

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

CARLA ROSA DUBIELA

**Detecção por RT-PCR em tempo real (Taqman) e caracterização
molecular parcial de vírus que infectam a videira**

**MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
FEVEREIRO - 2012**

CARLA ROSA DUBIELA

**Detecção por RT-PCR em tempo real (Taqman) e caracterização
molecular parcial de vírus que infectam a videira**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Eliezer Rodrigues de Souto.

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2012

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEM

O Desafio da montanha

Olhe para o alto e veja sua montanha, a montanha que está aí, dentro de você. São imensos os desafios: o medo da solidão, a desconfiança, os conflitos, a dúvida, o desconhecido, a insegurança, o compromisso, as tempestades que surgem no horizonte.

Mas em você, bem dentro de você, há forças poderosas que precisam ser despertadas, canalizadas.

Está o divino em forma de entusiasmo, está o humano em forma de ousadia, está a esperança feita de entusiasmo e ousadia.

Olhe para o alto e ouse ser aquilo que você deseja ser.

Olhe para o alto e ouse ser alguém maior do que já foi até agora.

Olhe para o alto e ouse ter grandes esperanças, acreditando poder transformar utopia em sonhos e sonhos em realidade.

Olhe para o alto e ouse fazer cada desafio um motivo para reforçar em si o espírito de luta, garra e determinação de vencer.

Por isso, avance, esforce-se o mais que puder e, quando chegar ao topo, olhe para baixo e sentirá a satisfação de ter a montanha a seus pés.

Terá o prazer supremo da conquista e, no coração, terá a alegria imensa de saber que outros o seguirão para escalar outras montanhas.

Firmino Biazus

Aos meus pais, Carlos Alberto Dubiela e Liliana de Oliveira Rosa.

Aos meus irmãos Júnior e Vanessa, pelo apoio, compreensão, amor incondicional e principalmente pela confiança em mim depositada.

Ao meu noivo, pelo carinho e compreensão.

Aos meus amigos, que nunca permitiram o desânimo e estiveram sempre presentes.

Com carinho dedico o sucesso deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, acima de tudo, pela minha vida, por me proporcionar tudo que tenho e estar sempre comigo nas conquistas e nas derrotas, por alimentar minha fé, sempre guiando meus passos e, principalmente, por nunca me deixar desistir.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor doutor Eliezer Rodrigues de Souto, pela oportunidade, pelos ensinamentos e por ter acreditado e investido no meu potencial.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), pelos ensinamentos que proporcionaram a base para a realização do trabalho.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Uva e Vinho), por permitir e auxiliar no desenvolvimento deste trabalho em seus Laboratórios.

Ao Dr. Thor V. M. Fajardo, pela competente orientação, por sua confiança, pelo apoio, incentivo, disponibilidade, paciência e dedicação neste trabalho e por ser um exemplo de profissionalismo em todas as suas ações.

Ao Dr. Marcelo Eiras, pela colaboração nos trabalhos, pelo incentivo e amizade.

Aos pesquisadores da Embrapa Uva e Vinho, Dr. Luis Fernando Revers e Dr. Osmar Nickel, pelos conselhos, sugestões e amizade.

Ao pesquisador e amigo, Dr. Gildo Almeida da Silva, pelos ensinamentos, não apenas em nível técnico, mas também para a vida.

Ao Técnico do Laboratório de Virologia Vegetal, Marcos Fernando Vanni, pela colaboração e auxílio no desenvolvimento dos trabalhos práticos e, principalmente, pela amizade.

A todos os integrantes do Laboratório de Biologia Molecular Vegetal, pelo auxílio e colaboração. Em especial, à analista Vanessa Buffon, pelos ensinamentos compartilhados, pela atenção e paciência.

Aos meus pais, pelo incansável apoio de sempre, pela compreensão, pela paciência, pela confiança e, principalmente, pelo esforço que dedicaram para a realização do meu sonho.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UEM, Patricia R. Carnelossi, Jaqueline Manzatti, Marcelo H. S. Picolli, Cassiele U. Franco, Taise Bijora e Noemi Pelizzon, pelo auxílio, apoio e amizade.

A todos os meus amigos de Bento Gonçalves, que jamais serão esquecidos.

Aos meus amigos de Maringá, em especial à Gislayne K. Coimbra e Carla Sousa.

Aos meus amigos de Cascavel, em especial às biólogas Karla Moraes, Fabiane Lazzari, Ana C. Locatelli, Danielle A. Bottega, e à agrônoma Monise T. Herpich, que sempre estiveram do meu lado, mesmo à distância, preservando esta valiosa amizade.

Aos professores e amigos, Robson M. Delai e Francine Martins, pelo incentivo, apoio e amizade.

A todos aqueles que, de certa forma, sempre me incentivaram e estiveram presentes na minha vida durante essa trajetória.

Meus sinceros agradecimentos!

BIOGRAFIA

CARLA ROSA DUBIELA, filha de Carlos Alberto Dubiela e de Liliana de Oliveira Rosa, nasceu em 27 de abril de 1986, na cidade de Ponta Grossa, estado do Paraná.

Em novembro de 2000, concluiu o Ensino Fundamental, no Colégio Estadual Marilis Faria Pirotelli, na cidade de Cascavel, estado do Paraná.

Concluiu o Ensino Médio, em novembro de 2003, no Curso e Colégio Alfa, na cidade de Cascavel, estado do Paraná.

Ingressou no curso de Ciências Biológicas, em março de 2005, na Faculdade Assis Gurgacz, em Cascavel, estado do Paraná, obtendo o título de Bióloga em agosto de 2008.

Em março de 2010, Ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), da Universidade Estadual de Maringá (UEM), na cidade de Maringá, estado do Paraná.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Viroses da videira e técnicas de diagnose	3
2.2. A cultura da videira e a importância das viroses no Brasil	3
2.3. Principais vírus que infectam a videira	7
2.4. Diagnóstico de viroses da videira	12
2.4.1. RT-PCR.....	14
2.4.2. PCR em tempo real	16
2.4.3. Multiplex PCR em tempo real.....	22
2.4.4. Fatores que influenciam a multiplex PCR em tempo real.....	23
2.5. Utilização da RT-PCR em tempo real (Taqman) para a detecção de vírus em videira	25
2.6. Análise de sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos de cinco espécies virais que infectam a videira.....	31
2.6.1. <i>Grapevine fleck virus</i> (GFkV)	31
2.6.2. <i>Grapevine leafroll-associated virus 5</i> (GLRaV-5)	32
2.6.3. <i>Grapevine virus A</i> (GVA) e <i>Grapevine virus D</i> (GVD)	33
2.6.4. <i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i> (GLRaV-1)	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1. Isolados virais.....	37
3.2. Extração de RNA total	37
3.3. Detecção por RT-PCR em tempo real (TaqMan)	39
3.4. Detecção simultânea por RT-PCR em tempo real - TaqMan duplex.....	44
3.5. Detecção simultânea por RT-PCR em tempo real - TaqMan triplex.....	46
3.6. Avaliação agrônômica de videiras infectadas por vírus.....	46
3.7. Análise de sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos de cinco espécies virais que infectam a videira.....	47
3.7.1. Síntese de cDNA e PCR “convencional”	47

3.7.2. Clonagem e seleção de clones recombinantes	48
3.7.3. Análise das sequências	48
3.7.4. RT-PCR em tempo real	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1. Extração, qualidade e integridade do RNA total	50
4.2. Detecção viral em reação única por RT-PCR em tempo real – TaqMan simplex	52
4.3. Detecção simultânea de dois vírus por RT-PCR em tempo real – TaqMan duplex	63
4.4. Detecção simultânea por RT-PCR em tempo real - TaqMan triplex	73
4.5. Avaliação agronômica de videiras infectadas por vírus	75
4.6. Análise de sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos de cinco espécies virais que infectam a videira	81
4.6.1. <i>Grapevine fleck virus</i> (GFkV)	81
4.6.2. <i>Grapevine leafroll-associated virus 5</i> (GLRaV-5)	86
4.6.3. <i>Grapevine virus D</i> (GVD)	89
4.6.4. <i>Grapevine virus A</i> (GVA)	92
4.6.5. <i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i> (GLRaV-1)	96
5. CONCLUSÕES	100
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Classificação taxonômica dos vírus da videira atualmente conhecidos.....	6
Quadro 2 -	Tipos de transmissão das espécies virais abordadas neste trabalho.	7
Quadro 3 -	Relação das famílias e gêneros onde se classificam as espécies virais que apresentam maior importância econômica para a videira e que foram abordadas neste trabalho.....	8
Quadro 4 -	Número total de depósitos, no banco de dados do NCBI (GenBank), em 24.10.2011, de sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos de espécies virais que infectam a videira e que foram estudadas neste trabalho.....	11
Quadro 5 -	Relação de controles positivos (hospedeiras infectadas com isolados virais previamente identificados e caracterizados) e negativo (planta sadia), utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real (TaqMan).....	38
Quadro 6 -	Relação de oligonucleotídeos e sondas utilizados na detecção por RT-PCR em tempo real, com sondas com fluoróforo (TaqMan), de dez diferentes vírus que infectam a videira.....	40
Quadro 7 -	Composição das reações de RT-PCR em tempo real considerando-se os reagentes utilizados nas reações formadas com o kit TaqMan Master Mix One-Step RT-PCR (Applied Biosystems) (Concentração na reação: 415 nM oligonucleotídeos, 85 nM sondas).....	42
Quadro 8 -	Relação de clones de cDNA de vírus de videira que foram empregados nos ensaios de PCR em tempo real triplex (TaqMan) ...	43
Quadro 9 -	Relação de clones de cDNA, previamente caracterizados molecularmente, de GRSPaV e GFLV, utilizados no ensaio de eficiência de amplificação com os oligonucleotídeos e sondas para PCR em tempo real.....	44
Quadro 10 -	Relação de cultivares de videira, exibindo sintoma da virose do enrolamento da folha, avaliadas por RT-PCR em tempo real (TaqMan) para GLRaV-3.....	45
Quadro 11 -	Relação dos oligonucleotídeos (complementar, R e viral, F)	

	empregados na amplificação do <i>Grapevine fleck virus</i> e do <i>Grapevine virus D</i> por RT-PCR convencional.....	47
Quadro 12 -	Resultados das indexações por RT-PCR em tempo real simplex para a detecção de nove vírus que infectam a videira.....	54
Quadro 13 -	Resultado da indexação por PCR em tempo real duplex, utilizando-se duas cultivares controles por reação e considerando-se nove vírus testados.....	63
Quadro 14 -	Resultado da indexação simultânea de dois vírus por RT-PCR em tempo real (duplex) a partir de uma mesma hospedeira, considerando-se nove vírus avaliados.....	67
Quadro 15 -	Resultado da avaliação por meio de RT-PCR em tempo real (TaqMan) de 36 acessos de videira, submetidos a termoterapia e/ou cultura de tecidos, para a presença de nove vírus.....	71
Quadro 16 -	Resultados da avaliação agrônômica e de uvas colhidas em videiras, cvs. Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon, sem e com sintomas, infectadas com os vírus <i>Grapevine virus B</i> (GVB) e <i>Grapevine rupestris stem pitting-associated virus</i> (GRSPaV). Média de 10 plantas.....	79
Quadro 17 -	Identidades de nucleotídeos e de aminoácidos do isolado BF (GenBank JN022610, gene da proteína capsidial) de GFkV, dos isolados Dolc (GenBank JQ031715) e Garg (GenBank JQ031716), genes CP e “RNA binding protein” de GVD; e isolado Card, gene HSP70 parcial, de GLRaV-5, caracterizados neste trabalho, com outros isolados depositados em banco de dados (GenBank).....	82
Quadro 18 -	Resultado das avaliações de diversos acessos de videira, mantidos em casa de vegetação, provenientes de campo experimental ou de mudas importadas, e testados para a detecção, por meio de RT-PCR em tempo real, para os vírus GVD, GLRaV-5 e GFkV.....	84
Quadro 19 -	Identidades de nucleotídeos dos genes incompletos da replicase (60 pb) e da proteína HSP70 (145 pb) do GLRaV-1 e da replicase do GVA (fragmento de 106 pb), caracterizados neste trabalho, com outros isolados depositados em banco de dados GenBank do NCBI.....	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática dos ciclos de uma reação de PCR.....	15
Figura 2 -	Representação esquemática de uma sonda tipo TaqMan, de seu pareamento com a sequência alvo e da degradação da sonda pela atividade 5' exonuclease da Taq DNA polimerase.....	17
Figura 3 -	Espectro de emissão de alguns fluoróforos, o que confere flexibilidade na escolha para as reações multiplex (Fonte: Manual do equipamento StepOnePlus [®] Real-Time PCR System - Applied Biosystems).....	19
Figura 4 -	Representação esquemática da atuação de uma sonda MGB.....	20
Figura 5 -	Representação esquemática do funcionamento de corantes intercalantes fluorescentes (SYBR Green). Losangos escuros, SYBR Green sem intercalar o DNA e losangos claros, SYBR Green intercalando a dupla fita de DNA sintetizada na PCR.....	21
Figura 6 -	Representação gráfica de uma reação de PCR em tempo real, mostrando uma curva de emissão de fluorescência (Novais e Pires-Alves, 2004).....	22
Figura 7 -	Eletroforese em gel de agarose a 1,2% (p/v), para comprovação da integridade do RNA total extraído de cinco videiras que foram indexadas. (M) Marcador 1 Kb (Fermentas); (1) cv. Paulsen 1103 (P1103) (submetido a termoterapia de 88+93+63 dias e cultura de tecidos); (2) cv. Itália [Pirovano 65]; (3) cv. Cabernet Franc; (4) cv. LN33/Isabel; (5) cv. Petit Syrah.....	50
Figura 8 -	Curvas (em 2 repetições) da detecção individual por RT-PCR em tempo real (simplex) de dez vírus que infectam videiras. Detalhamento do isolado e hospedeira consta no Quadro 5. A. GLRaV-2; B. GFLV; C. GLRaV-3; D. GFkV; E. GVA; F. GVD; G. GVB; H. GLRaV-5; I. GRSPaV; J. GLRaV-1. Intersecção da linha vertical com a curva define o valor de CT no eixo X.....	57
Figura 9 -	Resultado gráfico da amplificação, por RT-PCR em tempo real, de 10 amostras de videiras (Quadro 10) infectadas com diferentes isolados de GLRaV-3. (A) curva de amplificação para o controle	

	positivo de GLRaV-3 (Quadro 5). (B) Curvas de amplificação para as nove amostras infectadas.....	60
Figura 10 -	Análise dos clones (isolados) testados. Eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v), após a digestão dos clones de cDNA (Quadro 9) com EcoRI; (A) clones de cDNA de 11 diferentes isolados testados do vírus GRSPaV; (B) clones de cDNA de três diferentes isolados do vírus GFLV; (M) marcador DNA do fago Lambda/PstI	62
Figura 11 -	Resultado gráfico da amplificação por RT-PCR em tempo real de 11 diferentes isolados testados do vírus GRSPaV (A) e de três diferentes isolados testados do vírus GFLV (B). Concentração padronizada em 0,01ng DNA/ μ L.....	62
Figura 12 -	Curvas de detecção simultânea de dois vírus (duplex), por RT-PCR em tempo real, e reações realizadas com duas amostras (controles) infectadas, considerando-se os fluoróforos VIC e FAM para a marcação das sondas. Água e RNA total de videira sadia são controles negativos de vários testes. Para alguns vírus são mostradas duas curvas por reação, consistindo nas duplicatas do teste.....	64
Figura 13 -	Curvas de detecção simultânea de dois vírus (duplex) por RT-PCR em tempo real, e reações realizadas a partir de uma única amostra infectada por reação duplex, considerando-se os fluoróforos VIC e FAM, para a marcação das sondas.....	68
Figura 14 -	Resultado gráfico da detecção simultânea de três vírus (triplex), a partir de clones de cDNA, previamente caracterizados. (A) Curvas de amplificação para os vírus: GRSPaV, GLRaV-5 e GVA (106 pb); (B) Curvas de amplificação para os vírus: GRSPaV, GVA (106 pb) e GFLV. Amostras: cDNA viral a 0,01 ng/ μ L.....	74
Figura 15 -	Aspecto geral das plantas, dos sintomas e da produção verificado no ensaio de avaliação agronômica entre videiras assintomática e infectada por vírus. (A) videiras cv. Cabernet Franc sem sintomas de infecção viral, (B) com sintomas de infecção viral, (C) videira cv. Cabernet Sauvignon com intumescimento na região de inserção do ramo e (D) avermelhamento foliar decorrente de infecção viral, (E)	

	cv. Cabernet Franc: cachos provenientes de videira infectada e (F) de planta assintomática.....	76
Figura 16 -	Resultado gráfico da indexação por meio de RT-PCR em tempo real (TaqMan) das amostras de C. Franc testadas para seis vírus, destacando GRSPaV e GVB. (A) 10/10 plantas com sintomas, infectadas por GRSPaV (número de plantas infectadas com vírus / n° total de plantas testadas); (B) 9/10 plantas sem sintomas, infectadas por GRSPaV; (C) 9/10 plantas com sintomas, infectadas por GVB; (D) 2/10 plantas sem sintomas, infectadas por GVB.....	77
Figura 17 -	Amplificação por RT-PCR convencional e digestões de plasmídeos em gel de agarose 1,2% (p/v). (A) fragmento amplificado de 719 pb do GFkV, cv. Benifuji (2) e videira cv. Rupestris du Lot sadia (1), (B) fragmento de 852 pb do GVD, cvs. Dolcetto e Garganega (5 e 6), (C) Mini-prep digerido com EcoRI, mostrando a liberação de um fragmento de 719 pb do GFkV (1, 3 e 4), (D) Mini-prep digerido com EcoRI, mostrando a liberação de um fragmento de 852 pb do GVD (1 e 2). Marcador DNA do fago lambda/PstI (M).....	81
Figura 18 -	Sequências de nucleotídeos (linha superior) e de aminoácidos deduzidos (linha inferior) obtidas e depositadas no GenBank (JN022610) para o gene completo (693 pb) da proteína capsial do <i>Grapevine fleck virus</i> (GFkV), isolado BF. “_”: códon de parada..	83
Figura 19 -	Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzidos, depositada no GenBank (JN022610), do gene completo (693 pb) da proteína capsial do <i>Grapevine fleck virus</i> (GFkV), isolado BF, com outras sequências homólogas, disponíveis para esta espécie viral.	84
Figura 20 -	Análise eletroforética em gel de agarose 3% (p/v) das reações de RT-PCR “convencional”. (A) Amplificações dos fragmentos de 162 pb de GLRaV-5, cv. Cardinal (poço 1) e de 78 pb de GVD, cv. Dolcetto (poço 2), (B) Amplificação do fragmento de 106 pb de GVA, cv. Itália, (C) Amplificação dos fragmentos de 145 pb (poço 1) e 60 pb (poço 2) do GLRaV-1, cv. Petit Syrah. Marcador 50 pb DNA (Invitrogen).....	87

Figura 21 - Sequências de nucleotídeos (linha superior) e de aminoácidos deduzidos (linha inferior) obtidas para o gene incompleto (162 pb) da proteína HSP70 do <i>Grapevine leafroll-associated virus 5</i> (GLRaV-5), isolado Card.....	87
Figura 22 - Alinhamento múltiplo da sequência parcial de nucleotídeos (162 pb) do gene da proteína HSP70 do <i>Grapevine leafroll-associated virus 5</i> (GLRaV-5), isolado Card, com quatro isolados desta espécie viral (códigos de acesso no GenBank), além dos oligonucleotídeos e sondas definidos no Quadro 6, para a amplificação por RT-PCR em tempo real.....	88
Figura 23 - Alinhamento múltiplo da sequência parcial (53 aad) de aminoácidos deduzidos do gene da proteína HSP70 do <i>Grapevine leafroll-associated virus 5</i> (GLRaV-5), isolado Card, com quatro isolados desta espécie viral, depositados no banco de dados GenBank.....	88
Figura 24 - Alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos (512 pb do fragmento de 852 pb) do <i>Grapevine virus D</i> (GVD), isolados Dolc e Garg (JQ031715, JQ031716, respectivamente) com o isolado italiano (Y07764), além dos oligonucleotídeos e sonda, usados na RT-PCR em tempo real, e da sequência do fragmento de 78 pb (isolado Dolc) originado desta reação. “TAG” sublinhado: codon de parada do gene CP.....	91
Figura 25 - Sequências de nucleotídeos (linha superior) e de aminoácidos deduzidos (linha inferior) para os genes completos da proteína capsial (486 pb) (start e stop codons em negrito) e da proteína de ligação ao RNA (RNA binding protein) (276 pb) (start e stop codons sublinhados) do <i>Grapevine virus D</i> (GVD), obtidas a partir da cv. Dolcetto. Código do acesso no GenBank: JQ031715.....	92
Figura 26 - Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos deduzidos do gene completo (486 pb) da proteína capsial do <i>Grapevine virus D</i> (GVD), isolados Dolc e Garg, com o isolado italiano (Y07764), única sequência homóloga disponível no banco de dados GenBank.....	93

- Figura 27 - Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos deduzidos do gene completo (276 pb) da proteína de ligação ao RNA ("RNA binding protein") do *Grapevine virus D* (GVD), isolados Dolc e Garg, com o isolado italiano (Y07764), única sequência homóloga disponível no banco de dados GenBank..... 94
- Figura 28 - Alinhamento múltiplo da sequência parcial de nucleotídeos do gene da replicase (106 pb) do *Grapevine virus A* (GVA), isolado da cv. Itália (Pirovano 65), com outros doze isolados homólogos desta mesma espécie viral, além das sequências de oligonucleotídeos e da sonda empregadas na reação de RT-PCR em tempo real e na obtenção deste fragmento (106 pb-GVA)..... 94
- Figura 29 - Alinhamento múltiplo da sequência de nucleotídeos do gene incompleto (60 pb) da polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp) do *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1), isolado da cv. Petit Syrah, com as sequências de oligonucleotídeos e sonda, além da região homóloga de outros três isolados desta espécie viral depositados no banco de dados GenBank..... 97
- Figura 30 - Figura 30 - Alinhamento múltiplo da sequência de nucleotídeos do gene incompleto (145 pb) da proteína HSP70 do *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1), isolado da cv. Petit Syrah, com as sequências de oligonucleotídeos e sonda, além da região homóloga de outros três isolados desta espécie viral depositados no banco de dados GenBank..... 98

RESUMO

DUBIELA, Carla Rosa, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2012. **Detecção por RT-PCR em tempo real (Taqman) e caracterização molecular parcial de vírus que infectam a videira.** Orientador: Eliezer Rodrigues de Souto. Coorientador: Thor Vinícius Martins Fajardo.

Nos últimos anos, o Brasil tem se destacado na produção de uvas, seja para consumo *in natura* ou para processamento. Contudo, a ocorrência de doenças é sempre mencionada como uma das ameaças à viticultura, pois pode ocasionar danos significativos à produção e à qualidade da uva. Dentre os patógenos da videira, os vírus merecem destaque devido aos danos que podem causar, o que pode comprometer a viabilidade econômica desta atividade. Cerca de 60 espécies virais infectam a videira; no Brasil, já foram detectados dez vírus nesta cultura: *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV-1, -2, -3, -5 e -6), *Grapevine virus A e B* (GVA e GVB), *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *Grapevine fleck virus* (GFkV) e *Grapevine fanleaf virus* (GFLV). A aplicação, das ferramentas de diagnose dos vírus que infectam a videira, evolui continuamente, marcadamente a RT-PCR em tempo real, técnica que vem ganhando espaço no diagnóstico viral em função das vantagens sobre a PCR convencional. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a eficiência da RT-PCR em tempo real (TaqMan), variação que utiliza sonda marcada com um fluoróforo, para a detecção de dez importantes espécies virais que infectam a videira no Brasil: GLRaV-1, -2, -3 e -5, GVA, GVB, *Grapevine virus D* (GVD), GRSPaV, GFkV e GFLV. As reações visaram promover detecções individuais ou simultâneas (duplex e triplex). RNAs totais de videiras sadias e comprovadamente infectadas com estes vírus foram utilizados em ensaios tipo presença/ausência empregando-se um kit comercial para reações "one step" de RT-PCR em tempo real. Para validação desta técnica, 36 acessos de videiras, recuperados após tratamentos de termoterapia e cultura de tecidos, foram indexados. Foi possível detectar, de maneira muito sensível e precisa, em reações simplex com amostras infectadas por diferentes isolados, todos os vírus supracitados, a exceção do GLRaV-1. Também foi possível detectar em ensaios duplex, o GVA, GRSPaV, GLRaV-2 e GLRaV-3 (com sondas marcadas com o fluoróforo VIC e "quencher" TAMRA) combinados com o GVB, GFLV, GFkV, GVD e

GLRaV-5 (FAM/TAMRA). Já as reações triplex somente foram possíveis a partir de cDNA viral clonado. Na indexação dos 36 acessos, o status fitossanitário dos materiais avaliados foi considerado muito bom. Dez plantas de videira, por tratamento, cvs. Cabernet Franc e C. Sauvignon, com e sem sintomas de infecção viral, foram avaliadas agronomicamente. Em ambas cvs. detectou-se o GRSPaV e GVB, por meio de RT-PCR em tempo real, nas plantas avaliadas. Foram verificadas diferenças significativas, em favor das plantas sem sintomas, para muitas das variáveis agrônomicas avaliadas. Adicionalmente, objetivou-se: (a) estender a caracterização molecular de um isolado local de GFkV e (b) realizar a caracterização molecular de isolados locais do GVD e GLRaV-5. Os fragmentos de DNA amplificados foram clonados e sequenciados. Além desta caracterização, foram indexados, por meio de RT-PCR em tempo real, 37 acessos de videira para o GFkV, GVD e GLRaV-5. Adicionalmente, três fragmentos de DNA de GLRaV-1 e GVA, amplificados com oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real, foram sequenciados na tentativa de elucidar resultados, parcialmente negativos. As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos dos genes da proteína capsidial (CP) do GFkV, da CP e da “*RNA binding protein*” (GVD) e do gene parcial da HSP70 do GLRaV-5 foram obtidas para isolados locais. Foi possível detectar estes vírus em 20 (GVD), 7 (GLRaV-5) e 6 (GFkV) amostras avaliadas. A presença do GVD ainda não havia sido relatada no Brasil e o GLRaV-5 havia sido detectado, apenas por meio de sorologia, no Estado de São Paulo. A análise das sequências dos fragmentos de DNA do GLRaV-1 e GVA permitiu propor explicações sobre resultados obtidos. A RT-PCR em tempo real (TaqMan) aporta sensibilidade e especificidade ao diagnóstico viral, sendo uma importante ferramenta na indexação de materiais propagativos de videira, capaz de detectar, eficientemente, diferentes espécies e isolados virais. A caracterização molecular de isolados locais contribuiu no sentido de apoiar a definição dos oligonucleotídeos e das sondas visando maior eficiência desta técnica.

Palavras-chave: diagnose, viroses, *Vitis*, testes diagnósticos, PCR em tempo real-TaqMan, caracterização molecular.

ABSTRACT

DUBIELA, Carla Rosa, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, February 2012. **Detection by RT-real-time PCR (Taqman) and partial molecular characterization of viruses that infect the vine.** Advisor: Eliezer Rodrigues de Souto. Committee Member: Thor Vinícius Martins Fajardo.

In recent years, Brazil has excelled in the production of grapes, either for fresh consumption or for processing. However, the occurrence of diseases is frequently mentioned as a threat to the viticulture, as it can cause significant damage to production and quality of grapes. Among the pathogens of the grapevine, viruses are outstanding because of the damage they can cause, which can compromise the economic viability of viticulture. About 60 viral species infect the grapevine; in Brazil, *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV-1, -2, -3, -5 and -6), *Grapevine virus A* and *B* (GVA and GVB), *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *Grapevine fleck virus* (GFkV) and *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) have been detected. The application of tools for diagnosis of grapevine viruses are continually evolving, specifically for the real time RT-PCR, which is becoming more popular in viral diagnosis due to its advantages over conventional PCR. The objectives of this study were to evaluate the efficiency of TaqMan real-time RT-PCR, a variation that uses a fluorophore-labeled probe, for detection of ten important virus species that infect grapevine in Brazil: GLRaV-1, -2, -3 and -5, GVA, GVB, *Grapevine virus D* (GVD), GRSPaV, GFkV and GFLV. Reactions targeted individual (simplex) or simultaneous (duplex and triplex) detections. Total RNAs from healthy grapevines and virus infected plants were used for presence/absence assays employing a commercial kit for performed reactions as One Step real-time RT-PCR. To validate this technique, 36 grapevine accessions, recovered after treatment of thermotherapy and tissue culture, have been indexed. It was possible to detect all above-mentioned viruses, with the exception of GLRaV-1, in simplex reactions from samples with multiple infections including different viral isolates, as well as in duplex assays GVA, GRSPaV, GLRaV-2 and GLRaV-3 (with probes labeled with the fluorophore VIC and quencher TAMRA) combined with GVB, GFLV, GFkV, GVD and GLRaV-5 (FAM / TAMRA). Virus detection in triplex reactions were successful only from cloned viral cDNA. After in indexing of the 36 grapevine accessions, the status of the tested plant

materials can be considered satisfactory. Ten plants of each cvs. Cabernet Franc and C. Sauvignon, with and without symptoms of viral infection were evaluated agronomically. GRSPaV and GVB were detected in plants of both cultivars evaluated by real-time RT-PCR. Favourable values (with significant differences) were showed for many evaluated agronomic variables of asymptomatic plants. Additionally, aimed to: (a) to extend the molecular characterization of a local isolate of GFkV and (b) to perform the molecular characterization of local isolates of GVD and GLRaV-5. The amplified DNA fragments were cloned and sequenced. In addition to this characterization, 37 grapevine accessions were indexed for GFkV, GVD and GLRaV-5 by real-time RT-PCR. Three DNA fragments of GVA and GLRaV-1, amplified by conventional RT-PCR with primers used in real-time RT-PCR reactions, were sequenced in an attempt to elucidate the partially negative results. The nucleotide sequences and deduced amino acids of the capsid protein gene (CP) of GFkV, the CP and the RNA binding protein of GVD and partial HSP70 (heat shock protein) gene of GLRaV-5 were obtained for local isolates. These viruses were detected in 20 (GVD), 7 (GLRaV-5) and 6 (GFkV) evaluated samples. The presence of GVD had not been reported previously in Brazil and GLRaV-5 was detected by serology only in São Paulo State. The sequence analysis of DNA fragments of GLRaV-1 and GVA allowed to propose explanations about some results. The TaqMan real-time RT-PCR brings sensitivity and specificity for viral diagnosis, being an important tool for indexing grapevine propagative materials, and efficiently detecting different viral species and isolates. The molecular characterization of isolates contributed to support the design of the primers and probes for higher efficiency of this technique.

Key words: diagnosis, viruses, *Vitis*, diagnostic assays, real-time PCR-TaqMan, molecular characterization.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem demonstrado bom desempenho na produção de uvas para consumo *in natura* e para processamento (suco e vinho) em suas diversas regiões produtoras. Entretanto, práticas culturais inadequadas e importações de mudas, que não atendam ao rigoroso padrão fitossanitário, dentre outros fatores, têm favorecido a ocorrência de doenças ou representam riscos potenciais (Tavares et al., 2000). Dentre os patógenos que infectam a videira, os vírus merecem destaque, devido aos danos que causam e por induzirem a degenerescência (perda de vigor) das plantas ao longo dos anos, com conseqüente redução na produção e na qualidade da uva, podendo até inviabilizar economicamente esta atividade (Kuhn, 1989; Zanús et al., 1993; Amorim e Kuniyuki, 2005). Em combinações específicas de portaenxerto/cultivar e espécie viral, as viroses da videira podem ser latentes e, assim, podem passar despercebidas e serem propagadas sucessivamente, resultando em alta taxa de infecção em determinados materiais propagativos que são utilizados pelo produtor.

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios e, uma vez estabelecida a compatibilidade com a planta hospedeira, se replicam exclusivamente pela utilização de constituintes químicos das células hospedeiras. Assim, colonizam as células que compõem os diferentes tecidos da hospedeira e comprometem a integridade do organismo infectado em todos os níveis. Em decorrência disto, ocorrem várias alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas, através da ativação e/ou bloqueio de determinadas atividades celulares nas plantas infectadas. Dependendo da interação vírus-hospedeira, uma grande diversidade de sintomas pode ser observada incluindo redução do crescimento e alterações em tecidos foliares e nos ramos/troncos das plantas (Arias et al., 2003; Sampol et al., 2003; Bertamini et al., 2004; Gonçalves et al., 2005; Domiciano et al., 2009). De modo geral, as infecções virais são capazes de induzir desordens na célula vegetal, que incluem alterações na fotossíntese, na respiração, nas atividades enzimáticas, no transporte de fotoassimilados e no balanço hormonal (Sampol et al., 2003). Acontece uma verdadeira "batalha" metabólica e, nas plantas suscetíveis, os vírus passam a controlar parte do metabolismo da célula parasitada. Esse processo infeccioso

resultará em queda de rendimento e da qualidade da produção (Auger et al., 1992; Domiciano et al., 2009; Cretazzo et al., 2010).

As ferramentas de diagnose dos vírus que infectam a videira têm evoluído ao longo dos anos, marcadamente a RT-PCR em tempo real, técnica que vem ganhando espaço no diagnóstico viral em função das vantagens sobre a PCR convencional. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a eficiência da RT-PCR em tempo real, com sonda com fluoróforo (TaqMan), para a detecção de diferentes isolados locais de dez importantes espécies virais que infectam a videira no Brasil, incluindo os seguintes vírus: GRSPaV (*Foveavirus*), GVA, GVB e GVD (*Vitivirus*), GLRaV-1, -3 e -5 (*Ampelovirus*), GLRaV-2 (*Closterovirus*), GFLV (*Nepovirus*) e GFkV (*Maculavirus*), tanto em reações de detecção individuais quanto em detecções simultâneas (multiplex). Videiras infectadas por vírus foram comparadas a videiras assintomáticas e avaliadas agronomicamente. Além da detecção por meio de RT-PCR em tempo real, os vírus *Grapevine fleck virus*, *Grapevine virus D* e *Grapevine leafroll-associated virus 5* foram caracterizados molecularmente devido a ausência deste tipo de informação em relação a isolados locais (obtidos no Brasil).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Viroses da videira e técnicas de diagnose

Nos últimos anos, o Brasil tem apresentado destacado desempenho na produção de uvas, seja para consumo *in natura* ou para processamento. Contudo, a ocorrência de doenças é sempre mencionada como uma das ameaças ao setor produtivo, pois pode ocasionar danos significativos à produção, à qualidade, e elevar o custo. Dentre os patógenos da videira, os vírus merecem destaque, devido aos danos que podem causar, o que pode comprometer a viabilidade econômica desta atividade. Das, cerca de, 60 espécies virais que infectam a videira, no Brasil, já haviam sido detectados dez vírus nesta cultura: *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV-1, -2, -3, -5 e -6), *Grapevine virus A e B* (GVA e GVB), *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *Grapevine fleck virus* (GFkV) e *Grapevine fanleaf virus* (GFLV). No presente trabalho, a 11^a espécie viral, infectando videira no Brasil, é relatada: *Grapevine virus D* (GVD). Progressos consideráveis, no estudo de vírus de videira, ocorreram nos últimos anos, em relação à caracterização biológica e molecular, formas de disseminação e transmissão, técnicas de detecção e identificação além dos efeitos fisiológicos induzidos pelos vírus. Entretanto a expansão do conhecimento, acerca destes temas, ainda não é completa, a ponto de viabilizar métodos altamente eficientes de controle e manejo destas viroses. A necessidade de métodos rápidos de diagnóstico, que possam ser usados em larga escala é, particularmente, relevante para certificar a sanidade de materiais propagativos. Neste enfoque, quando comparada à PCR convencional, a PCR em tempo real mantém algumas características, tais como a sensibilidade, além de incrementar a especificidade na quantificação do produto amplificado. Essas vantagens são consequência do sistema de detecção do DNA amplificado, em "tempo real", que não requer tantas manipulações no preparo das reações de amplificação, as quais são fontes potenciais de alteração dos resultados.

2.2. A cultura da videira e a importância das viroses no Brasil

A videira pertence à família *Vitaceae* e ao gênero *Vitis*, o qual possui inúmeras espécies, destacando-se a *Vitis vinifera* L., conhecida como produtora de

uvas finas, de origem européia e a *Vitis labrusca* L., conhecida como produtora de uvas rústicas, de origem americana e que predomina no Brasil (Giovannini, 2008; Hernandez e Moreno, 2005; Leão e Soares, 2000).

Conforme o “Panorama 2010” da vitivinicultura brasileira (Mello, 2010), a área cultivada com vinhedos no Brasil, em 2010, foi de 83.718 hectares, com produção de 1.295.442 toneladas, sendo 557.888 toneladas destinadas para processamento e 737.554 toneladas para consumo *in natura*. A viticultura no Brasil está concentrada principalmente nos Estados da Região Sul, responsável por cerca de 90% da produção nacional, regiões Sudeste e Nordeste onde se destacam como os maiores produtores nacionais, em ordem decrescente de área cultivada: Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco, Paraná, Santa Catarina, Bahia e Minas Gerais. Além destas, a cultura da videira também tem se expandido para outras regiões não tradicionais a exemplo de áreas situadas no Mato Grosso do Sul, Goiás, Espírito Santo, Ceará e Piauí (Mello, 2010).

O Brasil, nos últimos anos, tem demonstrado bom desempenho na produção de uvas, seja para consumo *in natura* ou para processamento. Contudo, a ocorrência de doenças é sempre mencionada como uma das ameaças ao setor, pois pode ocasionar perdas significativas à produção e elevação dos custos. Dentre os patógenos da videira, os vírus merecem destaque devido aos danos que podem causar, o que pode comprometer a viabilidade econômica desta atividade. Assim, é importante conhecer os principais fitopatógenos associados a esta cultura, principalmente aqueles causadores de viroses. Em determinadas cultivares e portaenxertos, por não induzirem sintomas visualmente perceptíveis ou facilmente distinguíveis, as viroses podem passar despercebidas, havendo maior probabilidade de que sejam propagadas indefinidamente, o que resultaria em maior grau de infecção dos materiais propagativos (Fajardo et al., 2003a; Martelli e Boudon-Padieu, 2006).

No Brasil, as viroses ocorrem em todas as regiões vitícolas e a incidência, na maioria das cultivares americanas, e principalmente nas viníferas, é considerada alta. Dentre os prejuízos causados pelas viroses, verifica-se a redução no rendimento e na qualidade das uvas, a redução da vida útil do vinhedo e, dependendo da severidade da infecção, pode-se ocorrer perda total da produção, ou até a morte da planta (Brar et al., 2008; Cabaleiro et al., 1999).

Até o momento, já foram relatadas no mundo pelo menos 58 espécies virais na cultura da videira (Quadro 1), embora nem todas tenham importância econômica (Martelli, 2009; Monis et al., 2010). No Brasil, dez vírus já foram detectados em videiras: *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV-1, -2, -3, -5 e -6), *Grapevine virus A* e *B* (GVA e GVB), *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *Grapevine fleck virus* (GFkV) e *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) (Fajardo et al., 2003a), com destaque para o *Grapevine virus D* (GVD) caracterizado neste trabalho e detectado pela primeira vez no Brasil (Dubiel et al., 2011). As viroses que se destacam pelas maiores incidência e importância econômica são o enrolamento da folha (GLRaV-1, -2 e -3) e o lenho rugoso da videira, complexo formado por quatro viroses, do qual fazem parte o intumescimento dos ramos (GVB), acanaladura do lenho de Kober (GVA), caneluras do tronco de Rupestris (GRSPaV) e acanaladura do lenho de LN33 (vírus desconhecido) (Kuniyuki et al., 2002; Moreira et al., 2004).

A propagação vegetativa da videira facilita a disseminação e favorece o desenvolvimento de doenças complexas, pelo acúmulo de diferentes espécies/estirpes virais em uma mesma planta (Monis, 2008; Martelli, 2009). As viroses nem sempre despertam a atenção dos viticultores, talvez pelo desconhecimento de sua sintomatologia, a qual pode ser confundida com deficiências nutricionais ou inclusive com outros fitopatógenos (Garrido et al., 2008). Dependendo da combinação entre a cultivar e a espécie viral, os primeiros sintomas característicos poderão ser perceptíveis somente após dois ou três anos da infecção (Fajardo et al., 2003a).

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

Até o momento, o único controle viável a campo é a utilização de mudas ou material propagativo proveniente de plantas matrizes sadias (livres de vírus). Uma vez que a planta encontre-se infectada no campo, é impossível curá-la por métodos

tradicionais como aqueles utilizados para outros patógenos (bactérias, fungos, etc.), agravando-se o problema quando se considera que a planta infectada também poderá servir de fonte de inóculo para a disseminação do vírus por insetos vetores, enquanto as mesmas permanecerem no vinhedo (Andret-Link et al., 2004). A partir de uma planta infectada por vírus, somente pela adoção de técnicas laboratoriais (ex. cultura de tecidos, termoterapia, quimioterapia) é possível a obtenção e regeneração de plantas livres de vírus (Laimer et al., 2009; Valat et al., 2003; Salami et al., 2010).

Quadro 1 - Classificação taxonômica dos vírus da videira atualmente conhecidos

Família	Gênero	N° de espécies
Comoviridae	Nepovirus	15
	Fabavirus	1
Bromoviridae	Alfamovirus	1
	Cucumovirus	1
	Ilarvirus	1
Tombusviridae	Tombusvirus	2
	Carmovirus	1
	Necrovirus	1
Closteroviridae	Closterovirus	1
	Ampelovirus	8
Tymoviridae	Maculavirus	2
	Marafivirus	2
Bunyaviridae	Tospovirus	1
Potyviridae	Potyvirus	1
	Potexvirus	1
Flexiviridae	Foveavirus	1
	Trichovirus	1
	Vitivirus	4
	Sadwavirus	1
Gêneros não incluídos em famílias	Sobemovirus	1
	Tobamovirus	2
	Idaeovirus	1
Vírus não classificados	----	4
Possível nova espécie em via de caracterização	Ampelovirus	2
	Marafivirus	1

Além da disseminação por meio do material propagativo, alguns vírus são ainda transmitidos por vetores. O GFLV, por exemplo, é disseminado por nematóides do gênero *Xiphinema* e as espécies dos gêneros *Ampelovirus* (GLRaV-1, -3, -5 e -9) e *Vitivirus* (GVA e GVB) são disseminadas de maneira semipersistente por cochonilhas algodonosas (Família *Pseudococcidae*) e de carapaça (Família *Coccidae*) (Quadro 2). De maneira geral, o vírus é adquirido pelos insetos quando

estes se alimentam em planta infectada e, ao se alimentarem em uma planta sadia, realizam a transmissão viral (Lima, 2009).

Quadro 2 - Tipos de transmissão das espécies virais abordadas neste trabalho

Vírus	Transmissão mecânica (para hospedeira experimental)	Transmissão por Vetor	Transmissão por propagação vegetativa
<i>Grapevine fanleaf virus</i> (GFLV)	+	+ Nematóide	+
<i>Grapevine fleck virus</i> (GFkV)	-	-	+
<i>Grapevine rupestris stem pitting-associated virus</i> (GRSPaV)	-	-	+
<i>Grapevine virus A</i> (GVA)	+ (com dificuldade)	+ Cochonilha	+
<i>Grapevine virus B</i> (GVB)	+ (com dificuldade)	+ Cochonilha	+
<i>Grapevine virus D</i> (GVD)	+ (provavelmente transmitido)	+ (provavelmente cochonilha)	+
<i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i> (GLRaV-1)	-	+ Cochonilha	+
<i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i> (GLRaV-2)	+ (com dificuldade)	-	+
<i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i> (GLRaV-3)	-	+ Cochonilha	+
<i>Grapevine leafroll-associated virus 5</i> (GLRaV-5)	-	+ Cochonilha	+

Desta forma a recomendação ao viticultor é que utilize material propagativo “certificado”, que apresenta garantia de sanidade, além de se fazer o monitoramento de insetos vetores, visando-se um eventual controle de vetores, prática que, se adotada, deve obedecer a critérios técnicos específicos. (Kuhn e Fajardo, 2009).

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

2.3. Principais vírus que infectam a videira

Já foram relatadas infectando videiras 57 espécies virais distintas (Quadro 1), além de inúmeras estirpes específicas de algumas destas espécies (Martelli, 2009; Monis et al., 2010). Novas espécies e/ou estirpes virais infectando videiras ainda estão sendo identificadas ou (re)-classificadas. Também foram relatadas em videiras

algumas doenças consideradas de origem viral, tais como, a Necrose das nervuras da videira (*Grapevine vein necrosis*), a qual está associada à presença do GRSPaV (Bouyaria et al., 2005) e a Acanaladura do lenho de LN 33 (*LN 33 stem grooving*), cujo agente causal (vírus) ainda não foi identificado. Nem todas as espécies virais mencionadas no Quadro 1 apresentam significativa importância econômica, pois esta pode ser função da região geográfica de ocorrência da virose e da cultivar da videira. Entre os vírus mais importantes, que afetam a videira, destacam-se aqueles pertencentes às famílias *Closteroviridae*, *Secoviridae*, *Betaflexiviridae* e *Tymoviridae* (Martelli e Boudon-Padieu, 2006) (Quadro 3).

Quadro 3 - Relação das famílias e gêneros onde se classificam as espécies virais que apresentam maior importância econômica para a videira e que foram abordadas neste trabalho

Família	Gênero	Espécie
<i>Betaflexiviridae</i>	<i>Foveavirus</i>	<i>Grapevine rupestris stem pitting-associated virus</i> (GRSPaV)
		<i>Grapevine virus A</i> (GVA)
	<i>Vitivirus</i>	<i>Grapevine virus B</i> (GVB)
		<i>Grapevine virus D</i> (GVD)
<i>Closteroviridae</i>	<i>Closterovirus</i>	<i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i> (GLRaV-2)
		<i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i> (GLRaV-1)
	<i>Ampelovirus</i>	<i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i> (GLRaV-3)
		<i>Grapevine leafroll-associated virus 5</i> (GLRaV-5)
<i>Secoviridae</i>	<i>Nepovirus</i>	<i>Grapevine fanleaf virus</i> (GFLV)
<i>Tymoviridae</i>	<i>Maculavirus</i>	<i>Grapevine fleck virus</i> (GFkV)

Fonte: ICTV (<http://www.ictvonline.org>).

A família *Closteroviridae* compreende dois gêneros que possuem importantes vírus que infectam a videira. No gênero *Closterovirus*, está incluído somente o GLRaV-2, já o gênero *Ampelovirus* compreende os demais vírus associados ao enrolamento da folha da videira, dentre eles, o GLRaV-1 e o GLRaV-3. A virose do enrolamento das folhas é considerada uma das mais importantes doenças, na maioria das regiões vitícolas do mundo, devido à alta incidência e às constantes perdas que ocasiona à produção. Em cultivares sensíveis, os sintomas são reconhecidos, em especial no fim do ciclo vegetativo, pelo enrolamento dos bordos da folha para baixo, observado nas cultivares européias (*Vitis vinifera*) tintas e brancas (Kuhn, 1989; Martelli e Boudon-Padieu, 2006). É causada por um

complexo de até nove espécies virais, sorologicamente distintas e denominadas “vírus associados ao enrolamento da folha da videira” (GLRaV-1 a -9). Os principais vírus do complexo do enrolamento são o GLRaV-2 e GLRaV-3 em função da maior incidência e dos danos que podem induzir (Martelli et al., 2002a; Fajardo et al., 2003a). A importância relativa destes vírus pode ser indiretamente estabelecida pelo número de depósitos de sequências de nucleotídeos em bases de dados (Quadro 4), o que reflete, grosseiramente, o número de trabalhos conduzidos com estes vírus. Mesmo que esta doença seja causada por um complexo viral, em situações específicas, embora raras, estes vírus podem ocorrer de forma isolada (Fajardo et al., 2003a). No Brasil já foram detectados *Grapevine leafroll-associated virus-1*, -2, -3, -5 e -6 (Radaelli et al., 2009; Kuniyuki et al., 2003).

O GLRaV-2 também está associado a sintomas de incompatibilidade de enxertia e declínio em vinhedos novos (Abou Ghanem-Sabanadzovic et al., 2000; Bertazzon e Angelini, 2004; Meng et al., 2005b). Pertence à família *Closteroviridae* e ao gênero *Closterovirus*, possui partículas alongadas e flexuosas, genoma de RNA fita simples e senso positivo, com 16.494 nucleotídeos (nt) organizados em oito fases abertas de leituras (ORF, “open reading frame”) e é mecanicamente transmissível (Abou-Ghanem et al., 1998; Meng et al., 2005b; Beuve et al., 2007).

O GLRaV-3, família *Closteroviridae* e gênero *Ampelovirus*, possui partículas alongadas e flexuosas e genoma composto de RNA fita simples, senso positivo com 17.919 nt organizados em 13 ORF (Ling et al., 1997; Martelli et al., 2002a). É o vírus melhor caracterizado dentre aqueles que compõem o complexo do enrolamento da folha da videira, sendo o membro-tipo do seu gênero. Não é transmissível mecanicamente e se dissemina naturalmente nos vinhedos pela transmissão, de maneira semipersistente, por várias espécies de pseudococcídeos e coccídeos. Estes insetos são considerados os principais vetores de algumas das principais espécies virais que infectam a videira, sendo responsáveis pela dispersão destes patógenos (Quadro 2) (Cabaleiro e Segura, 1997; Kuniyuki et al., 2005). Segundo Botton et al. (2003), algumas espécies já identificadas em vinhedos brasileiros, como *Pseudococcus viburni*, *P. vitis*, *P. longispinus* e *Planococcus citri*, são consideradas importantes vetoras de vírus.

O GLRaV-3 é o principal agente causador da doença do enrolamento das folhas e se dissemina com relativa rapidez dentro dos vinhedos (Golino et al., 2008) e é considerado economicamente importante devido ao impacto negativo sobre os

setores produtivos de vinho (Atallah et al., 2011) e de uvas de mesa em todo o mundo (Pietersen, 2004; Boscia et al., 1995; Maree et al., 2008). A sequência completa de nucleotídeos do genoma do GLRaV-3 foi obtida por Ling et al. (2004). A existência de variantes do GLRaV-3, incluindo a variabilidade genética de 45 isolados deste vírus em 14 diferentes países, foi demonstrada por Turturo et al. (2005).

Dentre as doenças virais que afetam a videira (*Vitis* spp.) e que ocorrem no Brasil, o complexo rugoso e o enrolamento das folhas apresentam-se como as de maior relevância, devido à expressiva incidência e aos danos causados pelos vírus que compõem estes dois complexos (Fajardo et al., 2003a). Uma forma indireta de se quantificar a importância relativa das espécies virais, abordadas neste trabalho, seria por meio do número de sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos depositadas no banco de dados do NCBI (GenBank) (Quadro 4).

O *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) é um dos mais frequentes e importantes vírus que infectam a videira, no Brasil e em outros países vitícolas do mundo (Radaelli et al., 2009). Foi identificado e caracterizado molecularmente por Meng et al. (1998) e Zhang et al. (1998) como o agente causal das caneluras do tronco de *Rupestris*, virose conhecida por “lenho estriado de *Rupestris*” em São Paulo e por “caneluras do tronco de *Rupestris*” no Rio Grande do Sul (Espinha et al., 2003). Juntamente com os *Vitivirus* GVA, GVB e GVD faz parte do “complexo rugoso da videira” e caracteriza-se por induzir alterações no lenho da videira, como a presença de caneluras (reentrâncias) no lenho, além de engrossamento da casca, intumescimento e fendilhamento cortical dos ramos ou tronco, com reflexos negativos na qualidade e na produção (Martelli, 1993; Credi, 1997).

O GRSPaV, família *Betaflexiviridae*, gênero *Foveavirus*, possui partículas alongadas e flexuosas com cerca de 800 x 12 nm, genoma de RNA de fita simples, senso positivo, com 8.726 nucleotídeos, organizados em 5 ORFs.

Alguns trabalhos relatam que o GRSPaV seria uma espécie muito variável, sendo que infecções múltiplas com outros vírus também são comumente detectadas em videiras, o que dificulta a definição das propriedades biológicas das diferentes estirpes deste vírus (Meng et al., 1999; Meng et al., 2005a), a exemplo das estirpes “Syrah” (Lima et al., 2006) e “Pinot Noir, PN” (Lima et al., 2009). Nakaune et al.

(2008) e Radaelli et al. (2009) destacaram a variabilidade genética deste vírus por meio do estudo de análises de sequências de nucleotídeos de isolados do GRSPaV.

Quadro 4 - Número total de depósitos, no banco de dados do NCBI (GenBank), em 24.10.2011, de sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos de espécies virais que infectam a videira e que foram estudadas neste trabalho

Vírus	Família / Gênero	Nº sequências nucleotídeos	Nº sequências aminoácidos deduzidos
<i>Grapevine fanleaf virus</i> (GFLV)	<i>Secoviridae</i> / <i>Nepovirus</i>	411	505
<i>Grapevine fleck virus</i> (GFkV)	<i>Tymoviridae</i> / <i>Maculavirus</i>	24	34
<i>Grapevine rupestris stem pitting-associated virus</i> (GRSPaV)	<i>Betaflexiviridae</i> / <i>Foveavirus</i>	412	476
<i>Grapevine virus A</i> (GVA)	<i>Betaflexiviridae</i> / <i>Vitivirus</i>	119	226
<i>Grapevine virus B</i> (GVB)	<i>Betaflexiviridae</i> / <i>Vitivirus</i>	84	106
<i>Grapevine virus D</i> (GVD)	<i>Betaflexiviridae</i> / <i>Vitivirus</i>	3	4
<i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i> (GLRaV-1)	<i>Closteroviridae</i> / <i>Ampelovirus</i>	87	95
<i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i> (GLRaV-2)	<i>Closteroviridae</i> / <i>Closterovirus</i>	268	315
<i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i> (GLRaV-3)	<i>Closteroviridae</i> / <i>Ampelovirus</i>	421	814
<i>Grapevine leafroll-associated virus 5</i> (GLRaV-5)	<i>Closteroviridae</i> / <i>Ampelovirus</i>	26	43

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root>.

Já nas famílias *Comoviridae* e *Tymoviridae* destacam-se os seguintes vírus que infectam a videira: *Grapevine fanleaf virus* (GFLV, gênero *Nepovirus*) e *Grapevine fleck virus* (GFkV, *Maculavirus*), respectivamente (Fajardo et al., 2003a; Monis et al., 2010).

A transmissão de todos os vírus que infectam a videira ocorre principalmente através de enxertia utilizando-se gemas infectadas, enquanto a dispersão se dá por meio de material propagativo infectado. Algumas das espécies virais, abordadas neste estudo, podem ser transmitidas por cochonilhas ou nematóides, conforme apresentado no Quadro 2. No Brasil inexistem trabalhos conduzidos sobre dispersão de vírus de videira em condições naturais (vinhedos) e os poucos trabalhos se restringem a testes de transmissão sob condições controladas (Kuniyuki et al., 2005; Kuniyuki et al., 2006). Técnicas de detecção viral na hospedeira e em insetos vetores, incluindo a definição de oligonucleotídeos adequados, são aspectos

importantes a serem estudados para que possam contribuir com resultados que permitam fundamentar a proposição de estudos epidemiológicos.

Embora diversas espécies já tenham sido identificadas e caracterizadas no Brasil e no mundo e, em diferentes genótipos de videiras, ainda há carência de trabalhos envolvendo o emprego/adaptação de técnicas de diagnóstico e uma caracterização molecular mais abrangente, o que permitiria aumentar o conhecimento destes patógenos, além de estabelecer ferramentas para o diagnóstico mais específico e sensível (Beuve et al., 2007).

2.4. Diagnóstico de viroses da videira

De modo geral, os vírus apresentam grande potencial para a geração de variabilidade genética, pois são agentes infecciosos que estabelecem processos infecciosos ao longo de todo o ciclo de vida da hospedeira, além da propensão a erros na replicação do seu genoma e a deficiência nos mecanismos de reparo do RNA (Kominek et al., 2005; Prosser et al., 2007). A expressiva variabilidade genética apresentada por algumas das espécies virais que infectam a videira, tem resultado em dificuldades para gerar ferramentas moleculares universais de detecção e identificação. Já foi demonstrada que a indexação por RT-PCR de videiras infectadas, com determinado isolado viral, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para outro isolado, pode resultar em um resultado falso-negativo (Bertazzon e Angelini, 2004). Tais resultados servem para ressaltar a importância de estudos de variabilidade genética viral.

Até meados dos anos 1980, pouco era conhecido sobre as características físico-químicas e moleculares dos vírus filamentosos presentes no floema de videiras. Destes, apenas um, à época conhecido como o “vírus A da videira” (GVA) (Conti et al., 1980) foi transmitido para hospedeiras herbáceas e caracterizado a partir de plantas exibindo lenho rugoso. As técnicas iniciais de diagnóstico foram, portanto, baseadas em ensaios biológicos com indicadores lenhosas (Bovey e Martelli, 1992; Martelli, 1993) e identificavam a doença, mas não seus agentes causais. Algumas plantas indicadoras podem demorar até três anos para manifestar sintomas. Esta limitação é característica da indexação biológica envolvendo diferentes viroses. (Martelli et al., 1997). Contudo, o progresso na aplicação de técnicas moleculares em virologia vegetal e o avanço gradual do conhecimento

sobre as características específicas dos vírus associados às doenças da videira, permitiram a expansão e a consolidação do diagnóstico molecular, aportando ferramentas sensíveis e de fácil aplicação ao diagnóstico. A necessidade de métodos rápidos de diagnóstico que possam ser usados em larga escala, é, de fato, particularmente relevante. Tais métodos são necessários no âmbito de programas de melhoramento, que avaliam resistência a patógenos e em programas de certificação, em curso em muitos países europeus, nos EUA e também no Brasil. Um diagnóstico precoce e confiável, obtido em ensaios de laboratório, é preferível para superar as limitações impostas pela indexação biológica, quais sejam, custos expressivos e períodos de tempo longos até a manifestação dos sintomas na indicadora (Martelli, 1993).

As ferramentas de diagnóstico para a detecção de vírus em videiras inicialmente baseavam-se em plantas indicadoras evoluíram ao longo dos últimos anos e atualmente incluem metodologias altamente especializadas e sensíveis. No início do estudo sobre os vírus que infectam a videira, apenas a indexação em indicadoras lenhosas e hospedeiras herbáceas estava disponível, evoluindo até chegar às técnicas mais recentemente introduzidas, como ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), PCR (Polymerase Chain Reaction ou reação em cadeia da polimerase) e PCR em tempo real (Real-time PCR). Na indexação biológica, a única indicadora de infecção viral é inoculada com uma amostra da planta de status fitossanitário desconhecido, sendo que os sintomas, induzidos pelo vírus, são observados após determinado tempo na indicadora. Com esta técnica é possível identificar a doença que afeta a planta, mas não o vírus específico responsável pelos sintomas. Por exemplo, a doença viral conhecida como enrolamento da folha da videira pode ser causada por uma ou mais das nove espécies virais associadas às plantas sintomáticas (Sanchez-Navarro et al., 1998). Outras limitações desta técnica são o longo tempo e o amplo espaço de campo ou casa de vegetação necessários para o desenvolvimento da indexação biológica. Outro método de diagnóstico bastante utilizado para a identificação de infecções virais em videiras é o ELISA (Frosline et al., 1996). Aplicação de ELISA revolucionou o diagnóstico para os vírus, tornando a análise de um grande número de amostras, viáveis, mais simples, com baixo custo e alta sensibilidade. Embora os anticorpos policlonais frequentemente apresentem problemas de especificidade, a disponibilidade de anticorpos monoclonais específicos e recombinantes resolveu este problema (López et al.,

2009). Embora este método apresente certa sensibilidade e confiabilidade, tem algumas desvantagens que incluem a incapacidade de detectar baixo título viral em plantas como a videira, por exemplo, pois o título viral é geralmente muito baixo, e ainda, a indisponibilidade de anticorpos e a dificuldade para se produzir este reagente (anticorpo), em videira .

A RT-PCR convencional provou ser um método bastante preciso para o diagnóstico viral em videiras (Rowhani et al., 2000). A aplicação da PCR tem proporcionado uma nova abordagem no diagnóstico viral, devido a sua alta sensibilidade, especificidade e rapidez. Estima-se que esta técnica seja 100-1000 vezes mais sensível que o ELISA. Entretanto, a detecção de patógenos, baseada em PCR, sofre com a inerente limitada capacidade de processamento das amostras. Além disto, a possibilidade de pareamento incorreto dos oligonucleotídeos e o fato desta técnica requerer eletroforese em gel para avaliar o resultado podem comprometer a sua especificidade e eficiência, respectivamente, resultando em baixo rendimento.

2.4.1. RT-PCR

A transcrição reversa consiste na síntese de uma fita de DNA complementar (cDNA) utilizando como molde um RNA, por meio da ação da enzima transcriptase reversa; A RT-PCR envolve a realização de duas fases: na primeira ocorre a transcrição reversa do RNA (formação das primeiras fitas) e na segunda, a amplificação das moléculas de cDNA obtidos após a transcrição reversa (primeira fase).

Incubando-se o RNA total, extraído de um tecido vegetal, com a enzima transcriptase reversa, tampão apropriado e desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs), além de um oligonucleotídeo complementar ao RNA alvo, pode-se desencadear a síntese de uma fita de cDNA. O oligonucleotídeo complementar se anela na molécula de RNA viral alvo (processo denominado pareamento de oligonucleotídeos), fornecendo um terminal 3'-OH, do qual se utiliza a transcriptase reversa para estender a cadeia de nucleotídeos, usando o RNA viral como molde. A síntese da fita de cDNA normalmente é realizada em uma hora. Após a síntese do cDNA, antes de se prosseguir para a amplificação, é possível adicionar à reação uma enzima do tipo RNase, que degradará o RNA da amostra usado como molde

pela transcriptase reversa. Quando a reação de transcrição reversa é completada, o cDNA gerado é amplificado por um método de PCR padrão. Esta técnica é altamente sensível e específica, pois permite a síntese *in vitro* de segmentos de DNA de dupla fita e a amplificação de sequências-alvo por milhões de vezes em poucas horas. A reação de amplificação baseia-se na capacidade enzimática da DNA polimerase para sintetizar uma segunda fita partindo-se de um molde de DNA desnaturado. De modo geral, a reação de PCR deve conter os dNTPs, tampão com adequadas concentrações de sal e pH e oligonucleotídeos (“primers”) que funcionem como iniciadores para a atividade enzimática. Normalmente, se utiliza uma DNA polimerase termoestável, como a *Taq* polimerase, permitindo-se o desenvolvimento da reação em repetições cíclicas (Eiras et al., 1998).

A PCR geralmente consiste de 30-40 ciclos (Figura 1), cada qual composto de três etapas com temperamentos e tempos distintos: (1) Desnaturação: temperaturas elevadas (92-96°C) fazem com que o DNA molde, originalmente dupla fita, se separe em fitas simples devido ao rompimento das pontes de hidrogênio, que garantem as ligações entre as bases nitrogenadas; (2) Pareamento: (48-65°C) os dois oligonucleotídeos se ligam a regiões complementares do DNA fita simples; (3) Extensão: (60-75°C) a *Taq* DNA polimerase se liga aos oligonucleotídeos correspondentes e utiliza os nucleotídeos livres para completar a síntese dos fragmentos de DNA (Figura 1).

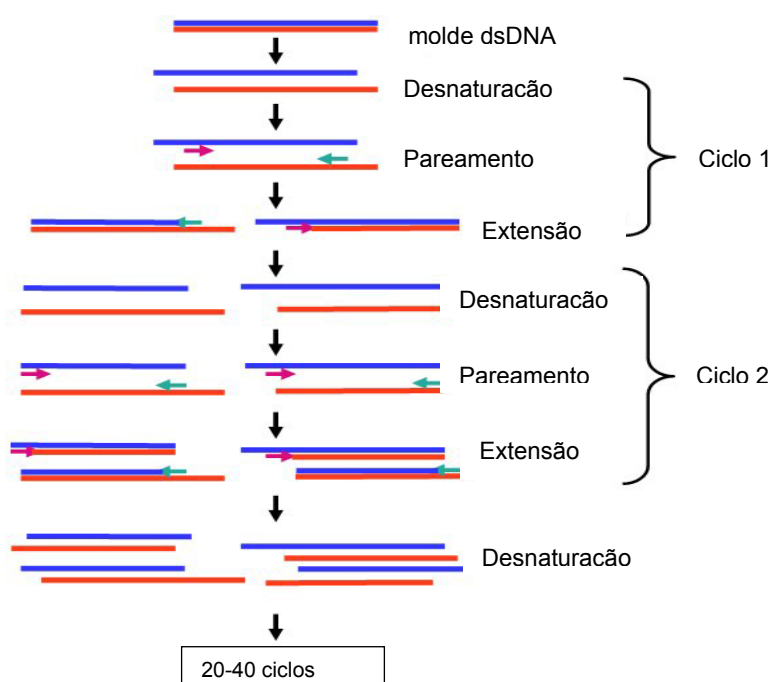


Figura 1 - Representação esquemática dos ciclos de uma reação de PCR.

O principal critério, que determina a especificidade da PCR, é a escolha dos oligonucleotídeos. Para garantir a especificidade da amplificação de uma sequência alvo, os oligonucleotídeos devem ter um tamanho médio de, cerca de, 20 pares de bases (pb). Oligonucleotídeos muito pequenos, são pouco específicos, gerando alta probabilidade de encontrarem complementaridade em diferentes regiões do DNA molde. Outros critérios também afetam a funcionalidade do oligonucleotídeo, tais como a relação entre adenina / timina (A/T) e guanina / citosina (G/C), e a presença de sequências repetidas ou complementares no próprio oligonucleotídeo. Atualmente, a otimização de sequências de oligonucleotídeos para uso em PCR é facilitada pelo emprego de programas ("softwares") apropriados. Outros critérios metodológicos envolvendo um teste PCR são a otimização de vários parâmetros da reação de amplificação, tais como as concentrações de DNA molde e dos oligonucleotídeos, a concentração de sais no tampão da reação, o número de ciclos e a temperatura de pareamento (Pallas et al., 2009). O uso de reagentes e protocolos padronizados, para a reprodutibilidade dos testes PCR, juntamente com a qualidade das preparações de DNA, são particularmente importantes para a obtenção de uma reação otimizada. Os métodos de extração de RNA ou DNA também devem garantir a ausência de inibidores da RT-PCR, tais como compostos fenólicos e polissacarídeos.

2.4.2. PCR em tempo real

A evolução da técnica de PCR convencional para a técnica de PCR em tempo real agrega algumas vantagens tais como: redução no tempo e relativa simplicidade de execução, eliminando completamente o uso de reagentes tóxicos (ex.: brometo de etídeo). Comparada à PCR convencional, esta técnica mantém as características de sensibilidade, além de incrementar a especificidade e a precisão na quantificação do produto amplificado a partir de uma amostra desconhecida. Essas vantagens são consequências do sistema de detecção do DNA amplificado, em "tempo real", que não requer tantas manipulações no preparo das reações de amplificação, as quais são fontes potenciais de alteração dos resultados (Heid et al., 1996).

A primeira determinação de produtos de PCR em tempo real foi realizada por Higuchi et al. (1992), com um sistema que incluía brometo de etídeo em cada

ciclo de amplificação, uma fonte de raios ultravioleta que irradiava os produtos amplificados e uma câmera CCD que capturava a emissão da fluorescência, em seguida processada por um software programado para avaliar a quantidade de DNA alvo. A concentração de amplicons aumenta conforme a evolução dos ciclos de amplificação, aumentando-se assim a emissão de fluorescência. Apresentando-se o resultado da amplificação em um sistema de eixos cartesianos com a intensidade de emissão na abscissa (eixo X) e, o número de ciclos, na ordenada (eixo Y), obtém-se uma curva que fornece informações sobre a quantidade de DNA amplificado e a evolução dos ciclos de amplificação.

Os fluoróforos são moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico. Os sistemas de detecção da PCR em tempo real utilizam-se destas moléculas para realizar o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos. Os compostos fluorescentes mais utilizados são o SYBR[®] Green e as sondas de nucleotídeos marcados com fluoróforos, TaqMan[®], marca registrada da Applied Biosystems (Novais e Pires-Alves, 2004; Saponari et al., 2008 (Figura 2).

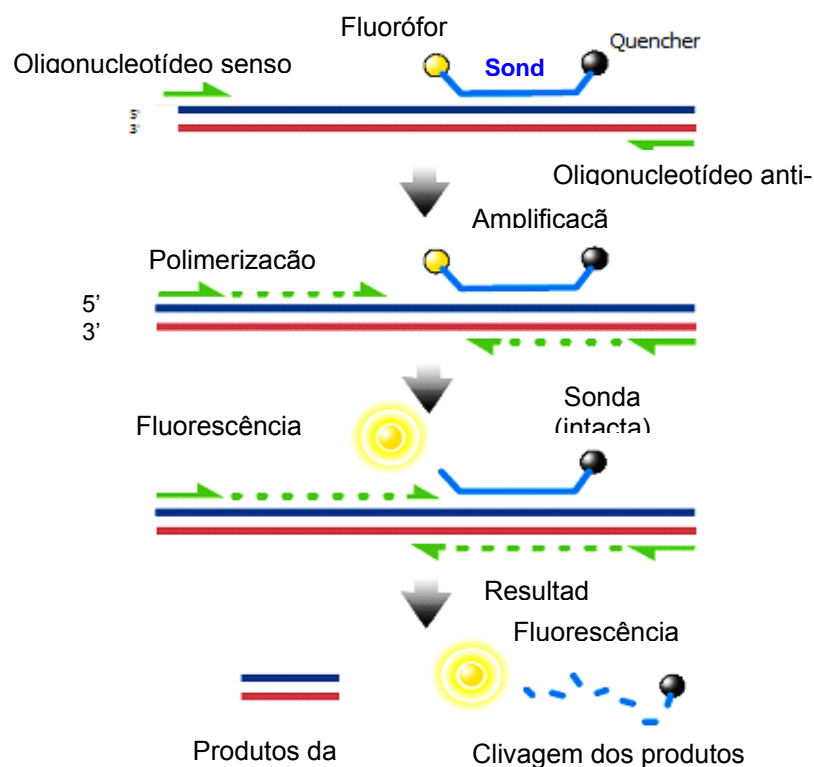


Figura 2 - Representação esquemática de uma sonda tipo TaqMan, de seu pareamento com a sequência alvo e da degradação da sonda pela atividade 5' exonucleásica da Taq DNA polimerase.

As sondas com fluoróforos apresentam a capacidade de hibridização com o DNA molde, além da propriedade de gerarem transferência de energia, base do sistema de quantificação do produto amplificado. As sondas com fluoróforos são fragmentos de DNA de fita simples marcados e usados para hibridizar com uma sequência de nucleotídeos complementar, presente em outra molécula de DNA previamente desnaturada. Assim, elas são empregadas para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados durante a PCR. Esta sonda apresenta em uma extremidade um fluoróforo e na outra extremidade um "quencher" (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor). Os produtos da reação são detectados pela fluorescência gerada após a atividade de exonuclease 5' - 3' da *Taq* DNA polimerase. Durante a reação de PCR em tempo real, a sonda com fluoróforo hibridiza com a sequência complementar da fita simples de DNA, alvo da amplificação. No processo de amplificação, a sonda com fluoróforo é degradada devido à atividade exonucleásica 5' - 3' da *Taq* DNA polimerase, separando-se o "quencher" da molécula fluorescente durante a etapa da extensão. Isto resulta em um aumento da intensidade da fluorescência. Assim, durante o processo de amplificação, a emissão de luz aumenta de forma exponencial. Esse aumento da fluorescência ocorre apenas quando a sonda hibridiza e quando a amplificação da sequência alvo é estabelecida (Heid et al., 1996). A degradação da sonda não deve ocorrer quando ela está livre, em solução; deve ocorrer apenas após o pareamento da sonda com o fragmento alvo e pela atividade da *Taq* DNA polimerase. A fluorescência emitida pela degradação da sonda com fluoróforo é considerada um método bastante sensível para se determinar a presença (ou ausência) de sequências específicas (Holland et al., 1991; Novais e Pires-Alves, 2004; Kokkinos e Clark, 2006; Osman e Rowhani, 2006; Osman et al., 2007; Osman e Rowhani, 2008; Osman et al., 2008).

A vantagem desse sistema é essencialmente a especificidade da sonda, que se hibridiza apenas com amplicons específicos e tem a propriedade de ser marcada com fluoróforos, excitados pela luz em diferentes comprimentos de onda (Figura 3). Assim, é possível a detecção de mais de uma sequência alvo, em uma única reação, por meio da utilização de diferentes sondas, marcadas com diferentes fluoróforos, criando-se uma reação multiplex (Bertolini et al., 2003; James et al., 2006).

Outro tipo de sonda é a *Minor Groove Binding* (MGB), que não contém um "quencher" fluorescente, a exemplo do TAMRA, mas contém uma molécula que age

como um quencher sem emissão de fluorescência (*Non fluorescent quencher, NFQ*), como mostrado na Figura 4.

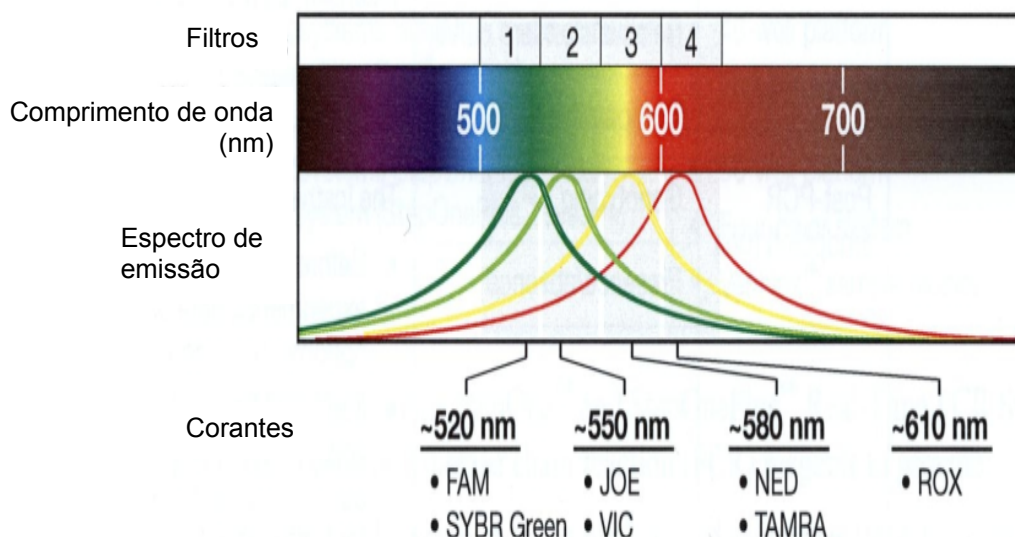


Figura 3 - Espectro de emissão de alguns fluoróforos, o que confere flexibilidade na escolha para as reações multiplex (Fonte: Manual do equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System - Applied Biosystems).

A molécula MGB é covalentemente ligada à sonda devido a presença de um "linker" específico que se liga ao sulco menor do DNA. O emprego deste tipo de sonda evita o sinal de fluorescência basal (ruído de fundo, *background*), emitido por um quencher fluorescente (TAMRA). Além disso, as sondas MGB, ao se parearem com a sequência complementar, são extremamente estáveis, permitindo-se, assim, o uso de sondas mais curtas (13-15 pb) e que pareiem em temperaturas mais elevadas, que as sondas TaqMan do tipo TAMRA, aumentando a especificidade da reação (Kutyavin et al., 2000).

Como uma alternativa, o acúmulo de produtos amplificados pode ser acompanhado em tempo real usando-se corantes específicos de DNA, que apresentem a capacidade de emitir fluorescência. Com isto, também, é possível se verificar o aumento da fluorescência de forma proporcional aos amplicons gerados sem que ocorra interferência na evolução da reação de PCR. Um corante com estas características é o SYBR® Green, que se liga entre as fitas duplas de DNA e, com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador, ocorre a emissão de uma fluorescência verde (Figura 5).

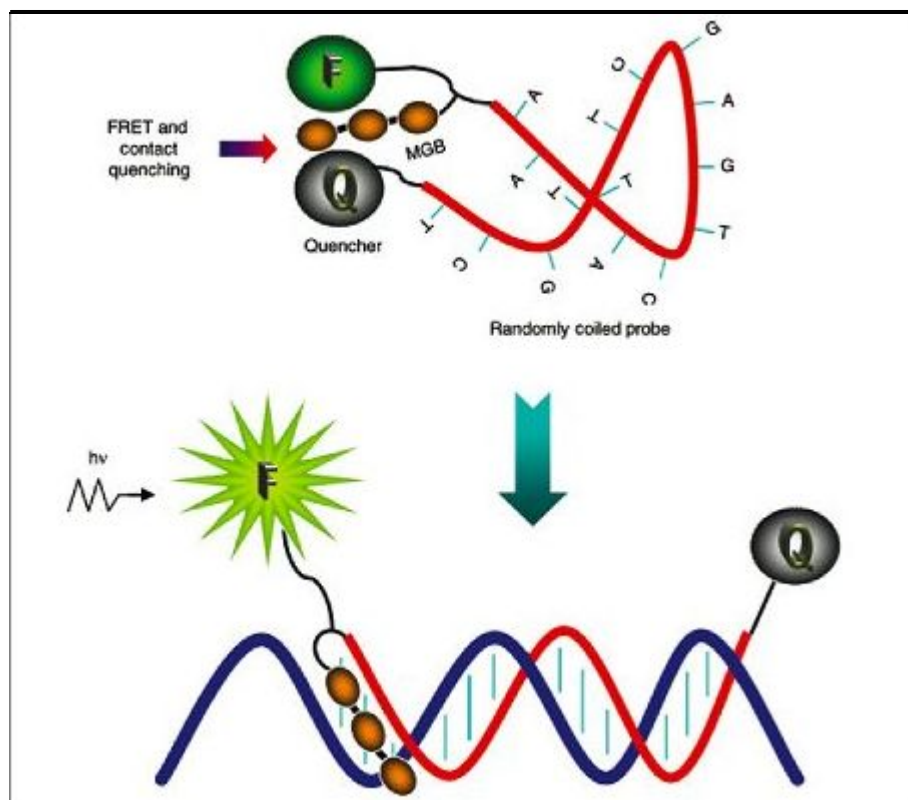


Figura 4 - Representação esquemática da atuação de uma sonda MGB.

O SYBR[®] Green não ligado ao DNA exibe uma fluorescência muito baixa. Durante a polimerização, catalisada pela *Taq* DNA polimerase, as moléculas do SYBR[®] Green vão se ligando ao DNA recém sintetizado. A detecção da fluorescência, no fim da etapa de extensão de cada ciclo da PCR, permite monitorar, continuamente e em tempo real, a quantidade crescente de DNA amplificado (Vitzthum et al., 1999; Novais e Pires-Alves, 2004; Picó et al., 2005; Stewart et al., 2007). As vantagens da utilização do SYBR[®] Green são: baixo custo, facilidade de uso e sensibilidade. A desvantagem é a ligação do SYBR[®] Green com todo DNA fita dupla sintetizado durante a reação, incluindo os dímeros dos oligonucleotídeos e os produtos inespecíficos, o que poderia resultar em superestimativa da concentração do fragmento alvo. Assim, ao final dos ciclos da PCR em tempo real com SYBR[®] Green é necessário a obtenção da curva de dissociação para comprovar que os fragmentos de DNAs amplificados são específicos.

Os equipamentos para o desenvolvimento de reação do tipo PCR em tempo real, além de funcionarem como termocicladores, durante a PCR, também excitam com um laser de íon argônio ou tungstênio, o(s) fluoróforo(s) presente(s) nas sondas e, em seguida, transmitem a fluorescência emitida para um espectrógrafo, que

separa as fluorescências originadas do fluoróforo repórter e da fluorescência basal do quencher (se este for do tipo fluorescente).

A PCR em tempo real ("Real-time PCR") permite a quantificação de ácidos nucleicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, pois determina valores durante a fase exponencial da reação. O cálculo da quantidade de DNA presente em amostras desconhecidas é realizado através da determinação do ciclo limiar da fase exponencial da PCR. O C_T ("Cycle Threshold") é o ponto em que se atinge o valor limite de fluorescência do fluoróforo repórter, separando os sinais de amplificação específica do "ruído de fundo" do sistema. Este ponto permite a quantificação baseada na fluorescência. A emissão de fluorescência aumenta na proporção direta da quantidade de produtos da PCR. Sendo assim, os valores de fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado.

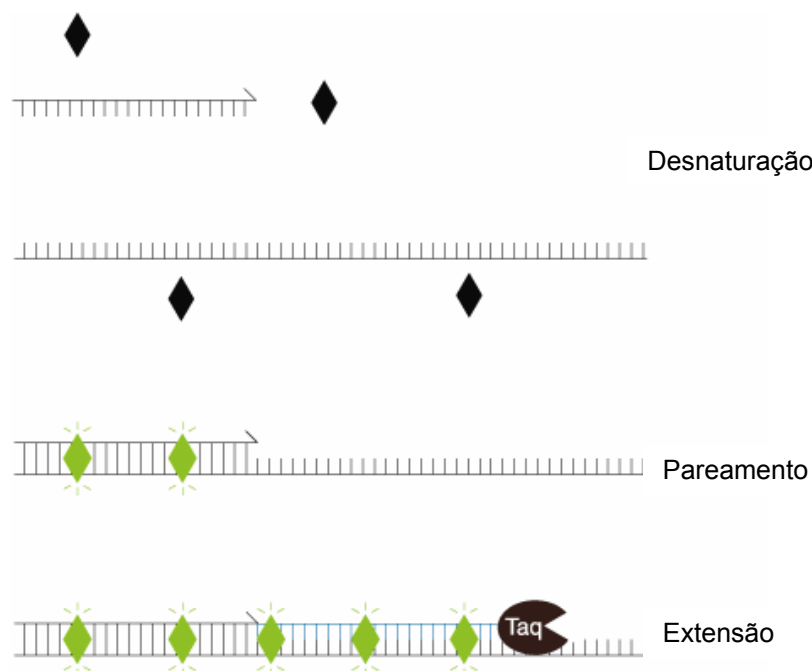


Figura 5 - Representação esquemática do funcionamento de corantes intercalantes fluorescentes (SYBR Green). Losangos escuros, SYBR Green sem intercalar o DNA e losangos claros, SYBR Green intercalando a dupla fita de DNA sintetizada na PCR.

O número de ciclos necessários para uma amostra atingir o seu C_T é inversamente proporcional ao número de cópias do DNA alvo inicialmente presente na amostra. Na representação gráfica do resultado de uma reação de PCR em tempo real (Figura 6), na fase exponencial da curva, há uma estreita relação entre a quantidade de DNA e o número de ciclos. Apenas uma pequena região da curva

apresenta uma correlação linear. Uma curva de referência pode ser elaborada a partir de uma amostra padrão de DNA, com C_T determinado em função do logaritmo da quantidade relativa de DNA, permitindo-se, assim, determinar a quantidade de DNA em uma amostra (Figura 6). A curva, sucessivamente, tende a atingir um "platô"; sendo que a medição da reação nesta fase, não está diretamente relacionada com a quantidade inicial do DNA alvo.

A PCR em tempo real apresenta algumas vantagens sobre a PCR convencional, tais como precisão e possibilidade de quantificação do DNA alvo. A quantificação do DNA é calculada na fase exponencial da reação de PCR (ciclo limiar), pois nesta fase da curva, os reagentes da reação ainda não foram totalmente consumidos ou degradados (sonda), refletindo em mínima variabilidade do resultado final do teste.

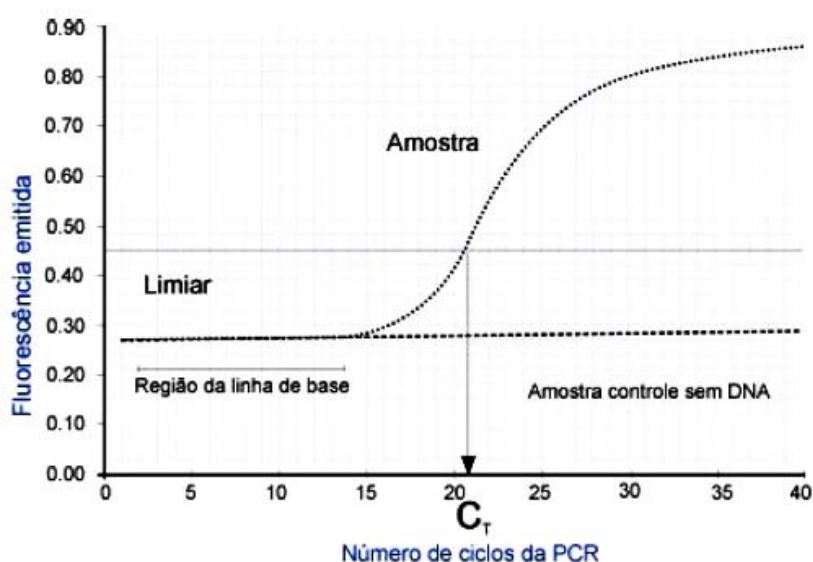


Figura 6 - Representação gráfica de uma reação de PCR em tempo real, mostrando uma curva de emissão de fluorescência (Novais e Pires-Alves, 2004).

2.4.3. Multiplex PCR em tempo real

Multiplex PCR é a amplificação simultânea de mais de uma sequência alvo em uma única reação (Henegariu et al., 1997). Especificamente, PCR duplex é a amplificação de duas sequências alvo em uma reação; PCR triplex consiste na amplificação de três alvos, e assim por diante. É possível realizar Multiplex PCR em tempo real utilizando sondas TaqMan®, no qual cada ensaio tem uma sonda específica, marcada com um corante fluorescente individual (fluoróforo), resultando em diferentes cores emitidas para cada ensaio (Bertolini et al., 2003; James et al.,

2006). Os equipamentos para a PCR em tempo real (Real-time PCR) podem distinguir entre os diferentes fluoróforos e o sinal de cada fluoróforo é usado para, separadamente, quantificar cada alvo (Eun et al., 2000; Varga e James, 2005). A PCR duplex, que apresenta várias vantagens sobre as reações individuais, é rotineiramente empregada em laboratórios de pesquisa. No entanto, o ajuste de uma multiplex PCR, reprodutível e confiável, pode ser um desafio, pois os resultados devem ser validados e, em algumas situações, a otimização das condições da reação pode ser necessária (Pallas et al., 2009). As vantagens da Multiplex PCR:

- Redução de custos, pois menos reações são realizadas, economizando reagentes caros (dNTPs, enzimas, controles endógenos, etc.);

- Preservação de amostras para as quais existe pouco material disponível: nos casos em que a quantidade da amostra é limitada, reações multiplex permitem que mais alvos sejam analisados, usando uma alíquota única de material da amostra;

- Confiabilidade (por exemplo, efeito reduzido dos erros de pipetagem): a qualidade dos resultados pode ser melhorada, pois o alvo de interesse é normalizado para o controle endógeno, presente dentro da mesma alíquota da amostra (Nassuth et al., 2000; Sharman et al., 2000).

2.4.4. Fatores que influenciam a multiplex PCR em tempo real

Ensaio multiplex devem ser sempre validados e muitas vezes requerem otimização. Dependendo dos alvos que estão sendo analisados e das amostras utilizadas, a reação de otimização e a validação podem variar de uma atividade simples até ensaios mais complexos que consumam tempo e recursos. O custo e o tempo necessários aumentam em função do número de alvos a serem detectados. É absolutamente essencial que os resultados obtidos, a partir de reações multiplex, sejam confirmados, de modo a refletirem os resultados obtidos, a partir de reações individualizadas, para as mesmas amostras (James et al., 2006).

Ao se desenhar e escolher os diferentes oligonucleotídeos para ensaios de multiplex PCR é importante considerar que:

- Um oligonucleotídeo não deve conter bases que são complementares a outras bases do mesmo oligonucleotídeo (autocomplementaridade), nem deve apresentar complementaridade com outros oligonucleotídeos presentes na reação

multiplex. Complementaridade nas extremidades 3' devem ser especialmente evitadas para minimizar a formação de "artefatos" (ex. dímeros, oligômeros).

- Um conteúdo GC de 40-60% é recomendado para todos os oligonucleotídeos, evitando-se repetições excessivas de qualquer base. Além disso, os oligonucleotídeos não devem parear em regiões de estrutura secundária dentro do alvo, pois estas regiões podem ter Tm maior do que o do próprio oligonucleotídeo.

- A Tm deve ser a mesma para todos os oligonucleotídeos utilizados na reação de multiplex.

- O tamanho do fragmento amplificado (amplicon) deve estar entre 50-150 pb para a eficiência ideal da reação de PCR. Oligonucleotídeos que geram um fragmento maior podem resultar em baixa eficiência de amplificação. Se não for possível amplificar fragmentos na faixa de tamanho mencionada, será necessário otimizar a ciclagem de amplificação e os componentes da reação para fragmentos maiores.

- O oligonucleotídeo deve ser específico para o alvo (Pallas et al., 2009).

Uma vez que dois ou mais alvos são amplificados no mesmo tubo, eles competem pelos mesmos reagentes (dNTPs e polimerase). É importante que esta competição seja minimizada. Os dois alvos (e/ou reações) também podem inibir um ao outro por meio de interações entre os quatro oligonucleotídeos, as duas sondas, os próprios alvos ou fragmentos amplificados (amplicons) ou qualquer combinação destes motivos. O objetivo da PCR multiplex é detectar e/ou quantificar com precisão cada alvo presente, sem interferências, tais como competição ou inibição entre as reações (Grondahl et al., 1999; James et al., 2006). Quanto mais alvos são amplificados em uma reação multiplex, maior a probabilidade de que possa ocorrer competição por reagentes e inibição entre as reações (Bertolini et al., 2001; Nassuth et al., 2000; Menzel et al., 2002).

Também é possível realizar multiplex PCR com mais de dois alvos. Na literatura científica existem vários trabalhos com triplex PCR, especialmente para a identificação e/ou detecção de patógenos (Pelletier et al., 2009; Agindotan, et al., 2007). As recomendações para a realização de uma PCR multiplex, com mais de dois alvos, são essencialmente as mesmas de uma reação duplex padrão. É importante levar em consideração a quantidade relativa, dentro das amostras, de cada um dos alvos e, se necessário, limitar a concentração de um par ou de todos

os pares de oligonucleotídeos nas reações, evitando-se a competição por reagentes entre os fragmentos alvo amplificados. Também devem ser consideradas as propriedades espectrais de cada fluoróforo que compõe as sondas (intensidade de fluorescência, sobreposição espectral com outros fluoróforos) dentro da reação, afim de que o registro de uma amplificação não interfira no registro de outra.

O desempenho da multiplex PCR deve ser cuidadosamente avaliado, visando-se verificar sua adequação para a diagnose envolvendo grande número de amostras e para ensaios de rotina. O tempo e os custos associados a uma validação com este objetivo poderão ser compensados pela redução dos custos globais de funcionamento de uma reação multiplex bem otimizada, ou seja, aquela em que os resultados da multiplex PCR são similares àqueles obtidos a partir de reações individualizadas para cada alvo (Menzel et al., 2002; Nassuth et al., 2000; Saade et al., 2000).

2.5. Utilização da RT-PCR em tempo real (Taqman) para a detecção de vírus em videira

As ferramentas para o diagnóstico dos vírus que infectam a videira têm evoluído ao longo dos anos, tendo começado pela indexação biológica em plantas indicadoras lenhosas ou herbáceas, passando pelos testes sorológicos (ELISA) e moleculares (RT-PCR convencional) até chegar à RT-PCR em tempo real. A detecção por PCR em tempo real é uma técnica muito sensível e que pode ser utilizada para superar as limitações apresentadas pelos ensaios de indexação biológica, ELISA e/ou PCR convencional (Osman et al., 2008). Esta técnica, derivada da PCR, vem ganhando espaço no diagnóstico viral, por apresentar capacidade de gerar resultados quantitativos, pois permite o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida em relação à PCR convencional, que apresenta somente resultados qualitativos (Novais e Pires-Alves, 2004; Saponari et al., 2008). Além disso, a PCR em tempo real apresenta elevada especificidade e sensibilidade.

A PCR em tempo real permite a quantificação dos fragmentos alvo amplificados de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, pois determina valores durante a fase exponencial da reação. A vantagem desse sistema fundamenta-se na especificidade da sonda, que se liga apenas à amplicons específicos e ainda apresenta a propriedade de usar diferentes tipos de fluoróforos,

excitados pela luz em diferentes comprimentos de onda. Desta forma se processa a marcação de diferentes sondas, o que permite a detecção de mais de uma sequência alvo em uma única reação, caracterizando-se uma reação multiplex (Bertolini et al., 2003; James et al., 2006).

O emprego da PCR em tempo real para a detecção de vírus que infectam diferentes hospedeiras (Picó et al., 2005; James et al., 2006; Kokkinos e Clark, 2006), incluindo a videira (Osman e Rowhani, 2006; Osman et al., 2007; Stewart et al., 2007; Osman e Rowhani, 2008; Osman et al., 2008) foi relatado por diferentes autores.

Stewart et al. (2007) avaliaram videiras infectadas com *Tomato ringspot virus* (ToRSV) por meio dos ensaios de detecção One-step RT-PCR em tempo real com SYBR[®] Green e imunoenzimático, detectando-se maior número de videiras infectadas ao utilizarem o primeiro teste. Da mesma forma, Beuve et al. (2007) detectaram por RT-PCR em tempo real com SYBR[®] Green, de forma reprodutível, e com sensibilidade 125 vezes superior, comparada a RT-PCR convencional, 43 isolados do GLRaV-2 provenientes de diferentes origens geográficas e cultivares de videira.

Osman et al. (2007) também realizaram ensaios de RT-PCR em tempo real, porém utilizando sondas marcadas com fluoróforos (TaqMan), para a detecção específica dos vírus associados ao enrolamento da folha da videira 1 ao 5 e 9 (GLRaV-1 ao -5 e -9). Nesse experimento foram avaliados diferentes isolados, com ampla distribuição geográfica, incluindo África do Sul, Europa, Austrália, Ásia, América Latina e Estados Unidos. Os resultados mostraram que a RT-PCR em tempo real foi mais sensível quando comparada à RT-PCR convencional, podendo detectar estes vírus em amostras mais diluídas, e obtidas a partir de diferentes métodos de extração.

Osman e Rowhani (2008) utilizaram a RT-PCR em tempo real, com sonda com fluoróforo, para a detecção dos vírus associados ao Complexo do Lenho Rugoso ("Rugose wood") da videira. Os vírus detectados foram GRSPaV (*Foveavirus*), além de GVA, GVB e GVD. Comparações entre RT-PCR convencional e RT-PCR em tempo real foram realizadas, assim como no trabalho de Osman et al. (2007). Em relação ao GRSPaV, estes autores demonstraram que RT-PCR em tempo real pode detectar mais isolados deste vírus (85% em RT-PCR em tempo real comparada a 80% em RT-PCR convencional), utilizando-se os oligonucleotídeos

48F/49R, desenhados com base em regiões conservadas do gene da proteína capsidial de vários isolados de GRSPaV. Resultados similares foram obtidos para GVA (72% e 62%), GVB (74% e 40%) e GVD (40% e 20%) quando testados por RT-PCR em tempo real e RT-PCR convencional, respectivamente.

Osman et al. (2008) realizaram comparações de matrizes de baixa densidade (LDA), uma modificação da técnica de RT-PCR em tempo real, utilizando micro placas com 384 poços, para a detecção específica de 13 vírus que infectam a videira [GLRaV-1, -2, -3, -4, -5 e 9, GLRaV-2 (estirpe RG), GRSPaV, GVA, GVB, GFLV, ToRSV e GFkV]. As LDAs foram avaliadas considerando-se ampla gama de isolados, distribuídos geograficamente na África, Europa, Austrália, Ásia, América Latina e nos Estados Unidos. A detecção, com alta eficiência, destes vírus, usando LDAs foi comparada com RT-PCR em tempo real (TaqMan). Os resultados demonstraram que a tecnologia LDA, aliada a RT-PCR em tempo real (TaqMan), é uma ferramenta promissora e economiza tempo na detecção de patógenos de plantas, permitindo analisar simultaneamente em uma única reação diferentes patógenos em uma amostra.

Margarita et al. (2009) realizaram a detecção múltipla de fitoplasmas associados às doenças *Flavescence dorée* (FD) e *Bois noir* (BN) e dos vírus GLRaV-1 e -3 e GVA, usando extrato bruto como molde e obtiveram resultados cinco vezes mais sensíveis, comparando o método de RT-PCR convencional com a RT-PCR em tempo real para a detecção do fitoplasma FD. Adicionalmente, os vírus foram detectados por nested-PCR em tempo real, método que também apresentou maior sensibilidade quando comparado aos ensaios de ELISA e RT-PCR convencional.

Klaassen et al. (2011) analisaram espécies de *Vitis* spp. e de outras hospedeiras provenientes de nove vinhedos do Napa Valley-EUA, e detectaram infecções simples e múltiplas dos vírus GLRaV-2 e -3, GVA e GVB por RT-PCR convencional e quantitativo (qRT-PCR) em seis de 66 acessos de *V. californica* e em 11 de 19 híbridos de *V. californica* × *V. vinifera*. GLRaV-1, -4, -5 e -9 e GVD não foram detectados. Análises filogenéticas da sequência de nucleotídeos de parte do gene da proteína capsidial do GLRaV-2 e -3 indicaram pouca variabilidade entre os isolados. Das 75 amostras positivas, 29 foram positivas por ambos os métodos, RT-PCR e qRT-PCR, enquanto que 46 foram positivas apenas em qRT-PCR, indicando que a qRT-PCR foi mais sensível para detecção dos vírus estudados.

Pacifico et al. (2011) também desenvolveram ensaios qRT-PCR TaqMan para a quantificação de GLRaV-1 e -3, GVA, GFLV e GFkV em *Vitis vinifera*, provenientes do Piemonte (Noroeste da Itália), confirmando se tratar de um método confiável e específico para a quantificação viral e indexação de infecções virais simples ou múltiplas em videiras. Cepin et al. (2010) detectaram de forma quantitativa, isolados de GFLV, provenientes de diferentes regiões geográficas, e demonstraram que a qRT-PCR apresentou sensibilidade 1000 vezes maior do que ELISA. Concentrações tão baixas quanto dez cópias do genoma do GFLV por reação foram detectadas, de forma segura, usando-se a qRT-PCR e a partir de diferentes tipos de amostras de videira, incluindo raspa de floema de plantas dormentes.

Bertolini et al. (2010) analisaram videiras produtoras de uvas de mesa, provenientes de importantes áreas de cultivo da Espanha (Vinalopó, Alicante), objetivando determinar a prevalência de cinco vírus, incluídos no programa de certificação espanhol: *Arabis mosaic virus* (ArMV), GFLV, GFkV, GLRaV-1 e GLRaV-3. As amostras foram coletadas em dois diferentes períodos vegetativos, na primavera e na dormência das plantas. A detecção por RT-PCR convencional resultou em 95,8% (primavera) e 47,4% (dormência) de plantas infectadas, sendo que as análises realizadas por RT-PCR em tempo real foram muito mais sensíveis quando comparadas ao ELISA. O vírus prevalente neste estudo foi o GFLV (95,8%), seguido do GLRaV-3 (94,7%), GLRaV-1 (66,3%) e GFkV (65,3%). Este trabalho também enfatizou afirmativas mencionadas por Osman et al. (2008) em relação a dificuldade de detecção de vírus em videira devido a expressivas variações sazonais na concentração viral. Também cita que o teste ELISA não possui suficiente sensibilidade quando realizado em determinados estádios de desenvolvimento da videira.

Na literatura científica é possível encontrar significativa quantidade de trabalhos que comparam a eficiência e vantagens da técnica de RT-PCR em tempo real em relação a RT-PCR convencional, para a detecção de diferentes vírus infectando diversas culturas. Kokkinos e Clark (2006) conduziram ensaios de RT-PCR em tempo real, com sondas com fluoróforo, para a detecção e a quantificação dos vírus de batata-doce *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV), *Sweet potato virus G* (SPVG), *Ipomoea vein mosaic virus* (IVMV), *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) e *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV), diretamente de plantas de

batata-doce infectadas. Os resultados obtidos demonstraram que a PCR em tempo real foi o método mais rápido, mais seguro e, também, o método mais sensível para a detecção e a quantificação destes vírus, diretamente da planta de batata-doce, quando comparado à PCR convencional.

Ruiz-Ruiz et al. (2009) desenvolveram ensaios de RT-PCR em tempo real (TaqMan) para a detecção e a quantificação de *Citrus leaf blotch virus* (CLBV) em plantas cítricas, determinando que a detecção foi altamente específica e cerca de mil vezes mais sensível quando comparada à detecção por RT-PCR convencional. O protocolo utilizado permitiu a detecção de, no mínimo, 100 cópias do RNA do CLBV, presentes em diferentes tecidos e variedades de citros, de diferentes origens geográficas, infectados com CLBV. Estes resultados incrementaram o método de detecção de CLBV e estão sendo aplicados em programas de obtenção de materiais sadios, na avaliação quarentenária e em programas de certificação de citros na Espanha.

Abordagens que permitam a detecção simultânea de vários vírus de plantas (multiplex) apresentam vantagens, tais como redução do número de testes (reações) a ser realizado, racionalização do uso de reagentes, diminuição do tempo necessário para a análise e consequente redução do custo da detecção por PCR em tempo real. A RT-PCR em tempo real também é uma tecnologia que apresenta certa flexibilidade, pois permite a detecção específica de amplo espectro e/ou simultânea de vários vírus de plantas, o que resulta em redução global de custos e na melhoria da capacidade de monitorar ou de manejar/controlar patógenos em determinados cultivos (James et al., 2006).

Em resumo, a PCR em tempo real permite a quantificação das amostras amplificadas, característica de grande relevância para o diagnóstico de patógenos e, as vantagens desta técnica, em relação a PCR convencional, são a facilidade de quantificação, maiores sensibilidade, precisão, reprodutibilidade e acurácia, velocidade na análise, melhor controle de qualidade no processo e menor risco de contaminação das reações (Novais e Pires-Alves, 2004). A detecção de mais de uma espécie viral, em uma única reação de PCR em tempo real (Multiplex PCR em tempo real), agrega vantagens a esta técnica, permitindo maximizar a indexação de maior número de amostras, entretanto, calibrações específicas das reações são necessárias para a execução da Multiplex PCR em tempo real.

A Multiplex PCR constitui-se em um valioso recurso das técnicas

moleculares, pois oferece a possibilidade de detectar dois ou mais patógenos em uma única reação. Pode ser usada para a detecção simultânea de vírus de plantas, com diferentes abordagens: utilização de diferentes oligonucleotídeos específicos em uma mesma reação ou utilização de oligonucleotídeos degenerados para a detecção de um gênero ou família viral, em ambos os casos a especificidade é resultado da hibridização da sonda (Pallas et al., 2009). Estas abordagens são muito atrativas para os diagnósticos de rotina, pois reduzem tempo, trabalho e custo. Várias técnicas que permitem a detecção simultânea e/ou a identificação de vários vírus em uma única reação de PCR e têm sido empregadas com sucesso (James et al., 2006; Pallas et al., 2009). Tais técnicas utilizam múltiplos pares de oligonucleotídeos específicos, a exemplo da multiplex RT-PCR (Henegariu et al., 1997; James e Upton, 1999; Bertolini et al., 2001; Ito et al., 2002; Thompson et al., 2003; Sanchez-Navarro et al., 2005) ou pares de oligonucleotídeos degenerados (Foissac et al., 2005; James e Upton, 1999) capazes de promover a amplificação de vários alvos (ex: diferentes espécies virais em um gênero ou família). É possível ainda vislumbrar estratégias mais complexas, nas quais há a combinação destas abordagens básicas, ou seja, a utilização de oligonucleotídeos degenerados em um formato do tipo multiplex (Saade et al., 2000; Dovas e Katis, 2003).

Técnicas tradicionais de detecção de vírus de plantas, por meio de bioensaios ou sorologia, são relativamente baratas, mas via de regra, apresentam limitada sensibilidade. Em contraponto, diversas técnicas mais atuais, baseadas em detecção múltipla, apresentam custo reduzido e maior sensibilidade (James et al., 2006). A PCR em tempo real é uma tecnologia nova e instigante, com amplas aplicações para a análise quantitativa e qualitativa de vírus em plantas (Eun et al., 2000; Varga e James, 2005).

A possibilidade de amplificação simultânea de dois ou mais alvos tem várias vantagens evidentes: diferentes regiões do genoma do alvo podem ser amplificadas para a confirmação de uma detecção específica; a detecção pode ser combinada com uma identificação específica, por ex. detecção de uma espécie viral e identificação da estirpe viral, com vários vírus podendo ser identificados em um único ensaio (Pallas et al., 2009). Entretanto, o desenvolvimento de um ensaio multiplex costuma ser complexo, envolvendo ajustes específicos. Cada reação de amplificação individual deve funcionar em condições idênticas, evitando-se, assim, a competição por interferência, que pode ocorrer entre as amplificações individuais.

Outro problema intrínseco à multiplex é a identificação e a discriminação dos produtos individuais da PCR (Bertolini et al., 2003; Grondahl et al., 1999).

As etapas de preparação das amostras vegetais, objetivando que as mesmas apresentem qualidade e ausência de compostos inibidores da reação de PCR, são fundamentais para que ensaios de multiplex PCR sejam realizados com sucesso (Nassuth et al., 2000; Bertolini et al., 2001; Nie e Singh, 2001; Dovas e Katis, 2003). Entretanto, apesar da possível dificuldade encontrada para a otimização, em muitos casos, a realização da detecção simultânea consiste em interessante estratégia para melhorar, em termos de especificidade e sensibilidade, a capacidade de detecção de vírus em plantas (James et al., 2006).

2.6. Análise de sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos de cinco espécies virais que infectam a videira

2.6.1. *Grapevine fleck virus* (GFkV)

A mancha das nervuras é uma virose que normalmente, apresenta alta incidência em vinhedos comerciais e, por ser latente em praticamente todas as cultivares de copa e portaenxerto de videira, faz parte dos programas de seleção sanitária da maioria dos países vitícolas. É causada pelo *Grapevine fleck virus* (GFkV), família *Tymoviridae* (Martelli et al., 2002b), gênero *Maculavirus* (Martelli et al., 2002c). Este vírus não é transmissível mecanicamente, é limitado ao floema, possui partículas isométricas de 30 nm de diâmetro e RNA fita simples com 7.564 nucleotídeos, organizados, em quatro ORFs. A sequência de nucleotídeos do genoma completo de um isolado italiano do GFkV foi obtido por Sabanadzovic et al. (2001) e Fajardo et al. (2004) também conduziram uma caracterização parcial do gene da replicase viral de um isolado brasileiro. A proteína capsidial (CP) tem massa molecular de 28 kDa (Sabanadzovic et al., 1996; Sabanadzovic et al., 2001).

Essa doença já foi registrada na maioria dos países vitícolas do mundo, inclusive no Brasil (Kuhn, 1992; Kuniyuki e Costa, 1987, 1995). O GFkV já foi relatado em videiras nos Estados Unidos (Califórnia e Missouri) (Milkus e Goodman, 1999), Austrália (Shi et al., 2003), Europa (Martelli et al., 2002c) e, recentemente, em Washington (EUA) (Naidu e Mekuria, 2010).

O GFkV é disseminado via material propagativo infectado e transmitido através de enxertia. Os sintomas da doença são observados nas folhas novas e de

meia idade (durante a fase de brotação na primavera) da cultivar de portaenxerto *Rupestris* du Lot, utilizada como indicadora desta virose. Observam-se manchas translúcidas, de um a três milímetros de comprimento, sem forma definida, que acompanham as nervuras, em especial as de terceira e quarta ordens (Hewitt et al., 1972; Kuhn, 1992; Kuniyuki e Costa, 1994). Estas manchas aparecem distribuídas em parte ou em toda a lâmina foliar. Outros sintomas comuns são a abertura excessiva do seio peciolar, a assimetria com distorção e a deformação das folhas. As plantas muito afetadas são menos desenvolvidas e podem apresentar as folhas com os bordos voltados para cima. O portaenxerto Kober 5BB também mostra os sintomas da doença, porém com menor intensidade. Nas demais cultivares comerciais, o vírus ocorre de forma latente. Nenhuma outra hospedeira natural, além da videira, é conhecida (Kuhn, 1992; Martelli et al., 2002c; Fajardo et al., 2003a).

Não há constatação de contaminação de plantas através de ferramentas ou tesoura de poda e, até o momento, não se tem comprovação científica da disseminação deste vírus por vetores (Martelli et al., 2002c).

2.6.2. *Grapevine leafroll-associated virus 5 (GLRaV-5)*

A virose do enrolamento das folhas, que ocorre em praticamente todas as regiões do mundo onde a videira é cultivada, é causada por um complexo de até nove espécies virais, sorologicamente distintas e denominadas “vírus associados ao enrolamento da folha da videira” (*Grapevine leafroll-associated virus*, GLRaV-1 a -9). O GLRaV-2 é classificado no gênero *Closterovirus*, os GLRaV-1, -3 e -5 como *Ampelovirus*; GLRaV-4, -6, -8 e -9 como *Ampelovirus* não classificados e o GLRaV-7 como *Closteroviridae* não classificado. Além destas espécies reconhecidas, outras espécies de GLRaV foram propostas, tais como: GLRaV-10, GLRaV WC-HSP-10, GLRaV-11, GLRaV-Carn, -Pr e -De (Abou Ghanem-Sabanadzovic et al., 2012).

Especificamente, o GLRaV-5 foi relatado em diversos países vitícolas, tais como Chile (Engel et al., 2010), China (Pei et al., 2010), Espanha (Padilla et al., 2010), Argentina (Talquenca et al., 2009) e Estados Unidos (Good e Monis, 2001; Thompson et al., 2012) e, também por meio de ELISA, no Brasil (Kuniyuki et al., 2008).

O GLRaV-5, classificado na família *Closteroviridae* e no gênero *Ampelovirus*, possui partículas alongadas e flexuosas e genoma composto de RNA fita simples,

senso positivo. Recentemente, Thompson et al. (2012) caracterizaram molecularmente o genoma completo do GLRaV-5, obtendo a sequência completa com 13.384 nucleotídeos organizados em sete ORFs. Esta espécie viral não é transmissível mecanicamente e se dissemina naturalmente nos vinhedos pela transmissão, de maneira semipersistente, por várias espécies de pseudococcídeos (Tsai et al., 2010).

2.6.3. *Grapevine virus A (GVA)* e *Grapevine virus D (GVD)*

O GVA, família *Betaflexiviridae*, é a espécie tipo do gênero *Vitivirus*; possui partículas alongadas com, cerca de, 800 nm de comprimento e genoma monopartido de RNA fita simples com 7351 nucleotídeos. Fajardo et al. (2003b) e Moreira et al. (2004) realizaram a caracterizações moleculares do GVA, baseadas no gene da proteína capsidial, de isolados provenientes do Rio Grande do Sul e de São Paulo, respectivamente. A proteína capsidial tem 22 kDa de peso molecular (Minafra e Hadidi, 1994; Minafra et al., 1994; Martelli et al., 1997). O GVA e o GVB apresentam distante relacionamento sorológico, compartilhando 75% de identidade de resíduos de aminoácidos na proteína capsidial (Choueiri et al., 1997). É transmissível para hospedeiras herbáceas, tais como: *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *Gomphrena globosa* e espécies de *Nicotiana*.

A etiologia das caneluras do tronco não está totalmente esclarecida, pertencendo, porém, ao complexo do lenho rugoso da videira (“Rugose Wood complex”). As caneluras do tronco são devidas à presença de uma ou mais das seguintes viroses: Acanaladura do lenho de Kober (“Kober stem grooving”); Intumescimento dos ramos (“Corky bark”) e Caneluras do tronco de Rupestris (“Rupestris stem pitting”), cujos agentes causais são GVA, GVB e GRSPaV, respectivamente (Savino et al., 1989; Minafra, 2000; Du-Preez et al., 2011). Além destas três espécies virais, o *Grapevine virus D (GVD)* também está associado ao Complexo do lenho rugoso da videira (Rosa et al., 2011). Todas estas viroses, à exceção do GVD, já haviam sido relatadas no Brasil (Kuniyuki, 1972; Amorim e Kuniyuki, 2005; Kuniyuki et al., 2001; Kuhn et al., 2002).

Em cultivares sensíveis, caneluras são observadas sob a casca do tronco da videira na superfície do lenho. As caneluras correspondem ao local onde a casca penetra no tronco, prejudicando a formação dos vasos condutores da seiva. O número de caneluras, seu comprimento e largura variam, dependendo da

sensibilidade da cultivar afetada e da estirpe do vírus. As plantas doentes em geral diminuem o vigor e há atraso na brotação das gemas de uma a duas semanas. A casca do tronco é mais grossa e de aspecto corticento (Du-Preez et al., 2011).

Em algumas combinações enxerto/portaenxerto, os sintomas podem se limitar a um dos componentes, quando o outro é tolerante. Os portaenxertos, especialmente o Paulsen 1103, normalmente mostram sintomas nítidos da doença. Muitas cultivares de produtoras viníferas e americanas são altamente suscetíveis. As caneluras podem ser observadas até nas raízes, especialmente em cultivares muito suscetíveis, como o portaenxerto Rupestris du Lot. Também pode ocorrer na região da enxertia uma diferença de diâmetro entre o enxerto e o portaenxerto. As folhas das cultivares tintas podem apresentar avermelhamento, em plantas muito afetadas, em função da formação anormal dos vasos condutores na região afetada (Kuniyuki, 2001; Amorim e Kuniyuki, 2005). Plantas severamente infectadas podem morrer entre seis e dez anos de idade, ou até mais cedo, quando ambas as cultivares (portaenxerto e enxerto) são muito sensíveis. Em algumas cultivares a doença pode permanecer em estado latente (Du-Preez et al., 2011).

A disseminação de longa distância das caneluras do tronco ocorre pelo material propagativo infectado e a transmissão através de enxertia. Demonstrou-se que o GVA pode ser transmitido entre videiras ou para hospedeiras herbáceas pelos pseudococcídeos (cochonilhas) *Heliococcus bohemicus*, *Pseudococcus longispinus*, *Pseudococcus viburni* (= *P. affinis*), *Planococcus citri*, *Planococcus ficus*, *Pseudococcus comstocki*, *Neopulvinaria innumerabilis* e *Parthenolecanium corni* (Rosciglione et al., 1983; La Notte et al., 1997; Regenmortel et al., 2000).

Boscia et al. (1992) determinaram 20% de incidência de GVA em 1.100 videiras, na Itália, provenientes de coleções de cultivares, mantidas a campo, e com diferentes origens geográficas. No Brasil, Kuhn et al. (2002) analisaram a infecção por GVA em amostras de videiras americanas, provenientes de municípios da principal região vitícola do Rio Grande do Sul, e observaram 6,1 a 8,6% de infecção.

Há relato de perdas na colheita de até 22% em cultivares de uvas para vinho na Itália, atribuídos ao GVA (Garau et al., 1994). Na República Checa, videiras infectadas com GVA e GVB com sintomas típicos de casca com aspecto corticento, apresentaram os efeitos negativos desta infecção viral (Kominek et al., 2009). No entanto, na Alemanha, mesmo a alta incidência de GVA (46,9%) não resultou em impacto expressivo sobre o crescimento das videiras (Ipach e Kling, 2008).

O *Grapevine virus D* (GVD), família *Betaflexiviridae*, gênero *Vitivirus*, também está associado aos sintomas do complexo do lenho rugoso, mas seu papel na etiologia desta doença não é completamente conhecido. Rosa (2007) determinou a sequência completa de nucleotídeos do genoma do GVD, embora tal sequência não esteja disponível no banco de dados GenBank do NCBI. Esta autora também identificou o mecanismo adotado por este vírus (supressão do silenciamento gênico) para neutralizar o sistema de defesa da hospedeira.

Em recente avaliação do efeito viral, plantas (portaenxerto cv. Freedom) infectadas unicamente com GVD, exibiram severa redução do crescimento, embora sem manifestar sintomas no lenho das plantas (Rosa et al., 2011).

O GVD apresenta genoma monopartido de RNA com, aproximadamente, 7600 nucleotídeos e organização genômica similar a outros membros do gênero *Vitivirus* (GVA, GVB). A partícula viral tem, cerca de, 825 nm de comprimento, enquanto a proteína capsidial possui massa molecular de 17,6 kDa (Abou-Ghanem et al., 1997). Antes deste trabalho, o GVD ainda não havia sido relatado em videira no Brasil (Dubiel et al., 2011).

O GVD foi detectado, por RT-PCR, em 4% de 218 videiras infectadas com o complexo do lenho rugoso, em trabalho realizado por Abou-Ghanem et al. (1997). Boscia et al. (2001) produziram anticorpos monoclonais contra o GVD, e utilizaram estes anticorpos em ELISA, para esclarecer o envolvimento deste vírus na etiologia do complexo do lenho rugoso. Constataram infecção por GVD em 209 das 676 videiras testadas (31%), percentual superior ao encontrado por Abou-Ghanem et al. (1997).

É possível que o GVD possa ser transmitido, de maneira semipersistente, por pseudococcídeos (cochonilhas) vetores, pois os outros *Vitivirus* (GVA e GVB) têm essa propriedade. Atualmente, o número de isolados caracterizados molecularmente é bastante limitado, com poucas sequências de nucleotídeos de GVD disponíveis em banco de dados (Quadro 4). O genoma completo do GVD não está disponível em banco de dados, apenas sequências incompletas do genoma estão disponíveis (Abou-Ghanem et al., 1997).

2.6.4. *Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1)*

O enrolamento da folha, uma das principais doenças da videira, diminui a

produção e a qualidade da uva, e pode ser causado por diferentes espécies do "vírus do enrolamento da folha da videira" (*Grapevine leafroll-associated virus*, GLRaV) (Quadro 4). Pela incidência e importância econômica, no Brasil e em outros países vitícolas, destaca-se o GLRaV-1 (Lima, 2009; Martelli, 2009).

Este vírus pertence à família *Closteroviridae*, gênero *Ampelovirus* (Quadro 3), e possui partícula alongada e flexuosa. Apresenta genoma composto por RNA de fita simples, senso positivo, com, cerca de, 19.500 nucleotídeos. É disseminado de maneira semipersistente por pseudococcídeos (cochonilhas) e transmitido através da enxertia, mas não é transmissível por inoculação mecânica (Fazeli e Rezaian, 2000) (Quadro 2). A única hospedeira natural deste vírus é a videira (*Vitis* spp.). Os sintomas típicos de enrolamento dos bordos da folha para baixo são observados nas cvs. européias (*V. vinifera*), podendo provocar o definhamento das plantas (Lima, 2009).

Isolados de GLRaV-1 já foram relatados em vinhedos do Brasil (Lima, 2009) e, posteriormente, alguns isolados locais foram caracterizados molecularmente por Fajardo et al. (2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolados virais

Os isolados virais foram obtidos de diferentes cultivares de videiras, previamente caracterizados molecularmente (controles positivos) e mantidos em casas de vegetação na Embrapa Uva e Vinho (Bento Gonçalves, RS) (Quadro 5). É possível que estas plantas-controle estivessem coinfectedas com outros vírus, entretanto isto não foi considerado neste trabalho. Videiras sadias (recuperadas após procedimentos de termoterapia e/ou cultura de tecidos) foram usadas como controles negativos das reações (Quadro 5).

3.2. Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada a partir da adoção de três protocolos distintos, visando-se obter extrações de RNA concentradas e livres de impurezas (inibidores), vinculadas a um protocolo de fácil e rápida execução.

O primeiro método utilizado foi o emprego do kit comercial “RNeasy Plant Mini” (Qiagen), com pequenas modificações, para a extração do RNA total. O tecido vegetal, 100 mg de nervuras e pecíolos de folhas ou de fragmentos do lenho de videiras infectadas, foi triturado em nitrogênio líquido, adicionando-se 450 µL do tampão de extração, descrito por Mackenzie et al. (1997), e incubando-se a amostra por três minutos a 56°C. As etapas seguintes foram desenvolvidas conforme as recomendações técnicas do fabricante.

O segundo método utilizado foi o método de adsorção em sílica (Rott e Jelkmann, 2001), partindo-se da trituração de 300 mg de tecido vegetal em tampão de extração, composto por tiocianato de guanidina (4 M), acrescido de outros reagentes. Após a precipitação dos ácidos nucleicos com 150 µL de etanol absoluto, 300 µL de iodeto de sódio (6 M) e 25 µL de sílica (60 g de sílica, Sigma S5631, em 500 mL de água livre de RNase), os sedimentos foram ressuspensos em 150 µL de água livre de RNase.

O terceiro método de extração foi o protocolo descrito por Zeng e Yang (2002), adaptado por Reid et al. (2006). A partir de 100 mg de tecido vegetal, triturado na presença de nitrogênio líquido, acrescentaram-se 750 µL de tampão de extração, composto por brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) a 2% (p/v) e outros

reagentes. Após a precipitação dos ácidos nucleicos com acetato de sódio e isopropanol, os sedimentos foram ressuspensos em água livre de RNase, para um volume final de 500 µL. As próximas etapas consistiram da precipitação seletiva do RNA com 2 M de cloreto de lítio (LiCl), lavagem do sedimento e a ressuspensão do RNA em 50 µL de TE, preparado com reagentes livres de RNase.

Quadro 5 - Relação de controles positivos (hospedeiras infectadas com isolados virais previamente identificados e caracterizados) e negativo (planta sadia), utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real (TaqMan)

Vírus	Acrônimo	Isolado Viral	gene caracterizado (pb)	Acesso no GenBank	Cultivar de videira hospedeira	Referência
<i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i>	GLRaV-1	OS	969 (proteína capsidial)	GQ332536	Petit Syrah	Fajardo et al. (2011)
<i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i>	GLRaV-2	L/I	597 (proteína capsidial)	EU053126	LN33/Isabel	Radaelli et al. (2009)
<i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i>	GLRaV-3	Pet-4	942 (proteína capsidial)	AY753208	Petit Syrah	Fajardo et al. (2007)
<i>Grapevine leafroll-associated virus 5</i> (*)	GLRaV-5	Card	162 (HSP70 parcial)	JQ031715 e JQ031716	Cardinal	Este trabalho
<i>Grapevine virus A</i>	GVA	GVA-RS	597 (proteína capsidial)	AF494187	Itália (Pirovano 65) LN33	Fajardo et al. (2003b)
<i>Grapevine virus B</i>	GVB	BR1	594 (proteína capsidial)	AF438410	(Couderc 1613 x Thompson Seedless)	Nickel et al. (2002)
<i>Grapevine virus D</i> (*)	GVD	Dolc e Garg	852 (proteína capsidial /RNA binding protein)	JQ031715 e JQ031716	Dolcetto e Garganega	Este trabalho
<i>Grapevine rupestris stem pitting-associated virus</i>	GRSPaV	CF210	780 (proteína capsidial)	EF690384	Cabernet Franc	Radaelli et al. (2009)
<i>Grapevine fanleaf virus</i>	GFLV	RUP	1515 (proteína capsidial)	EU258680	Rupestris du Lot / Maria (IAC 514-6)	Radaelli et al. (2009)
<i>Grapevine fleck virus</i> (*)	GFKV	BF	693 (proteína capsidial)	JN022610	Benefuji	Fajardo et al. (2004) (*) e este trabalho
Controle negativo (sadio)	—	—	—	—	Paulsen 1103 (submetido a termoterapia de (88+93+63 dias e cultura de tecidos)	—

(*) Isolados caracterizados molecularmente no presente trabalho. Para GFKV havia uma caracterização molecular parcial prévia deste isolado (245 pb na replicase viral) (Fajardo et al., 2004).

A concentração do RNA extraído foi avaliada em espectrofotômetro (GeneQuant Pro, Amersham Biosciences), selecionando-se, preferencialmente, para uso posterior, aquelas extrações de RNA com razão 260/280 nm entre 1,8 e 2,0 e razão 260/230 nm, maior que 2,0. A integridade do RNA total também foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v), corado com Gel Red™,

corante fluorescente ultrasensível e de baixa toxicidade. As extrações de RNA total foram armazenadas a -20° C.

3.3. Detecção por RT-PCR em tempo real (TaqMan)

Os ensaios foram conduzidos nos Laboratórios de Virologia e de Biologia Molecular Vegetal da Embrapa Uva e Vinho (Bento Gonçalves, RS). As videiras utilizadas, infectadas com dez diferentes vírus GRSPaV, GVA, GVB, GVD, GLRaV-1, -2, -3 e -5, GFLV e GFkV, previamente caracterizados, foram mantidas em casas de vegetação na Embrapa Uva e Vinho (Bento Gonçalves, RS). Videira comprovadamente sadia, proveniente de tratamento de termoterapia e cultura de tecidos, foi utilizada como controle negativo (Quadro 5).

Todos os oligonucleotídeos e as sondas para as reações de RT-PCR em tempo real estão descritos no Quadro 6. As sequências de nucleotídeos dos oligonucleotídeos e das sondas foram definidas com base no alinhamento múltiplo de nucleotídeos de regiões genômicas conservadas para diferentes isolados do mesmo vírus (Osman e Rowhani, 2006; Osman et al., 2007; Osman e Rowhani, 2008; Osman et al., 2008).

Múltiplos oligonucleotídeos e/ou sondas com fluoróforo foram desenhados para GRSPaV, GVA, GVB e GFkV devido à dificuldade para se encontrar regiões no genoma destas espécies virais com 100% de sequência consenso entre os isolados alinhados. A mistura desses múltiplos oligonucleotídeos e sondas foi usada, em cada reação, para aumentar a eficiência de detecção das quatro espécies virais mencionadas anteriormente. Para as demais espécies virais (GLRaV-1, -2, -3 e -5, GFLV e GVD) foram utilizados apenas os dois oligonucleotídeos ("forward" = viral e "reverse" = complementar), além de apenas uma sonda (Quadro 6). As sondas foram marcadas com os fluoróforos 6-FAM ou VIC na extremidade 5' para permitir a detecção de dois vírus na mesma amostra e com TAMRA, fluoróforo que funciona como "quencher", na extremidade 3'. Alternativamente, para a detecção simultânea de três vírus em uma reação de RT-PCR em tempo real, apenas uma sonda para GVA, do tipo NFQ-MGB ("quencher" não fluorescente) foi marcada com o fluoróforo NED (Quadro 6), compatível com o equipamento utilizado (Applied Biosystems). As particularidades da detecção simultânea de dois e três vírus serão abordadas nos itens 3.4 e 3.5, respectivamente.

Quadro 6 - Relação de oligonucleotídeos e sondas utilizados na detecção por RT-PCR em tempo real, com sondas com fluoróforo (TaqMan), de dez diferentes vírus que infectam a videira

Vírus	Número de identificação	Oligonucleotídeo e sonda	Fluoróforo / quencher	Orientação	Gene alvo	Sequência do oligonucleotídeo (5'-3')	Tamanho do produto (pb)	Referência
GRSPaV	3	RSPaV-52 F1	----	F	CP	AGACGGGAATACCACCAGCTAA	102	Osman e Rowhani (2008)
	4	RSPaV-52 F2	----	F		AGACGGGAATCCACCCGCTAA		
	5	RSPaV-52 F3	----	F		AGACGGGGATACCACCAGCTAA		
	6	RSPaV-130 R1	----	R		AGGAAGAAGTCAAAGGCTGCAA		
	7	RSPaV-130 R2	----	R		AAGAAAAATCAAAGGCTGCAA		
	43	RSPaV-75 P1	VIC / TAMRA	P		TGGGCCAAGAAAGGATTTAATGAGAATGAAAAG		
	44	RSPaV-75 P2	VIC / TAMRA	P		TGGGCCAAGAAAGGGTTAATGAGAATGAAAAA		
	45	RSPaV-75 P3	VIC / TAMRA	P		TGGGCCAAGAAGGGATTTAATGAAAATGAGAAA		
GVA	8	GVA-77 F1	----	F	CP	CGACCGAAATATGTACCTGAATACTC	115	Osman e Rowhani (2008)
	9	GVA-77 F2	----	F		CGACCGAACTATGTACCTGAATACTC		
	10	GVA-192 R1	----	R		TTTGCTAGCTTTAGGACCTACTATATCTACCT		
	11	GVA-192 R2	----	R		CTTGCTAGCCTTAGGTCCTACTATATCTACCT		
	46	GVA-104 P	VIC / TAMRA	P		CTTCGGGTACATCGCCTTGGTCCG		
GVB	12	GVB-92 F1	----	F	CP	CTAGGAGTGCGGCTAAACGAA	110	Osman e Rowhani (2008)
	13	GVB-92 F2	----	F		GGAGTGCGGCCAAACGA		
	14	GVB-92 F3	----	F		CAAGGAGTGCGGCTAAACGAA		
	15	GVB-202 R1	----	R		CCTTAACCTCGTCCTGTGATATGGT		
	16	GVB-202 R2	----	R		CCTTCACCTCATCYTGGGATCGTGT		
	33	GVB-119 P1	6-FAM / TAMRA	P		CTCGTTATGGTCGCTGTTACTGTTGTGGTAG		
	34	GVB-119 P2	6-FAM / TAMRA	P		ACCGTTACGGCCGTTGTTACTGTTGTGGTAG		
GVD	60	GVD-554 F	----	F	CP	AGGTGATTCAACGCCAGTCG	78	Osman e Rowhani (2008); Klaassen et al. (2011)
	61	GVD-631 R	----	R		CCTGCGAGAAATGATGGGTCA		
	64	GVD-580 P	6-FAM / TAMRA	P		TTGGAGAGCAGGCAGTTGAGATATAAATGGA		
GLRaV-1	17	LR1 HSP70-149 F	----	F	HSP70	ACCTGGTTGAACGAGATCGCTT	145	Osman et al. (2007)
	18	LR1 HSP70-293 R	----	R		GTAACGGGTGTTCTTCAATTCTCT		
	35	LR1 HSP70-225 P	6-FAM / TAMRA	P		ACGAGATATCTGTGGACGGA		

Quadro 6, Cont.

GLRaV-1	56	GLRaV1Ppoly167 F	----	F	polimerase	CTGACCCTATCGCTGCTACTGA	60	Pacífico et al. (2011)
	57	GLRaV1Ppoly206 R	----	R		TCCCATCAACCCAGGTATCAA		
	62	GLRaV1Ppoly190 P	6-FAM / TAMRA	P		CTCGCCAGCTTGTTT		
GLRaV-2	19	GLRaV-2 198 F	----	F	HSP70	CATTATATTCTTCATGCCTCTCAGGAT	116	Osman et al. (2007)
	20	GLRaV-2 290 R	----	R		GATGACAACTTCTGTCCGCTATAGC		
	47	GLRaV-2 233 P	VIC / TAMRA	P		TTGCTACTGATCGACTGTGCAGCTCACA		
GLRaV-3	21	GLRaV-3 56 F	----	F	HSP70	AAGTGCTCTAGTTAAGGTCAGGAGTGA	254	Osman e Rowhani (2006); Osman et al. (2007)
	22	GLRaV-3 285 R	----	R		GTATTGGACTACCTTTTCGGGAAAAT		
	48	GLRaV-3 181 P	VIC / TAMRA	P		CAGGTAATAGCGGACTGAGACTGGTGGACA		
GLRaV-5	58	GLRaV5 HSP-26 F	----	F	HSP70	AACACTCTGCTTTTCTGCTGGC	162	Osman et al. (2007); Osman et al. (2008); Klaassen et al. (2011)
	59	GLRaV5 HSP-188 R	----	R		CTTTTTATGTCCCATAAACGAGTACA		
	63	GLRaV5 HSP-131 P	6-FAM / TAMRA	P		CAATAGGTTTGGGGGCTTTGCTAGAAAAGG		
GFkV	23	Fleck 239 F	----	F	RdRP	CAACATCGAATGCCAATTTGG	89	Osman et al. (2008)
	24	Fleck 328 R	----	R		GCCAGGCTGTAGTCGGTGTTGT		
	36	Fleck 261 P1	6-FAM / TAMRA	P		CCTCTCACGTGCATGCGCATC		
	37	Fleck 261 P2	6-FAM / TAMRA	P		CCTCTCACGTGCATGCGGATC		
	38	Fleck 261 P3	6-FAM / TAMRA	P		CCTCTGACGTGCATGCGCATC		
GFLV	30	GFLV 769 F	----	F	CP	GGGACCACTATGGATGGAATGA	99	Osman e Rowhani (2006)
	31	GFLV 868 R	----	R		TTCGGTGATATGGAGAGCGAAT		
	41	GFLV 799 P	6-FAM / TAMRA	P		AAGTATCCCGGGGTGTATGTGGAAGAGGA		
GVA	54	GVA-4528 F	----	F	Replicase	GATCACARGAYGAGAARGTG	106	oligonucleotídeos (Este estudo); sonda (Radaelli, 2009)
	55	GVA-4633 R	----	R		CCCATCATCAGYTTRAGCTC		
	49	GVA-Triplex	NED / NFQ-MGB	P		TGGCCBGAGGATWT		

Obs.: F = oligonucleotídeo "forward" (viral); R = oligonucleotídeo "reverse" (complementar); P = "probe" (sonda com fluoróforo); Y = C, T; R = A, G; B = G, T, C; W = A, T. CP (proteína capsidial), HSP70 (proteína de choque térmico 70), RdRp (polimerase de RNA dependente de RNA)

Uma mistura de oligonucleotídeos e sonda para a RT-PCR em tempo real foi assim preparada, para cada vírus: 20 μL de cada oligonucleotídeo "viral" a 100 pmol/ μL (100 μmolar), 20 μL de cada oligonucleotídeo "complementar" a 100 pmol/ μL e 4 μL de cada sonda a 100 pmol/ μL , ajustando-se para um volume final de 240 μL com água e armazenando-se a -20°C até a utilização (Osman et al., 2007; Osman e Rowhani, 2008; Osman et al., 2008).

Reações de RT-PCR em tempo real foram conduzidas em placas de 96 poços usando um kit de reagentes da Applied Biosystems (TaqMan Master Mix ONE-STEP RT-PCR), conforme descrito a seguir: 6,1 μL do "One-step RT-PCR Master Mix" (Tubo "2X Master Mix without UNG", contendo: AmpliTaq Gold mix otimizado para o ensaio exonucleásico de sondas TaqMan com AmpliTaq Gold DNA polimerase, dNTPs com dUTP, uma referência passiva ROX™ e tampão otimizado); 0,6 μL da mistura de oligonucleotídeos e sonda(s) (415 nM de oligonucleotídeos e 85 nM de sonda); 0,3 μL de MuLV e inibidor de RNA (Tubo "40X MultiScribe e RNase Inhibitor Mix", contendo: enzima MultiScribe para reações de transcrição reversa e inibidor de RNase) e 3 μL de RNA total para um volume final de 12 μL (Quadro 7) (Osman et al., 2007; Osman e Rowhani, 2008; Osman et al., 2008).

Quadro 7 - Composição das reações de RT-PCR em tempo real considerando-se os reagentes utilizados na reações formadas com o kit TaqMan Master Mix One-Step RT-PCR (Applied Biosystems) (Concentração na reação: 415 nM oligonucleotídeos, 85 nM sondas)

MIX (1X)	Simplex (1 RNA total)	Duplex (1 RNA total = amostra desconhecida)	Duplex (2 RNAs totais com infecções conhecidas)	Triplex (amostras de cDNAs clonados)
Amostra 1	3	3	3	3 (a 0,01 ng/ μL)
Amostra 2	-	-	3	3 (a 0,01 ng/ μL)
Amostra 3	-	-	-	3 (a 0,01 ng/ μL)
Mix 1 (oligonucleotídeos + sondas para vírus 1)	0,6	0,6	0,8	1,8
Mix 2 (oligonucleotídeos + sondas para vírus 2)	-	0,6	0,8	1,8
Mix 3 (oligonucleotídeos + sondas para vírus 3)	-	-	-	1,8
One Step RT-PCR Master Mix (Tubo 2x: DNA polimerase)	6,1	6,1	8,1	18,3
MuLV e inibidor RNA (Tubo 40x)	0,3	0,3	0,4	-
Água	2	1,4	-	3,3
Volume Final (μL)	12	12	16,1	36,0

Para as reações de RT-PCR em tempo real Duplex (item 3.4), os volumes dos reagentes utilizados foram ajustados conforme o Quadro 7, assim como para a PCR em tempo real Triplex (item 3.5), neste último caso, empregando-se como moldes cDNA clonados de vírus de videira, previamente caracterizados (Quadro 8).

As reações de RT-PCR em tempo real foram conduzidas em termociclador com sistema apropriado para emissão e excitação da fluorescência (equipamento/modelo: StepOnePlus™ Real-Time PCR System da Applied Biosystems), conforme segue: 45 °C por 35 min (para transcrição reversa), 95 °C por 10 min (para ativação da AmpliTaq Gold), seguidos de 40 ciclos a 95 °C por 15 s (desnaturação) e 60 °C por 1 min (pareamento e extensão) (Osman et al., 2007; Osman e Rowhani, 2008; Osman et al., 2008). Os dados da reação foram analisados quantitativamente e graficamente, utilizando-se o software StepOne Software v2.2 (Applied Biosystems), pela determinação do C_T ("threshold cycles"). O C_T ("threshold cycles") é o ciclo no qual um significativo aumento na fluorescência ocorre; daí, um valor de C_T abaixo de 35 representa um resultado positivo (Osman et al., 2007; Osman e Rowhani, 2008; Osman et al., 2008). Quanto maior a concentração viral na amostra, menor o valor do C_T.

Quadro 8 - Relação de clones de cDNA de vírus de videira que foram empregados nos ensaios de PCR em tempo real triplex (TaqMan)

Nº	Vírus	Clone viral utilizado	Tamanho (pb)	Fluoróforo na sonda	Referência
1	GVA	CP parcial	430	VIC	Fajardo et al. (2003b)
2	GRSPaV	CP completa	780	VIC	Radaelli et al. (2009)
3	GVB	CP completa	594	FAM	Nickel et al. (2002)
4	GFLV	CP parcial	1067	FAM	Radaelli et al. (2009)
5	GLRaV-5	HSP70 parcial	162	FAM	Este trabalho
6	GVD	CP parcial	78	FAM	Este trabalho
7	GVA	CP parcial	106	NED	Este trabalho

Para verificar a eficiência e a reprodutibilidade dos oligonucleotídeos e das sondas, utilizados neste trabalho, e definidos a partir de estudos anteriores de Osman e Rowhani (2006); Osman et al. (2007); Osman e Rowhani (2008) e Osman et al. (2008) (Quadro 6), amostras, cuja condição fitossanitária era desconhecida, e amostras, com infecção viral identificada (controles positivos) (Quadro 5), foram testadas em reações individuais (simplex) de RT-PCR em tempo real para todos os dez vírus avaliados.

Considerando-se a existência de variabilidade entre isolados virais, procurou-se verificar também a eficiência dos diferentes oligonucleotídeos e sondas, usados no presente trabalho, para a detecção de diferentes isolados locais. Assim, onze isolados de GRSPaV, nove deles previamente caracterizados por Radaelli et al. (2009) e dois por Basso et al. (2010a), além de três isolados de GFLV caracterizados por Radaelli et al. (2009) (Quadro 9), foram testados em relação a capacidade de serem detectados por RT-PCR em tempo real.

Com o intuito de verificar a eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos e sondas testados, porém a partir de isolados virais mantidos *in vivo* em hospedeiras (videira), 10 amostras (Quadro 10), exibindo sintomas aparentes da virose do enrolamento das folhas, foram testadas para a detecção do GLRaV-3.

3.4. Detecção simultânea por RT-PCR em tempo real - TaqMan duplex

Para a detecção simultânea de dois vírus em uma mesma reação (duplex), amostras foram testadas, por RT-PCR em tempo real em duas situações. No primeiro ensaio realizado foram utilizadas duas cultivares (controles), ambas com infecção viral previamente conhecida, para a detecção simultânea de dois vírus em uma mesma reação (Quadro 5). No segundo ensaio, 13 videiras foram testadas para a detecção simultânea de dois vírus em uma mesma reação.

Quadro 9 - Relação de clones de cDNA, previamente caracterizados molecularmente, de GRSPaV e GFLV, utilizados no ensaio de eficiência de amplificação com os oligonucleotídeos e sondas para PCR em tempo real

Nº	Vírus	Gene sequenciado	Tamanho fragmento (pb)	Código depósito GenBank	Isolado	Clone seq.	Referência
1	GRSPaV	proteína capsial completa	780 pb (905 pb clonado)	EF636803	CF195	2C	Radaelli et al. (2009)
2	GRSPaV	proteína capsial completa	780 pb	EF636804	CF207	3B	Radaelli et al. (2009)
3	GRSPaV	proteína capsial completa	780 pb	EF690380	MG	1 ^a	Radaelli et al. (2009)
4	GRSPaV	proteína capsial completa	780 pb	EF690381	PN	2B	Radaelli et al. (2009)
5	GRSPaV	proteína capsial completa	780 pb	EF690382	MH	3 ^a	Radaelli et al. (2009)
6	GRSPaV	proteína capsial completa	780 pb	EF690383	CF208	4C	Radaelli et al. (2009)
7	GRSPaV	proteína capsial completa	780 pb	EF690384	CF210	5 ^a	Radaelli et al. (2009)
8	GRSPaV	proteína capsial completa	780 pb	EU040204	420 ^a	3 ^a	Radaelli et al. (2009)

Quadro 9, Cont.

9	GRSPaV	proteína capsidial completa	780 pb	EU204913	CF195-2	1	Radaelli et al. (2009)
10	GRSPaV	proteína capsidial completa	780 pb	GU166289	CS1	2	Basso et al. (2010a)
11	GRSPaV	proteína capsidial completa	780 pb	GU166290	IS2a	8	Basso et al. (2010a)
12	GFLV	proteína capsidial incompleta	1067 pb	EU038294	RS	1C	Radaelli et al. (2009)
13	GFLV	proteína capsidial incompleta	1067 pb	EU258680	RUP	4D	Radaelli et al. (2009)
14	GFLV	proteína capsidial incompleta	1067 pb	EU258681	IAC	3D	Radaelli et al. (2009)

Em ambas as situações, a detecção dupla envolveu a combinação de reagentes para os vírus GVA, GRSPaV, GLRaV-2 e GLRaV-3 (sondas marcadas com o fluoróforo VIC e “quencher” TAMRA) com os vírus GVB, GFLV, GFkV, GVD e GLRaV-5 (fluoróforo FAM e “quencher” TAMRA).

Acessos de videira, previamente recuperados após tratamentos de termoterapia e cultura de tecidos e mantidos em canteiros sob telado na Embrapa Uva e Vinho, foram indexados por meio de RT-PCR em tempo real, em reações duplex, envolvendo as combinações de vírus acima. As cultivares indexadas incluem as espécies *Vitis vinifera* e *Vitis labrusca* ou híbridos, para a formação de copa ou portaenxerto e para as finalidades de produção de uva para consumo *in natura* ou processamento, e representam as principais cultivares plantadas no Brasil.

Quadro 10 - Relação de cultivares de videira, exibindo sintoma da virose do enrolamento da folha, avaliadas por RT-PCR em tempo real (TaqMan) para GLRaV-3

Nº	Cultivar (clone)	Localização
1	Merlot (R8)	Embrapa Quarentena - T1E1F50P51
2	Malvasia di Candia Aromática	Embrapa Quarentena - T1E1F47P281
3	Garganega (R4)	Embrapa Quarentena - T1E1F47P89
4	Prosecco (ESAV10)	Embrapa Quarentena - T1E1F45P364
5	Chardonnay (R8)	Embrapa Quarentena - T1E1F29P600
6	Micheli Palieri	Embrapa Quarentena - T1E3F31P31A
7	Itália (VCR10)	Embrapa Quarentena - T1E3F2P539
8	Cabernet Franc (ENTAV337)	Embrapa Quarentena - T1E2F1P374
9	Regina (ISV6)	Embrapa Quarentena - T1E2F22P566
10	Alicante Bouchet (Cl.804)	Embrapa Quarentena - T1E2F27P569

3.5. Detecção simultânea por RT-PCR em tempo real - TaqMan triplex

Visando avançar na detecção simultânea de vírus de videira por meio de RT-PCR em tempo real, foram realizadas reações triplex envolvendo combinações dos vírus GRSPaV, GLRaV-5, GVA, GVB, GVD e GFLV, a partir de clones de cDNA, previamente obtidos e caracterizados molecularmente, conforme indicado no Quadro 8. Foram utilizadas sondas marcadas com os fluoróforos 6-FAM, VIC ou NED, esta última do tipo MGB (Quadro 6), pois estas opções atendiam a configuração do equipamento utilizado neste trabalho.

3.6. Avaliação agrônômica de videiras infectadas por vírus

Foram avaliadas 10 plantas de videira (*Vitis vinifera*), com evidentes sintomas de infecção viral (enrolamento e avermelhamento de folhas), comparativamente a 10 plantas sem nenhum sintoma perceptível, das cvs. Cabernet Franc (CF) e C. Sauvignon (CS) em dois vinhedos comerciais no município de Bento Gonçalves (RS). As avaliações foram realizadas na safra 2011 e as plantas identificadas em Fevereiro/2011. As 14 variáveis agrônômicas, registradas por planta, foram as seguintes: N° de gemas brotadas/ planta; N° de ramos com cachos/ planta; N° de ramos sem cachos/ planta; N° de gemas não brotadas/ planta; N° total de gemas/ planta; N° de cachos/ planta; Peso fresco do cacho (g); Peso total de bagas no cacho (g); Peso do engaço (g); N° de bagas/ cacho; Peso médio de baga (g); Sólidos solúveis totais (°Brix); Acidez total titulável (meq.L⁻¹) e pH. Para as determinações baseadas na uva, foram colhidos três cachos por planta. Na análise estatística foi realizada a comparação de médias pelo teste t bilateral.

Todas as plantas marcadas, de ambas as cultivares, foram avaliadas visando-se identificar as espécies virais envolvidas na expressão dos sintomas observados. A indexação foi realizada por meio de RT-PCR em tempo real ("TaqMan") para a detecção de seis espécies virais que infectam a videira: *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV-2 e -3), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine fleck virus* (GFkV) e *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV). Os oligonucleotídeos e as sondas (Quadro 6) e as reações de RT-PCR em tempo real foram descritas anteriormente (item 3.3) e baseadas nos trabalhos de Osman et al. (2007) e Osman et al. (2008). RNAs totais de videira sadia e infectada com cada um dos seis vírus testados foram utilizados

como controles negativo e positivo, respectivamente, em ensaios do tipo presença/ausência utilizando-se o kit "TaqMan Master Mix One-Step RT-PCR" e o equipamento "StepOnePlus™ Real-Time PCR System" (Applied Biosystems).

3.7. Análise de sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos de cinco espécies virais que infectam a videira

3.7.1. Síntese de cDNA e PCR "convencional"

A síntese do cDNA e as reações da PCR foram conduzidas conforme metodologia descrita por Sambrook e Russel (2001) e Fajardo et al. (2000), com algumas modificações. As reações de síntese do cDNA consistiram, para todas as amostras de: 4 µL de RNA total, 1 µL de oligonucleotídeo antisense (10 µM) para GLRaV-1 (oligonucleotídeos complementares para a amplificação de dois fragmentos), GLRaV-5 e GVA (oligonucleotídeo complementar para a amplificação do fragmento de 106 pb) (Quadro 6) e para GFkV e GVD (Quadro 11) e 5 µL de água autoclavada, incubando-se a 94°C por 5 min. Posteriormente, foram adicionados 5 µL de tampão da enzima RT 5X, 1 µL de dNTP (2,5 mM), 1 µL de enzima transcriptase reversa (RT) M-MLV (200 U/µL, Promega), 1 µL de inibidor de RNase (40 U/µL, Promega) e 7 µL de água autoclavada. Na sequência, a reação foi incubada a 37°C por uma hora.

Quadro 11 - Relação dos oligonucleotídeos (complementar, R e viral, F) empregados na amplificação do *Grapevine fleck virus* e do *Grapevine virus D* por RT-PCR convencional

Vírus	Oligonucleotídeo	Orientação	Sequência do oligonucleotídeo (5'-3')	Tamanho do produto (pb) e gene alvo
GFkV	Fk-6349v	F	CCCTCTCCGCCTCGTCTG	719 (gene da proteína capsial + nts adjacentes)
	Fk-7067c	R	GCCTCGGTTCATGACGAG	
GVD	GVD(v)	F	GACGCAGGGATGTACCTTAGGACG	852 (gene da proteína capsial + RNA binding protein)
	GVD(c)	R	CCTCTACTTATGGAAATTGCGCTC	

As reações de PCR consistiram de: 10 µL de cDNA, 5 µL de tampão da enzima *Taq* DNA polimerase 10X, 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 5 µL de dNTP (2,5 mM), 1 µL de cada oligonucleotídeo senso e antisense (10 µM) (Quadro 6, para GLRaV-1, -5 e GVA e Quadro 11 para GFkV e GVD), 0,5 µL de *Taq* DNA polimerase (5 U/µL, Invitrogen) e 26 µL de água autoclavada. Adicionalmente, um fragmento de

78 pb (Quadro 6) também foi amplificado a partir do isolado Dolc de GVD da cv. Dolcetto.

Para os fragmentos maiores (719-852 pb), as reações foram submetidas a uma desnaturação inicial (94°C por 5 min), seguida por 35 ciclos de amplificação, compostos por: desnaturação (94°C por 50 s), pareamento (50°C por 50 s) e extensão (72°C por 1 min), além de uma extensão final (72°C por 7 min). Para os fragmentos menores (60-162 pb), todos os três passos do ciclo de amplificação foram executados por 50 s.

Os produtos da RT-PCR, de cerca de, 719-852 e 60-162 pb de tamanho, foram analisados em géis de agarose a 1,2% e 3% (p/v), respectivamente, preparado em tampão TBE pH 8,0, corados com brometo de etídeo e visualizados em transluminador sob luz UV. As bandas observadas, com os fragmentos de tamanhos esperados, foram recortadas do gel e eluídas com a utilização do kit comercial “PureLink Quick Gel Extraction Kit” (Invitrogen), de acordo com as especificações do fabricante.

3.7.2. Clonagem e seleção de clones recombinantes

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

O DNA plasmidial das colônias bacterianas transformadas foi extraído utilizando-se o kit comercial “Illustra Plasmid Prep Mini Spin Kit” (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante. A confirmação da presença dos fragmentos virais amplificados nos plasmídeos recombinantes foi realizada por digestão com a enzima de restrição *EcoRI*. O sequenciamento automático de nucleotídeos foi realizado em dois clones obtidos para cada fragmento amplificado ou isolado viral.

3.7.3. Análise das sequências

As sequências de nucleotídeos (nt) e de aminoácidos deduzidos (aad) foram alinhadas com o auxílio do software Clustal X 1.8 (Larkin et al., 2007). As

comparações entre as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos obtidas e outros isolados virais disponíveis no GenBank foram realizadas utilizando-se os programas BLASTn ou BLASTp do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Foram incluídas nestas análises (comparações), sequências dos genes homólogos de isolados “estrangeiros” depositadas no banco de dados do NCBI (GenBank).

A massa molecular das três proteínas, cujas ORFs foram completamente sequenciadas, foi calculada utilizando-se o programa EXPASy Bioinformatics Resource Portal, disponível no site http://web.expasy.org/compute_pi/.

3.7.4. RT-PCR em tempo real

Além de caracterizar molecularmente os vírus GFkV, GVD e GLRaV-5, pois representam um vírus parcialmente caracterizado no Brasil (GFkV) e outros ainda não detectados, molecularmente, no Brasil (GVD e GLRaV-5), avaliou-se a eficiência da RT-PCR em tempo real para detectar diferentes isolados destas três espécies.

RNAs totais extraídos de videiras sadias e com sintomas evidentes de infecção viral (enrolamento, avermelhamento ou amarelamento das folhas e subdesenvolvimento da planta) foram utilizados em ensaios de detecção por RT-PCR em tempo real, do tipo presença/ausência, empregando-se o kit “TaqMan Master Mix One-Step RT-PCR” (Applied Biosystems). Os oligonucleotídeos e as sondas, assim como as condições das reações, estão descritos nos Quadros 6 e 7 e no item 3.3. Foram avaliados 37 acessos de videira, para a presença de GVD e GLRaV-5, mantidos em casa de vegetação, e provenientes de campo experimental ou de amostragem de mudas importadas (há alguns anos). Para GFkV, foram avaliados 30 acessos da cv. Itália, provenientes de campo experimental.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração, qualidade e integridade do RNA total

A integridade do RNA total extraído das videiras indexadas foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,2% (p/v) corado com Gel Red™, um corante fluorescente ultrasensível e de baixa toxicidade (Figura 7). Conforme é possível observar nesta figura, as extrações realizadas resultaram em RNA total com qualidade, em relação à pureza, a integridade e a concentração.

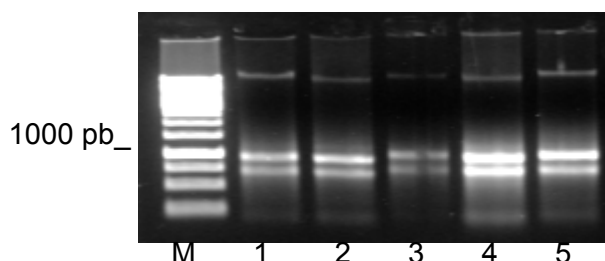


Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose a 1,2% (p/v), para comprovação da integridade do RNA total extraído de cinco videiras que foram indexadas. (M) Marcador 1 Kb (Fermentas); (1) cv. Paulsen 1103 (P1103) (submetido a termoterapia de 88+93+63 dias e cultura de tecidos); (2) cv. Itália [Pirovano 65]; (3) cv. Cabernet Franc; (4) cv. LN33/Isabel; (5) cv. Petit Syrah.

Para verificar a pureza das extrações de RNAs obtidas foram realizadas leituras de absorvância em espectrofotômetro (GeneQuant Pro - Amersham Biosciences). As razões entre as absorvâncias 260/280 nm e 260/230 nm estimam as contaminações por proteína e por compostos fenólicos, respectivamente. Os valores de referência para as razões 260/280 e 260/230 nm são 1,8 a 2,0 e maior que 2,0, respectivamente. As extrações obtidas apresentaram valores dentro destas faixas de referência. Em relação a quantificação das extrações de RNA total, pelos três métodos empregados, as médias mínimas e máximas (de cinco extrações) obtidas foram 125,6 e 651,7 ng de RNA/ μ L; 17,3 e 78,4 ng de RNA/ μ L; 28,9 e 99,9 ng de RNA/ μ L, para os métodos de extração com tampão de extração CTAB e precipitação em LiCl; kit comercial “RNeasy Plant Mini kit” (Qiagen) modificado e adsorção em sílica, respectivamente.

Gambino et al. (2008) quantificaram, por espectrofotometria, os RNAs obtidos por seis métodos de extração testados e verificaram os seguintes

rendimentos: 12,25; 3,56 e 5,37 (em $\mu\text{g}/100\text{ mg}$), para os métodos de extração com CTAB e precipitação em LiCl, kit comercial “RNeasy Plant Mini kit” (Qiagen) modificado e adsorção em sílica, respectivamente. Os resultados obtidos, a partir das extrações realizadas neste trabalho, foram semelhantes àqueles obtidos por Gambino et al. (2008), com médias, mínimas e máximas, convertidas para $\mu\text{g}/100\text{ mg}$, de 6,28 e 32,58; 0,86 e 3,92; e 1,44 e 4,99, respectivamente, para os três métodos. Em recente trabalho, Abdullahi et al. (2011) também compararam o rendimento e a qualidade do RNA total extraído de diferentes plantas herbáceas, tais como *Chenopodium quinoa* e *Nicotiana bentamiana*, e também de videiras. Diferentes métodos de extração foram testados, entres eles, o método com CTAB e precipitação em LiCl. Os rendimentos médios foram de 4 e 0,4 μg por 100 mg de folhas jovens e senescentes, respectivamente, portanto rendimentos inferiores aos obtidos por Gambino et al. (2008) e no presente trabalho.

Para se obter um resultado preciso por RT-PCR em tempo real, a partir de tecidos de videira, alta qualidade do RNA é imprescindível. No entanto, extrações de RNA que apresentem qualidade são normalmente limitadas devido ao baixo pH e ao alto conteúdo de compostos polifenólicos e de polissacarídeos desta planta (Reid et al., 2006; Gambino et al., 2008; Iandolino et al., 2004). Embora vários protocolos já tenham sido desenvolvidos para a extração de RNA total de videiras (Newbury e Possingham, 1977; Tesniere e Vayda, 1991; Wang e Vodkin, 1994; Boss et al., 1996; Loulakis et al., 1996; Geuna et al., 1998; Thomas e Schiefelbein, 2002), a maioria resulta em baixo rendimento de RNA, apresenta longo tempo de execução, foi otimizada para um órgão ou tecido específico e, em alguns casos, os protocolos são tecnicamente complexos. Gambino et al. (2008) desenvolveram um protocolo de extração de RNA total baseado em CTAB, com precipitação em LiCl, e que foi adaptado de Chang (1993). Estes autores visavam reduzir tempo e custo de extração, sem reduzir a qualidade e o rendimento do RNA extraído de tecidos com altas concentrações de polissacarídeos, a exemplo da videira. O método desenvolvido por estes autores foi comparado a seis diferentes métodos de extração de RNA, a partir de tecidos maduros de videira, dentre eles, o método de extração com o kit comercial “RNeasy Plant Mini” (Qiagen), modificado por Mackenzie et al. (1997) e o método de adsorção em sílica (Rott e Jelkmann, 2001), ambos também utilizados neste trabalho. Verificou-se que com o método de Gambino et al. (2008) foi possível obter RNAs mais íntegros e de melhor qualidade

(pureza) comparativamente aos outros métodos de extração de RNA total testados. No presente trabalho, o melhor resultado entre os três métodos utilizados, em relação à qualidade e a integridade do RNA total, foi obtido a partir do método de extração baseado em CTAB, com precipitação em LiCl, descrito por Zeng e Yang (2002) e adaptado por Reid et al. (2006). Porém, na prática, os outros dois métodos usados, adsorção em sílica e kit comercial da Qiagen, também sempre promoveram a detecção viral de forma confiável e consistente.

4.2. Detecção viral em reação única por RT-PCR em tempo real – TaqMan simplex

Para verificar a eficiência e a reprodutibilidade da detecção com os oligonucleotídeos e as sondas usados neste trabalho (Quadro 6), provenientes de estudos anteriores de Osman e Rowhani (2006); Osman et al. (2007); Osman e Rowhani (2008) e Osman et al. (2008), amostras de videira, com status fitossanitário desconhecido, e controles positivos, constituídos de videiras com infecção viral conhecida (Quadro 5), foram testados em reações simplex de RT-PCR em tempo real. A detecção de nove dos dez vírus avaliados (GRSPaV, GVA, GVB, GVD, GLRaV-2, -3 e -5, GFLV e GFkV) apresentou resultados precisos e bastante consistentes, com valores de C_T tecnicamente adequados (Quadro 12) e curvas de amplificação com formato esperado (Figura 8). O Quadro 12 apresenta o detalhamento (ex. localização e descrição da amostra, vírus testado, valor de C_T e resultado) de dez amostras avaliadas para cada vírus, além do próprio controle positivo do teste. A maioria dos valores de C_T se situou na faixa de 15 a 25, e no máximo de 35, compatíveis com plantas infectadas (Quadro 12). Não foram necessários ajustes nas reações de RT-PCR em tempo real em relação à concentração dos oligonucleotídeos e das sondas, bem como as sequências de nucleotídeos destes reagentes, se mostraram adequadas para a detecção de isolados locais dos nove vírus mencionados. A única exceção foi a impossibilidade de se detectar isolados locais do GLRaV-1, pois todas as tentativas falharam, resultando em curvas com traçado inapropriado (Figura 8J). Visando esclarecer este fato, foi conduzido um trabalho de sequenciamento de nucleotídeos dos fragmentos de DNA clonados a partir deste vírus.

A amplificação destes nove vírus ocorreu por existir complementaridade entre os nucleotídeos e as sondas utilizadas (Quadro 6) e a sequência de

nucleotídeos na região de pareamento dos oligos e sondas, nos isolados locais testados neste trabalho. Este fato é relevante, principalmente, em virtude da expressiva variabilidade já relatada em vários trabalhos para os vírus GRSPaV (Meng et al., 2000; Casati et al., 2003; Meng et al., 2006; Habili et al., 2006; Nakaune et al., 2008; Terlizzi et al., 2010; Terlizzi et al., 2011; Morelli et al., 2011), GVA (Moreira et al., 2004; Du-Preez et al., 2011), GVB (Shi et al., 2004; Goszczynski et al., 2010), GVD (Rosa, 2007), GLRaV-1 (Little et al., 2001; Fajardo et al., 2005; Fajardo et al., 2011; Kominek et al., 2005; Karthikeyan et al., 2011; Alabi, et al., 2011), GLRaV-2 (Angelini et al., 2004; Meng et al., 2005b; Bertazzon et al., 2010; Alkowni et al., 2011), GLRaV-3 (Turturo et al., 2005; Fajardo et al., 2007; Engel et al., 2008; Maree et al., 2008; Chooi et al., 2009; Fuchs et al., 2009; Gouveia et al., 2009; Jooste et al. 2010; Wang et al., 2011), GLRaV-5 (Talquenca et al., 2009; Engel et al., 2010; Pei et al., 2010; Padilla et al., 2010; Thompson et al., 2012), GFLV (Pompe-Novak et al., 2007; Oliver et al., 2010) e GFkV (Ghanem-Sabanadzovic et al., 2003).

As principais espécies virais envolvidas na etiologia do enrolamento da folha da videira (*Vitis* spp.) são GLRaV-1, -2 e -3. Fajardo et al. (2005) conduziram um estudo para avaliar a variabilidade desses dois *Ampelovirus* (GLRaV-1 e -3) e observaram, para cada vírus, dois padrões distintos de perfis eletroforéticos, demonstrando a ocorrência de sequências variantes destes vírus nas videiras analisadas.

Em relação aos resultados obtidos para o GLRaV-1, foram testados dois pares diferentes de oligonucleotídeos, com as respectivas sondas, um deles tendo como alvo o gene da HSP70 (Osman et al., 2007) e, o outro par, o gene da polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp) (Pacífico et al., 2011). Porém, mesmo após várias tentativas e ajuste das reações, os resultados foram inconsistentes, com as curvas de amplificação adquirindo um traçado em "zig-zag" (Figura 8J). Uma provável explicação poderia ser devido a uma menor identidade entre as sequências dos oligos ou sondas utilizados e os isolados locais de GLRaV-1, uma vez que expressiva variabilidade entre isolados deste vírus já foram relatadas (Little et al., 2001; Fajardo et al., 2005; Kominek et al., 2005; Karthikeyan et al., 2011; Alabi et al., 2011).

Kominek et al. (2005) analisaram por sequenciamento de nucleotídeos, a diversidade genética de oito isolados de GLRaV-1 em videiras provenientes de três locais na República Checa e Eslováquia. Estes autores encontraram a formação de

dois grupos de isolados, com divergência genética de 13,9% entre eles, além de altas variabilidades intra e intergrupos. Resultado semelhante foi obtido por Alabi et al. (2011). Karthikeyan et al. (2011) também demonstraram haver alta variabilidade entre isolados de GLRaV-1, com média de 80% de identidade de nucleotídeos entre os isolados estudados de cultivares ornamentais de videira. Estes resultados sugerem que o GLRaV-1, assim como outros vírus de videira, apresentam uma população heterogênea, possivelmente resultante de uma menor pressão seletiva e da mistura de estirpes desse vírus. Isto seria reflexo das práticas empregadas na viticultura, baseadas na propagação vegetativa e na enxertia das plantas, as quais permanecem, no campo, por um longo período de tempo (ciclo produtivo longo) (Little et al., 2001). Estes resultados negativos para a detecção do GLRaV-1 serão abordados, em detalhes, no subitem 4.6.5.

Quadro 12 - Resultados das indexações por RT-PCR em tempo real simplex para a detecção de nove vírus que infectam a videira

Local da amostra (placa-poço)	Descrição da amostra	Vírus (Acrônimo)	C _T	Resultado da indexação
8-A2	LN33/Isabel	GLRaV-2	17,4	Controle +
2-A3	Mission/Concord	GLRaV-2	29,8	+
8-B2	Rupestris du Lot / Maria (IAC 514-6)	GLRaV-2	17,1	+
8-C6	Concord Cl. 30	GLRaV-2	28,1	+
42-B3	Malvasia Di Candia	GLRaV-2	33,7	+
44-F1	LN33 (Couderc 1613 x Thompson Seedless)	GLRaV-2	23,1	+
54-E7	Itália (Garibaldina, amostra 17, pós-brotção)	GLRaV-2	30,7	+
54-B8	Itália (Garibaldina, amostra 20, pós-brotção)	GLRaV-2	35,0	+
8-C2	Cabernet Franc	GLRaV-2	N/A	-
8-E2	Cabernet Sauvignon	GLRaV-2	N/A	-
8-G2	Chardonnay	GLRaV-2	N/A	-
2-D6	Petit Syrah	GLRaV-3	18,2	Controle +
2-A6	Franciscana (Cabernet Franc)	GLRaV-3	23,4	+
11-A2	Cabernet Franc	GLRaV-3	21,7	+
22-E4	Merlot	GLRaV-3	17,9	+
22-G4	Malvasia di Candia	GLRaV-3	21,8	+
22-A5	Garganega	GLRaV-3	21,4	+
22-E5	Chardonnay	GLRaV-3	27,1	+
22-G5	Micheli Palieri	GLRaV-3	23,8	+
22-F6	Regina	GLRaV-3	22,0	+
30-D8	Itália (vinhedo Farroupilha)	GLRaV-3	23,4	+

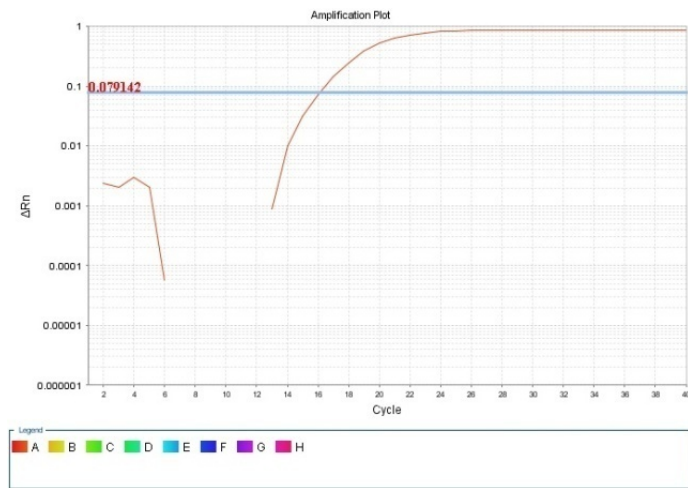
Quadro 12, Cont...

36-B9	Itália (Garibaldina, amostra 21)	GLRaV-3	24,2	+
6-E2	Itália (Pirovano 65)	GVA	23,1	Controle +
9-C6	Concord Cl. 30	GVA	28,1	+
26-B3	LN33 (Couderc 1613 x Thompson Seedless)	GVA	18,8	+
26-E3	BRS Cora (CNPUV 181-1) (62d)	GVA	25,0	+
30-C2	Itália (vinhedo Farroupilha)	GVA	17,3	+
35-B4	Itália (Garibaldina)	GVA	32,3	+
42-B1	Malvasia di Candia	GVA	25,8	+
42-E1	Cardinal	GVA	17,2	+
42-D5	Thompson Seedless (54+88d)	GVA	34,0	+
42-E5	Dolcetto	GVA	16,7	+
44-H1	Rupestris du Lot / Maria (IAC 514-6)	GVA	19,0	+
1-C2	LN33 (Couderc 1613 x Thompson Seedless)	GVB	20,9	Controle +
7-A2	Cabernet Franc	GVB	14,6	+
17-G2	Cabernet Franc (Vinícola Salton)	GVB	18,3	+
17-C5	Cabernet Sauvignon (CNPUV)	GVB	20,1	+
26-C3	Itália (Pirovano 65)	GVB	18,9	+
26-D3	BRS Cora (CNPUV 181-1) (62d)	GVB	19,7	+
30-C4	Itália (vinhedo Farroupilha)	GVB	21,8	+
54-D3	Itália (Garibaldina, amostra 16)	GVB	29,7	+
54-E3	Itália (Garibaldina, amostra 17)	GVB	32,2	+
7-A3	Concord Cl. 30	GVB	30,6	+
54-D3	Itália (Garibaldina, amostra 16, pós-brotação)	GVB	29,7	+
1-C5	Cabernet Franc	GRSPaV	25,0	Controle +
7-H1	LN33/Isabel	GRSPaV	21,2	+
7-A5	IAC 313 (Tropical)	GRSPaV	22,4	+
7-C5	IAC 766 (Campinas)	GRSPaV	24,6	+
7-E6	Isabel	GRSPaV	21,6	+
7-A7	Crimson Seedless	GRSPaV	23,7	+
16-G1	Cabernet Franc (Vinícola Salton)	GRSPaV	19,6	+
16-G4	Cabernet Sauvignon (CNPUV)	GRSPaV	21,7	+
26-D1	BRS Cora (CNPUV 181-1) (62d)	GRSPaV	22,2	+
35-E8	Itália (Garibaldina, amostra 16)	GRSPaV	25,3	+
47-A3	Riesling Itálico (Argenta)	GRSPaV	28,3	+
4-B4	Rupestris du Lot / Maria (IAC 514-6)	GFLV	21,3	Controle +
8-A2	LN33/Isabel	GFLV	15,7	+
35-E8	Itália (Garibaldina, amostra 16, dormente)	GFLV	22,2	+
35-F8	Itália (Garibaldina, amostra 17, dormente)	GFLV	25,8	+
35-G8	Itália (Garibaldina, amostra 18, dormente)	GFLV	23,2	+
35-A9	Itália (Garibaldina, amostra 20, dormente)	GFLV	25,1	+
35-B9	Itália (Garibaldina, amostra 21, dormente)	GFLV	22,3	+
48-B2	Itália (Pirovano 65)	GFLV	17,4	+
48-C2	Cabernet Franc	GFLV	28,9	+
35-F6	Itália (Garibaldina, amostra 1, dormente)	GFLV	22,9	+
4-A4	Rupestris du Lot	GFLV	21,4	+
3-C10	Benefuji	GfKV	19,9	Controle +
9-G1	Itália (Pirovano 65)	GfKV	24,1	+

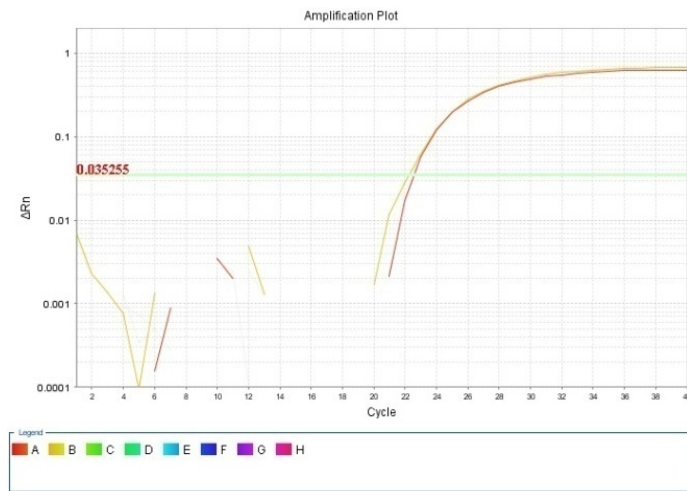
Quadro 12, Cont...

26-C1	Cabernet Franc	GFkV	20,9	+
36-E3	Itália (Garibaldina, amostra 16, dormente)	GFkV	22,0	+
36-F3	Itália (Garibaldina, amostra 17)	GFkV	32,3	+
36-G3	Itália (Garibaldina, amostra 18)	GFkV	20,9	+
36-B4	Itália (Garibaldina, amostra 21)	GFkV	32,6	+
46-H8	Itália (Garibaldina, amostra 16, pós-brotação)	GFkV	28,8	+
54-D1	LN33/Isabel	GFkV	25,3	+
9-A5	IAC 313 (Tropical)	GFkV	32,2	+
41-G7	Dolcetto	GVD	18,9	Controle +
41-C7	Cabernet Franc	GVD	29,8	+
41-H7	Nebiollo	GVD	32,7	+
41-A8	Dolcetto (CN)	GVD	22,1	+
41-B8	Tannat	GVD	33,6	+
41-C8	Cabernet Sauvignon Cl. 338	GVD	32,8	+
41-H8	Perlona	GVD	22,5	+
41-B9	Garganega	GVD	27,8	+
41-C10	Nero D' Avola	GVD	20,8	+
41-E11	Regina	GVD	20,5	+
41-B4	Cardinal	GLRaV-5	24,7	Controle +
54-A11	Itália (Garibaldina, amostra 1, pós-brotação)	GLRaV-5	26,9	+
54-B11	Itália (Garibaldina, amostra 16, pós-brotação)	GLRaV-5	26,7	+
54-C11	Itália (Garibaldina, amostra 17, pós-brotação)	GLRaV-5	25,6	+
54-D11	Itália (Garibaldina, amostra 18, pós-brotação)	GLRaV-5	25,4	+
54-E11	Itália (Garibaldina, amostra 20, pós-brotação)	GLRaV-5	24,8	+
54-G11	Itália (Garibaldina, amostra 22, pós-brotação)	GLRaV-5	25,4	+
41-G1	Dolcetto	GLRaV-5	N/A	-
41-H1	Nebiollo	GLRaV-5	N/A	-
41-B2	Tannat	GLRaV-5	N/A	-
41-D2	Refosco	GLRaV-5	N/A	-

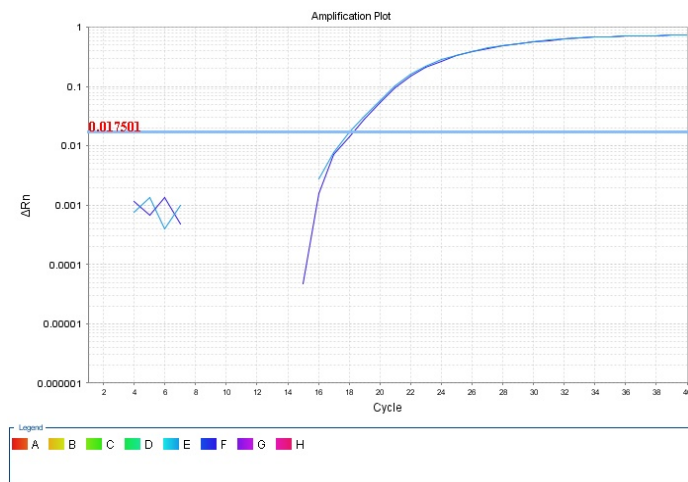
Visando verificar a eficiência dos diferentes oligonucleotídeos e sondas, testados no presente trabalho (Quadro 6) para a detecção de diferentes isolados locais, 10 amostras (Quadro 10), exibindo sintomas da virose do enrolamento da folha, foram testadas por RT-PCR em tempo real para a detecção do GLRaV-3. Foram identificadas nove plantas infectadas com este vírus, representadas pela Figura 9B, observando-se, ainda, na Figura 9A a reação positiva (curva) para a amostra controle, previamente identificada com infecção pelo GLRaV-3. Desta forma, demonstra-se que os oligonucleotídeos e a sonda para o GLRaV-3 reconhecem isolados locais deste vírus, obtidos a partir de extrações de RNA total de plantas infectadas.



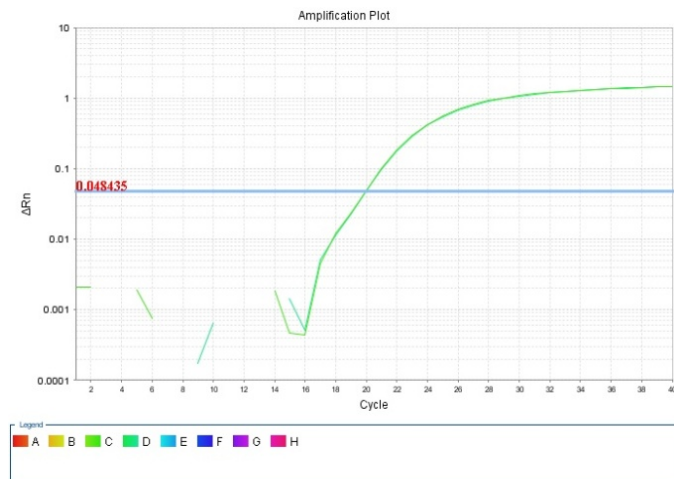
A



B



C

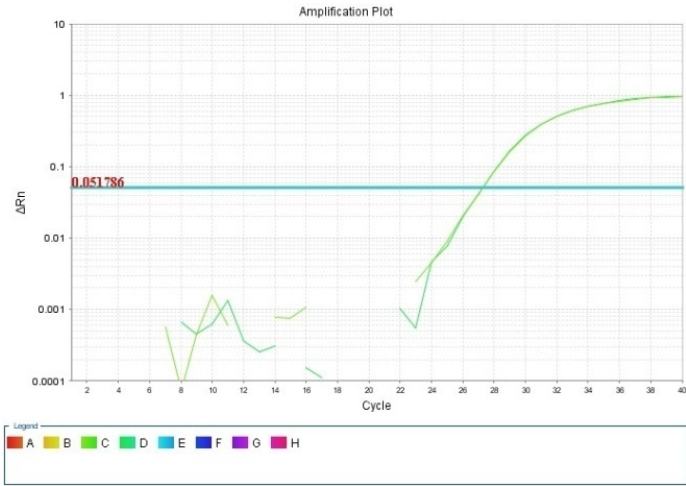


D

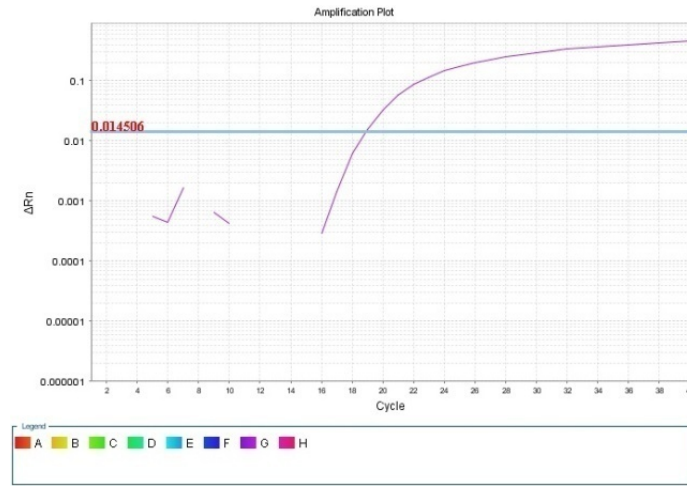
Figura 8 - Curvas (em 2 repetições) da detecção individual por RT-PCR em tempo real (simplex) de dez vírus que infectam videiras. Detalhamento do isolado e hospedeira consta no Quadro 5. A. GLRaV-2; B. GFLV; C. GLRaV-3; D. GFKV; E. GVA; F. GVD; G. GVB; H. GLRaV-5; I. GRSPaV; J. GLRaV-1. Intersecção da linha vertical com a curva define o valor de CT no eixo X.

Figura 8, Cont.

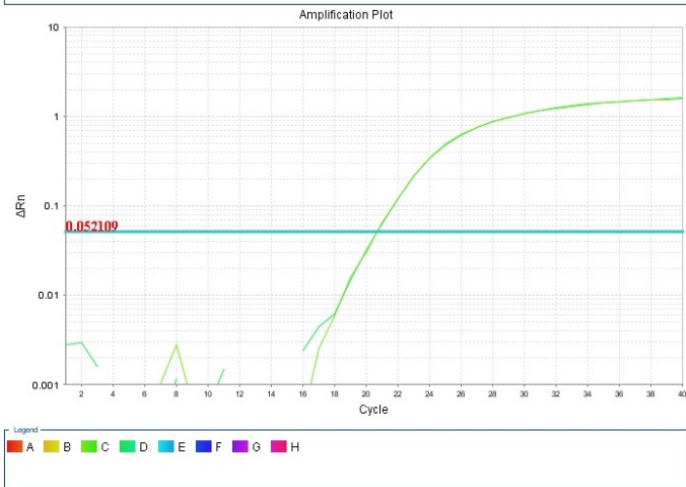
58



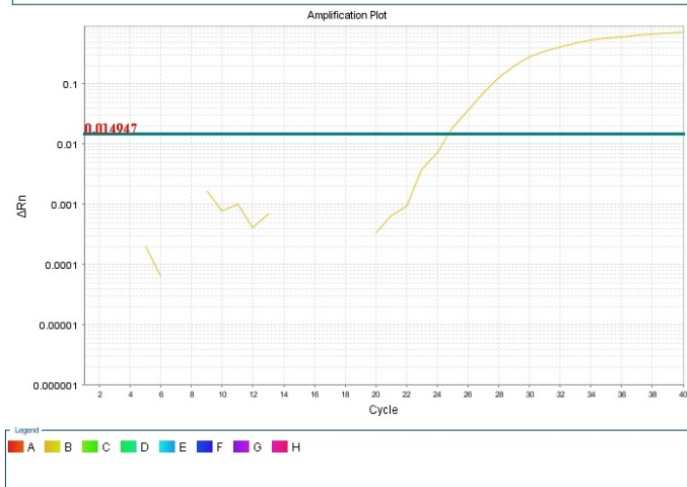
E



F

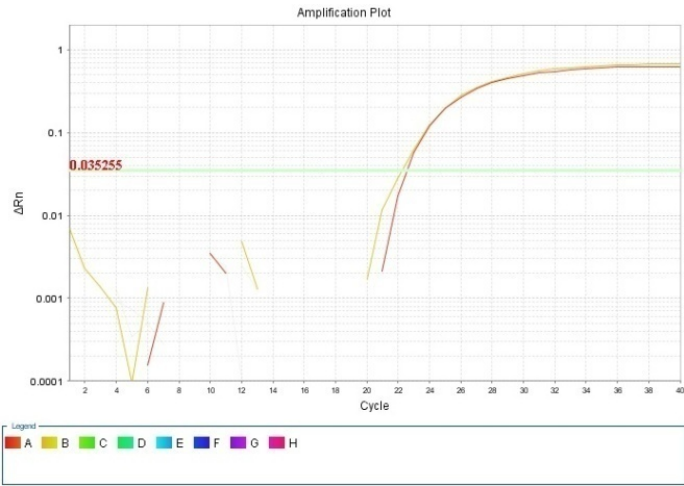


G



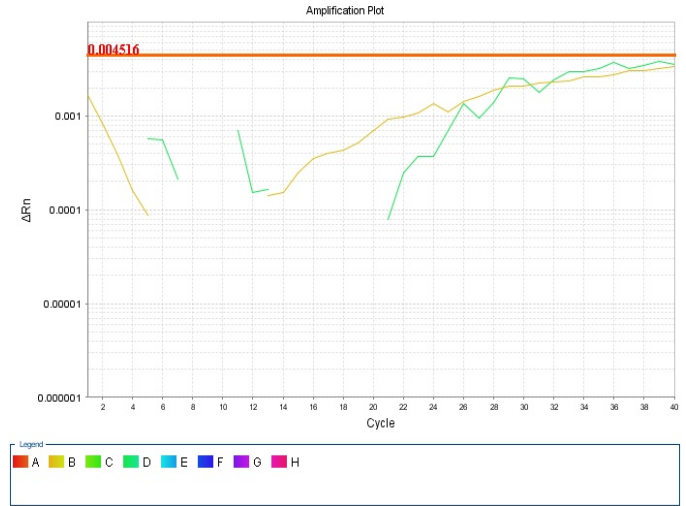
H

Figura 8, Cont.



59

I



J

Pesquisas em todo o mundo demonstraram a diversidade genética e a presença de variantes do GLRaV-3 (Turturo et al., 2005; Fajardo et al., 2007; Engel et al., 2008; Maree et al., 2008; Chooi et al., 2009; Fuchs et al., 2009; Gouveia et al., 2009; Jooste et al., 2010; Wang et al., 2011), com base nas análises dos genes das proteínas capsidial e de choque térmico 70 (HSP70). Estes trabalhos relataram a existência de diferentes grupos filogenéticos, variando de três a cinco, e diferenças entre as populações dos isolados estudados. A estrutura populacional e a variabilidade genética de 45 isolados de GLRaV-3, em diferentes cultivares de videira, provenientes de 14 países, foram determinadas por Turturo et al. (2005).

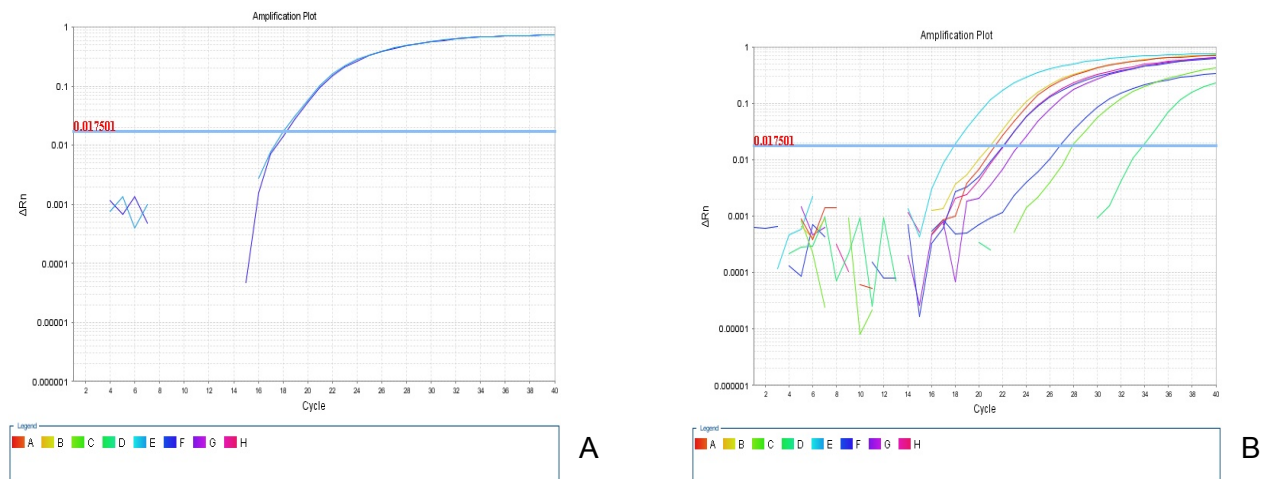


Figura 9 - Resultado gráfico da amplificação, por RT-PCR em tempo real, de 10 amostras de videiras (Quadro 10) infectadas com diferentes isolados de GLRaV-3. (A) curva de amplificação para o controle positivo de GLRaV-3 (Quadro 5). (B) Curvas de amplificação para as nove amostras infectadas.

Wang et al. (2011) determinaram a diversidade genética de 50 isolados de GLRaV-3, da cv. Merlot, provenientes do Napa Valey na Califórnia-EUA, subdividindo-os em quatro agrupamentos filogenéticos, segundo a divergência de nucleotídeos. Jooste et al. (2010) analisaram os genes HSP70 e da proteína capsidial de diferentes isolados Sul-Africanos de GLRaV-3 e verificaram a existência de três agrupamentos distintos. Recentemente, Gouveia et al. (2011) analisaram a sequência completa do gene da proteína capsidial do GLRaV-3 em isolados provenientes de 110 cultivares portuguesas de *Vitis vinifera*, e constataram maior variabilidade que alguns relatos anteriores. Sharma et al. (2011) verificaram também

uma alta variabilidade entre diferentes isolados de GLRaV-3 de 468 amostras analisadas, 65% foram positivas para GLRaV-3 e dessas, 22% estavam infectadas com diferentes isolados de GLRaV-3.

Considerando-se os diferentes relatos de expressiva variabilidade entre isolados de GLRaV-3, os resultados obtidos, no presente trabalho, atestam a eficiência dos oligonucleotídeos e sonda usados (Osman e Rowhani, 2006; Osman et al., 2007) na detecção de isolados, pois foram capazes de detectar diferentes isolados desta espécie viral, a partir da extração de RNA total, de forma eficiente e reprodutível (Figura 9).

Realizou-se também a verificação da eficiência de detecção de 11 isolados de GRSPaV e três isolados de GFLV por RT-PCR em tempo real (TaqMan), visando-se determinar a eficiência dos oligonucleotídeos e sondas na detecção de isolados, provenientes de clones de cDNA, previamente caracterizados por Radaelli et al. (2009) e Basso et al. (2010a) (Quadro 9). Os resultados desta análise são apresentados nas figuras 10 e 11, não tendo sido constatadas diferenças significativas na eficiência, formatos das curvas de detecção e valores de C_T (dados não apresentados), entre os isolados testados (Figura 11). Confirma-se, novamente, a eficiência dos oligonucleotídeos e sondas descritos por Osman e Rowhani (2008) e Osman e Rowhani (2006) em detectar isolados locais. A avaliação, utilizando cDNA clonado, permitiu melhor padronização dos ensaios, pois todas as amostras (cDNA) foram testadas a 0,01 ng/ μ L e representam isolados individualizados. No caso do ensaio com o GLRaV-3, a partir de RNA total extraído de diferentes hospedeiras, este tipo de padronização não foi possível.

Terlizzi et al. (2010), na análise da sequência de nucleotídeos de 17 isolados italianos, encontraram a existência de grande variabilidade de GRSPaV, independente da cultivar ou da origem geográfica, com identidades de nucleotídeos variando de 78,8 a 99,7%. Em outro recente estudo, Terlizzi et al. (2011) usando um conjunto de oligonucleotídeos degenerados, identificaram duas novas variantes de GRSPaV.

Radaelli et al. (2009) realizaram análises comparativas da sequência de nucleotídeos de três isolados de GFLV (RS, RUP, IAC) do Brasil e observaram a formação de dois grupos, com 90% de identidade entre eles, mas alta identidade (superior a 96%) foi detectada entre estes isolados estudados e outros estrangeiros.

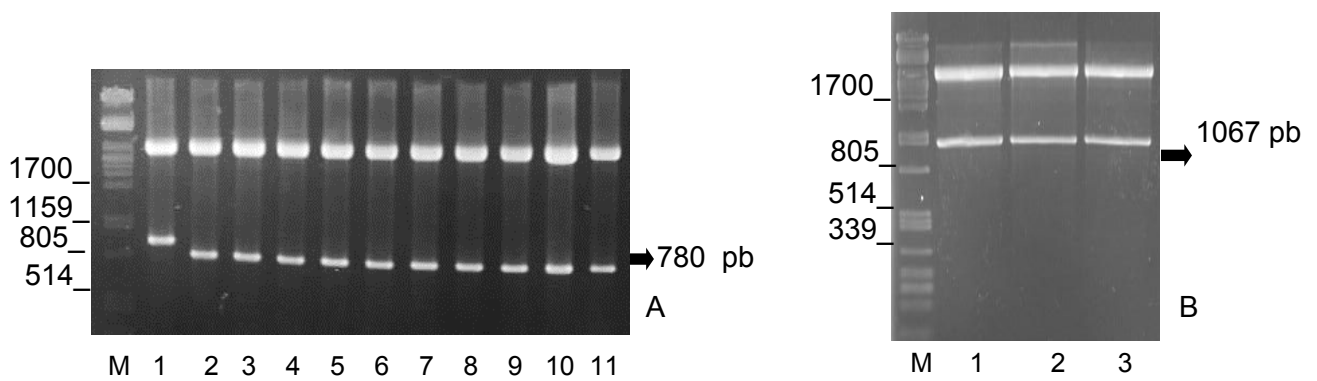


Figura 10 - Análise dos clones (isolados) testados. Eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v), após a digestão dos clones de cDNA (Quadro 9) com EcoRI; (A) clones de cDNA de 11 diferentes isolados testados do vírus GRSPaV; (B) clones de cDNA de três diferentes isolados do vírus GFLV; (M) marcador DNA do fago Lambda/PstI.

A técnica de detecção por RT-PCR em tempo real (TaqMan) apresenta maior sensibilidade, especificidade e robustez, sendo capaz de identificar uma série de isolados, geograficamente distintos. O processo da técnica, que começa a partir da extração de ácidos nucleicos até a obtenção dos resultados finais, pode ser executado em menos de 3 horas. Além disso, neste método, os resultados são avaliados quantitativamente com base nos valores C_T , portanto, elimina o uso de eletroforese e documentação em gel, economizando tempo e trabalho, especialmente quando grande número de amostras será avaliada (Osman e Rowhani, 2008).

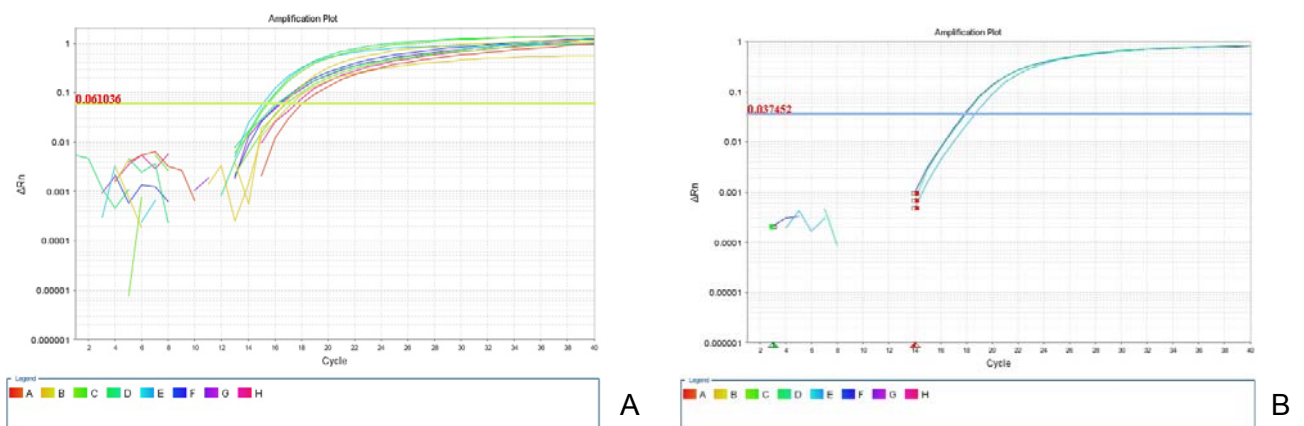


Figura 11 - Resultado gráfico da amplificação por RT-PCR em tempo real de 11 diferentes isolados testados do vírus GRSPaV (A) e de três diferentes isolados testados do vírus GFLV (B). Concentração padronizada em 0,01ng DNA/ μ L.

4.3. Detecção simultânea de dois vírus por RT-PCR em tempo real – TaqMan duplex

A detecção simultânea de dois vírus em uma mesma reação (duplex), por meio de RT-PCR em tempo real, foi testada com nove dos dez vírus deste trabalho. Foi possível detectar os vírus GVA, GRSPaV, GLRaV-2 e GLRaV-3 (sondas marcadas com o fluoróforo VIC e “quencher” TAMRA) combinados com GVB, GFLV, GFkV, GVD e GLRaV-5) (sonda com o fluoróforo FAM) de maneira muito sensível e reprodutível e com valores de C_T dentro de uma faixa tecnicamente recomendada (Quadro 13). A Figura 12 mostra o resultado gráfico destas reações, onde foram usadas duas hospedeiras, com infecções virais distintas e previamente conhecidas, para a detecção simultânea de dois vírus. Esta estratégia experimental foi adotada para se comprovar, com base em dois controles positivos conhecidos, a eficiência na detecção simultânea.

Quadro 13 - Resultado da indexação por PCR em tempo real duplex, utilizando-se duas cultivares controles por reação e considerando-se nove vírus testados

Local da amostra (placa-poço)	Descrição da amostra	Vírus	C_T	Resultado da indexação
6-E1	Itália (Pirovano 65)	GVA	27,7	+
	LN33 (Couderc 1613 x Thompson Seedless)	GVB	20,2	+
6-E2	Itália (Pirovano 65)	GVA	23,1	+
	Rupestris du Lot / Maria (IAC 514-6)	GFLV	21,4	+
15-F7	Itália (Pirovano 65)	GVA	35	+
	Benefuji	GFkV	14,5	+
6-E4	Cabernet Franc	GRSPaV	20,5	+
	LN33 (Couderc 1613 x Thompson Seedless)	GVB	22,5	+
6-E5	Cabernet Franc	GRSPaV	22,4	+
	Rupestris du Lot / Maria (IAC 514-6)	GFLV	22,1	+
15-E8	Cabernet Franc	GRSPaV	17,6	+
	Benefuji	GFkV	15,6	+
42-G6	Cabernet Franc	GRSPaV	23,6	+
	Dolcetto	GVD	21,1	+
-E7	LN33/Isabel	GLRaV-2	26,9	+
	LN33 (Couderc 1613 x Thompson Seedless)	GVB	22,7	+
6-E8	LN33/Isabel	GLRaV-2	26,9	+
	Rupestris du Lot / Maria (IAC 514-6)	GFLV	22	+
15-E9	LN33/Isabel	GLRaV-2	15,5	+
	Benefuji	GFkV	15,7	+
42-G7	LN33/Isabel	GLRaV-2	19,7	+
	Dolcetto	GVD	21,2	+

Quadro 13, Cont...

15-E1	Cabernet Franc	GLRaV-3	18,5	+
	LN33 (Couderc 1613 x Thompson Seedless)	GVB	13,1	+
15-F2	Cabernet Franc	GLRaV-3	24,4	+
	Rupestris du Lot / Maria (IAC 514-6)	GFLV	13,9	+
42-H8	Petit Syrah	GLRaV-3	27,2	+
	Dolcetto	GVD	21,7	+
42-E2	Cardinal	GLRaV-5	28,75	+
	Cabernet Franc	GRSPaV	31,21	+

Ainda, com o intuito de se verificar a eficiência da detecção simultânea de dois vírus, porém agora, a partir de uma mesma hospedeira com status fitossanitário desconhecido, foi realizada a detecção por RT-PCR em tempo real, para as combinações de vírus apresentados no Quadro 14. Os resultados gráficos dessa detecção dupla são ilustrados na Figura 13. Em ambos os casos, a detecção dupla a partir de dois controles positivos ou a partir de uma única amostra duplamente infectada, verificaram-se resultados precisos, sensíveis e reproduzíveis.

Também, em ambos os casos (Quadro 13 e 14) a maioria dos valores de C_T se situou na faixa de 15 a 25, e máximo de 35, correspondente ao esperado.

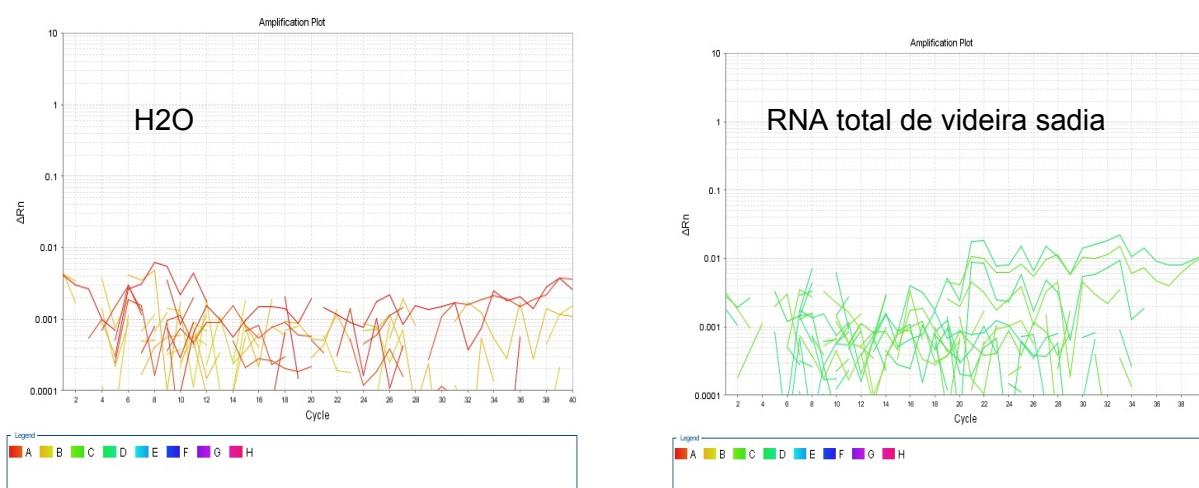


Figura 12 - Curvas de detecção simultânea de dois vírus (duplex), por RT-PCR em tempo real, e reações realizadas com duas amostras (controles) infectadas, considerando-se os fluoróforos VIC e FAM para a marcação das sondas. Água e RNA total de videira sadia são controles negativos de vários testes. Para alguns vírus são mostradas duas curvas por reação, consistindo nas duplicatas do teste.

Figura 12, Cont....

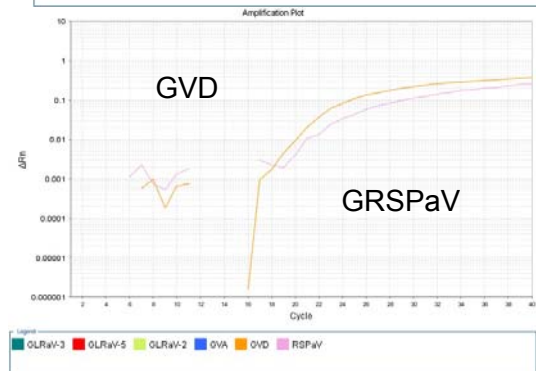
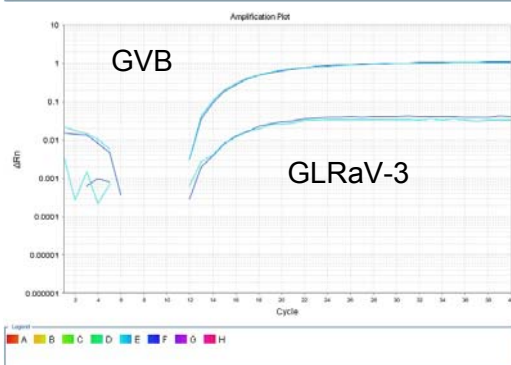
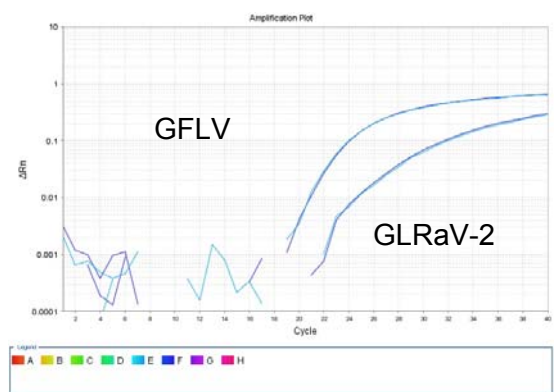
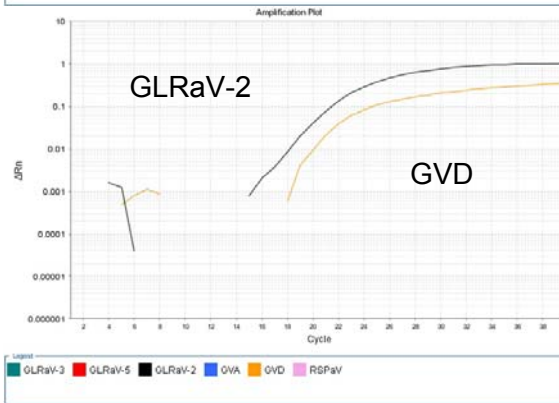
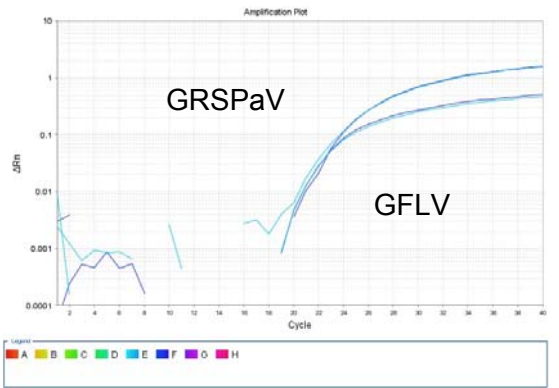
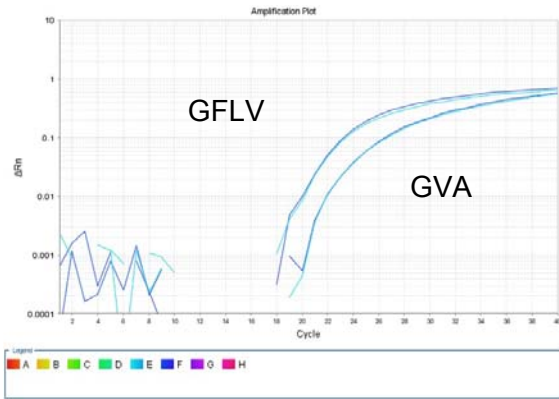
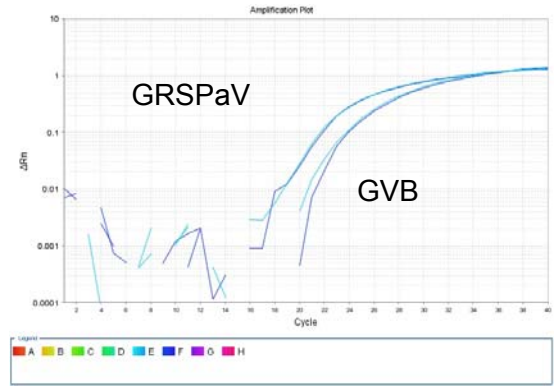
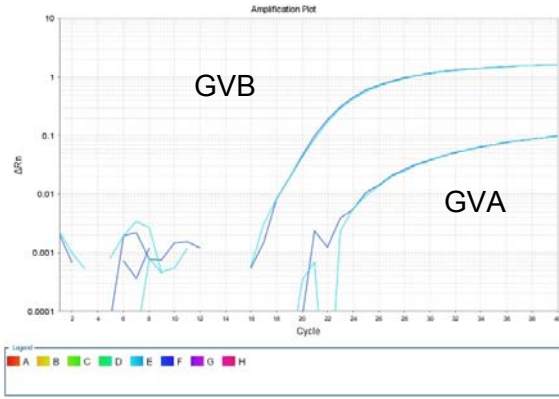
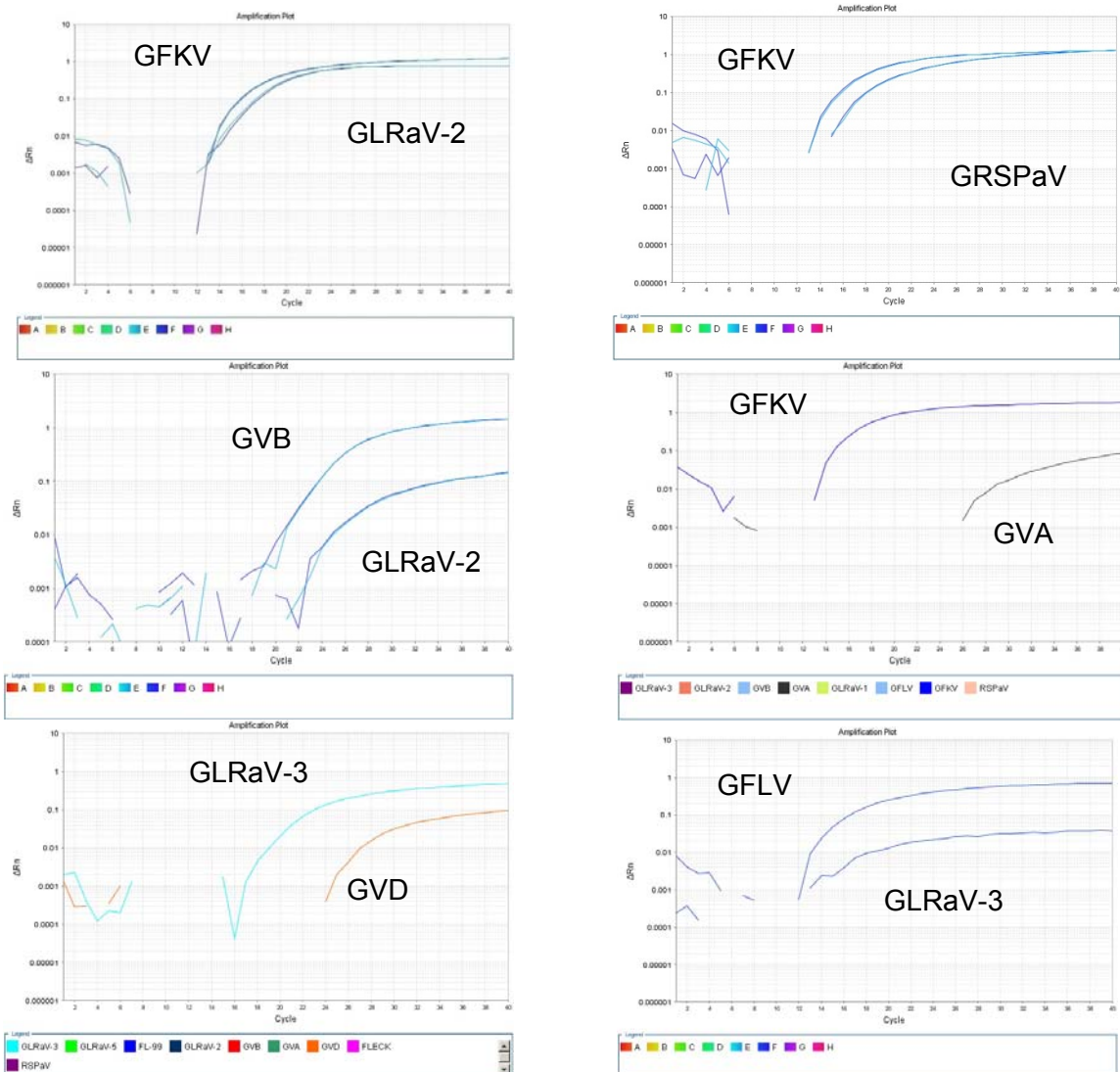


Figura 12, Cont....



Na indexação dos 36 acessos de videira, previamente recuperados após tratamentos de termoterapia e cultura de tecidos, e mantidos em canteiros suspensos, sob telado, poucas infecções virais, residuais, foram constatadas. A maior incidência foi constatada para o GRSPaV (5/36), seguida do GVA (2/36) e depois pelos vírus GVB, GLRaV-2 e GLRaV-3 (1/36 para cada vírus). As amostras estavam completamente livres dos vírus GVD, GLRaV-5, GFLV e GFKV (Quadro 15). Embora muitos destes 36 acessos já estivessem sido indexados, de maneira não sistemática, por outros testes diagnósticos (ex.: indexação biológica, ELISA e/ou RT-PCR convencional), esta foi a primeira vez que foram indexados por meio de um teste mais sensível (RT-PCR em tempo real). O status fitossanitário do material avaliado pode ser considerado “satisfatório” e a infecção residual, verificada nos acessos, também pode ser considerada “relativamente” normal após os

procedimentos adotados (termoterapia e/ou cultura de tecidos). A adoção destes procedimentos de limpeza clonal não é a garantia de que o material recuperado estará completamente livre de vírus, daí a necessidade destes materiais serem indexados por testes diagnósticos sensíveis.

Quadro 14 - Resultado da indexação simultânea de dois vírus por RT-PCR em tempo real (duplex) a partir de uma mesma hospedeira, considerando-se nove vírus avaliados

Local da amostra (placa-poço)	Descrição da amostra	Vírus	C _T	Resultado da indexação
26-D3	BRS Cora (CNPUV 181-1) (62d)	GVA	24,6	+
		GVB	19,7	+
44-H1	Rupestris du Lot / Maria (IAC 514-6)	GVA	19,0	+
		GFLV	17,1	+
9-A2	Itália (Pirovano 65)	GVA	31,7	+
		GFkV	16,5	+
42-E5	Dolcetto	GVA	16,7	+
		GVD	20,2	+
7-G1	Cabernet Franc	GRSPaV	20,6	+
		GVB	23,7	+
35-F6	Itália (Garibaldina, amostra 1, dormente)	GRSPaV	29,1	+
		GFLV	22,9	+
46-H8	Itália (Garibaldina, amostra 16, pós-brotação)	GRSPaV	24,3	+
		GFkV	28,8	+
42-E2	Cardinal	GRSPaV	28,0	+
		GLRaV-5	27,9	+
42-E6	Dolcetto	GRSPaV	23,2	+
		GVD	21,6	+
46-F1	LN33/Isabel	GLRaV-2	24,0	+
		GVB	21,6	+
8-B2	Rupestris du Lot / Maria (IAC 514-6)	GLRaV-2	17,1	+
		GFLV	15,6	+
54-F7	Itália (Garibaldina, amostra 17, pós-brotação)	GLRaV-2	28,9	+
		GFkV	32,7	+
54-A9	Itália (Garibaldina, amostra 1, pós-brotação)	GLRaV-3	20,0	+
		GVD	28,5	+

A maior incidência de GRSPaV nos acessos pode ser explicada pela termo-estabilidade deste vírus, ou seja, pela dificuldade de eliminação deste vírus utilizando termoterapia por calor. O GRSPaV, se comparado aos outros vírus de videira, parece ser o mais recalcitrante para a remoção de genótipos infectados (Pearson e Goheen, 1988; Martelli, 1993).

Eun et al. (2000) também obtiveram sucesso na detecção e na quantificação simultânea de dois vírus que infectam orquídeas, *Cymbidium mosaic potexvirus*

(CymMV) e *Odontoglossum ringspot tobamovirus* (ORSV) usando a RT-PCR em tempo real (TaqMan). Ling et al. (2007) desenvolveram um ensaio RT-PCR em tempo real (TaqMan), associado a um sistema de imunocaptura, para a detecção eficiente de 25 isolados de *Pepino mosaic virus* (PepMV), coletados em plantios comerciais de tomate. Este sistema de detecção utilizou um par de oligonucleotídeos, desenhado com base na região conservada do gene TGB2, e uma única sonda TaqMan, de amplo espectro, capaz de detectar todas as estirpes do PepMV.

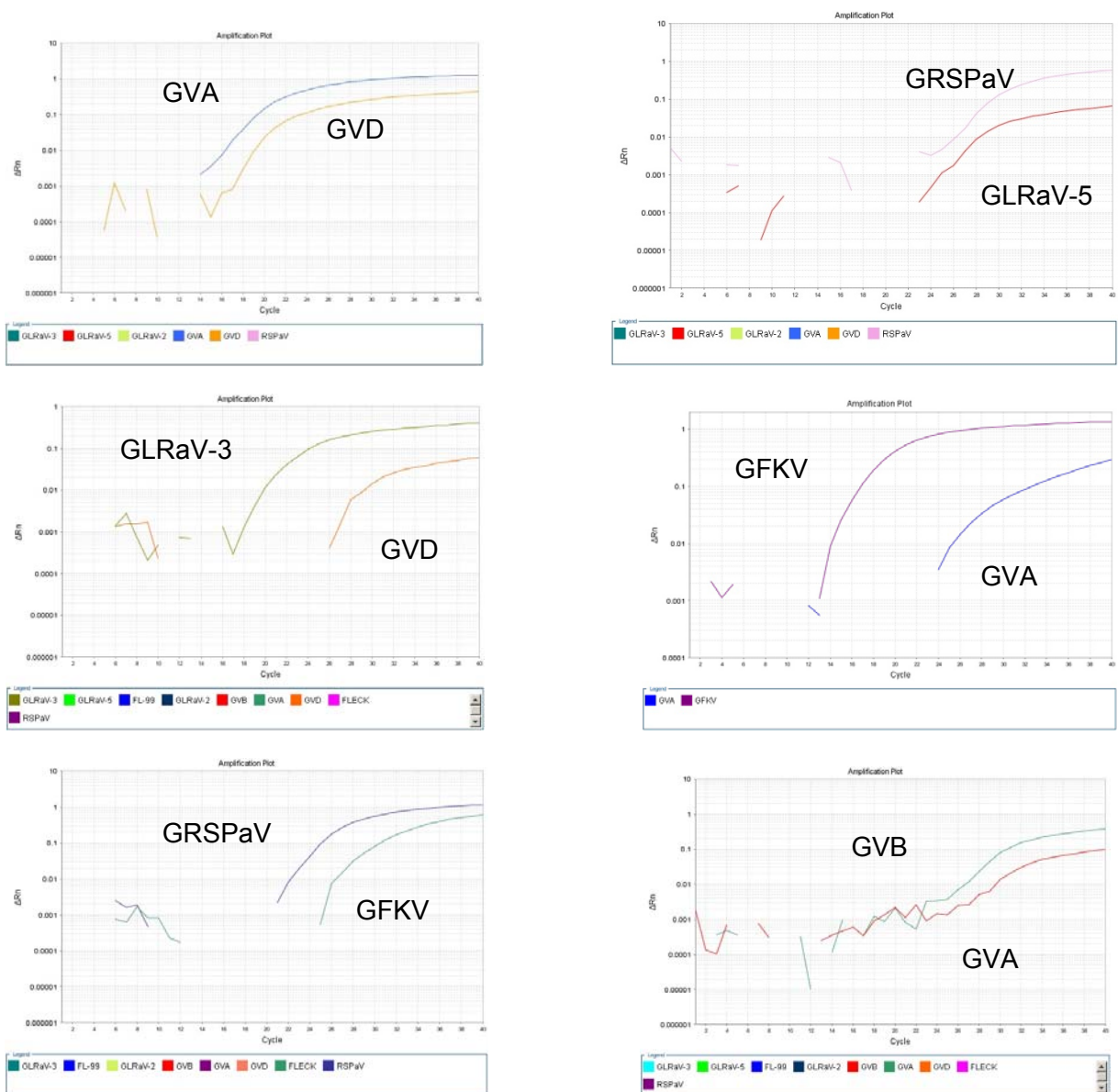
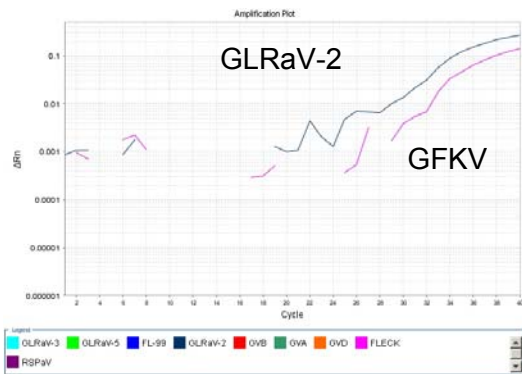
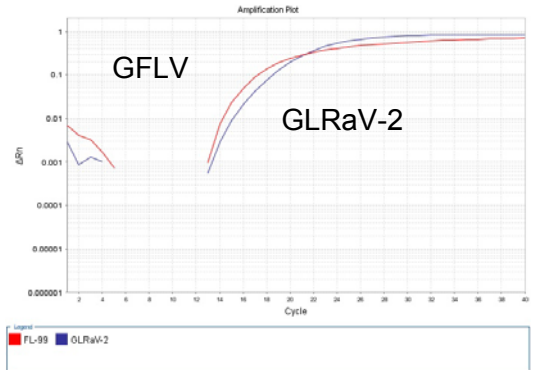
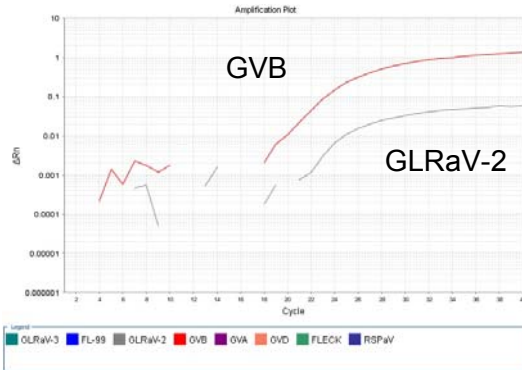
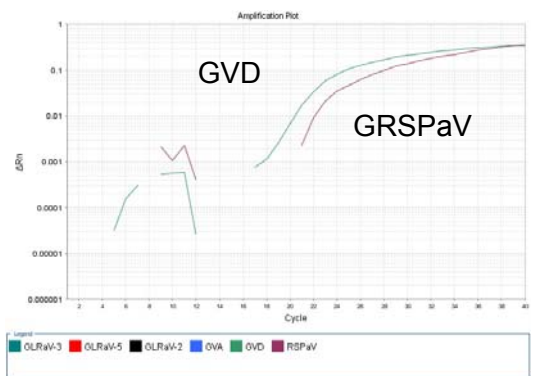
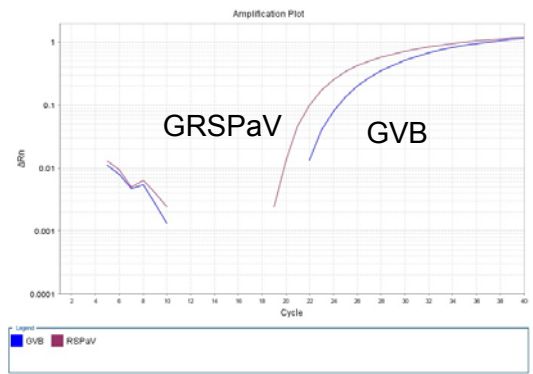
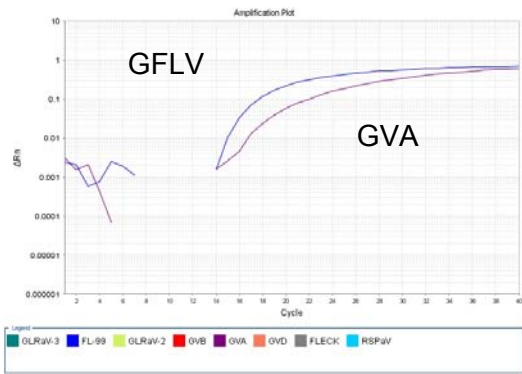


Figura 13 - Curvas de detecção simultânea de dois vírus (duplex) por RT-PCR em tempo real, e reações realizadas a partir de uma única amostra infectada por reação duplex, considerando-se os fluoróforos VIC e FAM, para a marcação das sondas.

Figura 13, Cont.



Margaria et al. (2009) realizaram a detecção múltipla de fitoplasmas associados às doenças Flavescência dourada (*Flavescence dorée*-FD e Madeira negra (*Bois noir*-BN) por RT-PCR em tempo real (TaqMan) com sensibilidade cinco vezes superior, comparativamente, à RT-PCR convencional. Yokomi et al. (2010) identificaram várias estirpes, potencialmente severas, de *Citrus tristeza virus* (CTV), na Califórnia (EUA), utilizando um ensaio multiplex RT-PCR em tempo real (TaqMan) com diferentes oligonucleotídeos e sondas.

Papayiannis et al. (2010) desenvolveram a detecção multiplex, por RT-PCR em tempo real (TaqMan), para dois begomovírus, *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) e *Tomato yellow leaf curl sardinia virus* (TYLCSV), frequentemente presentes em infecções múltiplas no Mediterrâneo. Recentemente, Papayiannis et al. (2011) também desenvolveram outro ensaio duplex para a detecção simultânea de *Tomato chlorosis virus* (ToCV) e *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV).

Um método que combina IC-RT-PCR e RT-PCR com o uso de sondas (TaqMan) foi desenvolvido para a detecção de *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) e *Leek yellow stripe virus* (LYSV), dois potyvirus prevalentes na cultura do alho. A eficiência dos oligonucleotídeos e das sondas vírus-específicas foi demonstrada por Lunello et al. (2004) pela detecção de três isolados de diferentes áreas geográficas e hospedeiras.

Recentemente, Debreczeni et al. (2011) desenvolveram um método de qRT-PCR para a detecção e a quantificação de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) usando oligonucleotídeos específicos e uma sonda MGB (TaqMan), desenhada com base em sequências conservadas do segmento M de TSWV. Além disso, a especificidade das sondas MGB (TaqMan) permitiram detectar e monitorar o acúmulo de dois isolados de TSWV, em infecções simples e múltiplas.

Beuve et al. (2007) utilizaram oligonucleotídeos degenerados para desenvolver um teste RT-PCR em tempo real (SYBR Green), de amplo espectro e altamente sensível, para a detecção quantitativa e universal de todas as variantes do GLRaV-2, que infectam portaenxertos de videira. Estes autores constataram, ainda, que a sensibilidade do ensaio multiplex RT-PCR em tempo real foi 125 vezes superior quando comparado ao RT-PCR convencional.

Quadro 15 - Resultado da avaliação por meio de RT-PCR em tempo real (TaqMan) de 36 acessos de videira, submetidos a termoterapia e/ou cultura de tecidos, para a presença de nove vírus

N°	Cultivar	Info. compl.	Finalidade	Localização	Tratamento	GLRaV-2	GLRaV-3	GLRaV-5	GVA	GVB	GVD	GRSPaV	GFLV	GFKV
01	Cabernet Franc	Almadén	uva vinífera tinta para vinho fino	T3E2F19	126+93+64d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
02	Cabernet Sauvignon	clone ISV1 – Itália	uva vinífera tinta para vinho fino	T2E4F39	84+93d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
03	Chardonnay	Almadén	uva vinífera branca para vinho fino	T2E1F23	126d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
04	Concord Clone 30		uva americana tinta para suco	T2E1F36	65+93d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
05	Isabel Precoce		uva americana para mesa, suco ou vinho comum tinto	T2E2F48B	54+115+64d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
06	Itália	IAC (clone 081210)	uva vinífera branca para mesa (com semente)	T2E1F56	126d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
07	Bordô (Ives)		uva americana para suco ou vinho comum tinto	T2E2F56B	35+75+93+62d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
08	Merlot	Almadén	uva vinífera tinta para vinho fino	T3E2F5	126+128+74d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
09	Moscato Embrapa	CNPUV 106-93	uva híbrida para vinho comum branco	T3E1F55	54+63d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	Niágara Branca		uva americana para mesa, suco ou vinho comum branco	T2E2F33B	65+62+56d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Niágara Rosada		uva americana para mesa, suco ou vinho comum branco	T3E2F7	65+93d+merist.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	IAC 313 (Tropical)	IAC-SP	portaenxerto tropical	T2E3F20	sem trat.	-	-	-	-	-	-	+	-	-
13	IAC 766 (Campinas)		portaenxerto tropical	T2E4F26C	65d	-	-	-	-	-	-	+	-	-
14	Paulsen 1103		portaenxerto subtropical (temperado)	T2E3F13B	88+93+63d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	Riesling Itálico	clone ISV1 – Itália	uva vinífera branca para vinho fino	T2E1F30	35+75+65d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	Thompson Seedless		uva vinífera branca para mesa (sem semente)	T2E1F26	54+88d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Concord		uva americana tinta para suco	T3E2F35	75d	+	+	-	+	-	-	-	-	-
18	Isabel		uva americana para mesa, suco ou vinho comum tinto	T3E1F10A	75+113d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	IAC 572 (Jales)		portaenxerto tropical	T2E3F15A	63+32+105d	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Quadro 15, Cont...

20	Crimson Seedless		uva vinífera tinta para mesa (sem semente)	T3E2F53	90d	-	-	-	-	-	-	+	-	-
21	BRS Lorena	CNPUV 127-31	uva híbrida para vinho comum branco	T2E2F34B	64+32+62+56d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N°	Cultivar	Info. compl.	Finalidade	Localização	Tratamento	GLRaV-2	GLRaV-3	GLRaV-5	GVA	GVB	GVD	GRSPaV	GFLV	GFkV
22	BRS Margot	CNPUV 28-6	uva híbrida para suco tinto	T2E4F1A	90d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	BRS Clara	CNPUV 667-1	uva híbrida branca para mesa (sem semente)	T2E3F12B	63d+merist.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	BRS Rúbea	CNPUV H65.9.14	uva híbrida para suco tinto	T2E1F33	75+65d	-	-	-	-	-	-	+	-	-
25	Moscato Bianco	R2	uva vinífera branca para vinho fino	T2E2F11B	90d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	101-14		portaenxerto subtropical (temperado)	T2E1F47	88+65d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	420 ^a		portaenxerto subtropical (temperado)	T2E4F38	88+93+74d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	Petit Syrah	Murilo A. Regina	uva vinífera tinta para vinho fino	T3E1F8A	113d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	Pinot Noir	Salton	uva vinífera tinta para vinho fino e espumante (branco)	T3E2F14	32+56d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	Superior		uva vinífera branca para mesa (sem semente)	T3E2F52	90d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	BRS Cora	CNPUV 181-1	uva híbrida para suco tinto	T2E1F51	62d	-	-	-	+	+	-	-	-	-
32	BRS Carmem	CNPUV 188-2	uva híbrida para suco tinto	T2E2F10A	88+62d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	BRS Linda	CNPUV 649-1	uva vinífera branca para mesa (sem semente)	T3E1F26B	113d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	BRS Violeta	CNPUV 773-26	uva híbrida para suco tinto	T3E2F3	74d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	BRS Morena	CNPUV 659-1	uva vinífera tinta para mesa (sem semente)	Q5F17A (EEVT Jales Q9R1P5)	sem trat.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	Itália "melhorada"	Vale do São Francisco	uva vinífera branca para mesa (com semente)	T2E2F27B	63d+merist.	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: (-) ausência de infecção viral; (+) presença de infecção viral.

Em comparativos de eficiência entre a PCR padrão (convencional), realizada em reação única, e a PCR multiplex, em geral, a reação de detecção simultânea de vírus apresenta sensibilidade melhor ou igual à reação de detecção por PCR padrão (Menzel et al., 2002; Nassuth et al., 2000; Saade et al., 2000). No entanto, uma pequena, mas significativa redução na sensibilidade, foi observada em algumas situações (Bertolini et al., 2001; Sánchez-Navarro et al., 2005; Sharman et al., 2000) como, por exemplo, a presença de mais de cinco pares de oligonucleotídeos na mesma reação de PCR, fator que pode interferir na otimização da reação. Em muitos casos, apesar da dificuldade para se otimizar a detecção simultânea, este procedimento ainda é compensador, pois maximiza a capacidade de detecção de vírus em plantas, de forma bastante específica e sensível, além de reduzir custos e o trabalho necessários, em relação a reação simplex (James et al., 2006).

4.4. Detecção simultânea por RT-PCR em tempo real - TaqMan triplex

Visando avançar na detecção múltipla de vírus de videira, por meio de RT-PCR em tempo real, foi realizada a detecção simultânea de três vírus em uma única reação (triplex). As combinações de vírus testadas, a partir de DNAs clonados (Quadro 8), envolveram a utilização de sondas marcadas com VIC-TAMRA, para os vírus GVA e GRSPaV; sondas com FAM-TAMRA, para os vírus GVB, GFLV, GLRaV-5 e GVD e, finalmente, sonda do tipo MGB, marcada com o fluoróforo NED, para a detecção do vírus GVA, neste último caso, também utilizando-se oligonucleotídeos degenerados para o GVA (106 pb) (Quadro 6). Foi possível realizar a detecção simultânea de três vírus, em uma única reação, a partir de amostras de cDNA viral. Por exemplo, os valores de C_T para a combinação de GVA (NED), GRSPaV (VIC) e GLRaV-5 (FAM) foram 17,7; 10,5 e 10,5 e para a combinação de GVA (NED), GRSPaV (VIC) e GFLV (FAM), 16,2; 15,0 e 15,8, respectivamente. Os resultados destas análises estão ilustrados graficamente na Figura 14. Entretanto, a detecção triplex, a partir de amostras de RNA total como molde, não foi obtida ou resultava em detecções erráticas e inconsistentes. Provavelmente, a detecção simultânea de três vírus, a partir de RNA total, requeira um processo mais detalhado de otimização da reação (ex. desenho de oligonucleotídeos específicos para atuarem na reação triplex, etc.). Na reação triplex, usando RNA total, a presença de ácidos nucleicos da planta, presentes na

reação, pode ter interferido negativamente no processo, evidenciando a necessidade de ajustes específicos para que a reação se processasse.

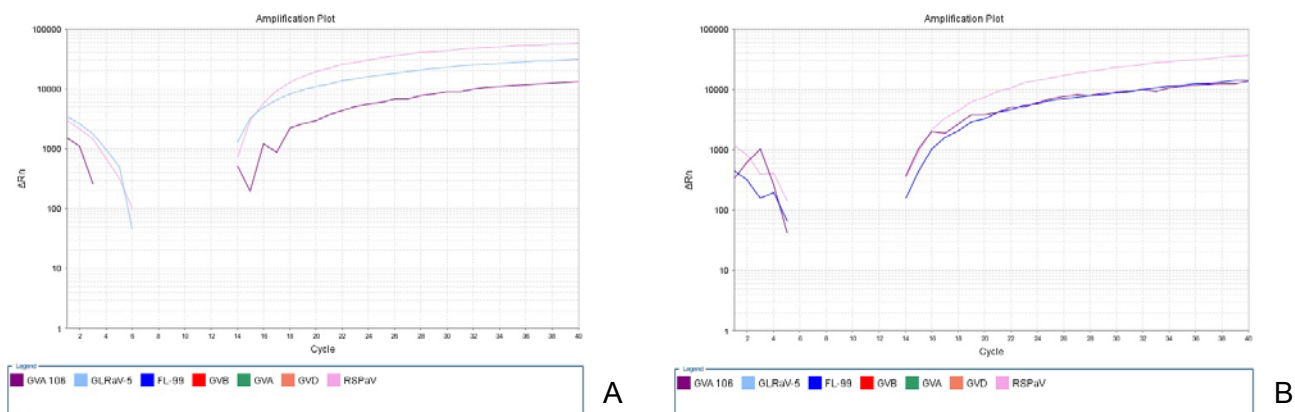


Figura 14 - Resultado gráfico da detecção simultânea de três vírus (triplex), a partir de clones de cDNA, previamente caracterizados. (A) Curvas de amplificação para os vírus: GRSPaV, GLRaV-5 e GVA (106 pb); (B) Curvas de amplificação para os vírus: GRSPaV, GVA (106 pb) e GFLV. Amostras: cDNA viral a 0,01 ng/μL.

Radaelli (2009) (dados não publicados) também realizou ensaios triplex por RT-PCR em tempo real (TaqMan) visando a detecção de vírus das famílias *Closteroviridae* (GLRaV-1, -2 e -3) ou *Flexiviridae* (GVA, GVB e GRSPaV). Foram utilizados oligonucleotídeos degenerados, desenhados para promover o pareamento em regiões conservadas dos genes HSP70 (CLI up e CLI dwn - fragmento de 560 pb) ou da replicase (Kat up e Kat dwn - fragmento de 330 pb), *Closteroviridae* e *Flexiviridae*, respectivamente. Os oligonucleotídeos para *Closteroviridae* ou *Flexiviridae* foram empregados, conjuntamente com sondas específicas para cada um dos três vírus. Os resultados desta detecção triplex, obtidos por Radaelli (2009), foram promissores, embora ainda necessitassem de ajustes e testes adicionais para a confirmação da confiabilidade e da reprodutibilidade (comunicação pessoal; Saldarelli, P. 2011).

No âmbito desta dissertação, foram realizadas tentativas visando reproduzir a reação triplex de Radaelli (2009), utilizando-se os mesmos oligonucleotídeos degenerados (Kat up e Kat dwn) e as mesmas sequências de nucleotídeos nas sondas para GVA, marcada com o fluoróforo NED-MGB-NFQ, para GVB (VIC-TAMRA) e para GRSPaV (FAM-TAMRA), além de RNA total como amostra. Entretanto, os resultados foram negativos, ou seja, não houve geração de sinal fluorescente nas reações de RT-PCR em tempo real (dados não mostrados). Isto,

provavelmente, é devido ao distanciamento entre os oligonucleotídeos degenerados (330 pb) e a sequência, bastante degenerada, destes oligonucleotídeos. Resultados positivos (geração de sinal fluorescente) nas reações de RT-PCR em tempo real não foram obtidos mesmo a partir de amostras infectadas.

Em uma segunda tentativa foram desenhados novos oligonucleotídeos degenerados para GVA (GVA-4528F/GVA-4633R), gerando um fragmento amplificado menor (106 pb) (Quadro 6), com o aproveitamento da sonda marcada com o fluoróforo NED-MGB-NFQ para a detecção do GVA. Esta sonda, juntamente com outras marcadas com 6-FAM e VIC, porém com distintos pares de oligonucleotídeos para cada um dos três vírus, não promoveu a detecção triplex, a partir de RNA total de amostras infectadas. Como anteriormente mencionado, a detecção triplex somente foi obtida a partir de cDNA viral clonado.

Agindotan et al. (2007) realizaram ensaio para a detecção simultânea de quatro vírus, que comumente infectam a batata, *Potato leafroll virus*, *Potato virus A*, *Potato virus X* e *Potato virus Y*, a partir de RNA total em reação quadriplex por RT-PCR em tempo real (TaqMan). Estes autores demonstraram ser possível a detecção de 200 a 400 cópias de RNA viral na batateira. Pelletier et al. (2009) também desenvolveram ensaio triplex por PCR em tempo real (TaqMan) para a detecção simultânea de dois fitoplasmas, *Flavescence dorée* (FD) e *Bois noir* (BN), além da detecção de um controle endógeno “chloroplast *tRNAL-F* spacer” de *Vitis* spp., a partir de videiras com sintomas de *Grapevine yellows* (GY). Foram empregadas sondas do tipo *minor groove binder*-MGB (TaqMan) e oligonucleotídeos específicos. A sensibilidade do teste foi até 100 vezes superior, comparativamente ao método nested-PCR duplex convencional (Clair et al., 2003), possibilitando a detecção de ambos fitoplasmas em videiras.

Visando-se elucidar alguns dos resultados obtidos na reação triplex, três fragmentos amplificados por RT-PCR convencional foram clonados e sequenciados (Quadro 8). Os resultados desta etapa e a sua interpretação serão apresentados e discutidos no âmbito do item 4.6 desta dissertação.

4.5. Avaliação agronômica de videiras infectadas por vírus

Este ensaio foi conduzido com o objetivo de se avaliar o efeito da infecção viral sobre variáveis agronômicas e variáveis que expressam a qualidade enológica

da uva. Dez plantas de videira (*Vitis vinifera*), com nítidos sintomas de infecção viral, foram comparadas a dez plantas sem sintomas perceptíveis (Figura 15). Foram avaliadas as cvs. Cabernet Franc (CF) e Cabernet Sauvignon (CS) de vinhedos comercial e experimental, respectivamente, situados em Bento Gonçalves-RS. As plantas foram identificadas no início da maturação da uva e as avaliações foram realizadas em fevereiro e março de 2011. Na cultivar Cabernet Franc foram observadas folhas com textura e aparência alteradas, tais como folhas coriáceas e com bolhosidades, enrolamento dos bordos foliares para baixo e coloração avermelhada, com as nervuras principais permanecendo verdes (Figura 15). Já na cv. Cabernet Sauvignon foram observados avermelhamento da folha e formação de tecido corticento na região de inserção do ramo (Figura 15). O efeito da infecção viral na produção (cachos) também pode ser observado na figura 15.



Figura 15 - Aspecto geral das plantas, dos sintomas e da produção verificado no ensaio de avaliação agrônômica entre videiras assintomática e infectada por vírus. (A) videiras cv. Cabernet Franc sem sintomas de infecção viral, (B) com sintomas de infecção viral, (C) videira cv. Cabernet Sauvignon com intumescimento na região de inserção do ramo e (D) avermelhamento foliar decorrente de infecção viral, (E) cv. Cabernet Franc: cachos provenientes de videira infectada e (F) de planta assintomática.

Todas as plantas marcadas, de ambas as cultivares, foram avaliadas visando-se identificar as espécies virais envolvidas na expressão dos sintomas observados. A indexação foi realizada por meio de RT-PCR em tempo real (TaqMan) para a detecção de seis espécies virais que infectam a videira: GLRaV-2, -3, GVA, GVB, GFkV e GRSPaV. Na cv. Cabernet Franc detectou-se GRSPaV na quase totalidade das plantas avaliadas, tanto naquelas com quanto naquelas sem sintomas (Figuras 16A e 16B) respectivamente. O GVB foi detectado na quase totalidade das plantas com sintomas (Figura 16C) e em apenas 2 plantas sem sintomas (Figura 16D). A cv. C. Sauvignon apresentou os mesmos resultados de infecção obtidos para a cv. C. Franc, a exceção de oito plantas infectadas com GVB em dez avaliadas com sintomas. Em ambas as cultivares, e considerando-se as plantas com e sem sintomas, não foram detectadas plantas infectadas por GLRaV-2 e -3, GVA e GFkV.

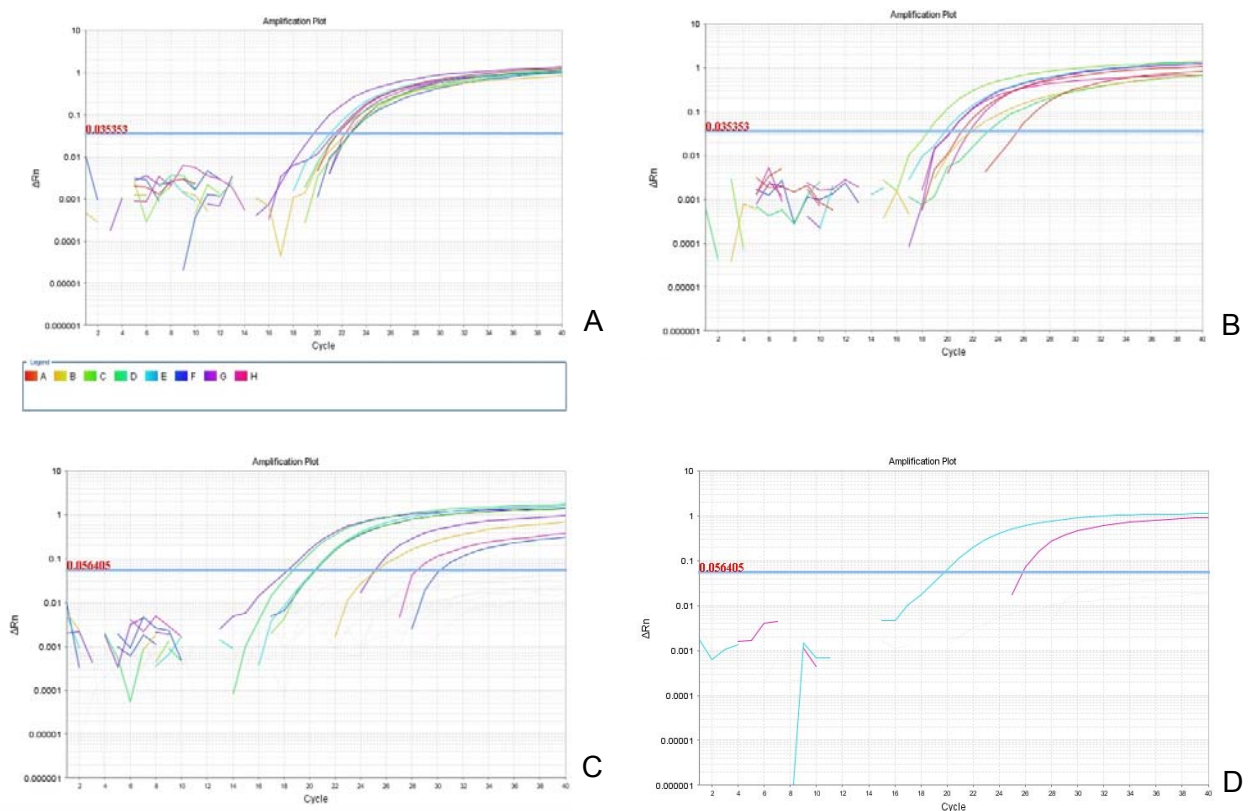


Figura 16 - Resultado gráfico da indexação por meio de RT-PCR em tempo real (TaqMan) das amostras de C. Franc testadas para seis vírus, destacando GRSPaV e GVB. (A) 10/10 plantas com sintomas, infectadas por GRSPaV (número de plantas infectadas com vírus / n° total de plantas testadas); (B) 9/10 plantas sem sintomas, infectadas por GRSPaV; (C) 9/10 plantas com sintomas, infectadas por GVB; (D) 2/10 plantas sem sintomas, infectadas por GVB.

Em todo o mundo, dentre as principais espécies virais que infectam a videira, incluem-se o GVB e o GRSPaV. Ambas pertencem à família *Betaflexiviridae*, classificando-se nos gêneros *Vitivirus* (GVB) e *Foveavirus* (GRSPaV). Em estudos de variabilidade genética, diferentes isolados, destas duas importantes espécies virais, encontrados em vinhedos brasileiros, foram caracterizados molecularmente por Nickel et al. (2002) e Radaelli et al. (2009). Como o “diferencial” entre plantas com e sem sintomas, neste ensaio específico, foi a presença do GVB, pois o GRSPaV foi detectado indistintamente, as alterações agronômicas verificadas seriam, provavelmente, resultantes da infecção pelo GVB.

Em relação a avaliação das variáveis agronômicas (Quadro 16), as plantas infectadas e sintomáticas apresentaram vigor reduzido, reduções no número de brotos e de cachos/planta e cachos desuniformes com maturação irregular (Figura 15). Observaram-se diferenças significativas, em favor das plantas sem sintomas, nas seguintes variáveis (% de redução em relação às plantas sem sintomas, em CF e CS): n° ramos com cachos (37 e 24%), n° cachos (35 e 35%), peso fresco do cacho (37 e 55%), peso total de bagas/cacho (36 e 55%), peso do engaço (52 e 54%) e n° bagas/cacho (27 e 47%) (Quadro 16).

Na cv. Cabernet Franc ainda foram verificadas diferenças significativas, em favor das plantas sem sintomas, quanto ao n° gemas brotadas (28%), n° total gemas (22%) e °Brix do mosto (aproximadamente 7%) e, na cv. Cabernet Sauvignon, quanto ao peso médio de baga (13%). O n° de gemas não brotadas na cv. Cabernet Sauvignon com sintomas foi reduzido em 51% (Quadro 15). Estes resultados demonstraram que o processo infeccioso, juntamente com a efetiva expressão de sintomas da infecção viral, nestas cultivares, influenciaram negativamente o desempenho agrônomico e de algumas variáveis de qualidade enológica da uva (ex: °Brix, acidez total titulável e pH). Adicionalmente, os resultados demonstraram a adequação do teste de RT-PCR em tempo real para a indexação de amostras de videiras provenientes diretamente do campo.

O GVB e o GRSPaV são vírus que invadem, replicam-se e se concentram nos tecidos do floema da planta. No processo de replicação viral, o vírus codifica a proteína de movimento (MP) viral, que ao interagir com os plasmodesmas, para promover o movimento viral célula-a-célula, pode alterar, mesmo que temporariamente, a funcionalidade dos plasmodesmas, interferindo no fluxo de fotoassimilados da folha para o floema (Lalonde et al., 2003; Gonçalves et al., 2005)

e, conseqüentemente, para os órgãos-dreno da planta, como ramos, raízes e frutos. Os impactos da infecção viral sobre o potencial fotossintético de folhas de videiras, potencialmente, restringem o acúmulo de reservas e a capacidade de crescimento, refletindo, conseqüentemente, em queda de qualidade da produção e de rendimento (Basso et al., 2010b).

Quadro 16 - Resultados da avaliação agrônômica e de uvas colhidas em videiras, cvs. Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon, sem e com sintomas, infectadas com os vírus *Grapevine virus B* (GVB) e *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV). Média de 10 plantas

Variável	Cabernet Franc		Cabernet Sauvignon	
	Planta sem sintomas	Planta com sintomas	Planta sem sintomas	Planta com sintomas
N° de gemas brotadas / planta	43,8 a*	31,3 b	34,5 ns	31,6 ns
N° de ramos com cachos / planta	33,1 a	20,8 b	27,8 A	21,1 B
N° de ramos sem cachos / planta	10,7 ns	10,5 ns	6,7 ns	10,5 ns
N° de gemas não brotadas / planta	10,5 ns	10,9 ns	5,1 b	10,4 a
N° total de gemas / planta	54,3 A	42,2 B	39,6 ns	42,0 ns
N° de cachos / planta	57,9 A	37,5 B	60,5 a	38,9 b
Peso fresco do cacho (g)	193,27 a	121,37 b	275,51 a	123,11 b
Peso total de bagas no cacho (g)	179,11 a	114,69 b	258,12 a	115,24 b
Peso do engaço (g)	14,16 A	6,69 B	17,40 a	7,87 b
N° de bagas / cacho	112,77 a	81,57 b	168,30 a	88,13 b
Peso médio de baga (g)	0,53 ns	0,47 ns	0,51 A	0,44 B
Sólidos solúveis totais (°Brix)	18,84 a	17,60 b	16,43 ns	15,81 ns
Acidez total titulável (meq.L ⁻¹)	81,39 ns	92,44 ns	141,78 ns	134,86 ns
Ph	3,26 ns	3,31 ns	3,17 ns	3,16 ns

*Médias seguidas por letras distintas por cultivar, para cada variável, são diferentes entre si pelo teste t, bilateral (letras maiúsculas, $P \leq 0,05$; letras minúsculas, $P \leq 0,01$). ns, não significativo.

As maiores conseqüências da infecção viral em videira são o amadurecimento irregular dos cachos, a redução do rendimento e a diminuição da cor em uvas tintas (Reynolds et al., 1997; Cabaleiro et al., 1999; Komar et al., 2010). O amadurecimento irregular dos cachos pode ocasionar aumento da acidez total titulável do mosto da uva (Cabaleiro et al., 1999), entretanto este efeito não foi significativo nas avaliações realizadas (Quadro 15). De maneira geral, o mosto da uva de plantas infectadas tende a apresentar menor pH quando comparado com o de plantas sadias (Credi e Babini, 1997; Cabaleiro et al., 1999; Guidoni et al., 2000; Kovacs et al., 2001), mas esse parâmetro também não apresentou diferença significativa, nas condições testadas, para ambas cultivares. Tais resultados variam

em função das características da infecção viral e da resposta fisiológica da cultivar (hospedeira) frente a infecção viral.

Os efeitos negativos verificados, e que afetam de forma direta ou indireta, a fisiologia da videira, com reflexos significativos sobre algumas variáveis agronômicas e de qualidade enológica da uva, podem ser, provavelmente, atribuídos à presença do GVB, que teve maior incidência em plantas com sintomas. A presença de vírus em plantas sem sintomas pode ser explicada pela altíssima sensibilidade do teste diagnóstico de RT-PCR em tempo real e pela ocorrência de plantas assintomáticas para o GRSPaV. Plantas assintomáticas infectadas poderiam exibir sintomas em outros ciclos de cultivo (safras).

Recentemente, Giribaldi et al. (2011) realizaram estudo comparativo de performance agrônômica entre videiras (*Vitis vinifera*) sadia e infectada por GLRaV-1, GVA e GRSPaV. Nas plantas infectadas foram observadas diminuições significativas na brotação, na fertilidade e na produtividade em comparação com os controles sadios. Estes resultados apresentam similaridade com alguns obtidos no presente trabalho (Quadro 16). Giribaldi et al. (2011) também determinaram que a composição de sólidos solúveis totais na baga e de polifenóis não foi afetada, no entanto, a acidez total titulável foi superior em videiras infectadas.

Os resultados obtidos no presente trabalho salientam que videiras momentaneamente assintomáticas, mesmo que infectadas, ainda apresentam melhor desempenho agrônômico quando comparadas às sintomáticas e infectadas. Porém, como já demonstrado o melhor desempenho agrônômico é obtido a partir de videiras livres de patógenos virais (Basso et al., 2010b). Mannini et al. (2011) demonstraram as vantagens advindas de vinhedos estabelecidos com material propagativo livre de vírus em relação a diferentes variáveis, tais como vigor, rendimento, taxa fotossintética e teor de sólidos solúveis (°Brix).

O impacto econômico das viroses na produção da videira pode ser significativamente reduzido pela remoção de plantas infectadas de dentro do vinhedo ("roguing") se a incidência da infecção for moderada (1% a 25%). Com incidência superior a esta taxa, a melhor alternativa é a substituição do vinhedo. Assim a utilização de material "certificado" é recomendada como a melhor estratégia para reduzir as perdas ocasionadas pela infecção viral (Atallah et al., 2011).

4.6. Análise de seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos de cinco espécies virais que infectam a videira

4.6.1. *Grapevine fleck virus (GFkV)*

A partir da amostra da cv. Benifuji, enxertada no portaenxerto cv. Rupestris du Lot, amplificou-se por RT-PCR convencional, um fragmento de DNA de tamanho esperado (719 pb) (Figuras 17A e 17C), contendo a seqüência completa de nucleotídeos do gene da proteína capsidial do GFkV, com 693 nucleotídeos (nt) e 230 aminoácidos deduzidos (aad). Esta seqüência foi depositada no banco de dados do GenBank com código de acesso JN022610 (Figura 18).

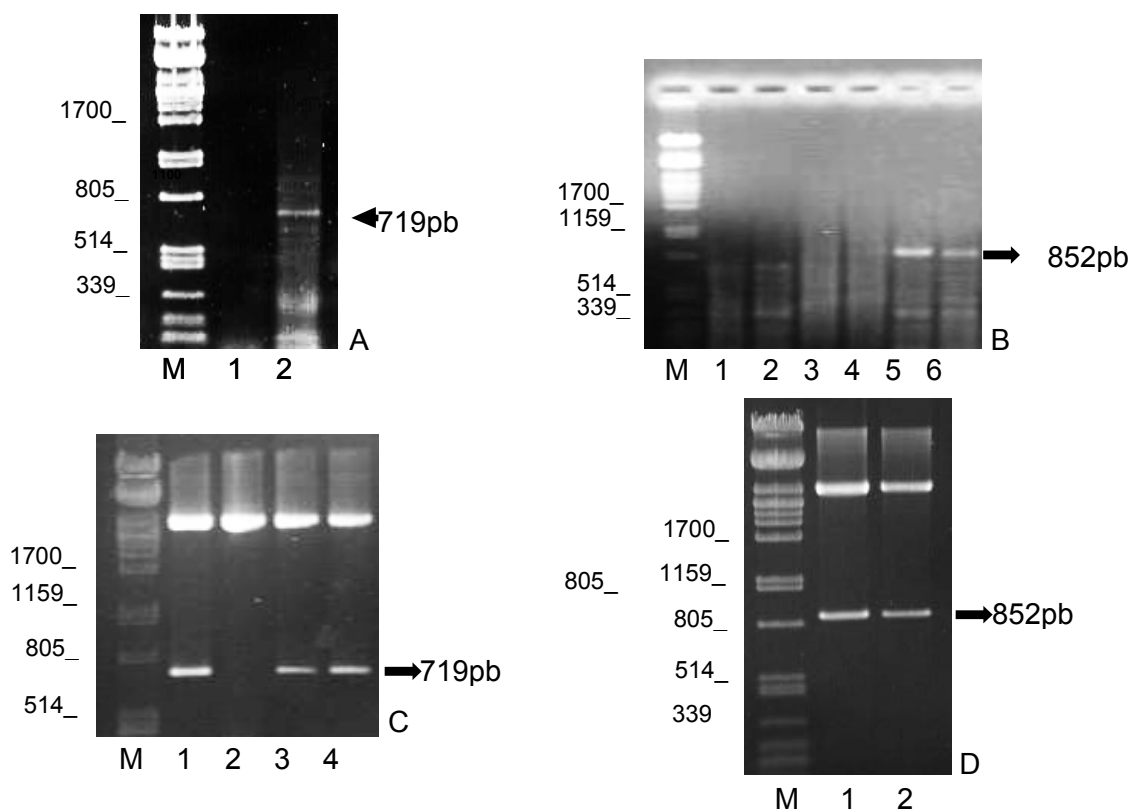


Figura 17 - Amplificação por RT-PCR convencional e digestões de plasmídeos em gel de agarose 1,2% (p/v). (A) fragmento amplificado de 719 pb do GFkV, cv. Benifuji (2) e videira cv. Rupestris du Lot sadia (1), (B) fragmento de 852 pb do GVD, cvs. Dolcetto e Garganega (5 e 6), (C) Mini-prep digerido com EcoRI, mostrando a liberação de um fragmento de 719 pb do GFkV (1, 3 e 4), (D) Mini-prep digerido com EcoRI, mostrando a liberação de um fragmento de 852 pb do GVD (1 e 2). Marcador DNA do fago lambda/PstI (M).

As seqüências obtidas para o isolado local, apresentaram maiores identidades de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos, 96,1% e 98,7%, respectivamente, com o isolado italiano MT48 (GenBank NC_003347) do GFkV (Quadro 17), isolado caracterizado por Sabanadzovic et al. (2001).

Quadro 17 - Identidades de nucleotídeos e de aminoácidos do isolado BF (GenBank JN022610, gene da proteína capsidial) de GFkV, dos isolados Dolc (GenBank JQ031715) e Garg (GenBank JQ031716), genes CP e “RNA binding protein” de GVD; e isolado Card, gene HSP70 parcial, de GLRaV-5, caracterizados neste trabalho, com outros isolados depositados em banco de dados (GenBank)

Vírus (isolado local)	Isolado estrangeiro	% ident. nucleotídeos	% ident. aminoácidos deduzidos	País	Hospedeira	Cód. Genbank (nt)	Cód. Genbank (aad)
GFkV (isol. BF)	MT48	96,1 (668/695)	98,7 (227/230)	Itália	Videira	NC_003347 (AJ309022)	NP_542613
	CI-1155	93,9 (651/693)	98,7 (227/230)	Chile	<i>Vitis vinifera</i>	HQ688989	AEL29445
	CH21-68.2	95,5 (644/674)	99,1 (222/224)	EUA	<i>Vitis vinifera</i> cv. Chardonnay	GU372373 ^(*)	ADM53709
	CH9-11	95,4 (643/674)	99,1 (222/224)	EUA	<i>Vitis vinifera</i> cv. Chardonnay	GU372372 ^(*)	ADM53708
	CH25-105.1	95,2 (642/674)	98,2 (220/224)	EUA	<i>Vitis vinifera</i> cv. Chardonnay	GU372374 ^(*)	ADM53710
	P	93,4 (230/246)	97,5 (80/82)	França	<i>Vitis vinifera</i> cv. Pinot Noir	FN555306 ^(*)	CBG91888
GVD (isol. Dolc)	—	89,2 (433/485)	95,0 (153/161)	Itália	<i>Nicotiana occidentalis</i>	Y07764	CAA69070 (gene prot. capsidial)
	—	93,5 (259/277)	91,2 (83/91)				CAA69071 gene "proteína de ligação ao RNA"
GVD (isol. Garg)	—	89,2 (433/485)	95,0 (153/161)	Itália	<i>Nicotiana occidentalis</i>	Y07764	CAA69070 (gene prot. capsidial)
	—	93,8 (260/277)	92,3 (84/91)				CAA69071 gene "proteína de ligação ao RNA"
GLRaV-5 (isol. Card)	Y217	97,5 (158/162)	100 (53/53)	França	<i>Vitis vinifera</i> cv. White Emperor	NC_016081 (FR822696)	YP_004901689
	—	96,9 (157/162)	100 (53/53)	EUA	Videira	AF039552	AAB96679
	—	96,2 (156/162)	100 (53/53)	EUA	Videira	AF233934	AAK38608
	WC	75,0 (114/152)	92,4 (49/53)	África do Sul	<i>Vitis vinifera</i> cv. Waltham Cross	EF103905	ABM05868
	CI-4408	96,1 (150/156)	98,0 (51/52)	Chile	<i>Vitis vinifera</i> cv. Superior	HM214151 ^(*)	ADN06382
	CI-3086	96,1 (150/156)	98,0 (51/52)	Chile	<i>Vitis vinifera</i> cv. S. Blanc	HM214150 ^(*)	ADN06381
	Potamisi	90,5 (143/158)	98,0 (51/52)	Grécia	<i>Vitis vinifera</i> cv. Potamisi	AM745343 ^(*)	CAN87154
	K5	88,6 (140/158)	98,0 (51/52)	Grécia	<i>Vitis vinifera</i> cv. K5	AM745344 ^(*)	CAN87155
	—	80,9 (123/152)	92,0 (46/50)	Argentina	<i>Vitis vinifera</i> cv. Redglobe	EU815935 ^(*)	ACJ03867

“ _ ” = não informado; *gene e/ou fragmento incompleto da proteína capsidial (GFkV) ou HSP70 (GLRaV-5) em relação ao isolado caracterizado.

(.../...) = número de nucleotídeos (nt) ou aminoácidos deduzidos (aad) idênticos em relação ao número total de nt ou aad alinhados.

No alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos deduzidos, do gene da proteína capsial, do GFkV caracterizado, isolado BF e outros dois isolados estrangeiros, depositados no banco de dados GenBank (NCBI), verificou-se a alteração de apenas dois aminoácidos deduzidos indicando baixa variabilidade desta espécie viral (Figura 19).

Naidu e Mekuria (2010) realizaram estudo de homologia, com base na comparação da sequência parcial de nucleotídeos do gene da proteína capsial (CP) de três isolados norte-americanos de GFkV da cv. Chardonnay. A comparação dessas sequências (GU372372, GU372373, GU372374) com as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos da CP do isolado italiano de GFkV (AJ309022) mostraram 94-95% e 98-100% de identidade, respectivamente, resultados similares aos obtidos no presente trabalho (Quadro 17).

Na indexação dos 30 acessos de videira cv. Itália, mantidas em casa de vegetação, e oriundas do Campo Experimental Garibaldina – Embrapa, foi possível detectar por RT-PCR em tempo real, seis plantas infectadas (ramos dormentes) pelo GFkV (Quadro 18), além de outras amostras infectadas por este vírus, já mencionadas (Quadros 12, 13 e 14), e também, analisadas por meio desta mesma técnica.

```

atgagcctccccgccacctcctcctgggcgccatttctctctcctcgcgaacccctccc
M S L P A D L L L G A I S S L L R N P P
acctctgatgccgcccgtcctgctgaccagcctgctgtctctagctctcgcctcagac
T S D A A A P S A D Q P A V S S S R S D
tctcgctggtcagcgtccgctcctgctgcccaccgccccgaccgcattgcccgc
S R L V S A P L P A A P P A P T A I A R
aacctcgcgtaagcatccacctcccctccagttcctgtggatgacatcacaggcacc
N P R V S I H L P F Q F L W Y D I T G T
gagtcctcctacacctccctgctcgcctccgctcccgaagtcgtcaccgctcgcccgc
E S S Y T S L S V A S R P E V V T V A R
ccctaccgccaagccgcccctcacctccctcgaagccttcgtccaaccacggcctcctca
P Y R H A R L T S L E A F V Q P T A S S
gccacctaccccaaacctcgactctgctggaccatcgactcgcctcacccccgcggc
A T Y P Q T V D L C W T I D S V T P A R
tctgagatcctctcctgctctcggcgcccaacgcacgcgtggggctccgtccaacttctcc
S E I L S V F G A Q R I A W G S V H F S
gccccatcctcctccccgcccagctctccagcctcaaccccaccatcaaggactccgctc
A P I L L P A E L S S L N P T I K D S V
acctacaccgactgccccgcctcacctgtggcttctaccgcaatgacgcctgctcgcc
T Y T D C P R L T C G F Y R N D A C V A
ctcggttctcgcgccccatctgcggtccatcctcatccgcgggcgttatcgagtgtccc
L G S S A P I C G S I L I R G V I E C S
gccccaccaaccgccccaccccctcgtcatga
A P T N R P T P S S -

```

Figura 18 - Sequências de nucleotídeos (linha superior) e de aminoácidos deduzidos (linha inferior) obtidas e depositadas no GenBank (JN022610) para o gene completo (693 pb) da proteína capsial do *Grapevine fleck virus* (GFkV), isolado BF. “_” : códon de parada.


```

*           20           *           40           *           60
JN022610 : MSLPADLLLGAISSLLRNPP TSDAAAPSADQPAVSSSRSDSRLV SAPLPAAPPAPT AIARNP : 62
AJ309022 : MSLPADLLLGAISSLLRNPP TSDAAAPSADQPAVSSSRSDSRLV SAPLPAAPPAPT AIARNP : 62
HQ688989 : MSLPADLLLGAISSLLRNPP TSDAAAPSADQPAVSSSRSDSRLV SAPLPAAPPAPT AIARNP : 62
MSLPADLLLGAISSLLRNPP TSDAAAPSADQPAVSSSRSDSRLV SAPLPAAPPAPT AIARNP

*           80           *           100          *           120
JN022610 : RVSIIHLPFQFLWYDITGT ESSYTSLSVASRPEVVTVARPYRHARL TSLEAFVQPTASSATYP : 124
AJ309022 : RVSIIHLPFQFLWYDITGT ESSYTSLSIASRPEVVTVARPYRHARL TSLEAFVQPTASSATYP : 124
HQ688989 : RVSIIHLPFQFLWYDITGT ESSYTSLSIASRPEVVTVARPYRHARL TSLEAFVQPTASSATYP : 124
RVSIIHLPFQFLWYDITGT ESSYTSLS6ASRPEVVTVARPYRHARL TSLEAFVQPTASSATYP

*           140          *           160          *           180
JN022610 : QTVDLCWTIDSVTPARSE ILSVFGAQR IAWG SVHFSAPILLPAELSSLNPTIKDSV TYTDCP : 186
AJ309022 : QTVDLCWTIDSVTPARSE ILSVFGAQR IAWG SVHFSAPILLPAELSSLNPTIKDSV TYTDCP : 186
HQ688989 : QTVDLCWTIDSVTPARSE ILSVFGAQR IAWG SVHFSAPILLPAELSSLNPTIKDSV TYTDCP : 186
QTVDLCWTIDSVTPARSE ILSVFGAQR IAWG SVHFSAPILLPAELSSLNPTIKDSV TYTDCP

*           200          *           220          *
JN022610 : RLTCGFYRNDACVALGSSAP ICGSILIRGVIECSAP INRPTPSS : 230
AJ309022 : RLTCGFYRNDACVALGSSAP ICGSILIRGVIECSAP INRPTPSS : 230
HQ688989 : RLTCGFYRNDACVALGSSAP ICGSILIRGVIECSAP INRPTPSS : 230
RLTCGFYRNDACVALGSSAP ICGSILIRGVIECSAP INRPTPSS

```

Figura 19 - Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzidos, depositada no GenBank (JN022610), do gene completo (693 pb) da proteína capsidial do *Grapevine fleck virus* (GFkV), isolado BF, com outras sequências homólogas, disponíveis para esta espécie viral.

A técnica de RT-PCR em tempo real, amparada pela caracterização viral, constitui-se em ferramenta útil para a rápida e sensível detecção do GFkV, agente causal da virose da mancha das nervuras em videiras, especialmente em atividades de monitoramento de campos de plantas-matrizes. Este trabalho também constitui-se na primeira caracterização do gene completo da proteína capsidial (CP) de um isolado local (“brasileiro”) de *Grapevine fleck virus*.

Quadro 18 - Resultado das avaliações de diversos acessos de videira, mantidos em casa de vegetação, provenientes de campo experimental ou de mudas importadas, e testados para a detecção, por meio de RT-PCR em tempo real, para os vírus GVD, GLRaV-5 e GFkV

N°	Cultivar/Acesso	Localização	Vírus/ Valor de C _T		
			GVD	GLRaV-5	GFkV
1	Itália 1	Casa de vegetação 1 - Embrapa (Campo Experimental - Garibaldina)	+ (27,6)	+ (26,9)	-
2	Itália 16	Casa de vegetação 1 - Embrapa (Campo Experimental - Garibaldina)	+ (27,6)	+ (26,6)	+ (22,3)
3	Itália 17	Casa de vegetação 1 - Embrapa (Campo Experimental - Garibaldina)	+ (27,6)	+ (25,6)	+ (32,7)
4	Itália 18	Casa de vegetação 1 - Embrapa (Campo Experimental - Garibaldina)	+ (26,6)	+ (25,4)	+ (19,8)
5	Itália 20	Casa de vegetação 1 - Embrapa (Campo Experimental - Garibaldina)	+ (26,5)	+ (24,8)	+ (32,1)
6	Itália 21	Casa de vegetação 1 - Embrapa (Campo Experimental)	-	-	+ (32,6)

Quadro 18, Cont.

7	Itália 22	Casa de vegetação 1 - Embrapa (Campo Experimental - Garibaldina)	+	+	+
			(26,7)	(25,4)	(35,0)
8	Alicante Bouschet Cl. 804	Embrapa Quarentena - T1E2F27P569	-	-	n.d.
9	Cabernet Franc (Carmenere) ISV	Embrapa Quarentena - T1E1F48P176	-	-	n.d.
10	Cabernet Franc ENTAV337	Embrapa Quarentena - T1E2F1P374	+	-	n.d.
			(31,4)		
11	Cabernet Sauvignon Cl.338	Embrapa Quarentena - T1E1F43P484	+	-	n.d.
			(32,8)		
12	Cabernet Sauvignon R5	Embrapa Quarentena - T1E1F41P482	-	-	n.d.
13	Cabernet Sauvignon R5	Embrapa Quarentena - T1E1F46P224	+	-	n.d.
			(31,4)		
14	Cardinal Cl.80	Embrapa Quarentena - T1E1F50P75	-	+	n.d.
				(24,7)	
15	Chardonnay R8	Embrapa Quarentena - T1E1F29P600	-	-	n.d.
16	Dolcetto CN 69	Embrapa Quarentena - T1E1F41P388	+	-	n.d.
			(22,1)		
17	Dolcetto CN69	Embrapa Quarentena - T1E1F41P388B	+	-	n.d.
			(18,9)		
18	Don Bem Hannah	Embrapa Quarentena - T1E1F47P49	-	-	n.d.
19	Garganega R4	Embrapa Quarentena - T1E1F47P89	+	-	n.d.
			(27,8)		
20	Itália VCR10	Embrapa Quarentena - T1E3F2P539	-	-	n.d.
21	Malvasia di Candia Aromática	Embrapa Quarentena - T1E1F47P281	+	-	n.d.
			(32,9)		
22	Marzemino	Embrapa Quarentena - T1E1F44P511	-	-	n.d.
23	Marzemino SMA9	Embrapa Quarentena - T1E1F45P345	-	-	n.d.
24	Merlot R8	Embrapa Quarentena - T1E1F50P51	+	-	n.d.
			(34,1)		
25	Micheli Palieri	Embrapa Quarentena - T1E1F48P151	+	-	n.d.
			(30,0)		
26	Micheli Palieri	Embrapa Quarentena - T1E3F31P31A	-	-	n.d.
27	Montepulciano R7	Embrapa Quarentena - T1E1F46P189	-	-	n.d.
28	Moscato Bianco	Embrapa Quarentena - T1E1F49P73	-	-	n.d.
29	Nebbiolo R1	Embrapa Quarentena - T1E1F41P508C	+	-	n.d.
			(32,7)		
30	Nero D' Avola	Embrapa Quarentena - T1E1F50P2	+	-	n.d.
			(20,9)		

Quadro 18, Cont.

31	Perlona	Embrapa Quarentena - T1E1F45P10	+	-	n.d.
			(22,5)		
32	Pinot Noir	Embrapa Quarentena - T1E1F49P45	-	-	n.d.
33	Prosecco ESAV10	Embrapa Quarentena - T1E1F45P364	-	-	n.d.
34	Refosco PR ISV1	Embrapa Quarentena - T1E1F44P528	-	-	n.d.
35	Regina ISV6	Embrapa Quarentena - T1E2F22P566	+	-	n.d.
			(20,5)		
36	Tannat Cl.717	Embrapa Quarentena - T1E1F43P493	+	-	n.d.
			(33,6)		
37	Uva di Troia VCA1	Embrapa Quarentena - T1E1F49P130	-	-	n.d.

n.d. = não determinado, "+" planta infectada, "-" planta sadia.

4.6.2. *Grapevine leafroll-associated virus 5 (GLRaV-5)*

O *Grapevine leafroll-associated virus 5* (GLRaV-5) foi caracterizado, molecularmente, a partir da amostra proveniente da cv. Cardinal (Quadro 5). Amplificou-se, por RT-PCR convencional e com os oligonucleotídeos HSP-26F/HSP-188R (Quadro 6), um fragmento de DNA de tamanho esperado (162 pb) que foi, posteriormente, clonado (Figura 20A). A sequência obtida, a partir deste fragmento, corresponde ao gene HSP70 incompleto do GLRaV-5, com 162 nucleotídeos (nt) e 53 aminoácidos deduzidos (aad) (Figura 21).

O alinhamento múltiplo da sequência de nucleotídeos do isolado local de GLRaV-5, isolado Card, com sequências homólogas de outros quatro isolados, incluindo-se, ainda, os oligonucleotídeos e sondas para GLRaV-5 (Quadro 6), mostrou existir mínima variabilidade nestas regiões e entre estes isolados, a exceção do isolado Sul Africano (EF103905) (Figura 22). O alinhamento múltiplo de aminoácidos deduzidos do isolado Card e outros quatro isolados de GLRaV-5 enfatiza a existência de baixa variabilidade nesta região genômica (Figura 23). As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos do GLRaV-5, isolado local (Card), proveniente da cv. Cardinal, apresentaram identidades de 97,5% e 100%, respectivamente, com o isolado francês Y217 (NC_016081) (Quadro 17). Entretanto, incluindo os alinhamentos parciais de sequências, estas identidades variaram de 80,9 a 97,5% e 92 a 100%, para nucleotídeos e aminoácidos deduzidos, respectivamente (Quadro 17).

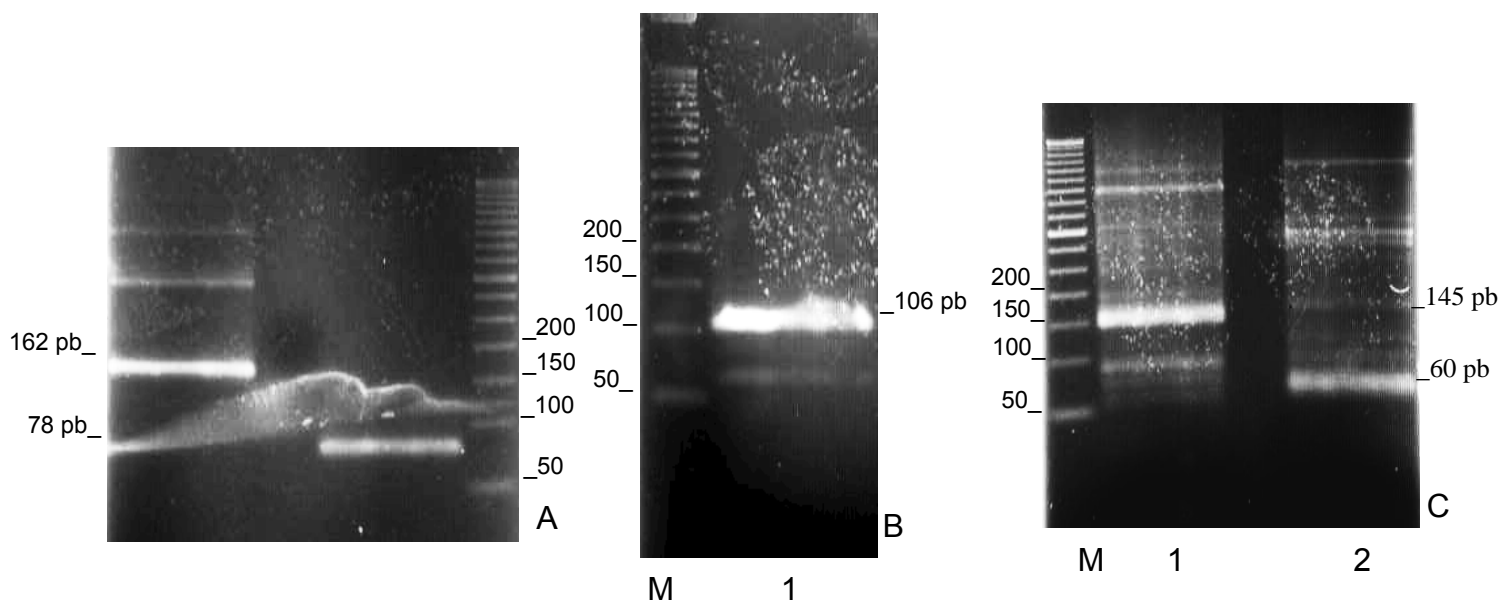


Figura 20 - Análise eletroforética em gel de agarose 3% (p/v) das reações de RT-PCR “convencional”. (A) Amplificações dos fragmentos de 162 pb de GLRaV-5, cv. Cardinal (poço 1) e de 78 pb de GVD, cv. Dolcetto (poço 2), (B) Amplificação do fragmento de 106 pb de GVA, cv. Itália, (C) Amplificação dos fragmentos de 145 pb (poço 1) e 60 pb (poço 2) do GLRaV-1, cv. Petit Syrah. Marcador 50 pb DNA (Invitrogen).

O GLRaV-5 foi parcialmente sequenciado por Good e Monis (2001) e sua ocorrência relatada em vários países onde se cultiva a videira. Talquenca et al. (2009) detectaram por DAS-ELISA o GLRaV-5 infectando videiras cv. Redglobe, na Argentina, e caracterizaram isolados com base nas ORFs HSP70h, HSP90h e CP. O isolado argentino apresentou alta identidade com sequências de outros isolados de GLRaV-5 e identidades de nucleotídeos entre 80% e 90% com isolados de GLRaV-9 e GLRaV-4, respectivamente.

```

aacactctgcttttctgctggcagaggtgtggacggttgtgttcctgagagtgacacggtg
  T L C F S A G R G V D G C V P E S D T V
tatataccgacggtcggttggtatacgaagacggaacgtacacaataggtttgggggct
  Y I P T V V G I R K D G T Y T I G L G A
ttgctagaaaaggatgtactcgtttatcgggacataaaaag
  L L E K D V L V Y R D I K

```

Figura 21 - Sequências de nucleotídeos (linha superior) e de aminoácidos deduzidos (linha inferior) obtidas para o gene incompleto (162 pb) da proteína HSP70 do *Grapevine leafroll-associated virus 5* (GLRaV-5), isolado Card.

```

          *           20           *           40           *           6
162bp-tese : AACACTCTGCTTTTCTGCTGGCAGAGGTTGTGGACGGTTGTGTTTCCTGAGAGTGACACCG : 59
LR5-26F    : AACACTCTGCTTTTCTGCTGGC----- : 22
LR5-131P   : ----- : -
LR5-188R   : ----- : -
FR822696  : AACACTCTGCTTTTCTGCTGGCAGAGGTTGTGGACGGTTGTGTTTCCTGAGAGTGACACCG : 59
AF233934  : AACACTCTGCTTTTCTGCTGGCAGAGGCGTGGACGGTTGTGTTTCCTGAGAGTGACACCG : 59
AF039552  : AACACTCTGCTTTTCTGCTGGCAGAGGCGTGGACGGTTGTGTTTCCTGAGAGTGACACCG : 59
EF103905  : AACGTTGTGTTTCTGCTGGACGAGGCGTAGATTGGTTGTGTTTCCTGAGTCAGATACGA : 59
          AACACTCTGCTTTTCTGCTGGCAGAGGCGTGGACGGTTGTGTTTCCTGAGAGTGACACCG

          0           *           80           *           100           *           1
162bp-tese : TGTATATACCACCGGTCGTTGGTATACGAAAAGACGGAACCTACACAATAGGTTTGGGG : 118
LR5-26F    : ----- : -
LR5-131P   : -----CAATAGGTTTGGGG : 14
LR5-188R   : ----- : -
FR822696  : TGTATATACCAACGGTAGTTGGTATACGAAAAGACGGAACATACACAATAGGTTTGGGG : 118
AF233934  : TGTATATACCAACGGTAGTTGGTATACGAAAAGACGGAACATACACGATAGGTTTGGGG : 118
AF039552  : TGTATATACCAACGGTAGTTGGTATACGAAAAGACGGAACATACACAATAGGTTTGGGG : 118
EF103905  : TGTATATACCAACGGTAGTTGGTGTGAGGCGTAGATTGGAACCTACACCATAGGATTGGGG : 118
          TGTATATACCAACGGTAGTTGGTATACGAAAAGACGGAACATACACAATAGGTTTGGGG

          20           *           140           *           160
162bp-tese : GCTTTGCTAGAAAAGGATGTACTCGTTTATCGGGACATAAAAAG : 162
LR5-26F    : ----- : -
LR5-131P   : GCTTTGCTAGAAAAGG----- : 30
LR5-188R   : -----TGTACTCGTTTATCGGGACATAAAAAG : 27
FR822696  : GCTTTGCTAGAAAAGGATGTACTCGTTTATCGGGACATAAAAAG : 162
AF233934  : GCTTTGCTAGAAAAGGATGTACTCGTTTATCGGGACATAAAAAG : 162
AF039552  : GCTTTGCTAGAAAAGGATGTACTCGTTTATCGGGACATAAAAAG : 162
EF103905  : GCTCTCTTGGAGAAGGATATTCTCGTGTACAGGGACATAAAGCG : 162
          GCTTTGCTAGAAAAGGATGTACTCGTTTATCGGGACATAAAAAG

```

Figura 22 - Alinhamento múltiplo da sequência parcial de nucleotídeos (162 pb) do gene da proteína HSP70 do *Grapevine leafroll-associated virus 5* (GLRaV-5), isolado Card, com quatro isolados desta espécie viral (códigos de acesso no GenBank), além dos oligonucleotídeos e sondas definidos no Quadro 6, para a amplificação por RT-PCR em tempo real.

Pei et al. (2010) realizaram a primeira detecção de GLRaV-5 em videira cv. Málaga Rose, na China sendo que a sequência de nucleotídeos do gene da proteína capsidial do isolado chinês (GQ246625) apresentou 95% de identidade de nucleotídeos com o isolado argentino de GLRaV-5 (EU815935).

```

          *           20           *           40           *
162bp-LR5  : TLCFSAGRGVDGCVPESDTVYIPTVVGIRKDGTYTIGLGALLEKDVLVYRDIK : 53
NC016081  : TLCFSAGRGVDGCVPESDTVYIPTVVGIRKDGTYTIGLGALLEKDVLVYRDIK : 53
AF039552  : TLCFSAGRGVDGCVPESDTVYIPTVVGIRKDGTYTIGLGALLEKDVLVYRDIK : 53
AF233934  : TLCFSAGRGVDGCVPESDTVYIPTVVGIRKDGTYTIGLGALLEKDVLVYRDIK : 53
EF103905  : TLCFSAGRGVDGCVPESDTIIYIPTVVGVRRDGTYTIGLGALLEKDIIVLYRDIK : 53
          TLCFSAGRGVDGCVPESDTVYIPTVVGIRKDGTYTIGLGALLEKDVLVYRDIK

```

Figura 23 - Alinhamento múltiplo da sequência parcial (53 aad) de aminoácidos deduzidos do gene da proteína HSP70 do *Grapevine leafroll-associated virus 5* (GLRaV-5), isolado Card, com quatro isolados desta espécie viral, depositados no banco de dados GenBank.

Padilla et al. (2010) identificaram, na Espanha, duas cultivares de videira (Estaladina e Tempranillo) infectadas com GLRaV-5, por RT-PCR em tempo real (TaqMan) com sondas específicas e DAS-ELISA. A identidade de aminoácidos deduzidos do gene da proteína capsidial, de ambos isolados (Est110 = HM363522 e Tem020 = HM363523), com o gene homólogo dos isolados norte-americano (AF233934) e argentino (EU815935) foi de 100%. Em outro trabalho semelhante, Engel et al. (2010) detectaram o GLRaV-5 em duas cultivares (Sauvignon Blanc e Superior), no Chile, e as sequências obtidas, para estes dois isolados (HM214148 e HM214149), mostraram 97 e 94% de identidade de nucleotídeos, respectivamente, no gene da proteína capsidial, e 99% de identidade de aminoácidos deduzidos com o isolado argentino (EU815935). Thompson et al. (2012) determinaram a identidade de nucleotídeos entre o GLRaV-5 e outras três espécies virais, associados a virose do enrolamento da folha da videira: GLRaV-9 (cerca de 75%), GLRaV-Pr (65%) e GLRaCV (59%).

Além de caracterizar parcialmente o gene da HSP70 do GLRaV-5, 37 acessos de videira, mantidos em casa de vegetação e provenientes de campo experimental ou de mudas importadas, foram indexados por meio de RT-PCR em tempo real. Foi possível detectar sete plantas infectadas com o GLRaV-5 (Quadro 18). Isto novamente enfatiza a eficiência dos reagentes utilizados para a detecção de diferentes isolados de GLRaV-5.

Kuniyuki et al. (2008), no Estado de São Paulo, detectaram o GLRaV-5 por ELISA, em baixa incidência nas cultivares avaliadas, exceto na cv. Cardinal, que apresentou 100% de infecção. É interessante destacar que, neste trabalho, identificou-se por RT-PCR em tempo real, o GLRaV-5 na cv. Cardinal (Quadro 12), a mesma cultivar avaliada por aqueles autores.

Este trabalho constitui a primeira detecção por método molecular (RT-PCR em tempo real – TaqMan) e a primeira caracterização molecular parcial de GLRaV-5 no Brasil.

4.6.3. *Grapevine virus D (GVD)*

Para o *Grapevine virus D (GVD)*, caracterizado a partir das cvs. Dolcetto e Garganega, amplificou-se, por RT-PCR convencional e com os oligonucleotídeos GVD(-v)/GVD(-c), um fragmento de DNA de tamanho esperado (852 pb), que foi,

posteriormente, clonado (Figuras 17B, 17D). As sequências deste fragmento contêm os genes completos da proteína capsidial com 486 nucleotídeos (nt) e 161 aminoácidos deduzidos (aad) e da proteína de ligação ao RNA (“RNA binding protein”), com 276 nucleotídeos (nt) e 91 aminoácidos deduzidos (aad), obtidos para dois isolados do GVD: Dolc (JQ031715) (Figura 25) e Garg (JQ031716). A proteína de ligação ao RNA (“RNA binding protein”), codificada pela ORF5 dos *Vitivirus*, tem as funções de supressora do silenciamento gênico e de determinante de patogenicidade no GVA (Du-Prezz et al., 2011), podendo ter as mesmas funções no GVD.

As massas moleculares calculadas das proteínas capsidial e de ligação ao RNA, para o isolado Dolc de GVD, foram 17,65 e 10,34, respectivamente, similares a relato anterior de Du-Prezz et al. (2011) que calcularam tais massas moleculares em 17,7 e 10,5 kDa, respectivamente.

Alternativamente, um fragmento de 78 pb do GVD, isolado Dolc, foi amplificado (Figura 20A) com os oligonucleotídeos definidos no Quadro 6, clonado, sequenciado e incluído no estudo de alinhamento múltiplo (Figura 24).

Foi realizado o alinhamento múltiplo, incluindo as sequências de nucleotídeos de 512 pb (dos fragmentos de 852 pb), obtidas para os isolados Dolc e Garg, a região homóloga do isolado italiano de GVD (Y07764), além dos oligonucleotídeos e da sonda, usados na RT-PCR em tempo real (Quadro 6) e a sequência do fragmento de 78 pb, gerado a partir desta PCR (Figura 24). Verificou-se alta similaridade entre todas as sequências alinhadas, explicando a consistente amplificação de diferentes isolados de GVD por meio da RT-PCR em tempo real.

As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos do GVD caracterizado, isolados Dolc e Garg, apresentaram altas identidades (superiores a 90%) com o isolado italiano (Y07764), único isolado com sequência disponível na região comparada dos genes CP e da proteína de ligação ao RNA (Quadro 17). Esta alta identidade (superior a 90%, Quadro 17), entre estes três isolados (Dolc e Garg, deste trabalho, e o isolado italiano de GVD), também, pode ser comprovada por meio do alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos deduzidos, considerando-se os dois genes sequenciados: proteína capsidial (Figura 26) e proteína de ligação ao RNA (Figura 27).

```

*           20           *           40           *           60
GVD-Dolc : ATGTACCTTAGGACGCTCTTCGGGTACATAGCTCTGGTGGGTACTAGTAAGAAGGCGCAG : 60
GVD-Garg : ATGTACCTTAGGACGCTCTTCGGGTACATAGCTCTGGTGGGTACTAGTAAGAAGGCGCAG : 60
78bp-tese : ----- : -
GVD-554F : ----- : -
GVD-580P : ----- : -
GVD-631R : ----- : -
Y07764 : ATGTACCTTAGGACGCTCTTCGGGTACATAGCTCTGGTGGGTACTAGTAAGAAGGCGCAG : 60
ATGTACCTTAGGACGCTCTTCGGGTACATAGCTCTGGTGGGTACTAGTAAGAAGGCGCAG

*           80           *           100          *           120
GVD-Dolc : CATTATGGGGAAGTTGATATCATAGGACCAAAGGCTAATAGGATTAATGTAGACTCTAGA : 120
GVD-Garg : CATTATGGGGAAGTTGATATCATAGGACCAAAGGCTAATAGGATTAATGTAGACTCTAGA : 120
78bp-tese : ----- : -
GVD-554F : ----- : -
GVD-580P : ----- : -
GVD-631R : ----- : -
Y07764 : CATTATGGGCTTAGTGATCTAATAGGCCCTAAGTCTAATAGGATTAATGTAGACTCTAGG : 120
CATTATGGGGAAGTTGATATCATAGGACCAAAGGCTAATAGGATTAATGTAGACTCTAGA

*           140          *           160          *           180
GVD-Dolc : GGTAGAATAAACATAAGCGAGAAGGTGGCGAGTATAATGGCTCTCAGCAGGGCAGTGAGC : 180
GVD-Garg : GGTAGAATAAACATAAGCGAGAAGGTGGCGAGTATAATGGCTCTCAGCAGGGCAGTGAGC : 180
78bp-tese : ----- : -
GVD-554F : ----- : -
GVD-580P : ----- : -
GVD-631R : ----- : -
Y07764 : GGTAAATAAACATAAGCGAGAAGGTGGCGAGTATCATGGCTCTTAGCAGAGCAGTGAGC : 180
GGTAGAATAAACATAAGCGAGAAGGTGGCGAGTATAATGGCTCTCAGCAGGGCAGTGAGC

*           200          *           220          *           240
GVD-Dolc : GAGGGACCGTTGGTGGGAGCAACTCTGAGGCAGGTGTGTGAACCGTTTCGCACAGGAAGCT : 240
GVD-Garg : GAGGGACCGTTGGTGGGAGCAACTCTGAGGCAGGTGTGTGAACCGTTTCGCACAGGAAGCT : 240
78bp-tese : ----- : -
GVD-554F : ----- : -
GVD-580P : ----- : -
GVD-631R : ----- : -
Y07764 : GAAAGGACCGTTGGTGGGTGCCTACTCTGAGGCAAAATGTGCGAACCATTTCGCACAGGAAGCT : 240
GAGGGACCGTTGGTGGGAGCAACTCTGAGGCAGGTGTGTGAACCGTTTCGCACAGGAAGCT

*           260          *           280          *           300
GVD-Dolc : TACGAGATGCTGGCTAAGATGGCTGAAATGGGACTGTACTCTCAATTGGCTCGTAAGATG : 300
GVD-Garg : TACGAGATGCTGGCTAAGATGGCTGAAATGGGACTGTACTCTCAATTGGCTCGTAAGATG : 300
78bp-tese : ----- : -
GVD-554F : ----- : -
GVD-580P : ----- : -
GVD-631R : ----- : -
Y07764 : TATGAGATGCTTGGCTAAGATGGCTGAAATGGGACTGTACTCTCAATTGGCTCGTAAGATG : 300
TACGAGATGCTGGCTAAGATGGCTGAAATGGGACTGTACTCTCAATTGGCTCGTAAGATG

*           320          *           340          *           360
GVD-Dolc : CCGAGGCTTGGCAACAAGGAACCTCAAGTGTATGTTGACTTTGCGTCCGGTCTGGATATA : 360
GVD-Garg : CCGAGGCTTGGCAACAAGGAACCTCAAGTGTATGTTGACTTTGCGTCCGGTCTGGATATA : 360
78bp-tese : ----- : -
GVD-554F : ----- : -
GVD-580P : ----- : -
GVD-631R : ----- : -
Y07764 : GCAGGCTCGCTAACCAAGGAACCTCAAGTGTATGTTGACTTTGCGTCCGGTCTGGATATA : 360
CCGAGGCTTGGCAACAAGGAACCTCAAGTGTATGTTGACTTTGCGTCCGGTCTGGATATA

*           380          *           400          *           420
GVD-Dolc : AGTCGTTTGACATTGCAAGAGGCAACTGTTATTCAAGGCTATGCATTCTCGCCTCTTTTCGT : 420
GVD-Garg : AGTCGTTTGACATTGCAAGAGGCAACTGTTATTCAAGGCTATGCATTCTCGCCTCTTTTCGT : 420
78bp-tese : ----- : -
GVD-554F : ----- : -
GVD-580P : ----- : -
GVD-631R : ----- : -
Y07764 : AGTCGCTTGACATTGCAAGAGGCTACTGTTATTCAAGGCTATGCATTCTCGCCTCTTTTCGC : 420
AGTCGTTTGACATTGCAAGAGGCAACTGTTATTCAAGGCTATGCATTCTCGCCTCTTTTCGT

*           440          *           460          *           480
GVD-Dolc : ACTGAAGGTGCTAAAGGTATTCAACGCCCAATCGTCGGTTGGAGAGCAGGCAGTTGAG : 480
GVD-Garg : ACTGAAGGTGCTAAAGGTATTCAACGCCCAATCGTCGGTTGGAGAGCAGGCAGTTGAG : 480
78bp-tese : ----- : -
GVD-554F : ----- : -
GVD-580P : ----- : -
GVD-631R : ----- : -
Y07764 : ACTGAAGGTGCTAAAGGTATTCAACGCCCAATCGTCGGTTGGAGAGCAGGCAGTTGAG : 480
ACTGAAGGTGCTAAAGGTATTCAACGCCCAATCGTCGGTTGGAGAGCAGGCAGTTGAG

*           500          *
GVD-Dolc : ATATAGATGGATGACCCATCATTCTCGCAGG : 512
GVD-Garg : ATATAGATGGATGACCCATCATTCTCGCAGG : 512
78bp-tese : ATATAGATGGATGACCCATCATTCTCGCAGG : 78
GVD-554F : ----- : -
GVD-580P : ATATAATGGA----- : 31
GVD-631R : -----TGACCCATCATTCTCGCAGG : 21
Y07764 : ATATAATGGAATGATGGATGACCCATCATTCTCGCAGG : 512
ATATAGATGGATGACCCATCATTCTCGCAGG

```

Figura 24 - Alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos (512 pb do fragmento de 852 pb) do *Grapevine virus D* (GVD), isolados Dolc e Garg (JQ031715, JQ031716, respectivamente) com o isolado italiano (Y07764), além dos oligonucleotídeos e sonda, usados na RT-PCR em tempo real, e da sequência do fragmento de 78 pb (isolado Dolc) originado desta reação. “TAG” sublinhado: codon de parada do gene CP.


```

gacgcagggatgtaccttaggacgctcttcgggtacatagctctgggtgggtactagtaag
M Y L R T L F G Y I A L V G T S K
aagggcgagcattatggggaagttgatatcataggaccaaaggctaataaggattaatgta
K A Q H Y G E V D I I G P K A N R I N V
gactctagaggtagaataaacataagcgagaaggtggcgagtataatggctctcagcagg
D S R G R I N I S E K V A S I M A L S R
gcagtgagcgggaccggttgggtgggagcaactctgaggcaggtgtgtgaaccgttcgca
A V S E G P L V G A T L R Q V C E P F A
caggaagcttacgagatgctggctaagatggctgaaatgggactgtactctcaattggct
Q E A Y E M L A K M A E M G L Y S Q L A
cgtaagatggcgaggcttggcaacaaggaacctcaagtgatgtttgactttgcgtccggt
R K M A R L G N K E P Q V M F D F A S G
ctggatataagtcgcttgacattgcaagaggcaactgttattcaggctatgcattctcgc
L D I S R L T L Q E A T V I Q A M H S R
ctctttcgtactgaaggtgctaaaggagtattcaacgccaatcgctcgggtggagagcag
L F R T E G A K G V F N A Q S S V G E Q
gcagttgagatatatagatggatgaccatcatttctcgcaggtaggagtagttatgctaag
A V E I * M D D P S F L A G R S S Y A K
aagcgtagggctaagcgatgaacgtatgtaagtgtgggtgctatattgcacaataatcct
K R R A K R M N V C K C G A I L H N N P
gactgtaggaagaagccatttccgggcacaagattgacaggttagagttcgtgaaacgg
D C R K K A I S G H K I D R L E F V K R
ggaagagtaaccctctcgggtgagactcccgctctatcggacttgattaaatgggtcgag
G R V T L S G E T P V Y R T W I K W V E
tgtgcgtacgggtatagtggtggatccttctgacgtgtcagaggtagaataaatcaataaa
C A Y G I V V D P S D V S E V E *
taaagagtaagaagcgcgcatagtgaggactaacttaagtggaagcgagcgcaatttc
cataagtagagg

```

Figura 25 - Sequências de nucleotídeos (linha superior) e de aminoácidos deduzidos (linha inferior) para os genes completos da proteína capsidial (486 pb) (start e stop codons em negrito) e da proteína de ligação ao RNA (RNA binding protein) (276 pb) (start e stop codons sublinhados) do *Grapevine virus D* (GVD), obtidas a partir da cv. Dolcetto. Código do acesso no GenBank: JQ031715.

A indexação dos 37 acessos de videira, mantidos em casa de vegetação, provenientes de campo experimental e de mudas importadas (Quadro 18), também foi realizada para o GVD por meio de RT-PCR em tempo real, conforme descrito anteriormente para GFkV e GLRaV-5, e com os oligonucleotídeos e sonda descritos por Osman e Rowhani (2008) (Quadro 6). Foi possível detectar, de maneira sensível e precisa, 20 plantas infectadas com o GVD (Quadro 18), comprovando a capacidade desta técnica em permitir a detecção de diferentes isolados deste vírus, amparada na constatação realizada de existência de baixa variabilidade entre os isolados de GVD estudados.

Este trabalho constitui o primeiro relato de *Grapevine virus D* (GVD) infectando videiras no Brasil.

4.6.4. *Grapevine virus A* (GVA)

Este estudo foi conduzido na tentativa de elucidar os resultados, parcialmente negativos, obtidos na reação triplex de RT-PCR em tempo real (item 4.4). Considerando-se que os outros oligonucleotídeos e sondas, marcadas com 6-FAM e VIC, promoveram eficientemente a detecção viral em reação duplex (item 4.3), este estudo foi direcionado para a formação da reação triplex, ou seja, para a

amplificação de um fragmento de 106 pb de GVA, e a sonda de GVA (NED-MGB-NFQ) (Quadro 6). Na figura 20B, observa-se o resultado da amplificação por RT-PCR “convencional” do fragmento de 106 pb de GVA com os oligonucleotídeos degenerados (4528F/4633R) (Quadro 6). Dois clones de cDNA foram sequenciados e a sequência obtida foi alinhada (Figura 28) e comparada (Quadro 19) com outros 12 isolados homólogos de GVA, depositados no banco de dados GenBank do NCBI.

Analisando o alinhamento da sequência do fragmento de 106 pb do GVA, isolado proveniente da cv. Itália (Figura 28) poder-se-ia inferir a respeito da dificuldade de otimização da reação triplex com estes oligonucleotídeos (4528F/4633R) e a sonda (GVA/NED-MGB-NFQ) utilizados. Tanto estes oligonucleotídeos, quanto esta sonda para GVA, apresentam posições degeneradas em relação às bases nucleotídicas (Figura 28). Em relação aos oligonucleotídeos viral (4528F), complementar (4633R) e a sonda (GVA-Trip), verificaram-se três, duas e duas posições degeneradas, respectivamente (Figura 28). Isto tem implicação na especificidade e na amplitude de isolados de GVA passíveis de serem detectados. Com base no alinhamento múltiplo apresentado na Figura 28, é possível a conversão dos oligonucleotídeos e sonda degenerados em oligonucleotídeos e sondas específicos, para a amplificação de determinado isolado ou grupo de isolados de GVA. Possivelmente esta agregação de especificidade permitiria a otimização da reação triplex, baseada nestes novos oligonucleotídeos e sonda desenhados para GVA e marcados com o fluoróforo NED.

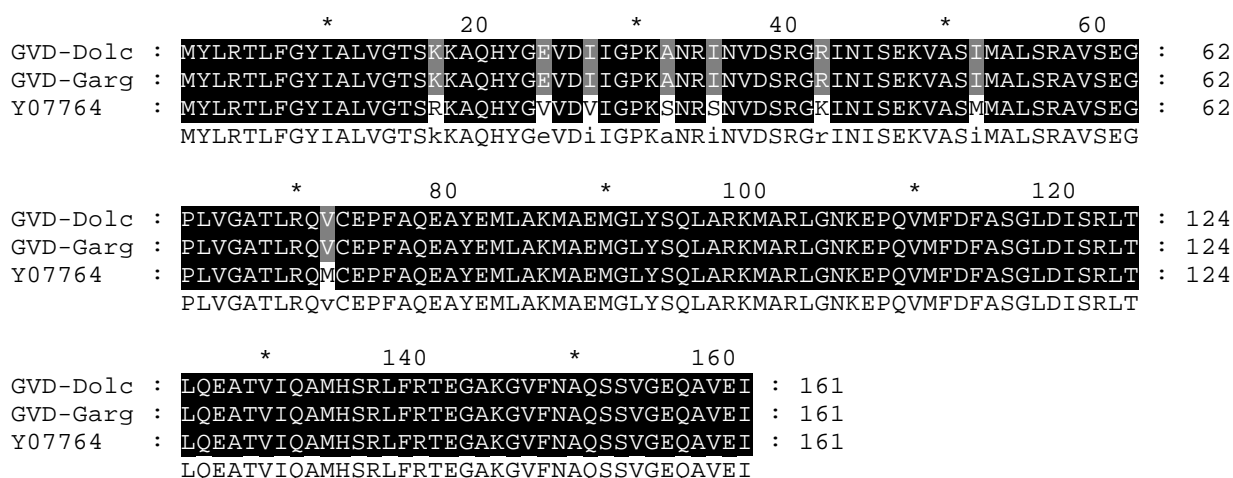


Figura 26 - Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos deduzidos do gene completo (486 pb) da proteína capsial do *Grapevine virus D* (GVD), isolados Dolc e Garg, com o isolado italiano (Y07764), única sequência homóloga disponível no banco de dados GenBank.

```

          *           20           *           40           *           60
GVD-Dolc : MDDPSFLAGRSSYAKKRRRAKRMNVCKCGAILHNNPDCRKKAI SGHKIDRLEFVKRGRVTL SGE : 63
GVD-Garg : MDDPSFLAGRSSYAKKRRRAKRMNVCKCGAILHNNPDCRKKAI SGHKIDRLEFVKRGRVTL SGE : 63
Y07764   : MDDPSFLAGRSSYAKKRRRAKRMNVCKCGAILHNNPDCRKKAI SGHKIDRLEFVKRGRVTL SGE : 63
          MDDPSFLAGRSSYAKKRRRAKRMNVCKCGAILHNNPDCRKKAI SGHKIDRLEFVKRGRVTL SGE

          *           80           *
GVD-Dolc : TPVYRTWIKWVECA YGIVVDPSD VSEVE : 91
GVD-Garg : TPVYRTWIKWVECA YGIVVDPSD ESEVE : 91
Y07764   : TPVYRTWVRWVECE YGIVVNPSE SDEE : 91
          TPVYRTWIKWVECA YGIVVDPSDeSeVE

```

Figura 27 - Alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos deduzidos do gene completo (276 pb) da proteína de ligação ao RNA ("RNA binding protein") do *Grapevine virus D* (GVD), isolados Dolc e Garg, com o isolado italiano (Y07764), única seqüência homóloga disponível no banco de dados GenBank.

```

          *           20           *           40           *           6
106bp-tese : GATCACAGGATGAGAAGCTGCTCGACTTGGAGGTAGAAAGTCTTCGCTTCTTTCTATGG : 59
GVA4528F   : GATCACARGAYGAGAARGT----- : 20
GVA-Trip   : -----TGG : 3
GVA4633R   : ----- : -
X75433     : GATCACAAGACGAGAAAGTCTCGACTTGGAGGTGAGGTCTTCGCTTCTTTCTATGG : 59
DQ855083  : GATCACAGGATGAGAAGGTGTTAGATCTGGAGGTGAGGTGCTACGTTTCTTCTCTGG : 59
DQ855082  : GATCACAAGATGAGAAGGTGTTAGATCTGGAAGTGGAGGTGCTACGTTTCTTCTCTGG : 59
DQ855081  : GATCACAGGACGAGAAAGTCTAGATCTGGAAGTAGAGGTGTTGCGTTTCTTTCTCTGG : 59
DQ855087  : GATCACAGGACGAGAAAGTCTGATCTGGAAGTGGAGGTGTTACGTTTCTTTCTCTGG : 59
AY676324  : GATCACAAGACGAGAAAGTCTGGACTTGGAGGTGAGGTCTTCGCTTCTTTCTATGG : 59
AY676326  : GATCTCAAGATGAGAAAGTCTAGATCTAGAGGTAGAAAGTCTTCGCTTCTTCTATGG : 59
AY244516  : GATCTCAAGATGAGAAAGTCTAGATCTAGAGGTAGAAAGTCTTCGCTTCTTCTATGG : 59
AF007415  : GATCTCAAGATGAGAAAGTCTAGATCTAGAGGTAGAAAGTCTTCGCTTCTTCTATGG : 59
AY676325  : GATCTCAAGATGAGAAAGTCTAGATCTAGAGGTAGAAAGTCTTCGCTTCTTCTATGG : 59
DQ855088  : GATCCCAAGACGAGAAAGATACTGGATATGGAGATAGAGGTGCTCAGATTCTTTCTCTGG : 59
DQ787959  : GATCCCAAGGATGAGAAGATACTGGACATGGAGATCGAGGTGCTCAGATTCTTCTTGG : 59
          GATCACAAGATGAGAAAGTCTAGATCTGGAGGTAGAGGTGCTTCGCTTCTTCTATGG

          0           *           80           *           100
106bp-tese : CCGGAGGATTTGATCAGGGAGTATGAGGAGCTCAAAGTATGATGATGGG : 106
GVA4528F   : ----- : -
GVA-Trip   : CCBGAGGATWT----- : 14
GVA4633R   : -----GAGCTYAARCTGATGATGGG : 20
X75433     : CCGGAAGATTTAATCAGGGAGTACGAGGAGCTTAAGCTGATGATGGG : 106
DQ855083  : CCAGAGGATTTGATAAGAGAGTATGAGGAATCAAGCTCATGATGGG : 106
DQ855082  : CCTGAGGACTTGATAAGAGAGTACGAGGAGCTCAAAGTATGATGATGGG : 106
DQ855081  : CCGAGGATTTGATCAGGGAGTACGAGGAGCTCAAAGTATGATGATGGG : 106
DQ855087  : CCGGAGGATTTGATCAGGGAGTATGAGGAGCTCAAAGTATGATGATGGG : 106
AY676324  : CCGGAAGATTTAATCAGGGAGTACGAGGAGCTTAAGCTGATGATGGG : 106
AY676326  : CCGGAGGATTTAATCAGGGAGTACGAGGAGCTTAAGCTGATGATGGG : 106
AY244516  : CCGGAGGATTTAATCAGGGAGTACGAGGAGCTTAAGCTGATGATGGG : 106
AF007415  : CCGGAGGATTTAATCAGGGAGTACGAGGAGCTTAAGCTGATGATGGG : 106
AY676325  : CCGGAGGATTTAGTCAGGGAGTACGAGGAGCTTAAGCTGATGATGGG : 106
DQ855088  : CCGGAGGAGATGATACAGGAGTACGAAAGCTCAAAGTATGATGATGGG : 106
DQ787959  : CCTGAGGAAATGATACAGGAGTATGAAAGCTCAAAGTATGATGATGGG : 106
          CCGGAGGATTTGATCAGGGAGTACGAGGAGCTCAAAGTATGATGATGGG

```

Figura 28 - Alinhamento múltiplo da seqüência parcial de nucleotídeos do gene da replicase (106 pb) do *Grapevine virus A* (GVA), isolado da cv. Itália (Pirovano 65), com outros doze isolados homólogos desta mesma espécie viral, além das seqüências de oligonucleotídeos e da sonda empregadas na reação de RT-PCR em tempo real e na obtenção deste fragmento (106 pb-GVA).

A identidade de nucleotídeos, da sequência de 106 pb do GVA, em relação a outros isolados homólogos, depositados no GenBank, variou de 78,1% (com um isolado sul-africano de videira P163-1) até 88,7% (com três isolados chileno e israelenses) (Quadro 19). Isto demonstra uma expressiva variabilidade nesta região genômica do GVA.

Quadro 19 - Identidades de nucleotídeos dos genes incompletos da replicase (60 pb) e da proteína HSP70 (145 pb) do GLRaV-1 e da replicase do GVA (fragmento de 106 pb), caracterizados neste trabalho, com outros isolados depositados em banco de dados GenBank do NCBI

Vírus (isolado local)	Isolado (estrangeiro)	% identidade de nucleotídeos	País	Hospedeira	Código Genbank (nt)
GLRaV-1 (60 pb) (isol. PS)	CN 308-1	98,3 (59/60)	Itália	<i>Vitis vinifera</i>	GU812894
	WC	93,1 (54/58)	África do Sul	Videira	EF103901
	—	76,6 (46/60)	Austrália	Videira	AF195822
GLRaV-1 (145 pb) (isol. PS)	WC	95,8 (139/145)	África do Sul	Videira	EF103901
	—	93,7 (136/145)	EUA	<i>Vitis vinifera</i>	EF195136
	—	92,9 (132/142)	Austrália	Videira	AF195822
GVA (106 pb) (isol. GVA-RS)	SA646	88,7 (95/107)	(Chile)	Videira	AY676326
	—	88,7 (95/107)	Israel	—	AY244516
	PA3	88,7 (95/107)	Israel	—	AF007415
	Bio	87,9 (95/108)	Chile	Videira	AY676325
	SA36	86,9 (93/107)	(Chile)	Videira	AY676324
	Is151	86,9 (93/107)	Itália	<i>Nicotiana benthamiana</i>	X75433
	BMo32-1	86,1 (93/108)	África do Sul	Videira cv. Merlot	DQ855087
	GTR1SD-1	86,1 (93/108)	África do Sul	Videira cv. Shiraz	DQ855081
	KWVMo4-1	84,1 (90/107)	África do Sul	Videira cv. Merlot	DQ855083
	P163-M5	82,2 (88/107)	África do Sul	Videira cv. Cinsaut Blanc	DQ855082
GTR1-1	78,8 (86/109)	África do Sul	Videira cv. Shiraz	DQ787959	
P163-1	78,1 (86/110)	África do Sul	Videira cv. Cinsaut Blanc	DQ855088	

(....) País de origem da submissão do acesso no GenBank, “_” não informado, (.../...) número de nucleotídeos (nt) idênticos em relação ao número total de nt.

A diversidade genética do GVA tem sido bastante estudada nos últimos anos. Em vinhedos sul-africanos, foi observada ampla heterogeneidade genética do GVA. Três diferentes grupos moleculares (I, II e III) foram definidos com base no polimorfismo conformacional de fita única (SSCP) (Goszczyński e Jooste, 2002). Em outro estudo, realizado com videiras da Itália, houve a confirmação da alta diversidade genética do GVA, com a identificação de um quarto grupo tentativo (Murolo et al., 2008).

4.6.5. Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1)

Em relação aos resultados obtidos para o GLRaV-1, foram testados, por meio de RT-PCR em tempo real (TaqMan), dois diferentes conjuntos de oligonucleotídeos e sondas, sendo um deles direcionado para o gene HSP70 (Osman et al., 2007) e o outro para o gene da polimerase de RNA dependente de RNA (Pacífico et al., 2011) (Quadro 6). Porém, mesmo após várias tentativas de otimização destas reações, os resultados para a detecção do GLRaV-1 foram inconsistentes, conforme ilustrado na Figura 8J, onde é possível observar curvas com o traçado em "zig-zag".

Um fragmento de DNA com 60 pb, contendo o gene incompleto da polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp), foi amplificado por RT-PCR convencional (Figura 20C), utilizando-se os oligonucleotídeos Ppoly167F/Ppoly206R, descritos por Pacífico et al. (2011) (Quadro 6). Um outro fragmento de DNA com 145 pb, contendo o gene incompleto da HSP70, também foi amplificado por RT-PCR convencional (Figura 20C), com os oligonucleotídeos HSP70-149F/HSP70-293R, descritos por Osman et al. (2007) (Quadro 6). Ambos os fragmentos foram clonados e dois clones de cada foram sequenciados, com o intuito de tentar elucidar os resultados negativos obtidos em relação a detecção do GLRaV-1 (item 4.2). Foi realizado o alinhamento múltiplo da sequência obtida (60 pb), dos oligonucleotídeos Ppoly167F/Ppoly206R e da sonda definida por Pacífico et al. (2011), além da região homóloga de três isolados do GLRaV-1 (Figura 29).

Da mesma maneira, realizou-se o alinhamento múltiplo da sequência obtida (145 pb), dos oligonucleotídeos HSP70-149F/HSP70-293R, da sonda definida por Osman et al. (2007) e da região homóloga de outros três isolados de GLRaV-1 (Figura 30).

A partir do alinhamento realizado com o fragmento de 60 pb (Figura 29) verificou-se uma divergência de nucleotídeos (C→A), na posição 26, considerando-se a sequência da sonda (LR1-190P) e a sequência do isolado brasileiro. Curiosamente, verificou-se a mesma divergência entre outros dois isolados de GLRaV-1 (EF103901 e AF195822), porém de C→T.

```

                *           20           *           40           *           60
60bp-tese : CTGACCCTATCGCTGCTACTGAGCTAGCCAGCTTGTTTTTTTGATACCTGGGTTGATGGGA : 60
LR1-167F : CTGACCCTATCGCTGCTACTGA----- : 22
LR1-190P : -----CTCGCCAGCTTGTTT----- : 15
LR1-206R : -----TTGATACCTGGGTTGATGGGA : 21
GU812894 : CTGACCCTATCGCTGCTACTGAGCTCGCCAGCTTGTTTTTTTGATACCTGGGTTGATGGGA : 60
EF103901 : CCGACCCTATCGCTGCTACAGAGCTTGCCAGCTTGTTTTTTGACCTGGGTAGATGGGA : 60
AF195822 : CCGATCCAGTGGCTGCCGCTGAACTTGCCAGTTTGTTTTTCAATACTTGGGTTGATGGAA : 60
                CTGACCCTATCGCTGCTACTGAGCTYGCCAGCTTGTTTTTTTGATACCTGGGTTGATGGGA

```

Figura 29 - Alinhamento múltiplo da sequência de nucleotídeos do gene incompleto (60 pb) da polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp) do *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1), isolado da cv. Petit Syrah, com as sequências de oligonucleotídeos e sonda, além da região homóloga de outros três isolados desta espécie viral depositados no banco de dados GenBank.

No alinhamento realizado entre o fragmento de 145 pb (Figura 30) e a respectiva sonda (HSP70-225P), foram verificadas duas divergências: na posição 87 (T→A) e na posição 90 (G→A). Coincidentemente, os isolados AF195822 e EF103901 também apresentam divergência (T→A), na posição 87; já na posição 90, o isolado AF195822 apresenta a mesma divergência de (G→A) (Figura 30).

Considerando-se a identidade de 100% entre as sequências obtidas e seus respectivos oligonucleotídeos (Figuras 29 e 30); as falhas na detecção do GLRaV-1, por RT-PCR em tempo real, poderiam ser atribuídas às homologias parciais das duas sondas que foram utilizadas. Especialmente para os vírus de RNA, ensaios baseados em sondas (a exemplo da RT-PCR em tempo real TaqMan) podem falhar em reconhecer todas as variantes (isolados, estirpes, subgrupos ou quasi-espécies) de vírus, em particular, se a mutação ocorrer dentro do sítio de pareamento da sonda, impedindo-se, assim, o pareamento da sonda e resultando em falso-negativo (James et al., 2006).

As duas sequências obtidas, para o GLRaV-1, isolado local, foram comparadas com sequências homólogas de outros três isolados “estrangeiros”, disponíveis no banco de dados GenBank do NCBI (Quadro 19). As identidades de nucleotídeos, das duas sequências obtidas para o isolado local de GLRaV-1, foram maiores com o isolado

italiano CN308-1 (GU812894) (98,3%) e com o isolado sul-africano WC (EF103901) (95,8%), considerando-se os fragmentos de 60 pb e 145 pb, respectivamente (Quadro 19). O insucesso na detecção do GLRaV-1, por meio de RT-PCR em tempo real, possivelmente, também, seria reflexo da alta variabilidade verificada entre isolados de GLRaV-1, conforme anteriormente relatado por outros autores (Little et al., 2001; Fajardo et al., 2005; Fajardo et al., 2011; Kominek et al., 2005; Karthikeyan et al., 2011; Alabi et al., 2011).

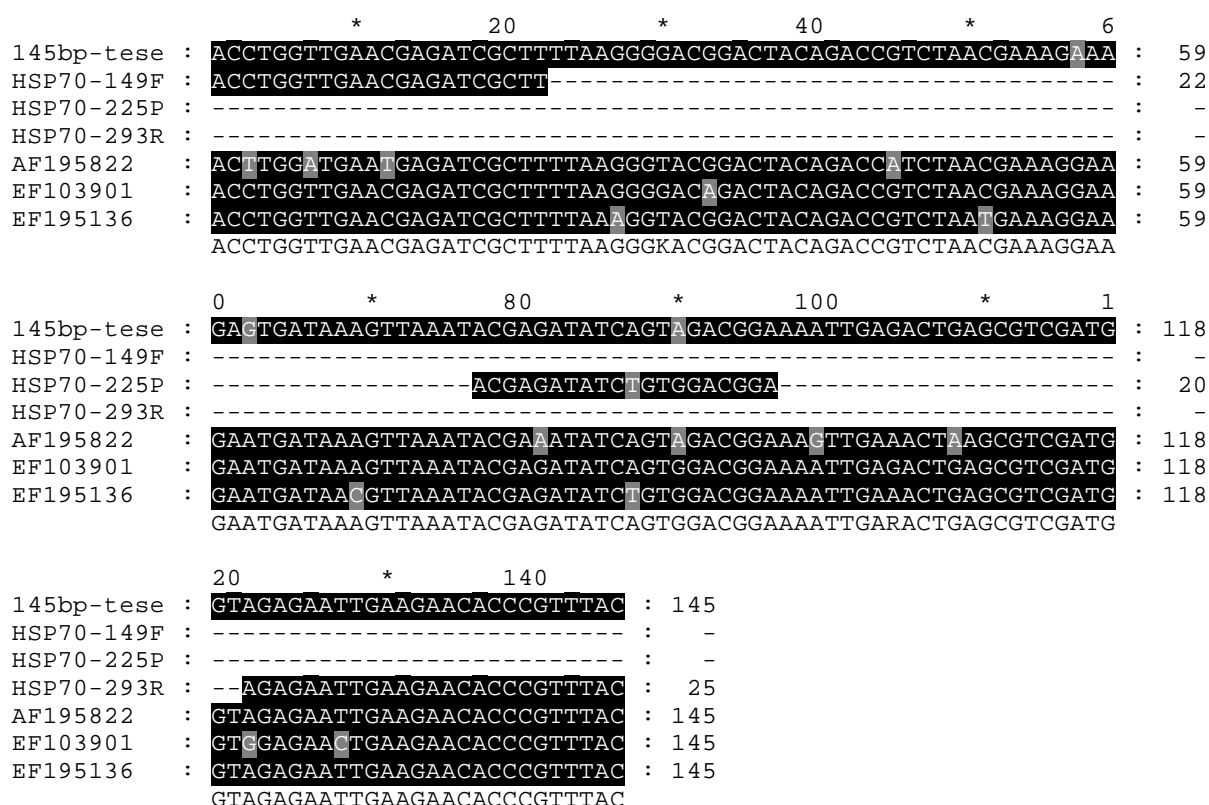


Figura 30 - Alinhamento múltiplo da sequência de nucleotídeos do gene incompleto (145 pb) da proteína HSP70 do *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1), isolado da cv. Petit Syrah, com as sequências de oligonucleotídeos e sonda, além da região homóloga de outros três isolados desta espécie viral depositados no banco de dados GenBank.

Kominek et al. (2005) analisaram a diversidade genética entre oito isolados de GLRaV-1, provenientes de videiras da República Checa e da Eslováquia, e estabeleceram a existência de dois grupos de isolados, com divergência genética de 13,9%. Alabi et al. (2011) detectaram alta variabilidade intra e intergrupos entre os isolados de GLRaV-1 incluídos no estudo. Da mesma forma, Karthikeyan et al. (2011) determinaram existir alta variabilidade (80% de identidade de nucleotídeos) entre isolados de GLRaV-1 provenientes de cultivares ornamentais de videira, e

sequências de nucleotídeos de outros isolados de GLRaV-1, disponíveis no banco de dados GenBank. Todos estes resultados corroboram a proposição de que o GLRaV-1 existe na forma de uma população heterogênea, caracterizada pela mistura de estirpes destes vírus, e, possivelmente, resultante da falta de pressão seletiva, em consequência das práticas vitícolas de propagação vegetativa e de enxertia (Little et al., 2001).

5. CONCLUSÕES

A RT-PCR em tempo real (TaqMan) é uma importante ferramenta na indexação de materiais propagativos de videira, capaz de detectar, eficientemente, diferentes espécies e isolados virais. A caracterização molecular de isolados locais contribuiu no sentido de apoiar a definição dos oligonucleotídeos e das sondas visando maior eficiência desta técnica. A implementação da técnica de detecção por RT-PCR em tempo real (TaqMan), apoiada na caracterização molecular de isolados virais divergentes, contribui para incrementar a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico viral.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAHI, I.; GRYSHAN, Y.; ROTT, M. Amplification-free detection of grapevine viruses using an oligonucleotide microarray. **Journal of Virological Methods**, 178:1-15, 2011.
- ABOU GHANEM-SABANADZOVIC, N.; SABANADZOVIC, S.; CASTELLANO, M.A.; BOSCIA, D.; MARTELLI, G.P. Properties of a new isolate of *grapevine leafroll-associated virus 2*. **Vitis**, 39:119-121, 2000.
- ABOU GHANEM-SABANADZOVIC, N.; SABANADZOVIC, S.; GUGERLI, P.; ROWHANI, A. Genome organization, serology and phylogeny of Grapevine leafroll-associated viruses 4 and 6: Taxonomic implications. **Virus Research**, 163:120-128, 2012.
- ABOU-GHANEM, N.; SABANADZOVIC, S.; MINAFRA, A.; SALDARELLI, P.; MARTELLI, G.P. Some properties of *Grapevine leafroll-associated virus 2* and molecular organization of the 3' region of the viral genome. **Journal of Plant Pathology**, 80:37-46, 1998.
- ABOU-GHANEM, N.; SALDARELLI, P.; MINAFRA, A.; BUZKAN N.; CASTELLANO M.A.; MARTELLI, G.P. Properties of *Grapevine virus D*, a novel putative trichovirus. **Journal of Plant Pathology**, 78:15-25, 1997.
- AGINDOTAN, B.O.; SHIEL, P.J.; BERGER, P.H. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan® real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, 142:1-9, 2007.
- ALABI, O.J.; ROWHANI, M.A.; KARTHIKEYAN, G.; POOJARI, S.; FUCHS M.; ROWHANI, A.; RAYAPATI, N. *Grapevine leafroll-associated virus 1* occurs as genetically diverse populations. **Phytopathology**, 101:1446-1456, 2011.
- ALKOWNI, R.; ZHANG, Y.P.; ROWHANI, A.; UYEMOTO, J.K.; MINAFRA, A. Biological, molecular, and serological studies of a novel strain of *Grapevine leafroll-associated virus 2*. **Virus Genes**, 43:102-110, 2011.
- AMORIM, L.; KUNIYUKI, H. Doenças da Videira. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 639-651.
- ANDRET-LINK, P.; LAPORTE, C.; VALAT, L.; RITZENTHALER, C.; DEMANGEAT, G.; VIGNE, E.; LAVAL, V.; PFEIFFER, P.; STUSSI-GARAUD, C.; FUCHS, M. *Grapevine fanleaf virus*: still a major threat to the grapevine industry. **Journal of Plant Pathology**, 86:183-195, 2004.
- ANGELINI, E.; BERTAZZON, N.; BORGIO, M. Diversity among *Grapevine leafroll-associated virus 2* isolates detected by heteroduplex mobility assay. **Journal of Phytopathology**, 152:416-422, 2004.

- ARIAS, M.C.; LENARDON, S.; TALEISNIK, E. Carbon metabolism alterations in sunflower plants infected with the *Sunflower chlorotic mottle virus*. **Journal of Phytopathology**, 151:267-273, 2003.
- ATALLAH, S.S.; GÓMEZ, M.I.; FUCHS, M.F.; MARTINSON, T.E. Economic Impact of Grapevine Leafroll Disease on *Vitis vinifera* cv. Cabernet Franc in Finger Lakes Vineyards of New York. **American Journal of Enology and Viticulture**, 63:73-79, 2011.
- AUGER, J.S.; ABALLAY, E.E.; PINTO, M.C.; PASTENES, C.V. Efecto del virus de la hoja en abanico (VHA) en el desarrollo y productividad de plantas de vid cv. Thompson Seedless. **Fitopatología**, 27:85-89, 1992.
- BASSO, M.F.; FAJARDO, T.V.M.; EIRAS, M.; AYUB, R.A.; NICKEL, O. Detecção e identificação molecular de vírus associados a videiras sintomáticas e assintomáticas. **Ciência Rural**, 40:2249-2255, 2010a.
- BASSO, M.F.; FAJARDO, T.V.M.; SANTOS, H.P.; GUERRA, C.C.; AYUB, R.A.; NICKEL, O. Fisiologia foliar e qualidade enológica da uva em videiras infectadas por vírus. **Tropical Plant Pathology**, 35:351-359, 2010b.
- BERTAMINI, M.; MUTHUCHELIAN, K.; NEDUNCHEZHIAN, N. Effect of *Grapevine leafroll* on the photosynthesis of field grown grapevine plants (*Vitis vinifera* L. cv. Lagrein). **Journal of Phytopathology**, 152:145-152, 2004.
- BERTAZZON, N.; ANGELINI, E. Advances in the detection of *Grapevine leafroll-associated virus 2* variants. **Journal of Plant Pathology**, 86:283-290, 2004.
- BERTAZZON, N.; BORGIO, M.; VANIN, S.; ANGELINI, E. Genetic variability and pathological properties of *Grapevine leafroll-associated virus 2* isolates. **European Journal of Plant Pathology**, 127:185-197, 2010.
- BERTOLINI, E.; GARCÍA, J.; YUSTE, A.; OLMOS, A. High prevalence of viruses in table grape from Spain detected by real-time RT-PCR. **European Journal of Plant Pathology**, 128:283-287, 2010.
- BERTOLINI, E.; OLMOS, A.; LOPEZ, M.M.; CAMBRA, M. Multiplex nested reverse transcription – polymerase chain reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastoni* pv. *savastoni* in olive trees. **Phytopathology**, 93:286-292, 2003.
- BERTOLINI, E.; OLMOS, A.; MARTINEZ, M.C.; GORRIS, M.T.; CAMBRA, M. Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colorimetric detection of six RNA viruses in olive trees. **Journal of Virological Methods**, 96:33-41, 2001.
- BEUVE, M.; SEMPÉ, L.; LEMAIRE, O. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detecting *Grapevine leafroll-associated virus 2* variants in grapevine. **Journal of Virological Methods**, 141:117-124, 2007.
- BOSCIA, D.; ASLOUJ, E.; ELICIO, V.; SAVINO, V.; CASTELLANO, M.A.; MARTELLI, G.P. Production, characterization and use of monoclonal antibodies to *Grapevine virus A*. **Archives of Virology**, 127:185-194, 1992.

BOSCIA, D.; DIGIARO, M.; SAFI, M.; GARAU, R.; ZHOU, Z.; MINAFRA, A.; ABOU GHANEM-SABANADZOVIC, N.; BOTTALICO, G.; POTERE, O. Production of monoclonal antibodies to *Grapevine virus D* and contribution to the study of its aetiological role in grapevine diseases. **Vitis**, 40:69-74, 2001.

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

BOSS, P.K.; DAVIES, C.; ROBINSON, S.P. Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. **Plant Physiology**, 111:1059-1066, 1996.

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

BOUYAHIA, H.; BOSCIA, D.; SAVINO, V.; LA NOTTE, P.; PIROLO, C.; CASTELLANO, M.A.; MINAFRA, A.; MARTELLI, G.P.; *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* is linked with grapevine vein necrosis. **Vitis**, 44:133-137, 2005.

BOVEY, R.; MARTELLI, G.P. **Directory of major viruses and virus-like diseases of grapevine**. Bari, Italy: Mediterranean Fruit Improvement Council e International Council for The Study of Viruses and Virus Diseases of the Grapevine, 1992. 111p.

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

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

CABALEIRO, C.; SEGURA, A. Temporal analyses of *Grapevine leafroll-associated virus 3* epidemics. **European Journal of Plant Pathology**, 114:441-446, 2006.

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

CASATI, P.; MINAFRA, A.; ROWHANI, A.; BIANCO, P.A. Further data on the molecular characterization of grapevine rupestris stem pitting associated virus. In: 14TH MEETING OF ICVG, Locorotondo, Italy. **Proceedings...** Locorotondo: International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), 2003. p. 130.

CEPIN, U.; GUTIÉRREZ-AGUIRRE, I.; BALAZIC, L.; POMPE-NOVAK, M.; GRUDEN, K.; RAVNIKAR, M. A one-step reverse transcription real-time PCR assay

for the detection and quantitation of *Grapevine fanleaf virus*. **Journal of Virological Methods**, 170:47-56, 2010.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, 11:113-116, 1993.

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

CHOOI, K.M.; PEARSON, M.N.; COHEN, D.; PONG, J.C.H. Sequence variation in *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3) New Zealand isolates. In: 16TH MEETING ICVG, Dijon. **Proceedings...** Dijon: International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), 2009. p. 290-291.

CHOUERI, E.; ABOU-GHANEM, N.; BOSCIA, D. *Grapevine virus A* and *Grapevine virus D* are serologically distantly related. **Vitis**, 36:39-41, 1997.

CLAIR, D.; LARRUE, J.; AUBERT, G.; GILLET, J.; CLOQUEMIN, G.; BOUDONPADIEU, E. A multiplex nested-PCR assay for sensitive and simultaneous detection and direct identification of phytoplasma in the Elm yellows group and Stolbur group and its use in survey of grapevine yellows in France. **Vitis**, 42:151-157, 2003.

CONTI, M.; MILNE, R.G.; LUISONI, E.; BOCCARDO, G. A closterovirus from a stem pitting-diseased grapevine. **Phytopathology**, 70:394-399, 1980.

CREDI, R. Characterization of grapevine rugose wood disease sources from Italy. **Plant Disease**, 81:1288-1292, 1997.

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

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

DEBRECZENI, D.E.; RUIZ-RUIZ, S.; ARAMBURU, J.; LÓPEZ, C.; BELLIORE, B.; GALIPIENSO, A.L.; SOLER, S.; RUBIO, L. Detection, discrimination and absolute quantitation of *Tomato spotted wilt virus* isolates using real time RT-PCR with TaqMan® MGB probes. **Journal of Virological Methods**, 176:32-37, 2011.

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

DOVAS, C.I.; KATIS, N.I. A spot multiplex nested RT-PCR for the simultaneous and generic detection of viruses involved in the aetiology of grapevine leafroll and rugose wood of grapevine. **Journal of Virological Methods**, 109:217-226, 2003.

DU-PREEZ, J.; STEPHAN, D.; MAWASSI, M.; BURGER, J.T. The grapevine infecting vitiviruses, with particular reference to grapevine virus A. **Archives of Virology**, 156:1495-1503, 2011.

DUBIELA, C.R.; FAJARDO, T.V.M.; EIRAS, M.; REVERS, L.F.; SOUTO, E.R.; NICKEL, O. Detecção por RT-PCR em tempo real e caracterização molecular do *Grapevine virus D* e *Grapevine leafroll-associated virus 5* em videira. In: 9º ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA UVA E VINHO E 5º ENCONTRO DE PÓS-GRADUANDOS DA EMBRAPA UVA E VINHO. Bento Gonçalves, 2011. **Resumos Expandidos...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2011. p. 26.

EIRAS, M.; RESENDE, R.O.; ÁVILA, A.C. Detecção de vírus de plantas através de reação em cadeia da polimerase. **Fitopatologia Brasileira**, 23:5-17, 1998.

ENGEL, E.A.; ESCOBAR, P.F.; ARREDONDO, V.; DOMINGUEZ, C.; PEREZ-ACLE, T.; VALENZUELA, P.D.T. Genome analysis and detection of a Chilean isolate of *Grapevine leafroll associated virus 3*. **Virus Genes**, 37:110-118, 2008.

ENGEL, E.A.; ESCOBAR, P.F.; RIVERA, P.A.; VALENZUELA, P.D.T. First report on the occurrence of *Grapevine leafroll-associated virus 5* in Chilean grapevines. **Plant Disease**, 94:1067, 2010.

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

EUN, A.J.C.; SEOH, M.L.; WONG, S.M. Simultaneous quantitation of two orchid viruses by the TaqMan real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, 87:151-160, 2000.

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

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**, 29:460, 2004.

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

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

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

FAJARDO, T.V.M.; NICKEL, O.; EIRAS, M. Detecção e caracterização molecular dos genes da proteína capsidial de ilarvirus e ampelovirus que infectam fruteiras temperadas. **Ciência Rural**, 41:5-9, 2011.

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

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

FOISSAC, X.; SVANELLA-DUMAS, L.; GENTIT, P.; DULUCQ, M.J.; MARAIS, A.; CANDRESSE, T. Polyvalent degenerate oligonucleotides reverse transcription-polymerase chain reaction: a polyvalent detection and characterization tool for trichoviruses, capilloviruses, and foveaviruses. **Phytopathology**, 95:617-625, 2005.

FROSLINE, P.L.; HOCH, J.; LIMBOY, W.F.; McFERSON, J.R.; GOLINO, D.; GONSALVES, D. Comparative effectiveness of symptomatology and ELISA for detecting two isolates of grapevine leafroll in Cabernet Franc. **American Journal of Enology and Viticulture**, 47:239-243, 1996.

FUCHS, M.; MARTINSON, T.E.; LOEB, G.M.; HOCH, H.C. Survey for the three major leafroll disease-associated viruses in Finger Lakes vineyards in New York. **Plant Disease**, 93:395-401, 2009.

GAMBINO, S.; PERRONE, I.; GRIBAUDO, I. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. **Phytochemical Analysis**, 19:520-525, 2008.

GARAU, R.; PROTA, V.A.; PIREDDA, R.; BOSCIA, D.; PROTA, U. On the possible relationship between Kober stem grooving and *Grapevine Virus A*. **Vitis**, 33:161-163, 1994.

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

GEUNA, F.; HARTINGS, H.; SCIENZA, A. A new method for rapid extraction of high quality RNA from recalcitrant tissues of grapevine. **Plant Molecular Biology Reporter**, 16:61-67, 1998.

GHANEM-SABANADZOVIC, N.A.; SABANADZOVIC, S.; SILDARELLI, P.; MARTELLI, G.P. Sequence analysis of the 3' end of three *Grapevine fleck virus*-like virus from grapevine. **Virus Genes**, 27:11-16, 2003.

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

GIRIBALDI, M.; PURROTTI, M.; PACIFICO, D.; SANTINI, D.; MANNINI, F.; CACIAGLI, P.; ROLLE, L.; CAVALLARIN, L.; GIUFFRIDA, M.G.; MARZACHI, C. A multidisciplinary study on the effects of phloem-limited viruses on the agronomical performance and berry quality of *Vitis vinifera* cv. Nebbiolo. **Journal of Proteomics**, 75:306-315, 2011.

GOLINO, D.A.; WEBER, E.; SIM, S.; ROWHANI, A. Leafroll disease is spreading rapidly in a Napa Valley vineyard. **California Agriculture**, 62:156-160, 2008.

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

GOOD, X.; MONIS, J. Partial genome organization, identification of the coat protein gene, and detection of *Grapevine leafroll-associated virus 5*. **Phytopathology**, 91:274-281, 2001.

GOSZCZYNSKI, D.E. Divergent molecular variants of *Grapevine virus B* (GVB) from corky bark (CB)-affected and CB-negative LN33 hybrid grapevines. **Virus Genes**, 41:273-281, 2010.

GOSZCZYNSKI, D.E.; JOOSTE, A.E.C. The application of single strand conformation polymorphism (SSCP) technique for the analysis of molecular heterogeneity of GVA. **Vitis**, 41:77-82, 2002.

GOUVEIA, P.; ESTEVES, F.; SANTOS, M.T.; FONSECA, F.; EIRAS-DIAS, J.E.; NOLASCO, G. Assessment of GLRaV-3 variants occurring in Portuguese grapevine varieties according to the coat protein gene. In: 16TH MEETING ICVG, 2009, Dijon, France. **Proceedings...** Dijon: International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), 2009. p. 316-317.

GOUVEIA, P.; SANTOS, M.T.; EIRAS-DIAS, J.E.; NOLASCO, G. Five phylogenetic groups identified in the coat protein gene of *Grapevine leafroll-associated virus 3* obtained from Portuguese grapevine varieties. **Archives of Virology**, 156:413-420, 2011.

GRONDAHL, B.; PUPPE, W.; HOPPE, A.; KUHNE, I.; WEIGL, J.A.; SCHMITT, H.J. Rapid identification of nine microorganisms causing acute respiratory tract infections by single-tube multiplex reverse transcription – PCR: feasibility study. **Journal of Clinical Microbiology**, 37:1-7, 1999.

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

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

HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, 6:986-994, 1996.

HENEGARIU, O.; HEEREMA, N.A.; DLOUHY, S.R.; VANCE, G.H.; VOGT, P.H. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. **Biotechniques**, 23: 504-511, 1997.

HERNÁNDEZ, D.M.S.; MORENO, P.M. **Viticultura – Técnicas de cultivo de la vid, calidad de la uva y atributos de los vinos**. Madrid: Mundi-Prensa, 2005. 325pp.

HEWITT, W.B.; GOHEEN, A.C.; CORY, L.; LUHN, C.F. Grapevine fleck disease, latent in many varieties, is transmitted by graft-inoculation. In: CONFÉRENCE DU GROUPE INTERNATIONAL D'ÉTUDE DES VIRUS ET DES MALADIES À VIRUS DE LA VIGNE, 1970, Colmar. **Proceedings...** Colmar: Annales de Phytopathologie, 1972. p. 43-47.

HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P.S.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Bio/Technology**, 10:413-417, 1992.

HOLLAND, P.M.; ABRAMSON, R.D.; WATSON, R.; GELFAND, D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, 88:7276-7280, 1991.

IANCOLINO, A.B.; GOES DA SILVA, F.; LIM, H.; CHOI, H.; WILLIAMS, L.E.; COOK, D.R. High-quality RNA, cDNA, and derived EST libraries from grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Plant Molecular Biology Reporter**, 22:269-278, 2004.

IPACH, U.; KLING, L. *Grapevine virus A* in Rheinland-Pfalz: Vorkommen und Bedeutung für den deutschen Weinbau. *Grapevine virus A*. **Gesunde Pflanzen**, 60:63-66, 2008.

ITO, T.; IEKI, H.; OZAKI, K. Simultaneous detection of six citrus viroids and *Apple stem grooving virus* from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, 106:235-239, 2002.

JAMES, D.; UPTON, C. Single primer pair designs that facilitate simultaneous detection and differentiation of peach mosaic virus and cherry mottle leaf virus. **Journal of Virological Methods**, 83:103-111, 1999.

JAMES, D.; VARGA, A.; PALLAS, V.; CANDRESSE, T. Strategies for simultaneous detection of multiple plant viruses. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 28:16-29, 2006.

JOOSTE, A.E.; MAREE, H.J.; BELLSTEDT, D.U.; GOSZCZYNSKI, D.E.; PIETERSEN, G.; BURGER, J.T. Three genetic *Grapevine leafroll-associated virus 3* variants identified from South African vineyards show high variability in their 5'UTR. **Archives of Virology**, 155:1997-2006, 2010.

KARTHIKEYAN, G.; ALABI, O.J.; NAIDU, R.A. Occurrence of *Grapevine leafroll-associated virus 1* in two ornamental grapevine cultivars in Washington State. **Plant Disease**, 95:613, 2011.

KLAASSEN, V.A.; SIM, S.T.; DANGL, G.S.; OSMAN, F.; RWAHNIH, M.; ROWHANI, A.; GOLINO, D.A. *Vitis californica* and *Vitis californica* × *Vitis vinifera* hybrids are hosts for *Grapevine leafroll-associated virus-2* and *-3* and *Grapevine virus A* and *B*. **Plant Disease**, 95:657-665, 2011.

KOKKINOS, C.D.; CLARK, C.A. Real-Time PCR assays for detection and quantification of sweetpotato viruses. **Plant Disease**, 90:783-788, 2006.

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

KOMINEK, P.; GLASA, M.; BRYXIOVA, M. Analysis of the molecular variability of *Grapevine leafroll-associated virus* reveals the presence of two distinct virus groups and their mixed occurrence in grapevines. **Virus Genes**, 31:247-255, 2005.

KOMINEK, P.; GLASA, M.; KOMINKOVA, M. Analysis of multiple virus-infected grapevine plant reveals persistence but uneven virus distribution. **Acta Virologica**, 53:281-285, 2009.

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

KUHN, G.B. Efeitos causados pelo vírus do enrolamento da folha da videira na cultivar Cabernet Franc. **Fitopatologia Brasileira**, 14:280-283, 1989.

KUHN, G.B. Manchas das nervuras da folha da videira (*Vitis* spp.), doença constatada no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, 17:435-440, 1992.

KUHN, G.B.; FAJARDO, T.V.M. Viroses da videira no Brasil. **Artigos técnicos online. Embrapa Uva e Vinho**. 2009. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/viticultura/viroses.html>>. Acesso em: 17, novembro, 2011.

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

KUNIYUKI, H. Nota sobre a ocorrência do “cascudo”, moléstia semelhante ao “legno riccio” em São Paulo. **Revista Brasileira de Fitopatologia**, 5:137, 1972.

KUNIYUKI, H. *Vitivirus* – Aspectos biológicos. **Virus Reviews e Research**, 6:33, 2001.

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

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

KUNIYUKI, H.; COSTA, A.S. Ocorrência de mais um isolado do vírus do mosaico das nervuras da videira que não causa sintomas no portaenxerto Kober 5 BB. **Fitopatologia Brasileira**, 20:618-622, 1995.

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

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

KUNIYUKI, H.; REZENDE, J.A.M.; GASPAR, J.O.; YUKI, V.A. Detecção do *Grapevine leafroll-associated virus 5* no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, 34:366-367, 2008.

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

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

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

KUTYAVIN, I.V.; AFONINA, I.A.; MILLS, A.; GORN, V.V.; LUKHTANOV, E.A.; BELOUSOV, E.S.; SINGER, M.J.; WALBURGER, D.K.; LOKHOV, S.G.; GALL, A.A.; DEMPCY, R.; REED, M.W.; MEYER, R.B.; HEDGPETH, J. 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. **Nucleic Acids Research**, 28:655-661, 2000.

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

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

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

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.;

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, 23:2947-2948, 2007.

LEÃO, P.C.S.; SOARES, J.M. **A Viticultura no Semi-Árido Brasileiro**. Embrapa Semi Árido, 2000. 366p.

LIMA, M.F. **Detecção e controle de viroses em videiras**. Petrolina: Embrapa semi-árido, 2009. 9p. Disponível em: http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/public_eletronica/downloads/CTE90.pdf. Acesso em: 05, dezembro, 2011.

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

LING, K.S.; WECHTER, W.P.; JORDAN, R. Development of a one-step immunocapture real-time TaqMan RT-PCR assay for the broad spectrum detection of *Pepino mosaic virus*. **Journal of Virological Methods**, 144:65-72, 2007.

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

LING, K.S.; ZHU, H.Y.; GONSALVES, D. Complete nucleotide sequence and genome organization of grapevine leafroll-associated virus 3, type member of the genus *Ampelovirus*. **Journal of General Virology**, 85:2099-2102, 2004

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

LÓPEZ, M.M.; LLOP, P.; OLMOS, A.; MARCO-NOALES, E.; CAMBRA, M.; BERTOLINI, E. Are Molecular Tools Solving the Challenges Posed by Detection of Plant Pathogenic Bacteria and Viruses? **Current Issues in Molecular Biology**, 11:13-46, 2009.

LOULAKIS, K.A.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS K.A.; KANELIS, A.K. Isolation of functional RNA from grapevine tissues poor in nucleic acid content. **American Journal of Enology and Viticulture**, 47:181-185, 1996.

LUNELLO, P.; MANSILLA, C.; CONCI, V.; PONZ, F. Ultra-sensitive detection of two garlic potyviruses using a real-time fluorescent (Taqman®) RT-PCR assay. **Journal of Virological Methods**, 118:15-21, 2004.

MACKENZIE, D.J.; MCLEAN, M.A.; MUKERJI, S.; GREEN, M. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Plant Disease**, 81:222-226, 1997.

MANNINI, F.; MOLLO, A.; CREDI, R. Field performance and wine quality modification in a clone of *Vitis vinifera* cv. Dolcetto after GLRaV-3 elimination. **American Journal of Enology and Viticulture**, 63:144-147, 2011.

MAREE, H.J.; FREEBOROUGH, M.J.; BURGER, J.T. Complete nucleotide sequence of a South African isolate of *Grapevine leafroll-associated virus 3* reveals a 5'UTR of 737 nucleotides. **Archives of Virology**, 153:755-757, 2008.

MARGARIA, P.; TURINA, M.; PALMANO, S. Detection of Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas, *Grapevine leafroll associated virus-1* and *-3* and *Grapevine virus A* from the same crude extract by reverse transcription-Real Time Taqman assays. **Plant Pathology**, 58:838-845, 2009.

MARTELLI, G.P. Rugose wood complex. In: GRAFT-TRANSMISSIBLE DISEASES OF GRAPEVINE, HANDBOOK FOR DETECTION AND DIAGNOSIS, 1993, Rome. **Proceedings...** Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1993. p. 45-54.

MARTELLI, G.P. Grapevine Virology Highlights 2006-09. In: 16TH MEETING OF INTERNATIONAL COUNCIL OF VIRUSES AND VIRUS DISEASES OF GRAPEVINE, 2009, Dijon, France. **Proceedings...** Dijon: International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), 2009. p. 15-23.

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

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

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

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

MELLO, L.M.R. Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2010. **Artigos técnicos on line. Embrapa Uva e Vinho**. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/prodvit2010.pdf>. Acesso em: 17, novembro, 2011.

MENG, B.; GOSZCZYNSKI, D.; GONSALVES, D. Detection of *Rupestris stem pitting associated virus-1* in the indicator *Vitis rupestris* "St. George" and sequence analysis. In: 13TH ICVG, 2000, Adelaide. **Proceedings...** Adelaide: International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), 2000. p. 43-44.

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

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**, 86:1555-1560, 2005a.

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

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

MENG, B.; ZHU, H.; GONSALVES, D. *Rupestris stem pitting associated virus-1* consists of a family of sequence variants. **Archives of Virology**, 144:2071-2085, 1999.

MENZEL, W.; JELKMANN, W.; MAISS, E. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. **Journal of Virological Methods**, 99:81-92, 2002.

MILKUS, B.N.; GOODMAN, R.N. A survey of Missouri vineyards for the presence of five grape viruses. **American Journal of Enology and Viticulture**, 50:133, 1999.

MINAFRA, A. Rugose wood of grapevines. In: 13TH MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE (ICVG), 2000, Adelaide, Australia. **Proceedings...** Adelaide: International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), 2000. p. 30-34.

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

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

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

MONIS, J.; CONSTABLE, F.; HABIL, N. Avances en el estudio de enfermedades de la vid provocadas por virus. **Revista Enología**, 6:1-8, 2010.

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

MORELLI, M.; MINAFRA, A.; BOSCIA, D.; MARTELLI, G.P. Complete nucleotide sequence of a new variant of grapevine rupestris stem pitting-associated virus from southern Italy. **Archives of Virology**, 156:543-546, 2011.

MUROLO, S.; ROMANAZZI, G.; ROWHANI, A.; MINAFRA, A.; LA NOTTE, P.; BRANZANTI, M.B.; SAVINO, V. Genetic variability and population structure of

Grapevine virus A coat protein gene from naturally infected Italian vines. **European Journal of Plant Pathology**, 120:137-144, 2008.

NAIDU, R.A.; MEKURIA, T.A. First report of *Grapevine fleck virus* from Washington Vineyards. **Plant Disease**, 94:784, 2010.

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

NASSUTH, A.; POLLARI, E.; HELMECZY, K.; STEWART, S.; KOFALVI, S.A. Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts. **Journal of Virological Methods**, 90:37-49, 2000.

NEWBURY, H.J.; POSSINGHAM, J.V. Factors affecting the extraction of intact ribonucleic acid from plant tissues containing interfering phenolic compounds. **Plant Physiology**, 60:543-547, 1977.

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

NIE, X.; SINGH, R.P. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers. **Journal of Virological Methods**, 91:37-49, 2001.

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 33:10-13, 2004.

OLIVER, J.E.; VIGNE, E.; FUCHS, M. Genetic structure and molecular variability of *Grapevine fanleaf virus* populations. **Virus Research**, 152:30-40, 2010. OSMAN, F.; LEUTENEGGER, C.; GOLINO, D.; ROWHANI, A. Real-time RT-PCR (TaqMan[®]) assays for the detection of *Grapevine leafroll associated viruses* 1-5 and 9. **Journal of Virological Methods**, 141:22-29, 2007.

OSMAN, F.; LEUTENEGGER, C.; GOLINO, D.; ROWHANI, A. Comparison of low-density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan[®] RT-PCR in detection of grapevine viruses. **Journal of Virological Methods**, 149:292-299, 2008.

OSMAN, F.; ROWHANI, A. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time RT-PCR (TaqMan[®]). **Journal of Virological Methods**, 133:130-136, 2006.

OSMAN, F.; ROWHANI, A. Real-time RT-PCR (TaqMan[®]) assays for the detection of viruses associated with Rugose wood complex of grapevine. **Journal of Virological Methods**, 154:69-75, 2008.

PACIFICO, D.; CACIAGLI, P.; PALMANO, S.; MANNINI, F.; MARZACHI, C. Quantitation of *Grapevine leafroll associated virus-1* and *-3*, *Grapevine virus A*,

Grapevine fanleaf virus and *Grapevine fleck virus* in field-collected *Vitis vinifera* L. 'Nebbiolo' by real-time reverse transcription-PCR. **Journal of Virological Methods**, 172:1-7, 2011.

PADILLA, C.V.; CRETAZZO, E.; HITA, I.; LÓPEZ, N.; PADILLA, V.; VELASCO, L. First report of *Grapevine leafroll-associated virus 5* in Spain. **Plant Disease**, 94:1507, 2010.

PALLAS, V.; SANCHEZ-NAVARRO, J.; VARGA, A.; APARICIO, F.; JAMES, D. Multiplex polymerase chain reaction (PCR) and Real-time multiplex PCR for the simultaneous detection of plant viruses. **Plant Pathology: Methods in Molecular Biology**, 508:193-208, 2009.

PAPAYIANNIS, L.C.; HARKOU, I.S.; MARKOU, Y.M.; DEMETRIOU, C.N.; KATIS, N.I. Rapid discrimination of *Tomato chlorosis virus*, *Tomato infectious chlorosis virus* and co-amplification of plant internal control using Real-Time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, 176:53-59, 2011.

PAPAYIANNIS, L.C.; IACOVIDES, T.A.; KATIS, N.I.; BROWN, J.K. Differentiation of *Tomato yellow leaf curl virus* and *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* using real-time TaqMan® PCR. **Journal of Virological Methods**, 165:238-245, 2010.

PEARSON, R.C.; GOHEEN, A.C. **Compendium of Grape Diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society Press, 1988. 93p.

PEI, G.Q.; DONG, Y.F.; ZHANG, Z.P.; FAN, X.D. First report of *Grapevine leafroll-associated virus 4* and *5* in grapevines in China. **Plant Disease**, 94:130, 2010.

PELLETIER, C.; SALAR, P.; GILLET, J.; CLOQUEMIN, G.; VERY, P.; FOISSAC, X.; MALEMBIC-MAHER, S. Triplex real-time PCR assay for sensitive and simultaneous detection of grapevine phytoplasmas of the 16SrV and 16SrXII-A groups with an endogenous analytical control. **Vitis**, 48:87-95, 2009.

PICÓ, B.; SIFRES, A.; NUEZ, F. Quantitative detection of *Cucumber vein yellowing virus* in susceptible and partially resistant plants using real-time PCR. **Journal of Virological Methods**, 128:14-20, 2005.

PIETERSEN, G. **Spread of grapevine leafroll disease in South Africa - a difficult, but not insurmountable problem**. Disponível em: <http://www.wynboer.co.za/recent/articles/articles.php3>. 2004. Acesso em: 08, novembro, 2011.

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

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

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

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

REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; McGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. (Eds.). Genus *Vitivirus*. Virus Taxonomy. In: SEVENTH REPORT OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2000, San Diego. **Proceedings...** San Diego: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2000. p. 960-964.

REID, K.E.; OLSSON, N.; SCHLOSSER, J.; PENG, F.; LUND, S.T. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. **BMC Plant Biology**, 6:27, 2006.

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

ROSA, C. **Etiology of “Rugose Wood Complex” and Functional Analysis of Grapevine virus D**. Davis: University of California, 2007. 215p. Thesis (Doctor of Philosophy in Plant Pathology).

ROSA, C.; JIMENEZ, J.F.; MARGARIA, P.; ROWHANI, A. Symptomatology and effects of viruses associated with rugose wood complex on the growth of four different rootstocks. **American Journal of Enology and Viticulture**, 62:207-213, 2011.

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

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

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: 13TH ICVG MEETING, 2000, Adelaide, Australia. **Proceedings...** Adelaide: International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), 2000. p. 37.

RUIZ-RUIZ, S.; AMBRÓS, S.; VIVES, M.C.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; GUERRI, J. Detection and quantitation of *Citrus leaf blotch virus* by TaqMan real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, 160:57-62, 2009.

SAADE, M.; APARICIO, F.; SÁNCHEZ-NAVARRO, J.A.; HERRANZ, M.C.; MYRTA, A.; DI TERLIZZI, B.; PALLÁS, V. Simultaneous detection of the three ilarviruses affecting stone fruit trees by nonisotopic molecular hybridization and multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. **Phytopathology**, 90:1330-1336, 2000.

SABANADZOVIC, S.; GHANEM-SABANADZOVIC, N.A.; SALDARELLI, P.; MARTELLI, G.P. Complete nucleotide sequence and genome organization of *Grapevine fleck virus*. **Journal of General Virology**, 82:2009-2015, 2001.

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

SALAMI, S.A.; ABADI, A.; ZAMANI, Z.; HABIBI, M.K. Distribution of GFLV in Iranian vineyards and improvements to sanitation protocols for production of virus-free grapevines. **Acta Horticulture**, 829:389-393, 2010.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd edition. **New York: Cold Spring Harbor Laboratory**, 2001. 999p.

SAMPOL, T.; BOTA, J.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. Analysis of the virus-induced inhibition of photosynthesis in malmsey grapevines. **New Phytologist**, 160:403-412, 2003.

SANCHEZ-NAVARRO, J.A.; APARICIO, F.; HERRANZ, M.C.; MINAFRA, A.; MYRTA, A.; PALLAS, V. Simultaneous detection and identification of eight stone fruit viruses by one-step RT-PCR. **European Journal of Plant Pathology**, 111:77-84, 2005.

SANCHEZ-NAVARRO, J.A.; APARICIO, F.; ROWHANI, A.; PALLAS, V. Comparative analysis of ELISA, nonradioactive molecular hybridization and PCR for the detection of *Prunus necrotic ringspot virus* in herbaceous and *Prunus* hosts. **Plant Pathology**, 47:780-786, 1998.

SAPONARI, M.; MANJUNATH, K.; YOKOMI, R.K. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan). **Journal of Virological Methods**, 147:43-53, 2008.

SAVINO, V.; BOSCIA, D.; MARTELLI, G.P. Rugose wood complex of grapevine: can grafting to *Vitis* indicators discriminate between diseases? In: 9TH MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE (ICVG), 1989, Kiryat Anavim, Israel. **Proceedings...** Kiryat Anavim: International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), 1989. p. 91-94.

SHARMA, M.A.; WANG, J.; DUFFY, S.; ZHANG, S.; WONG, M.K.; RASHED, A.; COOPER, M.L.; DAANE, K.M.; ALMEIDA, R.P.P. Occurrence of *Grapevine leafroll-associated virus* complex in Napa Valley. **PLoS ONE**, 6:1-7, 2011.

SHARMAN, M.; THOMAS, J.E.; DIETZGEN, R.G. Development of a multiplex

immunocapture PCR with colourimetric detection for viruses of banana. **Journal of Virological Methods**, 89:75-88, 2000.

SHI, B.J.; HABIL, N.; GAFNY, R.; SYMONS, R.H. Extensive variation of sequence within isolates of *Grapevine virus B*. **Virus Genes**, 29:279-285, 2004.

SHI, B.J.; HABIL, N.; SYMONS, R.H. Nucleotide sequence variation in a small region of the *Grapevine fleck virus* replicase provides evidence for two sequence variants of the virus. **Annals of Applied Biology**, 142:349-355, 2003.

STEWART, E.L.; QU, X.; OVERTON, B.E.; GILDOW, F.E.; WENNER, N.G.; GROVE, D.S. Development of a Real-Time RT-PCR SYBR Green assay for *Tomato ring spot virus* in grape. **Plant Disease**, 91:1083-1088, 2007.

TALQUENCA, S.G.; MUNÓZ, C.; GRAU, O.; GRACIA, O. First description of *Grapevine leafroll-associated virus 5* in Argentina and partial genome sequence. **Virus Genes**, 38:184-186, 2009.

TAVARES, S.C.C.H.; LIMA, M.F.; MELO, N. F. Principais doenças da videira e alternativas de controle. In: LEÃO, P.C.S.; SOARES, J.M. (Eds.). A VITICULTURA NO SEMI-ÁRIDO BRASILEIRO. Petrolina, 2000. **Resumos Expandidos...** Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2000. p. 293-346.

TERLIZZI, F.; LI, C.; RATTI, C.; QIU, W.; CREDI, R.; MENG, B. Detection of multiple sequence variants of *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* using primers targeting the polymerase domain and partial genome sequencing of a novel variant. **Annals of Applied Biology**, 159:478-490, 2011.

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

TESNIERE, C.; VAYDA, M.E. Method for the isolation of high-quality RNA from grape berry tissues without contaminating interfering phenolics compounds. **Plant Molecular Biology Reporter**, 9:242-251, 1991.

THOMAS, P.; SCHIEFELBEIN, J.W. Improved method for purification of RNA from stem tissue of grapevine and its use in mRNA profiling. **American Journal of Enology and Viticulture**, 53:231-234, 2002.

THOMPSON, J.R.; FUCHS, M.; PERRY, K.L. Genomic analysis of *Grapevine leafroll associated virus 5* and related viruses. **Virus Research**, 163:19-27, 2012.

THOMPSON, J.R.; WETZEL, S.; KLERKS, M.M.; VASKOVA, D.; SCHOEN, C.D.; SPAK, J.; JELKMANN, W. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria spp.* in combination with a plant mRNA specific internal control. **Journal of Virological Methods**, 111:85-93, 2003.

TSAI, C.W.; ROWHANI, A.; GOLINO, D.A.; DAANE, K.M.; ALMEIDA, R.P.P. Mealybug transmission of grapevine leafroll viruses: An analysis of virus-vector specificity. **Phytopathology**, 100:830-834, 2010.

TURTURO, C.; SALDARELLI, P.; YAFENG, D.; DIGIARO, M.; MINAFRA, A.; SAVINO, V.; MARTELLI, G.P. Genetic variability and population structure of grapevine leafroll-associated virus 3 isolates. **Journal of General Virology**, 86:217-224, 2005.

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

VARGA, A.; JAMES, D. Detection and differentiation of *Plum pox virus* using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: a rapid method for strain typing. **Journal of Virological Methods**, 123:213-220, 2005.

VITZTHUM, F.; GEIGER, G.; BISSWANGER, H.; BRUNNER, H.; BERNHAGEN, J.A. quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. **Analytical Biochemistry**, 276:59-64, 1999.

WANG, C.S.; VODKIN, L.O. Extraction of RNA from tissues containing high levels of procyanidins that bind RNA. **Plant Molecular Biology Reporter**, 12:132-145, 1994.

WANG, J.; SHARMA, A.M.; DUFFY, S.; ALMEIDA, R.P.P. Genetic diversity in the 3' terminal 4.7-kb region of *Grapevine leafroll-associated virus 3*. **Phytopathology**, 101:445-450, 2011.

YOKOMI, R.K.; SAPONARI, M.; SIEBURTH, P.J. Rapid differentiation and identification of potential severe strains of *Citrus tristeza virus* by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays. **Phytopathology**, 100:319-327, 2010.

ZANUS, M.C.; RIZZON, L.A.; KUHN, G.B. **Efeito da virose do enrolamento da folha na composição química do vinho Cabernet Franc**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 1993. 2p.

ZENG, Y.; YANG, T. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter**, 20:417, 2002.

ZHANG, Y.P.; UYEMOTYO, J.K.; KIRKPATRICK, B.C. Analysis of double stranded RNAs from cherry trees with stem pitting in California. **Plant Disease**, 82:871-74, 1998.