1997; Kuhn *et al.*, 2002).

As doenças que compõem este complexo não são facilmente distinguidas em campo, devido à ausência de sintomas específicos nas folhas e a intensidade destes sintomas dependerem da combinação copa/porta-enxerto. Desta maneira, a identificação das doenças é feita utilizando-se três indicadores diferenciais: ‘Kober 5BB’, ‘LN-33’ e *Vitis rupestris* (Amorim & Kuniyuki, 1997; Lima, 2002).

II.4.1 Fendilhamento cortical (“*Grapevine corky bark*”)

Partículas de cerca de 800 nm de comprimento têm sido associadas com esta doença (Namba *et al.*, 1991; Boscia *et al.*, 1993; Bonavia *et al.*, 1996) e o vírus foi denominado *Grapevine virus B* (GVB) pertencente ao gênero *Vitivirus* (Martelli *et al.*, 1997). A sequência completa dos nucleotídeos do GVB foi determinada (7600 nucleotídeos), o que tem permitido a detecção molecular do vírus por PCR (Saldarelli *et al.*, 1996).

No Brasil, o fendilhamento cortical foi constatado pela primeira vez em 1973 em videiras no estado de São Paulo (Kuniyuki & Costa, 1982) e posteriormente no Rio Grande do Sul (Kuhn, 1992), sendo sua identificação feita em videiras indicadoras ('LN-33' e 'Niagara') e por teste ELISA com anti-soro comercial (Kuniyuki *et al.*, 2000a). Foi determinado, mediante esse teste imuno-enzimático, que os dois isolados (GVB-C e GVB-I) sintomatologicamente distintos que ocorrem nos vinhedos paulistas são sorologicamente semelhantes. O gene da proteína capsidial desses dois isolados foi seqüenciado e caracterizado (Moreira *et al.*, 2004a) indicando que o GVB-C apresenta maior similaridade de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos com o isolado italiano, enquanto que o GVB-I foi mais similar a um outro isolado brasileiro do GVB descrito no Rio Grande do Sul (Nickel *et al.*, 2002). Os dois isolados paulistas do GVB podem ser diferenciados por digestão com a enzima de restrição *EcoRI*, uma vez que há um sítio interno no GVB-C que está ausente no isolado GVB-I (Moreira *et al.*, 2004a).

II.4.2 Acanaladura do lenho de kober ("Kober stem grooving")

Esta doença foi reconhecida no Brasil em 1992 em uma plantação de 'Niagara Rosada' de Jundiaí, SP e é, provavelmente, causada pelo *Grapevine virus A* (GVA). O vírus, de aproximadamente 800 nm de comprimento, pertencente ao gênero *Vitivirus* (Martelli *et al.*, 1997), foi seqüenciado (Minafra *et al.*, 1997), permitindo a síntese de "primers" para sua detecção por PCR. Em São Paulo, o GVA foi detectado por ELISA (Kuniyuki *et al.*, 2001) e por RT-PCR (Moreira *et al.*, 2004b) em amostras de videiras infetadas pelo "Kober stem grooving". Esse isolado do GVA teve o gene da proteína capsidial seqüenciado e caracterizado (Moreira *et al.*, 2004b) mostrando maior identidade com um isolado da África do Sul e menor com um isolado de Israel e outro descrito no Rio Grande do Sul (Fajardo *et al.*, 2003).

II.4.3 Acanaladura do lenho de LN-33 ("LN-33 stem grooving")

Doença caracterizada por apresentar sulcos ou canais longos e profundos no lenho de "LN-33", mas sem intumescências nos entre-nós e descolorações foliares como as causadas pelo agente do fendilhamento cortical. Nenhum vírus específico tem sido associado com esta doença. Existe relato da detecção desse tipo de doença no Rio Grande do Sul (Kuhn *et al.*, 2002).

II.4.4 Lenho estriado de rupestris ou cascudo ("Rupestris stem pitting")

O lenho estriado de rupestris ou cascudo foi observado pela primeira vez no Brasil em vinhedos de uva Itália na região de Mogi das Cruzes, SP (Kuniyuki, 1972b), sendo sua identificação feita na videira indicadora 'Rupestris du Lot', onde os sintomas aparecem 3 a 4 anos após a enxertia (Amorin & Kuniyuki, 1997).

O lenho estriado de rupestris é uma doença transmitida por enxertia que se caracteriza por induzir o desenvolvimento de faixa ou banda de pequenas caneluras no lenho ("pittings"), do ponto de enxertia para a base da planta, na indicadora *Vitis rupestris* 'St. George' ('Rupestris du Lot') (Figura 2). Os sintomas característicos do lenho estriado de rupestris ou cascudo são apresentados pelas variedades Itália, Rubi e Benitaka. As folhas são menores, ligeiramente assimétricas e com mosaico difuso. A casca do tronco torna-se espessa, quebradiça e fendilhada e não se destaca com facilidade do lenho. Muitas vezes a casca adquire uma coloração escura ou cinza, facilitando a identificação de plantas doentes (Figura 3). Sob esta casca podem ser notadas depressões rasas ou alongadas que se formam no lenho (Amorin & Kuniyuki, 1997).

A origem viral desta doença foi proposta baseando-se pelo fato de a transmissão do agente causal ocorrer através de enxertia e pela observação de partículas virais filamentosas em videiras afetadas pelo lenho estriado de rupestris (Meng *et al.*, 1999b; Meng & Gonsalves, 2003; Meng *et al.*, 2003; Petrovic *et al.*, 2003). Posteriormente, o vírus denominado *Rupestris stem pitting associated virus* (RSPaV) foi identificado como o possível agente causador da doença do lenho estriado de rupestris ou cascudo (Meng *et al.*, 2005).



Figura 2. Sintoma característico do Lenho estriado de rupestris ou cascudo na indicadora ‘Rupestris du Lot’. Da esquerda para a direita: lenho sadio e dois lenhos infectados mostrando caneluras ou estrias (“pittings”) logo abaixo do ponto de enxertia (seta). Imagem fornecida pelo Dr. Hugo Kuniyuki, do Instituto Agrônômico de Campinas.



Figura 3. Tronco de videira (cv. Itália) com sintomas de RSP: espessamento da casca, caneluras no lenho e coloração cinza. Imagem fornecida pelo Dr. Hugo Kuniyuki, do Instituto Agrônômico de Campinas.

III *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV)

A associação entre o lenho estriado de *rupestris* ou cascudo e o RSPaV foi sugerida através da análise de clones de cDNA de diferentes videiras afetadas pelo RSP. O genoma de dois isolados quase idênticos foi seqüenciado por diferentes grupos de pesquisa. O primeiro isolado foi seqüenciado por Meng *et al.* (1998) e denominado *Rupestris stem pitting associated virus* (RSPaV), o segundo isolado foi seqüenciado por Zhang *et al.* (1998) e denominado *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (GRSPaV). Para evitar confusão na nomenclatura deste vírus, neste trabalho será utilizado o nome *Rupestris stem pitting associated virus* (RSPaV).

O RSPaV foi classificado como espécie do gênero *Foveavirus* (Martelli & Jelkmann, 1998) e incluído na família *Flexiviridae*, que agrupa outros gêneros como, por exemplo, *Carlavirus*, *Potexvirus* e *Vitivirus* (Adams *et al.*, 2004). As partículas virais dos *Foveavirus* são filamentosas com 800 nm de comprimento. O genoma viral é composto por RNA de fita única e polaridade positiva, variando entre 8.400 a 9.300 nucleotídeos e poliadenilado na extremidade 3' (Martelli & Jelkmann, 1998).

O genoma completo do RSPaV apresenta 8.726 nucleotídeos com extremidade 3' poliadenilada (Zhang *et al.*, 1998) e similaridade com as seqüências de nucleotídeos e aminoácidos do Apple stem pitting virus – ASPV (Meng *et al.*, 1998), espécie tipo do gênero *Foveavirus* (Martelli & Jelkmann, 1998). O genoma do RSPaV está organizado em seis cadeias abertas de leitura (“Open reading frame”, ORF) (Figura 4). A ORF1 codifica proteína envolvida na replicação viral, que inclui os motivos para a metiltransferase (MTR), helicase (HEL), protease (PRO) e polimerase (RNA dependente de RNA polimerase – RdRP), domínios conservados em vírus de fita única com polaridade positiva. As ORF2, ORF3 e ORF4 constituem o bloco triplo de genes, os quais codificam proteínas relacionadas ao movimento célula-a-célula do vírus. A ORF5 codifica uma proteína de 28kDa e está envolvida na formação do capsídeo viral (Martelli & Jelkmann, 1998; Meng *et al.*, 1998; Meng & Gonsalves, 2003). A ORF 6, parcialmente sobreposta a ORF5, foi identificada por Zhang *et al.* (1998) e codifica uma possível proteína de 14kDa com função ainda desconhecida. A presença de uma ORF adicional sobrepondo o gene da proteína capsidial também foi encontrada em outra espécie do gênero *Foveavirus*, o *Apricot latent virus* - APLV (Gentit *et al.*, 2001).

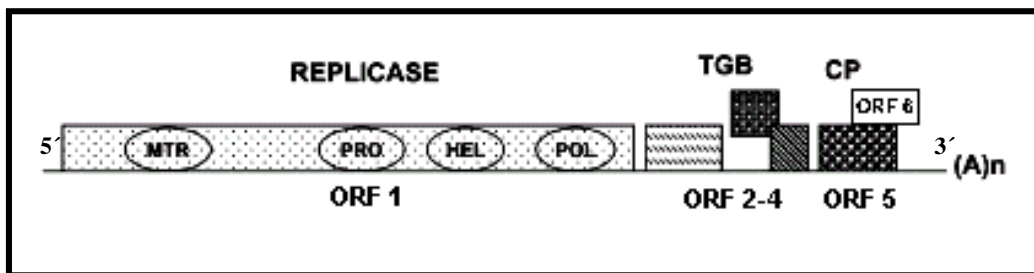


Figura 4. Organização do genoma do RSPaV. **ORF 1:** gene da replicase, que inclui os motivos MTR (metiltransferase); PRO (protease); HEL (helicase) e POL (polimerase); **ORF 2-4:** bloco triplo de genes (Triple gene block – TGB) envolvidos no movimento célula-célula do vírus; **ORF 5:** gene da proteína capsial (Coat protein – CP); **ORF 6:** gene codificante de uma proteína com função ainda desconhecida. Extremidade 3' poliadenilada (A_n). Adaptado de Meng *et al.*, 2006.

Nos últimos anos vários trabalhos que descrevem a variabilidade genética do RSPaV têm sugerido que este vírus é muito diversificado, constituindo uma família de seqüências variantes (Soares *et al.*, 2000; Casati *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2003; Meng *et al.* 2005; Habili *et al.*, 2006; Nolasco *et al.*, 2006; Talquenca, *et al.*, 2006). O sequenciamento parcial de nucleotídeos do gene da replicase do RSPaV (Espinha *et al.*, 2003, Fajardo *et al.*, 2004a) sugere a existência de seqüências variantes ocorrendo também no Brasil.


O desenvolvimento de técnicas moleculares para a detecção do RSPaV mostrou que este vírus encontra-se distribuído mundialmente (Minafra & Boscia, 2003). No entanto, a detecção de infecções causadas pelo RSPaV ainda é problemática. No Brasil, o RSPaV foi detectado por meios moleculares, pela primeira, através de testes de RT-PCR e sonda molecular não radioativa (Espinha *et al.*, 2003). O diagnóstico pela caracterização biológica em *Vitis rupestris* cv. St. George e a detecção por RT-PCR não são totalmente eficientes por apresentarem resultados falsos negativos (Nolasco *et al.*, 2000). A existência de seqüências variantes do RSPaV foi sugerida como uma explicação para os resultados falso negativos obtidos pela técnica de RT-PCR (Nolasco *et al.*, 2000). Muito embora estas técnicas moleculares estejam sendo utilizadas para a detecção deste vírus, sua aplicação em larga escala não é adequada, em função principalmente dos custos e da relativa complexidade das técnicas.

Técnicas sorológicas são, até o momento, pouco utilizadas para a detecção do RSPaV, pois os anti-soros produzidos em outros países para a detecção da proteína capsidial recombinante ainda não foram comercializados e, se o forem, poderão ter preço elevado (Minafra *et al.*, 2000; Meng *et al.*, 2003). Levando-se em consideração a variabilidade genética do RSPaV e o fato de a proteína capsidial ser altamente conservada entre as variantes (Nolasco *et al.*, 2006), a produção e comercialização de anti-soro apropriados para esta proteína poderão constituir ferramenta importante para a detecção do vírus. Assim, a produção de anti-soro para o RSPaV no Brasil é de grande interesse, pois a detecção do vírus poderá ser realizada em testes de larga escala, como o ELISA, e também ser utilizado em programas de propagação de material livre de vírus.

IV OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi utilizar técnicas moleculares para a caracterização do gene da proteína capsidial de um isolado brasileiro do RSPaV, aqui denominado RSPaV-SP, e a detecção sorológica deste vírus encontrado em videiras do estado de São Paulo. Desta maneira, constituíram objetivos específicos:

- 1- Sequenciamento do gene da proteína capsidial do RSPaV-SP e análise filogenética;
- 2- Expressão em *Escherichia coli* e purificação da proteína capsidial recombinante para produção de anti-soro policlonal em coelho;
- 3- Detecção do vírus por “Western-blot” com o intuito de sua posterior utilização em testes de larga escala, como o ELISA, e em programas de propagação de material livre de vírus.



MATERIAL E MÉTODOS

Capítulo Dois

II.1 Vírus/Planta

O material biológico (folhas e pecíolos de videiras sadias e infectadas pelo *Rupestris stem pitting associated virus* – RSPaV, aqui denominado RSPaV-SP) foi fornecido pelo Dr. Hugo Kuniyuki, do Centro de Fitossanidade (Área de Virologia) do Instituto Agronômico de Campinas, SP.

II.2 Extração de RNA

A extração de RNAs totais foi feita a partir de pecíolos de *Vitis vinifera* cv. Brasil, infectados pelo RSPaV, seguindo-se o método de Mackenzie *et al.* (1997) e com a utilização do “RNeasy Plant Mini kit” (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi eluído em água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) e estocado a -20°C.

II.3 Construção de Oligonucleotídeos

Com base em seqüências de nucleotídeos descritas na literatura e depositados no GenBank (Acesso: AF057136), dois pares de oligonucleotídeos foram desenhados utilizando-se os programas Primer-3 e Oligo-4.

O par de oligonucleotídeos utilizados para a clonagem em vetor de seqüenciamento do gene da proteína capsial – ORF5 do RSPaV-SP (senso: *RSPCP52F*: 5’– TGA AGG CTT TAG GGG TTA G – 3’, antisenso: *RSPCP53R*: 5’– CTT AAC CCA GCC TTG AAA T – 3’) amplifica uma seqüência de 905 nucleotídeos. Este fragmento inclui o gene codificador da ORF 5 com 780 nucleotídeos.

O par de oligonucleotídeos utilizados para a clonagem do gene em vetor de expressão (senso: *RSEXPCPF2*: 5’– ACA GGA TCC ATG GCA AGT CAG – 3’, antisenso: *RSEXPCPR2*: 5’– CAC GAA GCT TCC ACA GTC AA – 3’) amplifica uma seqüência de 809 nucleotídeos, que inclui o gene codificador da proteína capsial. Estes oligonucleotídeos apresentam sítio para as enzimas de restrição *Bam*HI (sense) e *Hind*III (antisense) (sublinhados).

II.4 Síntese de cDNA

Para a produção do DNA complementar (cDNA), a partir do RNA total, utilizou-se um volume de reação de 20 µL que continha: 1 µg de RNA total e 10 µg/mL de oligonucleotídeo antisense, desnaturados a 95°C por 10 minutos; tampão (50 mM Tris-HCl pH 8,3; 75 mM KCl; 3 mM MgCl₂); 10 mM DTT; 0,2 mM de cada dNTP (dGTP, dATP, dCTP e dTTP); 2 unidades de inibidor de RNase e 40 unidades de transcriptase reversa “Superscript II” (Invitrogen). A reação foi incubada por 2 horas a 42°C.

II.5 Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (“Polimerase Chain Reaction” – PCR)

O volume da reação de PCR foi de 25 µL consistindo de tampão (20 mM Tris-HCl pH 9,5; 50 mM KCl); 5 mM de MgCl₂; 0,2 mM cada dCTP, dGTP, dATP e dTTP; 10 µg/mL de cada oligonucleotídeo (senso e anti-senso); 1 µL de cDNA e 3 unidades de Taq DNA-polimerase (Invitrogen).

O programa de PCR, realizado em um termociclador MJ Research, envolveu uma desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos e 30 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto de anelamento a 50°C e 1 minuto de extensão à 72°C, seguidos de extensão final por 10 minutos a 72°C. Os fragmentos de DNA amplificados foram submetidos à eletroforese em gel nativo de agarose 1% em tampão TAE (40 mM Tris-HCl; 20 mM de acetato de sódio e 1 mM de EDTA, pH 8,3) a uma voltagem de 80V, corado com brometo de etídio (0,05 µg/mL) (Sambrook *et al.*, 1989) e visualizados sob luz ultravioleta.

II.6 Purificação do DNA amplificado por PCR

A purificação dos fragmentos amplificados foi feita utilizando-se o “Minelute Gel Extraction Kit” (Qiagen). Em linhas gerais, a banda formada pelo fragmento de DNA foi extraída e tratada com um tampão de solubilização por 10 minutos a 50°C até a completa dissolução da agarose. Em seguida, foi adicionado 1 volume de isopropanol e a amostra aplicada a uma coluna de afinidade, sendo então centrifugada por 1 minuto a 10.000 x g, descartando-se o efluente. Após lavagens para eliminação de possíveis contaminantes e restos

de oligonucleotídeos a coluna foi colocada em um novo tubo coletor e o DNA amplificado foi eluído em tampão de eluição sob centrifugação por 1 minuto a 10.000 x g.

O DNA foi quantificado em gel de agarose 1%, utilizando-se “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen) como marcador.

II.7 Clonagem do gene para seqüenciamento

II.7.1 Reação de ligação em vetor de seqüenciamento (TOPO-TA)

Após a purificação do fragmento amplificado foi realizada a reação de ligação do produto de PCR ao vetor TOPO TA (Invitrogen), conforme orientação do fabricante.

II.7.2 Transformação em célula competente

Após a reação de ligação procedeu-se a transformação do vetor recombinante em *Escherichia coli* linhagem TOP10, utilizando-se 50 µL de células quimiocompetentes e 3 µL da reação de ligação. Essa mistura permaneceu no gelo durante 1 hora e, então, foi submetida ao choque de temperatura por 1 minuto a 42°C e novamente colocada no gelo por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 250 µL de meio líquido SOC (meio SOB: peptona, extrato de levedura, KCl e NaCl, 10 mM de glicose e 10 mM de Mg²⁺) e o meio agitado a 200 rpm durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, as bactérias foram plaqueadas em meio sólido seletivo (meio *Luria Bertani* - LB, ampicilina 100 µg/mL), contendo ainda 40 µL de “5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside” 20 mg/mL (X-Gal), utilizado para a detecção colorimétrica da atividade da enzima β-galactosidase. Após crescimento durante a noite a 37°C, as colônias brancas foram testadas por PCR para comprovar a existência do inserto. As colônias que apresentaram o inserto foram utilizadas como fonte de inóculo em tubos individuais contendo 5 mL de meio líquido seletivo (LB, ampicilina 100 µg/mL) sob agitação constante a 37°C durante 16 horas.

A extração do DNA recombinante foi feita utilizando-se o “PureLink Quick Plasmid Miniprep kit” (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. O DNA plasmidial foi eluído em 50 µL de tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0).

Após a extração do DNA plasmidial dos clones selecionados, foi feita digestão com enzima de restrição (*EcoRI*). A comprovação da formação do DNA recombinante foi

verificada através da liberação do fragmento de tamanho esperado. A análise dos produtos de digestão foi feita em gel de agarose 1%.

II.8 Seqüenciamento do gene em vetor TOPO TA

O DNA plasmidial purificado foi seqüenciado pela técnica de reação de terminação em cadeia (Sanger *et al.*, 1977), utilizando-se o seqüenciador automático “ABI 377 DNA Sequencer” (Laboratório de Estudos Genômicos, IBILCE/UNESP – São José do Rio Preto, SP) e o “ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (Applied Biosystems), seguindo-se as instruções do fabricante.

O seqüenciamento de um único clone foi realizado nos dois sentidos de leitura (sense e antisense) com 3 repetições e o alinhamento das seqüências consenso utilizando-se o programa Multalin (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>). A seqüência de aminoácidos deduzida foi determinada pelo programa Translate (<http://www.expasy.org/tolls/dna/html>) e a estimativa da massa molecular feita pelo programa ExPASy Proteomics Server, disponível no site <<http://bo.expasy.org/tools/protparam.html>>.

II.9 Análise Filogenética

As relações filogenéticas foram inferidas através do programa PAUP v.4.0b10 (Swofford, 1997), pelo método de máxima parcimônia e utilizando-se teste de confiança de topologia (*bootstrap*) de 500 réplicas. O alinhamento das seqüências foi feito com o auxílio do programa Multiple Sequence Alignment – CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). Como algumas seqüências depositadas no GenBank são parciais, 2 árvores filogenéticas foram feitas: a primeira utilizando variantes com seqüência completa da CP e outra utilizando-se seqüências correspondentes a região central do gene. Para o alinhamento das seqüências foram selecionadas variantes representantes de cada um dos 4 grupos recentemente identificados por Nolasco *et al.* (2006) e Meng *et al.* (2006). Os valores de identidade foram obtidos através do site <http://bioinformatics.org/sms/ident_sim.html>.

II.10 Clonagem do gene para expressão

II.10.1 Clonagem no vetor pGEM – T Easy

Após a reação de PCR (utilizando-se os oligonucleotídeos desenhados para expressão do gene) e a purificação do fragmento amplificado foi realizada a reação de ligação com o vetor “pGEM – T Easy Vector System I”, seguindo as orientações do fabricante (Promega). Em seguida, o plasmídeo recombinante foi transformado em *E. coli* linhagem TOP 10 e purificado, conforme descrito no item II.7.2.

II.10.2 Digestão enzimática com BamHI e HindIII

O vetor de multiplicação recombinante foi digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III (Promega). Para cada 1 µg de DNA foram utilizadas 10 unidades (1 µL) de cada enzima. A reação foi incubada a 37°C por 2 horas e a 65°C por 15 minutos e, em seguida, submetida à eletroforese em gel de agarose 1%. A banda referente ao fragmento digerido com as enzimas foi extraída conforme descrito no item II.6.

II.10.3 Digestão enzimática e defosforilação do vetor de expressão (pET 28a)

Após a digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III (conforme descrito no item II.9.2), o vetor de expressão foi defosforilado utilizando-se a enzima fosfatase alcalina de intestino de bezerro (CIAP) (Gibco). O produto desta reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e a banda correspondente ao vetor digerido foi extraída de acordo com o item II.6.

II.10.4 Ligação do inserto no vetor pET 28a

Para a reação de ligação foram utilizadas 50 ng do vetor previamente cortado e defosforilado, 65 ng de inserto (fragmento liberado do vetor de multiplicação), 3 unidades de T4 DNA ligase e tampão de ligação (Promega). A mistura foi submetida a 4°C por 16 horas.

II.10.5 Transformação em célula competente

Após a reação de ligação procedeu-se a seleção dos recombinantes que foram transformados em *E. coli* linhagem BL21 – RIL, seguindo-se o mesmo protocolo descrito no item II.7.2. As colônias foram testadas por PCR e aquelas que apresentaram o inserto foram utilizadas como fonte de inóculo em tubos individuais contendo 5 mL de meio líquido seletivo (LB, 100 µg/mL de canamicina e cloranfenicol e 2 mg/mL de glicose) sob agitação e aeração constantes a 37°C por aproximadamente 16 horas. Esta cultura serviu como pré-inóculo para os testes de expressão descrito no item II.12.

II.11 Seqüenciamento do gene em vetor de expressão (pET 28a)

As reações de seqüenciamento foram realizadas seguindo-se as descrições do item II.8, com algumas modificações. O seqüenciamento do vetor de expressão foi realizado em um único sentido de leitura (sense) utilizando-se 200 µg de DNA, 1 µL de oligonucleotídeo T7 - Promega (10 pmol/µL) e 2 µL da solução de BigDye. As seqüências obtidas foram comparadas com aquelas depositadas no GenBank para confirmação da inserção do gene da proteína capsidial no vetor de expressão pET 28a.

II.12 Testes de expressão

Inicialmente 700 µL do pré-inóculo foram transferidos para um novo tubo contendo 7 mL de meio líquido seletivo (LB, 100 µg/mL de canamicina e cloranfenicol e 2mg/mL de glicose). O tubo foi mantido sob agitação e aeração a 37°C por 90 minutos. Quando a cultura de células atingiu a densidade óptica de 0,6 a 550nm, a indução da expressão foi feita com 1mM de isopropil-β-D-galactosidase (IPTG), a 37°C por 4 horas sob agitação de 200 rpm. Foram coletadas amostras após 30 minutos, 2 horas e 4 horas de indução.

II.13 Análise em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%

A eletroforese foi feita em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) segundo Laemmli (1970). As proteínas foram desnaturadas a 100°C durante 3 minutos em tampão de amostra (125mM Tris-HCl pH 6,8, 4% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 20% glicerol, 10%

2-mercaptoetanol (2-ME), 1 mM azul de bromofenol). As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 16.000 x g e 10 µL do sobrenadante de cada amostra foram aplicados no gel. A eletroforese ocorreu por 2 horas a 40 mA em aparelho Mini Protean II (BioRad). Os géis foram fixados e corados em mistura contendo metanol, água, ácido acético nas proporções 5:5:1 e 0,25% de comassie Blue por 3 horas e descorados com metanol e água (1:1) por 18 horas.

II.14 Expressão de proteínas para purificação

Inicialmente 25 mL de pré-inóculo foram transferidos para um novo tubo contendo 250 mL de meio líquido seletivo (LB, 100µg/mL de canamicina e cloranfenicol e 2mg/mL de glicose). O tubo foi mantido sob agitação e aeração a 37° C por 90 minutos e em seguida foi feita uma leitura da amostra em espectrofotômetro. Quando a cultura de células atingiu a densidade óptica de 0,6 a 550nm a indução de expressão foi feita com 1mM de IPTG por 4 horas. O meio de cultura foi centrifugado por 20 minutos a 3.000 x g e 4°C. O pellet foi ressuspenso em 20 mL de tampão de lise (20mM fosfato de sódio, 500mM cloreto de sódio, 6M guanidina, pH 7,8) A solução foi submetida a 6 pulsos de 15 segundos a 300 W em sonicador (Marconi, modelo MA 103) para lise celular. A amostra foi centrifugada por 20 minutos a 4.000 x g e 4°C. A fase aquosa coletada, contendo a proteína desnaturada, foi utilizada para a purificação da proteína de interesse.

II.15 Purificação da proteína recombinante em coluna de afinidade

Após expressão, a proteína de interesse foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna contendo resina de níquel (Ni-NTA), conforme instruções do fabricante (Invitrogen). As amostras resultantes da eluição foram analisadas em SDS-PAGE 12% e as frações contendo a proteína capsidial recombinante do RSPaV-SP foram reunidas e concentradas utilizando-se colunas Centricon-30 (Millipore).

II.16 Produção de anti-soro policlonal

A produção do anti-soro policlonal contra a proteína capsidial recombinante do RSPaV-SP foi realizada no Laboratório de Virologia (Departamento de Entomologia,

Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Esalq/USP – Piracicaba) sob orientação do professor colaborador Dr. Jorge A. M. Rezende.

Coelho branco da raça Nova Zelândia foi imunizado com injeção inicial de 300 µg da proteína purificada misturada (1:1) com adjuvante de Freund completo (Sigma). Quatro injeções subseqüentes foram administradas semanalmente, com 300 µg de proteína por injeção misturadas (1:1) com adjuvante de Freund incompleto (Sigma). O anti-soro foi obtido uma semana após a última injeção e estocado a -20°C. Este anti-soro foi analisado quanto à titulação e especificidade por “Western-blot” e ELISA.

II.17 Pré-adsorção do anti-soro policlonal

Inicialmente foi realizada a extração de proteína total de 1g de folha de videira sadia em 5 mL de tampão de extração (50mM Tris-HCl pH 7,5, 400mM sacarose, 20% glicerol, 5mM MgCl₂, 10 mM KCl) contendo 1mM de inibidor de protease (“Phenyl methyl-sulfonyl fluoride”, PMSF), 25mM de 2-ME e 200mM de sulfito de sódio. Este extrato foi filtrado em gaze e a ele foi adicionado o anti-soro policlonal na proporção de 1:1. Esta mistura foi incubada por 4°C durante 16 horas. Após centrifugação durante 10 minutos a 10.000 x g o sobrenadante foi coletado e estocado a 4°C.

II.18 Extração de proteínas totais

Folhas e pecíolos de plantas sadias e infectadas pelo RSPaV foram homogeneizadas em 5 volumes de tampão de extração (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-ME, 1 mM azul de bromofenol) contendo 1 mM de PMSF. Após centrifugação a 10.000 x g por 20 minutos, 10 µL do sobrenadante de cada extrato foram aplicados em SDS-PAGE 12%.

II.19 “Western-blot”

Após separação em gel (SDS-PAGE 12%), as proteínas foram transferidas para membrana de “Polyvinyl difluoride” (PVDF) (Amershan Pharmacia Biotech) em um eletrotransferidor (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell Bio-Rad) operando por 60 minutos a 130mA. O tampão de transferência utilizado foi o Tris-Glicina (25 mM Tris, 192 mM Glicina) contendo metanol 20%.

A detecção da proteína viral foi realizada através de incubação da membrana em tampão PBS-T (10 mM fosfato de sódio, 150 mM NaCl, pH 7,2, 0,3% Tween-20) contendo 3% de albumina de soro bovino (BSA) por 3 horas. Em seguida, a membrana foi incubada por 1 hora com o anti-soro específico pré-adsorvido nas diluições 1:1000; 1:2000 e 1:4000 em tampão PBS-T contendo 0,3% de BSA e heparina (20 µg/mL). A membrana foi lavada com tampão PBS-T e incubada com anti-soro anti-imunoglobulina do tipo G (IgG) de coelho acoplado com fosfatase alcalina (Promega) diluído em tampão PBS-T contendo 0,3% de BSA na proporção de 1:7.500 por 1 hora. Após lavagens com tampão PBS 1 X, o substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato/nitro-blue tetrazolio (BCIP/NBT) foi adicionado à membrana até o aparecimento do resultado da reação (cor azul púrpura).

II.20 “Plate Trapped Antigen – Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (PTA-ELISA)

Esta técnica foi realizada no Laboratório de Virologia (Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Esalq/USP – Piracicaba) com a colaboração do professor Dr. Jorge A. M. Rezende.

Extratos de folhas e pecíolos de plantas sadias e infectadas pelo RSPaV foram preparados utilizando-se 50 volumes de tampão carbonato (15mM Na₂CO₃, 35mM NaHCO₃, 3mM NaN₃, pH 9,6). Em seguida, 100 µL de cada amostra foram aplicados na placa de ELISA e incubados a 4°C durante a noite. Após lavagens com tampão PBS-T, o anti-soro policlonal primário anti-RSPaV-SP (diluído 1:1.000) foi adicionado à placa e esta incubada a 37°C por 2 horas. A placa foi submetida a lavagens com tampão PBS-T e então incubada com anti-soro secundário (anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina diluído 1:30.000, Sigma) a 37°C por 2 horas. O substrato p-fosfato de nitrofenil (diluído em dimetanolamina – 0,6g/mL) foi adicionado à placa e incubado a temperatura ambiente no escuro. Após 30-60 minutos a reação foi observada visualmente pelo aparecimento de cor amarelada e então medida a absorbância a 405 nm no leitor de ELISA.



RESULTADOS

Capítulo Três

III.1 Clonagem e seqüenciamento do gene da proteína capsidial do RSPaV-SP

III.1.1 Amplificação por RT/PCR

O produto da reação de PCR evidenciou uma banda de aproximadamente 900 bp (Figura 5).

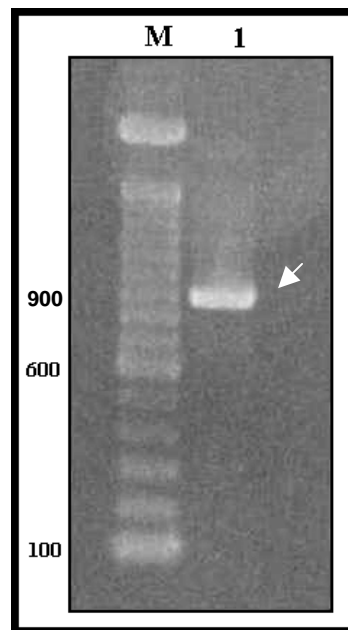


Figura 5: Gel nativo de agarose 1% mostrando a amplificação do fragmento contendo o gene da proteína capsidial do RSPaV-SP. (M) Marcador de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). (1) Produto amplificado com aproximadamente 900 pb (seta).

III.1.2 Digestão enzimática do vetor de seqüenciamento (TOPO TA)

Após a digestão com a enzima de restrição *EcoRI* foi comprovada a formação do DNA recombinante (Figura 6, linha 1) com a liberação de um fragmento de aproximadamente 900bp (Figura 6, linha 2).

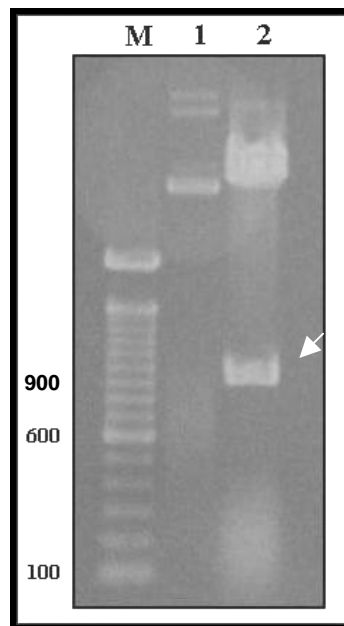


Figura 6: Gel nativo de agarose 1% mostrando a formação do DNA plasmidial (TOPO TA) recombinante que contém o gene da CP do RSPaV-SP. (M) Marcador de tamanho molecular (100 pb DNA Ladder - Invitrogen). (1) DNA plasmidial recombinante extraído do clone selecionado. (2) DNA plasmidial digerido com *EcoRI* e o fragmento de interesse liberado (aproximadamente 900 pb - seta).

III.1.3 Seqüenciamento automatizado do gene

A seqüência do gene da proteína capsidial do RSPaV-SP apresentou 780 nucleotídeos e 259 aminoácidos deduzidos (Figura 7). Nesta seqüência foi encontrado o motivo conservado ‘RR/QX---FDF’, localizado na região central da seqüência de aminoácidos deduzidos (área sombreada na Figura 7).

	10	20	30	40	50	
001-	atggcaagtcagg	ttggaaaattgc	cctagcgaatc	aaatgaagcgt	atgaggctagactt	
	M A S Q V G K L P S E S N E A Y E A R L					020
061-	aaggcttagagct	agcaagggccaaa	agctccagaagt	tccagccaacctcccaca		
	K A L E L A R A Q K A P E V S S Q P P T					040
121-	cttgaggcattct	agccaaaaggaaa	<u>agagtgattgagaatgcactctcaaagacagtg</u>			
	L G G I L A K R K R V I E N A L S K T V					060
181-	<u>gatatgcgtgaagt</u>	<u>ccttaaggcatgaat</u>	<u>ctggtgtactctctccgaatgtgatggacgag</u>			
	D M R E V L R H E S V V L S P N V M D E					080
241-	<u>ggagcaatagacgagctgg</u>	<u>ttcgtgcctttggggagtcgggaatagctgaaaatgtgcag</u>				
	G A I D E L V R A F G E S G I A E N V Q					100
301-	<u>tttgatggtgcaatagacattg</u>	<u>ctcgcgcctgttctgatgtggggagctctcagaggtca</u>				
	F D V A I D I A R R C S D V G S S Q R S					120
361-	<u>accctcattggtaaaagcccctt</u>	<u>ctgtgagttaaataggtctgaaattgccggaataata</u>				
	T L I G K S P F C E L N R S E I A G I I					140
421-	<u>agggaggtaccacgctgcgcagatt</u>	<u>tttgcagtgactacgcaaagattgtgtggaacatc</u>				
	R E V T T L RR F C M Y A A K I V W N I					160
481-	<u>cattggagacgggaataaccaccagctaattgggccaagaaaggattta</u>	<u>atgagaatgaa</u>				
	H L E T G I P P A N W A K K G F N E N E					180
541-	<u>aagtttgacgctttgacttcttccttggagtcacagatgaaagcgcgcttgagcctaag</u>					
	K F A A F D F F L G V T D E S A L E P K					200
601-	ggtagagcaagagagctcca	caaaaagcagagatgg	tcgctaataattgcctcttttgaa			
	G G V K R A P T K A E M V A N I A S F E					220
661-	gtcaaagtgtcagacagactatgg	ctgaaggaaagcggagctccaatcttgagaaatt				
	V K V L R Q T M A E G K R S S N L G E I					240
721-	agtgggtggaacggctggggcgttatcaaca	accctttgcaa	atgttacgcatgaataa			
	S G G T A G A L I N N P F A N V T H E *					

Figura 7. Seqüência de nucleotídeos (acima) e aminoácidos deduzidos (abaixo) correspondentes ao gene da CP do RSPaV-SP. O motivo conservado ‘RR/QX---FDF’ encontra-se sombreado. Os nucleotídeos em negrito (atg) correspondem ao códon de início da ORF6 e os nucleotídeos duplamente sublinhados (nt 147-587) compreendem a região central utilizada para construção da árvore filogenética. (*) Códon de terminação (taa). Acesso no GenBank: DQ443732.

III.1.4 Alinhamento e análise filogenética das seqüências

Os valores de identidade entre a seqüência de aminoácidos deduzidos e nucleotídeos correspondentes a região central do gene da proteína capsidial do RSPaV-SP com outras variantes do vírus são mostrados na Tabela 1.

O alinhamento das seqüências de nucleotídeos de algumas variantes do RSPaV está representado na figura 8, mostrando as diferentes localizações do códon de iniciação da ORF6.

A figura 9 representa a árvore de máxima parcimônia de seqüências gênicas parciais, onde 4 grupos (1, 2, 3 e 4) foram formados com valores de “bootstrap” superiores a 70%. A árvore obtida com seqüências completas do gene da CP apresentou topologia similar (dado não apresentado).

Tabela 1. Porcentagem de identidade da seqüência de aminoácidos deduzidos (aa) e nucleotídeos (nt) correspondentes a região central do gene da proteína capsidial do RSPaV-SP com outras variantes do *Rupestris stem pitting-associated virus*. O número de acesso no banco de dados GenBank encontra-se na primeira coluna.

Acesso GenBank	Grupos de Variantes	RSPaV-SP	
		aa	nt
G-1			
AY927676	E105G	91,1	81,6
DQ278615	SeyeVillard	94,6	81,4
AF057136	RSPaV-1	91,9	81,9
AF026278	GRSPaV	91,9	81,6
G-2			
AY881626	RSPaV-SG1	89,2	83,2
AY927673	M3135	91,5	83,7
DQ278616	Trebbiano	94,6	83,2
G-3			
AY881627	RSPaV-BS	98	92,5
DQ278606	Niagara	96,9	88,2
AY927672	D-10	97,7	91,4
G-4			
AY927685	Vs28421	91,9	82,8
DQ278609	Merlot	93,9	83,2

(nt 458-532)	458	506
RSPaV1	<u>ATG</u> CAAAAATCGTGTGGAACATCCATCTGGAGACGGGGATAACCACCAGC	
GRSPaV	<u>ATG</u> -----	
Niagara	<u>ATG</u> -----T-----T-----C--	
D10	ACG-----T-----T-----	
BS	ACG-----T--T-----A-----	
RSPaV-SP	ACG---G--T-----T-----A-----	
	507	532
RSPaV1	AACCTGGGCCAAGAAAGGATTTA <u>ATG</u>	
GRSPaV	----- <u>ATG</u>	
Niagara	---T----- <u>ATG</u>	
D10	---T-----G-- <u>ATG</u>	
BS	---T----- <u>ATG</u>	
RSPaV-SP	---T----- <u>ATG</u>	

Figura 8: Alinhamento da seqüência de nucleotídeos de algumas variantes do RSPaV, mostrando o códon de iniciação (ATG) da ORF6 em diferentes localizações (posição 458 e 530) da ORF5. Nucleotídeos idênticos estão representados por traços (-).

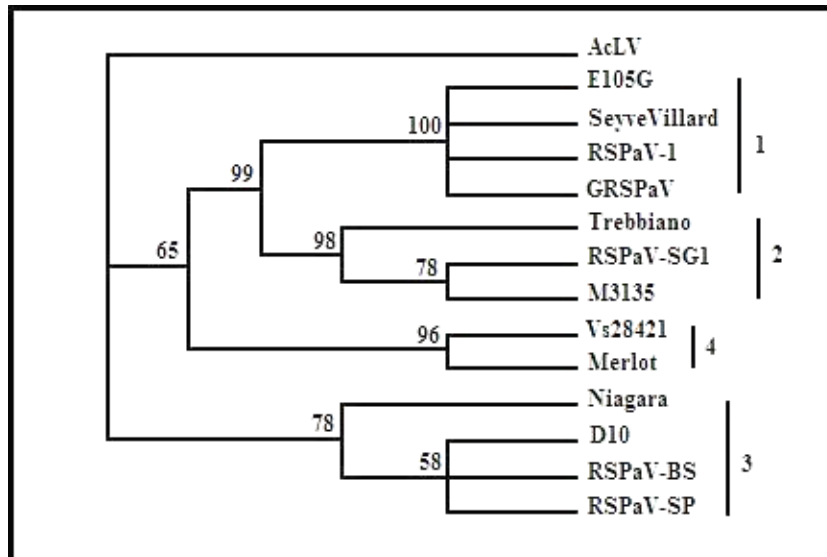


Figura 9: Árvore filogenética com base no alinhamento da seqüência parcial de nucleotídeos da proteína capsial do RSPaV-SP com outras variantes do vírus. **Grupo 1:** linhagem GRSPaV; **grupo 2:** linhagem GRSPaV-SG1; **grupo 3:** linhagem GRSPaV-BS; **grupo 4:** GRSPaV-VS. Os valores de “bootstrap” (localizados à esquerda) são representados em porcentagem. **Grupo externo:** AcLV – *Aconitum latent virus*, gênero *Carlavirus* (Acesso no GenBank: NC002795.)

III.2 Clonagem e expressão do gene da proteína capsidial do RSPaV-SP

III.2.1 Digestão enzimática do vetor de expressão (pET 28a)

O DNA plasmidial recombinante extraído do clone selecionado por PCR foi digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III, comprovando a formação do DNA recombinante (Figura 10, linha 1) com a liberação de um fragmento de aproximadamente 800 bp (Figura 10, linha 2).

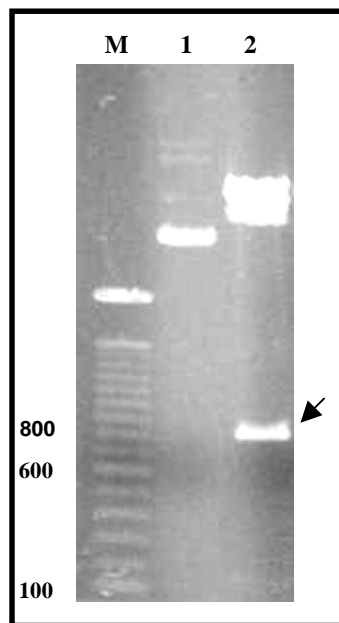


Figura 10: Gel nativo de agarose 1% mostrando a formação do DNA plasmidial (pET 28a) recombinante que contém o gene da CP do RSPaV-SP. **(M)** Marcador de tamanho molecular (100 pb DNA Ladder - Invitrogen). **(1)** DNA plasmidial recombinante extraído do clone selecionado. **(2)** DNA plasmidial digerido com *Bam*HI e *Hind*III e o fragmento de interesse liberado (aproximadamente 800 pb - seta).

III.2.2 Expressão em *E. coli* e purificação da proteína capsidial recombinante do RSPaV-SP em coluna de afinidade

A confirmação da expressão foi feita através da visualização da proteína recombinante com massa molecular aproximada de 32 kDa (28 kDa referente a CP do RSPaV e 4 kDa referente a cauda de histidina do vetor) (Figura 11, linhas 1 a 4). A purificação em resina de níquel possibilitou a obtenção da proteína recombinante de 32 kDa, como visto em gel corado com Comassie blue, após concentração em colunas Centricon-30 (Figura 11, linha 5).

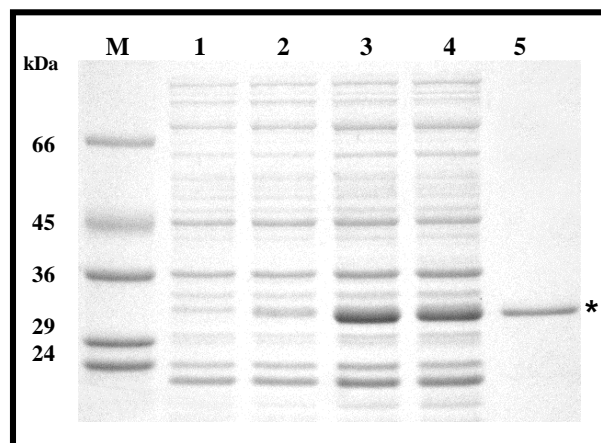


Figura 11. SDS-PAGE 12% da expressão em *E. coli* e purificação da proteína capsidial recombinante do RSPaV-SP em coluna de níquel. **(M)** Marcador de massa molecular BenchMark (Invitrogen). Extrato de células: **(1)** antes da indução; **(2)** após 30 minutos; **(3)** após 2 horas e **(4)** após 4 horas de indução da expressão com 1mM de IPTG. **(5)** Proteína capsidial recombinante do RSPaV-SP purificada e concentrada, com massa molecular estimada de 32 kDa (*).

III.2.3 Detecção da proteína recombinante por “Western-blot”

A especificidade do anti-soro produzido para a proteína capsial recombinante do RSPaV-SP foi determinada por testes de “Western-blot” e o anti-soro foi eficiente em detectar 50 ng de proteína purificada até uma diluição de 1:64.000 (Figura 12). Na diluição 1:4000 o anti-soro foi efetivo na detecção de até cerca de 12 ng de proteína recombinante purificada (Figura 13, linha 3). A análise dos extratos por “Western-blot” de proteínas totais de folhas de videira mostrou que o anti-soro (diluído 1:4000) foi eficiente na detecção do vírus em extratos de plantas infectadas (Figura 14, linhas 3 e 4), sem reação com extrato de plantas sadias (Figura 14, linha 2).



Figura 12. Detecção por Western-blot da proteína capsial recombinante purificada do RSPaV-SP em diferentes diluições do anti-soro. Linhas ímpares correspondem a proteína purificada do RSPaV-SP; linhas pares correspondem a possível proteína do movimento recombinante purificada do *Pepper ringspot tobravirus* (PepRSV). Diluições do anti-soro para detecção de 50ng de proteína purificada: linhas **1, 2**: 1:1000; **3, 4**: 1:2000; **5, 6**: 1:4000; **7, 8**: 1:8000; **9, 10**: 1:16.000; **11, 12**: 1:32:000; **13, 14**: 1:64:000

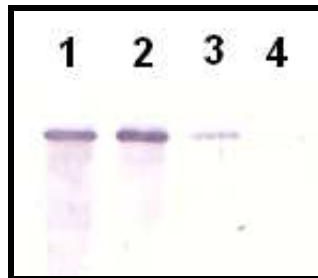


Figura 13. Sensibilidade do Western-blot para a detecção de diferentes concentrações da proteína capsial recombinante purificada do RSPaV-SP na diluição de 1:4000 do anti-soro. Linhas **1**: 50ng; **2**: 25 ng; **3**: 12,5 ng; **4**: 6,25 ng.

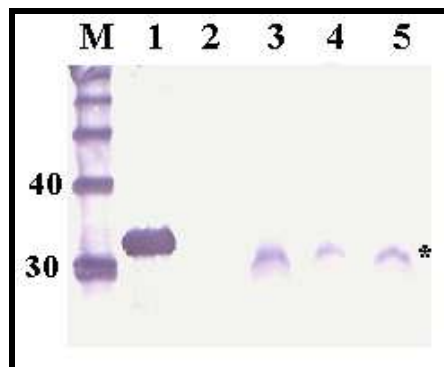


Figura 14. Detecção por Western-blot da proteína capsial do RSPaV em extratos de folhas de videira. **M**: Marcador de massa molecular (MagicMark XP Western Standard – Invitrogen); **1**: Proteína capsial recombinante purificada do RSPaV-SP; **2**: Extrato de planta sadia; **3, 4 e 5**: Extrato de plantas infectadas das cultivares Brasil (clone TP 1780), Itália (clone SMA 1536), Benitaka (clone LD 1587), respectivamente. (*) Proteína capsial.



DISCUSSÃO

Capítulo Quatro

Atualmente, são conhecidas na videira cerca de cinquenta doenças consideradas de origem viral. Existem relatos da ocorrência de pelo menos sete importantes viroses em videiras no estado de São Paulo. São elas: enrolamento da folha, mosaico das nervuras, mosaica da videira Traviú e as viroses do complexo do lenho rugoso da videira, o qual inclui a acanaladura do lenho de Kober, fendilhamento cortical, acanaladura do lenho de LN33 e o lenho estriado de rupestris ou cascudo (Kuniyuki, 1978; Kuniyuki & Costa, 1982; Kuniyuki, 1989; Kuniyuki, 1994; Kuniyuki *et al.*, 1994, 2001). A ocorrência destas viroses no Brasil é resultado da multiplicação de clones de variedades tradicionais de copa e porta-enxerto, cujos materiais propagativos estavam inicialmente infectados. Os vírus responsáveis por estas doenças podem apresentar alta incidência em variedades importantes para a viticultura nacional (Kuniyuki & Costa, 1987; Kuhn & Fajardo, 2006).

O controle destas viroses pode ser feito de modo eficiente pelo emprego constante de material livre de vírus através da utilização de testes de sanidade antes da propagação das mudas, o que impede a disseminação do vírus (Amorim & Kuniyuki, 1997). No Brasil, uma das formas de diagnóstico são os testes biológicos com enxertia em videiras indicadoras (Amorim & Kuniyuki, 1997; Lima, 2002). No entanto, a obtenção de resultados pode levar até três anos, o que torna estes testes bastante demorados.

Métodos alternativos de detecção de vírus em videira que ofereçam resultados mais rápidos e ao mesmo tempo confiáveis nas triagens iniciais do material de propagação são de grande interesse para a diminuição da incidência destas viroses.

O lenho rugoso da videira apresenta grande importância econômica para a viticultura, razão pela qual é objeto de constante atenção nos programas de seleção sanitária dos diversos países vitícolas (Kuhn & Fajardo, 2006). O *Rupestris stem pitting-associated virus*, vírus associado ao lenho estriado ou cascudo do Rupestris e que constitui uma preocupante virose do complexo do lenho rugoso da videira, foi escolhido como tema central desta pesquisa. Com o objetivo de contribuir para o controle desta virose no Brasil, foram propostos o seqüenciamento do gene da proteína capsidial (CP) de um isolado brasileiro do RSPaV (RSPaV-SP), sua expressão em *Escherichia coli*, purificação e produção de anti-soro para a proteína capsidial recombinante.

Este vírus tem sido detectado em muitos países onde a videira é cultivada (Meng *et al.*, 1999a; Stewart & Nassut, 2001; Tarnowski *et al.*, 2002; Dovas & Katis, 2003). A análise de seqüências do RSPaV obtidas de videiras afetadas pelo lenho estriado do Rupestris tem sugerido que o vírus é muito diversificado, constituindo uma família de seqüências variantes (Meng *et al.*, 1999b; Rowhani *et al.*, 2000; Soares *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2003; Casati *et*

al., 2003; Terlizzi & Credi, 2003; Lima *et al.*, 2003; Meng *et al.*, 2005; Nolasco *et al.*, 2006; Habili *et al.*, 2006; Talquenca *et al.*, 2006).

Comumente, além da diversidade de seqüências, encontra-se mais de uma variante do RSPaV infectando a mesma planta (Meng *et al.*, 1999b; Rowhani *et al.*, 1999, 2000; Nolasco *et al.*, 2006). Diante disto, no presente trabalho, foi selecionado apenas um clone (colônia) contendo o DNA plasmidial recombinante para realização do seqüenciamento. O resultado obtido evidenciou que o gene da proteína capsidial do RSPaV-SP apresenta uma seqüência de 780 nucleotídeos e 259 aminoácidos deduzidos, com massa molecular de 28 kDa, semelhante às seqüências descritas na literatura (Zhang *et al.*, 1998; Meng *et al.*, 1998). Na região central da seqüência de aminoácidos deduzidos foi encontrado o motivo 'RR/QX---FDF', também identificado em outras seqüências variantes do RSPaV (Meng *et al.*, 1998; Nolasco *et al.*, 2006). Este motivo é conservado em CPs de vírus de RNA de fita positiva com morfologia filamentosa e está possivelmente envolvido na formação de pontes salinas, o que parece ser importante para a estrutura da proteína capsidial (Dolja *et al.*, 1991).

A análise comparativa da seqüência parcial de nucleotídeos e aminoácidos correspondentes à região central do gene da CP (nt 147-587) entre o RSPaV-SP com outras seqüências do RSPaV depositadas no GenBank (Tabela 1) mostrou que este isolado brasileiro está mais relacionado com a variante BS do RSPaV ("Bertille Seyve 5563"; Meng *et al.*, 2005). A análise filogenética da seqüência parcial de nucleotídeos correspondentes à região central do gene mostrou que os isolados do RSPaV estão segregados em quatro grupos distintos, como previamente identificado por Nolasco *et al.* (2006) e Meng *et al.* (2006). O primeiro ramo compreende a linhagem GRSPaV-1, que inclui os isolados GRSPaV (Zhang *et al.*, 1998) e RSPaV-1 (Meng *et al.*, 1998) primeiramente descritos e os quais compartilham identidade de 98% do seu genoma completo. O isolado RSPaV-SP foi incluído no grupo 3 (linhagem GRSPaV-BS), apresentando *bootstrap* de 78%, sendo este agrupamento reforçado pelos altos valores de identidade com as variantes do mesmo grupo (Tabela 1). O teste de confiança de topologia (*bootstrap*) representa a consistência interna dos ramos, onde os valores acima de 70% revelam confiabilidade à formação dos ramos (Hillis & Bull, 1993).

Além da existência de quatro grupos distintos, o estudo comparativo da estrutura genômica realizado por Meng e colaboradores (2006) revela que há uma distribuição distinta das variantes do RSPaV. As variedades de copa podem ser infectadas por uma mistura de diferentes variantes, enquanto as variedades de porta-enxerto infectadas por uma população homogênea de uma única variante. A linhagem de variante mais encontrada pelos autores nas variedades de copa foi a GRSPaV-SG1 (grupo 2) seguida pela linhagem GRSPaV-1 (grupo

1). As outras duas linhagens de variantes, GRSPaV-BS (grupo 3) e GRSPaV-VS (grupo 4), foram detectadas em menor frequência nas variedades de copa e não foram detectadas nas variedades de porta-enxerto. O sequenciamento de outros clones do RSPaV-SP poderá elucidar quais variantes e a frequência com que elas ocorrem em videiras no Brasil. A prática de enxertia na viticultura aliada a infecção assintomática do RSPaV e a troca regional e internacional frequente de material de propagação vegetativo pode ter levado à distribuição e infecção mista entre as variedades de copa. Entretanto, a possível origem e evolução das variantes do RSPaV ainda não foi totalmente esclarecida, abrindo caminho para novos estudos sobre a diversidade de seqüências deste vírus (Meng *et al.*, 2006).

O genoma do RSPaV apresenta seis cadeias abertas de leitura que codificam proteínas envolvidas na replicação (ORF1), movimento célula-célula (ORF2-4) e formação do capsídeo viral (ORF5) (Martelli & Jelkmann, 1998, Meng & Gonsalves, 2003). A ORF6, identificada por Zhang *et al.* (1998), sobrepõe a ORF5 em 332 nucleotídeos codificando uma proteína de 119 aminoácidos com massa molecular de 14 kDa. A função desta proteína ainda é desconhecida. A existência desta ORF tem sido proposta baseando-se na ocorrência ‘in frame’ de códon de iniciação e finalização. O códon de iniciação da ORF6 está localizado na região central (nt 458) do gene da CP (Zhang *et al.*, 1998) e apresenta-se conservada entre as variantes analisadas (Nolasco *et al.*, 2006). Entretanto, estes autores não localizaram este códon de iniciação em um dos grupos de variantes do RSPaV por eles analisado. Para este grupo, linhagem GRSPaV-BS (grupo 3), o códon de iniciação mais próximo foi localizado 72 nt após o códon de iniciação citado por Zhang *et al.* (1998), ou seja, no nucleotídeo 530 da ORF5, o que codificaria uma proteína de menor massa molecular (10.7 kDa). Foi observado que para o RSPaV-SP o códon ‘in frame’ de iniciação está localizado somente na posição 530 da ORF5. No entanto, o alinhamento das seqüências de nucleotídeos das variantes do RSPaV incluídas no grupo 3 aqui analisadas, mostrou que a seqüência variante ‘Niagara’ (Meng *et al.*, 2006) possui o códon de iniciação nas duas posições, ou seja, no nucleotídeo 458 e 530 (Figura 3b). Estas variações levam ao questionamento quanto à existência da ORF6 no genoma do RSPaV (Nolasco *et al.*, 2006).

O estudo das viroses de videira apresenta várias limitações e, com isso, a etiologia de muitas dessas doenças ainda é pouco conhecida. Muito embora técnicas moleculares, como o RT-PCR e a hibridização “dot blot” com sondas de cDNA, estejam sendo utilizadas para a detecção de alguns vírus da videira no Brasil (Moreira *et al.*, 2005), sua aplicação em larga escala não é adequada, em função principalmente dos custos e da relativa complexidade das técnicas. Tradicionalmente, as técnicas sorológicas, principalmente o ELISA, têm sido

utilizadas para a detecção e diagnóstico de vírus de plantas. Com relação aos vírus da videira, métodos imunológicos têm sido aplicados através da utilização de anti-soros comerciais, que quando existentes, são importados a um custo bastante elevado. Assim, a produção de anti-soro para o RSPaV no País é de grande interesse. Em geral, a produção de anti-soros é normalmente realizada via injeção de partículas virais purificadas na corrente sanguínea de coelhos. Entretanto, devido à presença de altos níveis de substâncias inibidoras, à baixa concentração viral na planta e localização restrita ao floema (Meng *et al.*, 2003), a purificação deste vírus torna-se um processo altamente trabalhoso e com obtenção de preparações com grau de pureza insatisfatório. Considerando-se estas limitações e a diversidade genômica do RSPaV, uma possível solução para estes problemas é a utilização de proteínas recombinantes para a obtenção de anticorpos.

A utilização de técnicas de clonagem e expressão de proteínas virais em *Escherichia coli*, principalmente a proteína capsidial, tem permitido a produção e purificação dessas proteínas em quantidades suficientes para a imunização de animais e conseqüente obtenção de anti-soros policlonais em larga escala (Nikolaeva *et al.*, 1995; Vaira *et al.*, 1996; Targon *et al.*, 1997; Ling *et al.*, 2000, 2007; Minafra *et al.*, 2000; Meng *et al.*, 2003; Petrovic *et al.*, 2003; Barbieri *et al.*, 2004; Nickel *et al.*, 2004). Os anti-soros assim produzidos normalmente apresentam as mesmas propriedades daqueles obtidos com a imunização de partículas virais purificadas. Existem evidências de que o anti-soro produzido contra a proteína capsidial recombinante do RSPaV é capaz de detectar os quatro grupos de variantes do RSPaV (Meng *et al.*, 2003).

O anti-soro produzido para a proteína capsidial recombinante do RSPaV-SP foi efetivo na detecção do vírus por “Western-blot”, sem reação com proteína heteróloga a partir da diluição 1:4000. Nesta diluição, o anti-soro foi efetivo na detecção do vírus em extratos de plantas infectadas, sendo que nenhuma reação foi observada com extratos de plantas sadias. Considerando-se que este vírus apresenta variações de concentração na planta durante as estações do ano (Stewart & Nassut, 2001; Meng *et al.*, 2003; Minafra *et al.*, 2000) e que os testes sorológicos foram realizados durante uma estação de baixa concentração do vírus, estes resultados podem ser considerados altamente satisfatórios.

Os experimentos realizados até o momento utilizando-se a técnica de ELISA não apresentaram resultados satisfatórios. Além da possibilidade do vírus encontrar-se em baixa concentração na planta durante a realização dos testes, estes resultados podem estar ainda relacionados à utilização da proteína recombinante desnaturada para a produção do anti-soro policlonal. Grande parte da proteína capsidial recombinante do RSPaV-SP expressa em *E.*

coli encontrou-se na forma insolúvel, dificultando sua purificação em condições nativas. Uma das razões para a alteração da solubilidade pode estar relacionada ao envelhecimento incorreto destas proteínas (Mitraki & King, 1989). Após várias tentativas mal sucedidas de solubilização da proteína, optou-se por produzir o anti-soro para a proteína recombinante do RSPaV em condições desnaturantes.

Embora a detecção do RSPaV-SP não tenha sido efetiva por ELISA, ainda não é possível afirmar que este fato esteja diretamente relacionado à utilização de proteína desnaturada para produção do anti-soro. Observa-se na literatura que os resultados obtidos com o dois anti-soros produzidos para a proteína capsidial recombinante do RSPaV purificada em condições nativas são conflitantes. De acordo com Minafra e colaboradores (2000), o anti-soro anti-RSPaV também não foi efetivo na detecção do vírus por ELISA, sendo efetivo apenas por “Western-blot” e “Dot-blot”. Já os resultados obtidos por Meng e colaboradores (2003) mostram que o anti-soro produzido para a CP recombinante do RSPaV em condições nativas foi efetivo tanto para “Western-blot” quanto para o ELISA indireto.

Outros fatores também podem ser fundamentais na detecção do vírus, como as flutuações de concentração viral na planta durante as estações do ano (Stewart & Nassut, 2001; Meng *et al.*, 2003; Minafra *et al.*, 2000) ou a presença de altos níveis de substâncias inibidoras da planta (Meng & Gonsalves, 2003). Fica evidente que novos estudos ainda se fazem necessários para estabelecer condições em que o teste ELISA seja efetivo na detecção do RSPaV-SP, inclusive a produção de anti-soro para proteína recombinante nativa.

Brevemente, estudos serão iniciados para expressão da proteína capsidial do RSPaV-SP em *Saccharomyces cerevisiae*, o que poderá levar à produção de proteína recombinante em sua forma nativa. À medida que mais dados forem divulgados, melhores serão as condições para o aprimoramento destas técnicas e, conseqüentemente, maiores serão as contribuições para a melhor execução dos programas de controle de viroses da viticultura nacional.




CONCLUSÕES

Capítulo Cinco

A realização deste trabalho permitiu concluir que:

- 1- A seqüência do gene da proteína capsial do RSPaV-SP é similar as seqüências variantes do RSPaV descritas na literatura, apresentando maior identidade com a variante BS (“Bertille Seyve 5563”; Meng *et al.*, 2005);

- 2- O anti-soro anti-RSPaV-SP mostrou-se eficiente na detecção por “Western-blot” de pequena quantidade da proteína recombinante purificada e também na detecção do vírus em extratos de plantas infectadas.



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

AMORIM, L. & KUNIYUKI, H. Doenças de videira. In: KIMATI H., AMORIM L., BERGAMIN A., ARANHA L.E.A., REZENDE J.A.M. (Org). **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p. 736-757.

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

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**, Siebeldingen, v. 35, p. 53-58, 1996.

BOSCIA, D.; GREIF, C.; GUGERLI, P.; MARTELLI, G.P.; WALTER, B.; GONSALVES, D. Nomenclature of grapevine leafroll-associated putative closteroviruses. **Vitis**, Siebeldingen, v. 34, p. 171-175, 1995.

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**, New York, v. 130, p. 109-120, 1993.

CASATI, P.; MINAFRA, A.; ROWHANI, A.; BIANCO, P.A. Further data on the molecular characterization of grapevine rupestris stem pitting associated virus. In: Meeting of International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevines, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts...** Locorotondo: ICVG, 2003. p. 130.

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

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

DOLJA, V.V.; BOYKO, V.P.; AGRANOVSKY, A.A.; KOONIN, E.V. Phylogeny of capsid proteins of rod-shaped and filamentous RNA plant virus: two families with distinct pattern of sequence and probably structure conservation. **Virology**, New York, v. 184, p.79-86, 1991.

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

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

FAJARDO, T.V.M.; EIRAS, M.; SANTOS, H.P.; NIKEL, O.; KUHN, G.B. Detecção e Caracterização Biológica e Molecular de *Rupestris stem pitting-associated vírus* e seu Efeito na Fotossíntese de Videiras. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 209-214, 2004a.

FAJARDO, T.V.M.; EIRAS, M.; SCHENATO, P.G.; NICKEL, O.; KUHN, G.B. Detecção e Caracterização Molecular Parcial do *Grapevine fleck virus* em Videiras. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 460, 2004b.

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

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**, Brasília, v. 28, n. 5, p. 521-527, 2003.

GENTIT, P.; FOISSAC, X.; SVANELLA-DUMAS, L.; PEYPELUT, M.; CANDRESSE, T. Characterization of two different apricot latent virus variants associated with peach asteroid spot and peach sooty ringspot diseases. **Archives of Virology**, New York, v. 146, p. 1453-1464, 2001.

GUGERLI, P. Grapevine leafroll and related viruses. Extended Abstracts. In: Meeting of International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevines 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstrats...** Locorotondo: ICVG, 2003. p. 25-31.

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

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

HILLIS, D.M.; BULL, J.J. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. **Systematic Biology**, Washington, v. 42, p. 182-192, 1993.

KRAKE, L.R.; STEELE SCOTT, N.; REZAIAN, M.A.; TAYLOR, R. H. **Graft-transmitted Diseases of Grapevines**. Collingwood: CSIRO, 1999. p. 45-52.

KUHN, G.B. Efeitos causados pelo vírus do enrolamento da folha da videira no cultivar Cabernet Franc. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 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**, Brasília, v. 17, p. 399-406, 1992.

KUHN, G.B. In: Mudanças de videira: qualidade do material e enxertia. Importância do material vegetativo selecionado. 2006. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/viticultura/muda.html>> Acesso: fev. 2008.

KUHN, G.B. & FAJARDO, T.V.M. **Viroses da Videira no Brasil**. 2006. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/viticultura/viroses.html>> Acesso: fev. 2006.

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**, Brasília, v. 24, p. 355, 1999.

KUHN, G.B.; FAJARDO, T.V.M.; NICKEL, O. Detecção biológica de três vírus do complexo rugoso da videira causador de caneluras. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 35., 2002, Recife. **Fitopatologia Brasileira...** Brasília: SBF, 2002. v. 27. p. S207.

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

KUNIYUKI, H. Nota sobre a ocorrência do “cascudo”, moléstia semelhante ao “legno riccio” em São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 5, p. 137, 1972b.

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

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

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

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

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

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

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**, Brasília, v. 19, p. 224-230, 1994.

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

KUNIYUKI, H.; RESENDE, J. A. M.; KITAJIMA, E. W.; BETTI, J. A. Detecção serológica do vírus do mosaico das nervuras da videira no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 443, 2000a.

KUNIYUKI, H.; REZENDE J.A.M.; YUKI, V.A.; KITAJIMA, E.W; BETTI, J.A. Confirmação da identidade do vírus do mosaico das nervuras da videira no Brasil por ELISA. In: Reunião de Controle Biológico de Doenças de Plantas, 6., 2000, Campinas. **Summa Phytopathologica...** Jaguariúna, 2000b, v. 26, p. 130-131.

KUNIYUKI, H.; RESENDE, J.A.M.; YUKI, V.A; BETTI, J.A. Detecção do *Grapevine vírus B* em videira com a doença de fendilhamento cortical. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 116-117, 2001a.

KUNIYUKI, H.; REZENDE, J.A.M.; SCAGLIUSI, S.M.M.; VEGA, J.; YUKI, V.A. Incidência dos vírus 1, 2 e 3 do enrolamento da folha da videira em vinhedos do estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Brasília, v. 28, p. 311-314, 2002.

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

KUNIYUKI, H.; REZENDE J.A.M.; GASPAR, J.O.; YUKI, V.A. Detecção do Grapevine leafroll-associated virus 5 por ELISA no Estado de São Paulo. In: Congresso Paulista de Fitopatologia, 9., 2006, Botucatu. **Summa Phytopathologica...** Jaguariúna, 2006, v. 32, p. S21.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, New York, v. 227, p. 680-685, 1970.

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

LIMA, M.F.; ALKOWNI, R.; ROWHANI, A.; UYEMOTO, J.K.; MOLINO, D.A.; RENAULT-SPILMONT, A.S. Genomic study of two grapevine rupestris stem pitting associated virus like isolates. In: Meeting of International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevines, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts...** Locorotondo: ICVG, 2003. p. 125.

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**, London, v. 79, p. 1299-1307, 1998.

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

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

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**, Saint Paul, v. 81, p. 222-226, 1997.

MAIA, J. D. G.; NAVES, R. L.; GARRIDO, L. R.; SÔNEGO, O. R.; KUHN, G. B. In: Cultivo da videira niágara rosada em regiões tropicais do Brasil. **Doenças e seus controles**. 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvaNiagaraRosadaRegioesTropicais/doenca.htm>> Acesso: fev. 2006.

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. Rugose wood complex. In: MARTELLI, G. P. (Org.). **Graft-transmissible diseases of grapevines**. Handbook for detection and diagnosis. Rome: FAO Publication Division, 1993. p. 43-45.

MARTELLI, G.P. Grapevine virology highlights 2000-2003. In: Meeting of International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevines, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts**.... Locorotondo: ICVG, 2003. p. 3-10.

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. & JELKMANN, W. *Foveavirus*, a new plant virus genus. **Archives of Virology**, New York, v. 143, n. 6, p.1245-1249, 1998.

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

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

MELLO, L.M.R. **Atuação do Brasil no Mercado Internacional de Uvas e Vinhos: Panorama 2003**. 2003. Disponível em:<[ww.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos](http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos)>. Acesso em junho de 2007.

MELLO, L.M.R. **Atuação do Brasil no mercado vitivinícola mundial – Panorama 2006**. 2006a. Disponível em:<[ww.cnpuv.embrapa.br/](http://www.cnpuv.embrapa.br/)> Acesso: nov. 2007.

MELLO, L.M.R. **Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2006**. 2006b. Disponível em:<[ww.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos](http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos)> Acesso: fev. 2008.

MENG, B. & GONSALVES, D. Rupestris stem pitting-associated virus of grapevines: genome structure, genetic diversity, detection, and phylogenetic relationship to other plant viruses. **Research Trends, Current Topics in Virology**, v. 3, p.125-135, 2003.

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

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

MENG, B.; ZHU, H.Y.; GONSALVES, D. Rupestris stem pitting associated vírus-1 consists of a family of sequence variants. **Archives of Virology**, New york, v. 144, p. 2071-2085, 1999b.

MENG, B.; CREDI, R.; PETROVIC, N.; TOMOZIC, I.; GONSALVES, D. Antiserum to a Recombinant Virus Coat Protein Detects Rupestris stem pitting-associated virus in Grapevines. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, n. 5, p. 515-522, 2003.

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

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

MINAFRA, A. Rugose wood grapevines. In: Meeting of International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevines, 13., 2000, Adelaide. **Extended Abstrats...** Adelaide: ICVG, 2000. p. 30-34.

MINAFRA, A. & BOSCIA, D. An overview of rugose wood-associated viruses; 2000-2003. In: Meeting of International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevines, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstrats...** Locorotondo: ICVG, 2003. p. 116-119.

MINAFRA, A.; SALDARELLI, P.; MARTELLI, G.P. Grapevine virus A: nucleotide sequence, genome organization, and relationship in the Trichovirus genus. **Archives of Virology**, New York, v. 142, p. 417-423, 1997.

MINAFRA, A.; CASATI, P.; ELICIO, V.; ROWHANI, A.; SALDARELLI, P.; SAVINO, V.; MARTELLI, G.P. Serological detection of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus

(GRSPaV) by a polyclonal antiserum to a recombinant virus coat protein. **Vitis**, Siebeldingen, v. 39, n. 3, p. 115-118, 2000.

MITRAKI, A. & KING, J. Protein folding intermediates and inclusion body formation. **Bio/Technology**, v. 7, p. 690-697, 1989.

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**, Brasília, v. 29, p. 75-80, 2004a.

MOREIRA, A.E., GASPAR, J.O., CAMARGO, L.E.A.; KUNIYUKI, H. Caracterização do Gene da Proteína Capsidial do *Grapevine vírus A* em Videiras Afetadas pela Acanaladura do lenho de Kober no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 205-208, 2004b.

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**, Brasília, v. 30, p.538-542, 2005.

MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.I.; GHABRIAL, S.A.; GARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A.; SUMMERS, M.D. **Virus Taxonomy: sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Wien: Springer-Verlag, 1995.

NAMBA, S.; YAMASHITA, S.; DOI, Y.; YORA, K.; TERAJ, Y.; YANO, R. Grapevine leafroll virus, a possible member of the *Closteroviruses*. **Annals of Phytopathological Society of Japan**, v. 45, p. 497-502, 1979.

NAMBA S.; BOSCIA, D.; AZZAM, O.; MAIZNER, M.; HU, J.S. Purification and properties of closterovirus-like particles associated with grapevine corky bark disease. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, p. 964-970, 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**, Brasília, v. 27, p. 279-284, 2002.

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

- NIKOLAEVA, O.V.; KARASEV, A.V.; GUMPF, D.J.; LEE, R.F.; GARNSEY, S.M. Production of polyclonal antisera to the coat protein of citrus tristeza virus expressed in *Escherichia coli*: Application for immunodiagnosis. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, p. 691-694, 1995.
- NOLASCO, G.; MANSINHO, A.; TEIXEIRA SANTOS, M.; SOARES, C.; SEQUEIRA, Z.; CORREIA, P.K.; SEQUEIRA, O.A. Large scale evaluation of primers for diagnosis of rupestris stem pitting associated virus-1. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 106, p. 311-318, 2000.
- NOLASCO, G.; SANTOS, C.; PETROVIC, N.; TEIXEIRA SANTOS, M.; CORTEZ, I.; FONSECA, F.; BOBEN, J.; NAZERÉ PEREIRA, A.M.; SEQUEIRA, O. Rupestris stem pitting-associated virus isolates are composed by mixtures of genomic variants which share a highly conserved coat protein. **Archives of Virology**, New York, v. 151, p. 83-96, 2006.
- PETROVIC, N.; MENG, B.; RAVNIKAR, M.; MAVRIC, I.; GONÇALVES, D. First detection of *Rupestris stem pitting associated virus* particles in grapevine by antibody to a recombinant coat protein. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, n. 5, p. 510-514, 2003.
- ROWHANI, A.; ZHANG, Y.P.; GOLINO, D.A.; UYEMOTO, J.K. Diversity among different isolates of rupestris stem pitting associated virus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, p. S66, 1999.
- ROWHANI, A.; ZHANG, Y.P.; CHIN, J.; MINAFRA, A.; GOLINO, D.A.; UYEMOTO, J.K. Grapevine rupestris stem pitting associated virus: population diversity, titer in the host and possible transmission vector. In: Meeting of International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevines, 13., 2000, Adelaide. **Extended Abstracts...** Adelaide: ICVG, 2000. p. 37.
- SABANADZOVIC, S.; ABOUTH-GHANEM, N.; CASTELLANO, M.A.; DIGIARO, M.; MARTELLI, G.P. Grapevine fleck virus-like viruses in Vitis. **Archives of Virology**, New York, v. 145, p. 1-13, 2000.
- SALDARELLI, P.; MINAFRA, A.; MARTELLI, G.P. The nucleotide sequence and genomic organization of grapevine virus B. **Journal of General Virology**, London, v. 77, p. 2645-2652, 1996.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings of National Academy of the Science**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, M.T.; CUNHA, J.; EIRAS-DIAS, J.E.J.; SANTOS, C.; NOLASCO, G. Detection of grapevine viruses by RT-PCR from dsRNA templates in three natural occurring Portuguese populations of *Vitis vinifera* spp *sylvestris* (Gmel) Hegi. In: Meeting of International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevines, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts...** Locorotondo: ICVG, 2003. p. 197-198.

SAVINO, V.; BOSCIA, D.; MARTELLI, G. P. Rugose wood complex of grapevine: can grafting to *Vitis* indicators discriminate between diseases? In: Meeting of International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevines, 9., 1989, Kiryat Anavim. **Extended Abstracts...** Kiryat: ICVG, 1989. p. 91-94.

SCAGLIUSI, S.M.M. **Vírus do enrolamento da folha da videira no Brasil: caracterização através de estudos serológicos e de microscopia eletrônica.** 1995. 62 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – UNICAMP, Campinas, 1995.

SCHIEBER, O.; SEDDAS, A.; BELIN, C.; WALTER, B. Monoclonal antibodies for detection, serological characterization and immunopurification of grapevine fleck virus. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, p. 767-774, 1997.

SOARES, C.; MANSINHO, A.; SANTOS, M.T.; SEQUEIRA, O.A., NOLASCO, G. Studying the genomic variability of Rupestris stem pitting associated vírus-1. In: Meeting of International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevines, 13., 2000, Adelaide. **Extended Abstracts...** Adelaide: ICVG, 2000. p. 37.

STWART, S. & NASSUT, A. RT-PCR Based Detection of *Rupestris stem pitting-associated virus* Within Field-Grown Grapevines Throughout the Year. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n. 6, p.617-620, 2001.

SWOFFORD, D. **PAUP: Phylogenetic analysis using parcimony.** Version 4.0b10. Washington: Smithsonian Institution, 1997.

TALQUENCA, S. G.; GRAU, O.; GRACIA, O. Genetic diversity of RDRP among Rupestris stem pitting associated virus isolates from Argentina. In: Meeting of International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevines, 15., 2006, Stellenbosch. **Extended Abstracts...** Stellenbosch: ICVG, 2006. p. 258-259.

TARGON, M.L.P.N.; NIKOLAEVA, O.; MANJUNATH, K.K.; LEE, R.F.; MACHADO, M.A. Cloning and expression in *E. coli* of CTV coat protein gene and production of polyclonal antisera. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 99, 1997.

TARNOWSKI, C.G.; WORLOCK, P.A.; ULANOVSKY, S.; GOMEZ TALQUENCA, S. First report of Rupestris stem pitting-associated virus in Argentina. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, p. 921, 2002.

TERLIZZI, F. & CREDI, R. Partial molecular characterization of Italian grapevine rupestris stem pitting associated virus isolates. In: Meeting of International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevines, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts**... Locorotondo: ICVG, 2003. p. 133-134.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTALW W: Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weigh matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

VAIRA, A.M.; VECCHIATI, M.; MASENGA, V.; ACCOTTO, G.P.A polyclonal antiserum against a recombinant viral protein combines specificity with versatility. **Journal of Virological Methods**, London, v. 56, p. 209-219, 1996.

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**, Saint Paul, v. 88, n. 11, 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 leafroll-associated virus-2 are similar to beet yellows virus, the closterovirus type member. **Journal of General Virology**, London, v. 79, p. 1289-1298, 1998.