



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

**Efeitos de vírus sobre características agronômicas em
vinhedos, incidência viral em matrizeiros e caracterização
de isolados de vírus de videira, roseira e pessegueiro**

Monique Bezerra Nascimento

**Recife – PE
2015**

Monique Bezerra Nascimento

**EFEITOS DE VÍRUS SOBRE CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS EM
VINHEDOS, INCIDÊNCIA VIRAL EM MATRIZEIROS E CARACTERIZAÇÃO DE
ISOLADOS DE VÍRUS DE VIDEIRA, ROSEIRA E PESSEGUEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof.^o. Dr.^o. Gilvan Pio Ribeiro (UFRPE)

Coorientador: Dr.^o. Thor Vinícius Martins Fajardo (Embrapa Uva e Vinho)

**RECIFE-PE
FEVEREIRO – 2015**

Ficha catalográfica

N224e Nascimento, Monique Bezerra
Efeitos de vírus sobre características agronômicas em vinhedos, incidência viral em matrizeiros e caracterização de isolados de vírus de videira, roseira e pessegueiro / Monique Bezerra Nascimento. – Recife, 2015.
63 f.: il.

Orientador: Gilvan Pio Ribeiro.
Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2015.
Referências.

1. Enrolamento da folha 2. Complexo do lenho rugoso
3. PNRSV I. Ribeiro, Gilvan Pio, orientador II. Título

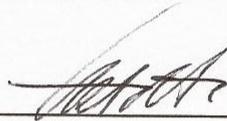
CDD 632

**EFEITOS DE VÍRUS SOBRE CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS EM
VINHEDOS, INCIDÊNCIA VIRAL EM MATRIZEIROS E CARACTERIZAÇÃO DE
ISOLADOS DE VÍRUS DE VIDEIRA, ROSEIRA E PESSEGUEIRO**

MONIQUE BEZERRA NASCIMENTO

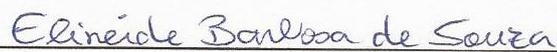
Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 27/02/2015.

ORIENTADOR:



Prof.º Dr.º. Gilvan Pio Ribeiro (UFRPE)

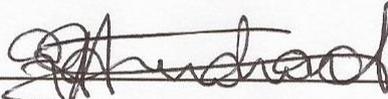
EXAMINADORES:



Prof.ª Dr.ª. Elineide Barbosa de Souza (UFRPE)



Prof.º Dr.º. Marco Aurélio Siqueira da Gama (UFRPE)



Dr.ª. Genira Pereira de Andrade (UFRPE)

RECIFE-PE

FEVEREIRO – 2015

Agradeço a

Deus por guiar meus passos, ser meu alicerce, meu amparo, tudo devo a ti Senhor.

“O Senhor é minha luz e salvação” – Sl 27 (26).

Dedico

Ao meu orientador e coorientador, que me ensinaram sobre ciência, e aos meus pais, Maria do Amparo e José Wilson, que me ensinaram sobre a vida.

Ofereço

Ao meu namorado José Janderson, pela confiança, paciência e apoio incondicional. E ao meu irmão Bryan Wilson pela amizade.

“O conhecimento serve para encantar as pessoas, não para humilhá-las”

(Mário Sergio Cortella)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Uva e Vinho), por oferecer o espaço e a infraestrutura adequada para a execução deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao professor Gilvan Pio Ribeiro, pela orientação, ensinamento, paciência e generosidade e à Dr.^a Genira Andrade pela confiança, ensinamentos, apoio e amizade.

Ao Dr. Thor Vinícius Martins Fajardo pela coorientação em todo o trabalho, pela oportunidade, dedicação e ensinamento, sendo um exemplo de bom profissional. A Marcos Fernando Vanni, pelo auxílio no desenvolvimento dos trabalhos.

A todos os professores da área de Fitossanidade da UFRPE pela contribuição para minha formação profissional, principalmente às professoras Elvira Pedrosa, Elineide Souza e Rosa Mariano por serem exemplos de bons profissionais.

Aos familiares que me apoiaram e incentivaram em todos os momentos da minha vida, em especial minha amada mãe Maria do Amparo e meu pai José Wilson, ao meu irmão Bryan Wilson, pela ajuda e amizade, aos meus padrinhos, Marlene Bezerra e Alexandre Fonseca. E ao meu namorado José Janderson, pelo companheirismo e ajuda nos momentos de dificuldade.

Aos amigos da Pousada Embrapa Simone Andzeiewski, Gisele Crizel, Sabrina Lerin, Tatiane Storch, Felipe Ferreira, Marcelo Zanelato que me acolheram na casa dos estagiários.

Aos colegas de Recife, Tamiris Joana, Josiene Veloso, Luana Alves, Mirzânia Guerra, Edilaine Melo, Elias Silva, Greecy Mirian, Kátia Felix.

Aos amigos do laboratório de Virologia da Embrapa Uva e Vinho Flávia Villa, Bruna Bassani, Monichara Marinello, Cláudia Lemes, e em especial a amiga Elen Bonilha, que tornaram os momentos de trabalho mais descontraídos e animados, além do companheirismo, amizade e carinho

À amiga Meridiana Lima, pelo acolhimento no momento mais difícil, pela amizade e carinho. À amiga-irmã Christiane Almeida pela amizade compartilhada em todos os momentos.

Às amigas de sempre e para sempre, Camila Souza, Catiane Lima e Mayara Pimentel por terem entendido minha ausência e por acreditarem em nossa amizade.

A todos aqueles, que de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho direta ou indiretamente.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO GERAL	vii
GENERAL ABSTRACT	viii
CAPÍTULO I – Introdução Geral	01
1. A videira e a importância econômica da cultura	02
2. Principais doenças virais da videira de importância econômica 04	04
.....	
2.1. Efeitos dos vírus na videira	04
3. Importância da origem do material de propagação para o manejo das	
viroses	07
4. Caracterização de vírus da videira, roseira e pessegueiro 09	09
.....	
5. Referências bibliográficas	12
CAPÍTULO II – Efeitos de vírus sobre características agronômicas em	
vinhedos e incidência viral em matrizeiros	
.....	21
Resumo	22
Abstract	23
.....	
Introdução	23
Material e Métodos 25	25
.....	
Resultados e Discussão 27	27
.....	
Referências	32
.....	
CAPÍTULO III – Caracterização de isolados de vírus em videira, roseira e	
levantamento de PNRSV em pessegueiro 43	43
.....	
Resumo	44

Abstract		44
.....		
Introdução		45
Material	e	Métodos 47
.....		
Resultados	e	Discussão 50
.....		
Referências		55
.....		
Conclusões Gerais		62

RESUMO GERAL

As viroses da videira (*Vitis* spp.) afetam severamente a produção, a qualidade da uva e diminuem a vida útil dos vinhedos. No Brasil, destacam-se, o complexo do lenho rugoso, causados por *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB) e *Grapevine virus D* (GVD), e o enrolamento das folhas, causado por *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *Grapevine leafroll-associated virus* -1 ao -4, -4 estirpe 5 (GLRaV-1 ao -4, -4 estirpe 5). A primeira parte do presente trabalho teve como objetivos avaliar os efeitos destes vírus sobre as variáveis agronômicas relacionadas ao vigor da planta, tais como, peso fresco do cacho, °Brix, peso de ramos podados, diâmetros do tronco do porta-enxerto e da copa, em plantas sintomáticas e assintomáticas em vinhedos das cultivares Niágara Rosada e Merlot, além do levantamento de vírus em matrizeiros comerciais para GRSPaV, GVA, GVB, *Grapevine fleck virus* (GFkV) e GLRaV-3. Todas as plantas foram indexadas por RT-PCR em tempo real. Videiras assintomáticas, porém infectadas, foram afetadas negativamente pela infecção viral, porém em menor intensidade, quando comparadas com as sintomáticas. Os matrizeiros testados apresentaram alta incidência de GRSPaV e GVA, ficando caracterizados como fontes de inóculo destes patógenos para vinhedos formados com esses materiais. Na segunda parte do trabalho, visou-se a caracterização molecular de isolados dos seguintes vírus: *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), agente do mosaico da roseira (*Rosa* sp.), obtido da roseira; GRSPaV, GVA e GLRaV-2, de videiras sintomáticas e assintomáticas. Apesar da importância econômica do PNRSV para as fruteiras de caroço no Brasil, apenas isolados brasileiros, obtidos de pessegueiro, tinham sido caracterizados molecularmente. Dentro de cada espécie, os isolados de GRSPaV, GVA e GLRaV-2 demonstraram altas porcentagens de identidade, de modo que, as diferenças entre eles, dificilmente, explicariam as variações na expressão e ausência de sintomas. Neste estudo, foi realizada pela primeira vez a caracterização molecular dos genes completos da capa proteica (CP) e da proteína de movimento (MP) de um isolado brasileiro do PNRSV, obtido em roseira no Brasil. Os resultados obtidos demonstraram a utilização de material propagativo livre de vírus como opção para atingir o melhor potencial agronômico das cultivares de videira e reduzir perdas ocasionadas por estes patógenos.

Palavras-chaves: Enrolamento da folha, complexo do lenho rugoso, PNRSV.

GENERAL ABSTRACT

The grapevine (*Vitis* spp.) virus diseases affect severely the production, the quality of the grape and reduce the life of the vineyards. In Brazil, among them, the complexes of rugose wood caused by *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB) and *Grapevine virus D* (GVD) and the leafroll, caused by *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) and *Grapevine leafroll-associated virus -1 to -4, -4 strain 5* (GLRaV-1 to -4, -4 strain 5) are very important. The first part of the present work had the objectives of evaluating the effects of these viruses on agronomic traits, such as, fresh weight of the bunch, °Brix, weight of pruned branches, stem diameters of rootstock and canopy, in symptomatic and asymptomatic plants in Niagara Rosada and Merlot vineyards, and to survey commercial nurseries for GRSPaV, GVA, GVB, *Grapevine fleck virus* (GFkV) and GLRaV-3. All plants were indexed by real-time RT-PCR. Asymptomatic infected grapevines, however, were affected negatively by the viral infection, but to a lesser intensity in comparison with the symptomatic ones. The nurseries presented a high incidence of GRSPaV and GVA, being characterized as sources of inoculum for vineyards formed with these materials. The second part of the work aimed the molecular characterization of isolates of the following viruses: *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), agent of rose mosaic (*Rosa* sp.), obtained from rose; GRSPaV, GVA and GLRaV-2, from symptomatic and asymptomatic grapevine plants. Despite the economic importance of PNRSV for stone fruit trees in Brazil, only peach isolates have been molecularly characterized in Brazil, it was observed high percentages of identity, among the isolates GRSPaV, GVA and GLRaV-2, which made it difficult to explain the variation in symptom expression or their absence, based on the sequence differences. In this study, it was conducted, for the first time, the molecular characterization of the complete genes to the coat protein (CP) and movement protein (MP) of a Brazilian PNRSV isolate obtained from rose. The obtained results demonstrated the high importance of using virus-free propagative materials to achieve the highest agronomic potential of the grapevine cultivars and to reduce losses caused by these pathogens.

Keywords: Leafroll, wood rugose complex, PNRSV.

CAPÍTULO I

Introdução Geral

EFEITOS DE VÍRUS SOBRE CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS EM VINHEDOS, INCIDÊNCIA VIRAL EM MATRIZEIROS E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE VIDEIRA, ROSEIRA E PESSEGUEIRO

INTRODUÇÃO GERAL

1. A videira e a importância econômica da cultura

A videira (*Vitis* spp.) é uma planta arbustiva, trepadeira, apresenta ramos longos e flexíveis, pertencente à família *Vitaceae* e ao gênero *Vitis*, com cerca de sessenta espécies, das quais aproximadamente 75% são nativas da América do Norte. É cultivada principalmente para produção de sucos, fermentados e frutos utilizados na forma *in natura*.

As espécies de maior interesse econômico são agrupadas em videiras europeias (*V. vinifera* L.), com mais de 120 cultivares conhecidas, produtoras de uvas finas, é a espécie extensivamente usada na indústria do vinho. O segundo grupo é formado pelas videiras americanas (*V. labrusca* L. e *V. bourquina* L.), com mais de 40 cultivares, produtoras de uvas comuns. (CAMARGO et al., 2011; GIOVANNINI, 2008; WALTERS; DECKER-WALTERS; POSLUSZNY, 1990; SOUSA, 1996).

Até o final da década de 50, a viticultura brasileira ficou restrita aos três estados da região Sul, o leste de São Paulo e o sul de Minas Gerais. Com a expansão da fronteira vitícola, o plantio de videiras seguiu para o Vale do Submédio São Francisco, nos estados de Pernambuco e Bahia, depois para às regiões norte do Paraná, noroeste de São Paulo e norte de Minas Gerais. Diante das exigências de mercado, ao longo dos anos, as regiões tradicionais produtoras de uva modificaram o seu sistema de produção, com o aumento das oportunidades, estimulando os viticultores a investir em tecnologias que contribuísse para aumentar o nível de desenvolvimento do setor (CAMARGO et al., 2011).

Conforme dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2014), o Brasil produziu em 2014 cerca de 1.430.940 toneladas de uva em uma área cultivada de 79.651 hectares. Destacando-se como maior produtor nacional, o estado do Rio Grande do Sul com 812.537 toneladas, correspondendo a aproximadamente 57% da produção do país.

De acordo com o Anuário Brasileiro de Fruticultura (2014), o volume destinado ao processamento em 2013 (vinhos, sucos e derivados) foi de 679.793 toneladas, representando 48,1% da produção nacional, tendo o Rio Grande do Sul contribuído com cerca de 90% deste

volume. Os restantes foram destinados ao consumo *in natura*, concentrando 733.061 toneladas, representando 51,9% da safra nacional.

A videira representa uma das culturas lenhosas amplamente cultivada em clima temperado e de modo tradicional no Sul e em regiões de altitude do Sudeste do Brasil. Nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Minas Gerais, a videira, caracteriza-se por um ciclo anual, seguido de um período de dormência induzida por baixas temperaturas no inverno. (CAMARGO et al., 2011).

A viticultura na região Sul e Sudeste do país consolidou-se com uvas americanas, predominantemente, a cultivar Isabel, ao longo, ganharam espaço uvas americanas como Herbemont, Seibel 2, Niágara Branca, Niágara Rosada e Jacquez. O mercado de vinhos brancos expandiu-se com a entrada de outras cultivares de uvas americanas como Seyve Villard 5276 e Couderc 13, em relação aos vinhos tintos e suco de uva, com as cultivares Bordô e Concord, respectivamente. A cultivar N. Rosada substituiu a cv. Isabel como uva de mesa no estado de São Paulo (CAMARGO et al., 2011).

Entre as cultivares viníferas inicialmente introduzidas no estado do Rio Grande do Sul, destacam-se as italianas como Perverella, Trebbiano, entre outras. E as cultivares varietais, como, Cabernet Franc, Merlot e Riesling Itálico, mais tarde substituídas pelas castas (variedades que produzem uvas com características enológicas específicas ou semelhantes) de origem francesa, como a Cabernet Sauvignon, Tannat, Sémillon e Chardonnay. Entre as introduções recentes no Sul do país, citam-se as cultivares Syrah, Alicante Bouschet, Chenin Blanc e Moscato Canelli (CAMARGO et al., 2011).

No vale do São Francisco a produção vinícola consolidou-se com Syrah, Alicante Bouschet, Chenin Blanc e Moscato Canelli (CAMARGO et al., 2011).

A importância das videiras americanas e híbridas estão no fato de seu sistema radicular ser mais resistente à pragas, enquanto que as uvas europeias são mais suscetíveis ao ataque de filoxera (*Phylloxera vastatrix*), um pulgão que ataca o sistema radicular da cultura. No final do século 19, este inseto dizimou a maioria dos vinhedos europeus, levando a mudanças no modo de plantio das videiras com a utilização de porta-enxertos em substituição ao pé franco. Além do controle de filoxera, a vantagem dessa técnica é a maior produtividade e qualidade da uva, além de maior tolerância a doenças de solo (BATTEY; SIMMONDS, 2005; EMBRAPA, 2003).

Em cultivares utilizadas como porta-enxertos, a seleção de material sadio é dificultada, pois as plantas infectadas, normalmente, não exibem sintomas. Por isso, recomenda-se obter material de fonte segura (EMBRAPA, 2003).

A propagação vegetativamente da videira, facilita a disseminação e favorece o ataque de vários patógenos, como agentes intracelulares infecciosos, destacando os vírus, que ocasionam grandes perdas, principalmente pelo encurtamento da vida produtiva dos vinhedos e colocando em risco a sobrevivência desses.

2. Principais doenças virais da videira de importância econômica

São relatados mais de setenta agentes infecciosos intracelulares na videira, dos quais, mais de sessenta são vírus, cinco viroides, oito fitoplasmas e um procarionte restrito ao xilema, pertencentes a aproximadamente trinta gêneros (MARTELLI, 2012). A classificação das viroses da videira inclui quatro grupos: enrolamento das folhas, complexo do lenho rugoso, mancha das nervuras e degenerescência ou declínio.

2.1. Efeitos dos vírus na videira

Os vírus são parasitas obrigatórios que de dentro da célula hospedeira comandam as principais vias metabólicas desta, ocasionando desordens nos processos bioquímicos, morfológicos e fisiológicos. Assim, quando o vírus estabelece uma relação parasitária com a planta induzem alterações citológicas na estrutura e na função dos cloroplastos, que produzem alterações nas funções fotossintéticas, nas atividades enzimáticas, no balanço hormonal, no transporte de fotoassimilados, entre outras alterações (BASSO et al., 2010; DOMICIANO et al., 2009; SAMPOT et al., 2003). Tudo isso leva a planta a uma progressiva queda de produtividade e da qualidade da produção (BASSO et al., 2010; CRETAZZO et al., 2010; DOMICIANO et al., 2009). Os efeitos dos vírus sobre a produção e a qualidade da uva não são totalmente compreendidos (CRETAZZO et al., 2010).

Apesar de constar na literatura muitos trabalhos sobre os efeitos dos vírus no desempenho agrônomo e enológico das videiras, os resultados são por vezes contraditórios (CRETAZZO et al., 2010).

Vários estudos evidenciaram os efeitos negativos induzidos pela presença dos vírus do enrolamento das folhas, especialmente o *Grapevine leafroll associated-virus 1* (GLRaV-1) e o *Grapevine leafroll associated-virus 3* (GLRaV-3), e do complexo do lenho rugoso sobre os parâmetros fisiológicos (BERTAMINI et al., 2004), de crescimento (CREDI; BABINI, 1997; MANNINI et al., 1994), rendimento e qualidade da uva, tais como intensidade de cor, acúmulo de sólidos solúveis nas bagas e acidez titulável (MANNINI et al., 2007). Em

contrapartida, alguns estudos relataram que infecções não produzem qualquer efeito sobre a produção (CABALEIRO et al., 1999) e parâmetros de qualidade (MALOSSINI et al., 2003).

Os efeitos da infecção viral em videiras variam em função da cultivar, além de condições climáticas anuais. A produção é afetada quando pelo menos um vírus está infectando a planta, contudo, infecções mistas têm efeito mais severo nos parâmetros de produção, observa-se um declínio maior no desempenho agrônômico da videira (CRETAZZO et al., 2010).

Dentre os vírus que afetam a videira, o enrolamento da folha ou Grapevine Leafroll Disease (GLD) é a virose mais disseminada e economicamente importante, em todos os países produtores de uva (NAIDU et al., 2014).

Os vírus do complexo do enrolamento das folhas pertencem à família *Closteroviridae*, com dois gêneros importantes que infectam a videira, *Closterovirus* e o *Ampelovirus*. Ao gênero *Closterovirus* inclui apenas o *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2). Os outros vírus que compõem o complexo, tais como, GLRaV-1, GLRaV-3, GLRaV-4 e GLRaV-4 estirpe 5 pertencem ao gênero *Ampelovirus* (MARTELLI, 2014). Estudos indicam que a presença do vírus GLRaV-3 seja o mais incidente nos vinhedos comerciais (KUNIUYUKI et al., 2002).

Os principais impactos causados pelos vírus do GLD na videira são redução do vigor e da longevidade e perdas significativas no rendimento (em média de 15-20%, com picos acima de 40%) e qualidade do fruto. Também afetam negativamente o desenvolvimento do sistema radicular, a enxertia e a fotossíntese em cultivares de bagas vermelhas. Sob condições de campo, há redução no tamanho dos cachos, tamanho das bagas e cachos soltos, bem como modulação de genes do hospedeiro envolvido em uma variedade de funções biológicas. A dimensão das perdas de rendimento exibidas dependem da combinação cultivar-porta-enxerto, da idade do vinhedo quando ocorreu a infecção, do agente viral, infecção simples ou mista e das condições ambientais (ATALLAH et al., 2012; MARTELLI, 2014).

No campo, os sintomas nas videiras infectadas revelam que existem vários tipos de enrolamento, diferindo no aspecto e na severidade, portanto, indica a existência de agentes causais mais agressivos. O risco de disseminação do patógeno aumenta com o uso de porta-enxertos não testados, pois, caso o porta-enxerto esteja infectado e este não apresente sintomas da doença, será facilmente propagado como material sadio (MARTELLI, 2014). Estudo recente em vinhedos localizados em Finger Lakes, Nova York (EUA), demonstrou que o complexo GLD diminui o rendimento e afeta a qualidade da fruta, dependendo do nível

de incidência da doença, causando perdas estimadas de 25.000 a 40.000 dólares por hectare (ATALLAH et al., 2012).

O lenho rugoso “grapevine rugose wood” é o principal complexo de doenças que infectam a videira. Foi relatado em 1966 por Graniti, causando grande impacto econômico em todos países produtores de uva (ROSA; ROWHANI, 2007). Fazem parte deste complexo os vírus GRSPaV junto com o GVA, GVB e GVD. Estes vírus são restritos aos tecidos floemáticos, por isso caracterizam-se por alterações no lenho, presença de caneluras/reentrâncias, engrossamento da casca, intumescimento e fendilhamento cortical dos ramos ou tronco (FAJARDO et al., 2012; MARTELLI et al., 2007). Em algumas cultivares de porta-enxertos são frequentemente assintomáticos (ROSA et al., 2011).

Os vírus do complexo lenhoso pertencem à família *Betaflexaviridae*, classificados nos gêneros *Foveavirus* e *Vitivirus*. O gênero *Foveavirus* inclui somente uma espécie economicamente importante e largamente distribuída infectando a cultura, o *Grapevine ruspestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV). O gênero *Vitivirus* possui cinco espécies, destacando-se *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB) e *Grapevine virus D* (GVD) (MARTELLI, 2014).

O GRSPaV está entre os mais frequentes e importantes vírus que afetam a videira no Brasil e em outros países (RADAELLI et al., 2009). A videira é a única hospedeira natural do GRSPaV. O vírus não é transmitido mecanicamente e não tem vetor conhecido (ROWHANI et al., 2000a), portanto sua disseminação ocorre por enxertia de gemas infectadas, enquanto que a dispersão do vírus é realizada por meio de material propagativo infectado (MARTELLI; JELKMAN, 2000). Frequentemente, este vírus é encontrado nas cultivares *V. vinifera* em infecção latente. Geralmente, quando a infecção é causada apenas pelo GRSPaV, não observa-se a indução de sintomas em seu hospedeiro e também não causa grande impacto sobre seu crescimento e rendimento, porém, quando há presença de outros vírus em infecções mistas, envolvendo GVA, *Grapevine fleck virus* (GFkV) e/ou GLRaV-1, as plantas infectadas exibem os sintomas típicos da doença do lenho rugoso. Alguns isolados de GRSPaV afetam o hospedeiro reduzindo o potencial fotossintético e aumentam a taxa respiratório no escuro. (MARTELLI, 2014; TERLIZZI et al., 2010).

O GVA é agente causal da canelura do lenho de Kober. O vírus é a espécie tipo do gênero *Vitivirus*, de grande ocorrência na maioria das regiões vitivinícolas. Sendo disseminado entre videiras de maneira semi-persistente por várias espécies de cochonilhas, e em menor escala por outras espécies de insetos. Também pode ser transmitido mecanicamente, de forma experimental, por ensaios de inoculação em plantas herbáceas pela

seiva e por cochonilhas (ALABI et al., 2013; DU PREEZ et al., 2011). Além disso, foi relatado que GVA causa perdas acima de 22% em variedades viníferas na Itália (GARAU et al., 1994).

Outro vírus importante pertencente ao gênero *Vitivirus* é o GVB, conhecido como agente causal do intumescimento dos ramos da videira, e que pode ser observado em cultivares viníferas, americanas ou híbridas, sendo transmitido por diferentes espécies de cochonilhas (LIMA; FAJARDO, 2012). O sintoma típico dessa doença é o engrossamento na região da enxertia, intumescimento dos entrenós, com fendilhamento longitudinal do tecido. O GVB causa declínio de videiras jovens. Já foi relatado na Califórnia, causando incompatibilidade na enxertia (BASSO et al., 2014; MARTELLI, 2014).

No Brasil, o GVD foi detectado infectando videiras. Pertencente à família *Betaflexiviridae*, gênero *Vitivirus*. É um vírus que ainda não se sabe a importância do impacto econômico causado a cultura (FAJARDO et al., 2012). De acordo com Rosa et al. (2011), verificou-se reduções severas no crescimento em porta-enxerto da cultivar Freedom, sem expressão dos sintomas do enrolamento no cilindro lenhoso da planta.

A doença da mancha das nervuras causado pelos vírus *Grapevine fleck virus* (GFkV) e o *Grapevine ruspestris vein feathering virus* (GRVfV), pertencentes à família *Tymoviridae*, gêneros *Maculavirus* e *Marafivirus*, respectivamente. Relatados na maioria dos países vitivinícolas e também no Brasil, estes dois vírus não são transmitidos mecanicamente e não tem vetor conhecido. Os sintomas são manchas translúcidas e sem forma definida que acompanham as nervuras, em casos mais severos, as bordas das folhas ficam voltadas para cima (BASSO et al., 2014). De acordo com Catarino et al. (2013) detectou-se por meio da RT-PCR em tempo real o GRVfV em amostras de videiras coletadas no estado de Pernambuco, este vírus antes não tinha ainda sido relatado no Brasil, apenas o GFkV. Estes vírus causam infecções latentes ou semi-latente em *V. vinifera* e muitas espécies americanas *Vitis* e cultivares de porta-enxerto híbridos. Contudo, a natureza do complexo dificulta a avaliação do seu impacto econômico, mas, já foi relatado a influência negativa deste vírus em videiras infectadas, no vigor, no ‘pegamento’ e enraizamento de estacas do porta-enxerto (MARTELLI, 2014).

3. Importância da origem do material de propagação para o manejo de viroses

Para a implementação de um vinhedo é fundamental a utilização de material de propagação de origem confiável, livre de doenças, principalmente tratando-se de agentes

virais (KUHN; FAJARDO, 2004).

A grande maioria das cultivares de videira, se não a totalidade, são suscetíveis às doenças virais, e parte dos viticultores ainda utilizam mudas com sanidade desconhecida, e ainda hoje, há alta incidência desses patógenos nas principais regiões produtoras, a exemplo da Serra Gaúcha (RS), principal polo produtor da fruta para processamento do país (PROTAS et al., 2002; KUHN; FAJARDO, 2004).

Os principais danos e sintomas associados à infecção viral em videiras são perdas contínuas e graduais do vigor da planta, produção reduzida, coloração (avermelhamento ou amarelecimento) anormal das folhas, folhas com aparência atípica (bordos enrolados, textura rugosa e bolhosidade na superfície do limbo foliar), brotação irregular dos ramos, engrossamento e amadurecimento irregular dos ramos, presença de caneluras no lenho (ranhuras sob a casca do tronco) e casca do tronco com aparência alterada (espessa e com rachaduras), além do amadurecimento irregular e menores teores de açúcares na uva (FAJARDO, 2011).

Com isso, observa-se que as viroses afetam severamente à produção, qualidade da uva e podem causar tanto a morte de plantas jovens quanto de adultas, além de diminuir evidentemente a vida útil das videiras (KUHN; FAJARDO, 2004). Estas perdas vêm sendo registradas em vários países produtores de uva, e podem chegar até 70% da produção e diminuição de 4°Brix no teor de açúcar (KUHN; FAJARDO, 2004).

A principal medida de controle das viroses da videira baseia-se na utilização de material propagativo sadio. Como alguns dos vírus que infectam a videira podem ser latentes em muitas cultivares comerciais ou porta-enxertos, ou seja, as plantas quando infectadas não mostram os sintomas característicos da doença, é impossível identificar plantas sadias pela simples observação no campo (EMBRAPA, 2003).

A maior competitividade do mercado e o setor vitivinícola brasileiro cada dia mais exigente fez com que, nestes últimos anos, ocorresse um avanço no uso de sistemas de certificação da produção, quanto a qualidade do produto, segurança alimentar e proteção ambiental (CAMARGO et al., 2011).

Por isso, é indispensável adquirir material propagativo (estaca do porta-enxerto e gema da produtora) de viveiristas credenciados e regularmente fiscalizado pela Secretaria Estadual de Agricultura. Da mesma forma, deve-se verificar a identidade do porta-enxerto e da cultivar enxertada e a sanidade das mudas, particularmente com relação às viroses. Caso não tenha estes cuidados há comprometimento da viabilidade econômica do empreendimento, pela introdução de focos de doenças e pragas de difícil controle (EMBRAPA, 2003).

4. Caracterização de vírus da videira, roseira e pessegueiro

Devido as replicações imprecisas e o curto período de geração, os vírus de RNA têm a possibilidade de formar grande diversidade populacional. Estudos demonstram que os vírus devido a sua maior variabilidade, uma correlação entre a frequência de mutação e a gama de hospedeiros dos vírus. Um vírus com taxa de mutação superior é mais provável adaptar-se a uma variedade de plantas hospedeiras, mediante transmissão por insetos e pode significar sobrevivência em um ambiente natural (ROOSSINCK, 2003; SCHNEIDER et al., 2000; SCHNEIDER et al., 2001).

Os vírus de RNA persistem como uma população não idêntica, intimamente relacionados como variantes mutantes e recombinantes, conhecidos como quase-espécie viral. Isto ocorre, devido à sujeição de um vírus a uma constante variação genética, competição e seleção, que permite às populações virais sobreviver, adaptar-se e causar doenças (DOMINGO et al., 1998; FORNS et al., 1999; MARTELL et al., 1992).

Em videiras do sul da África foi observado que GVA tem uma heterogeneidade molecular ampla. Foram formados três grupos moleculares distintos (I, II e III) baseados no polimorfismo conformacional de fita simples “single-strand conformational polymorphism” (SSCP), através do estudo de diferentes regiões genômicas curtas da sequência de variantes de GVA (GOSZCZYNSKI; JOOSTE, 2003). Cada grupo deu origem a uma sintomatologia diferente na hospedeira herbácea *Nicotiana benthamiana*, que variou entre o clareamento leve de nervuras a necrose irregular generalizada. Variantes leves (grupo III) compartilhou apenas 78-79,6% de identidade da sequência com outros nucleotídeos variantes na parte 3' final do genoma viral (parte da ORF 3, toda a ORF 4, ORF 5 e parte da UTR 3') (GOSZCZYNSKI; JOOSTE, 2003). Estudo realizado na Itália em videiras, confirmou a elevada diversidade molecular do vírus GVA. Trinta e sete isolados de GVA foram submetidos a análise comparativa de RT-PCR-RFLP do gene da proteína capsidial (CP). Estes aglomeram-se em quatro grupos moleculares, três previamente identificados por Goszczyński e Jooste (2002) e um quarto (IV) suposto grupo (MUROLO et al., 2008)

O vírus GLRaV-2 tem características genômicas distintas que o separa dos outros GLRaVs. Este vírus ocorre divergentes variantes moleculares segregado em seis linhagens distintas (JARUGULA et al., 2010). Variantes de GLRaV-2 envolve-se em uma gama de propriedades fitopatológicas, incluindo enrolamento da folha, incompatibilidade na união da enxertia em porta-enxertos sensíveis, declínio de videiras jovens e doença da lesão no tronco do porta-enxerto (ALKOWNI et al., 2011; GREIF et al., 1995).

Vários isolados de GLRaV-2 foram identificados e caracterizados a nível mundial infectando videiras (MENG; GONSALVES, 2007). Na Suíça, uma videira da cv. Chasselas foi identificada com infecção mista de GLRaVs, incluindo o closterovirus antes identificado como GLRaV-IIb e subsequentemente denominado como GLRaV-2 (BOSCIA et al., 1995; GUGERLI; RAMEL, 1993). Na França, um isolado de GLRaV-2 foi caracterizado (ZIMMERMAN et al., 1990) e demonstrou ser semelhante ao vírus previamente caracterizado da Suíça (BOSCIA et al., 1995). Dois isolados da África do Sul, com o nome 94/970 e 93/955, que induziam sintomas diferentes em *N. benthamiana*, foram recuperados a partir cv. Muscat de Alexandria e LN33 híbrido, respectivamente (GOSZCZYNSKI et al., 1996).

O GRSPaV apresenta grande grau de variação genética, que compreende uma ampla gama de sequências variantes. Os altos níveis de diversidade genética foram reconhecidos inicialmente quando os primeiros isolados de GRSPaV estavam sendo sequenciados (MENG; GONSALVES, 2007). A existência de diferentes grupos de variantes virais foi confirmada por vários estudos (CASATI et al., 2003; ROWHANI et al., 2000b; SANTOS et al., 2003; TERLIZZI; CREDI, 2003). Por exemplo, Rowhani et al. (2000b) analisaram a diversidade genética de 17 isolados de GRSPaV usando primers RSP52 e RSP53 que têm como alvo a região genômica de 905 nts flanqueados no gene da proteína capsidial. Identificaram-se três principais grupos de variantes virais, que provisoriamente foram chamados de linhagens 1, 2 e 3. Para as análises das sequências, os autores utilizaram primers que tem como o gene alvo a CP.

Para comparar a eficácia de diferentes primers para o domínio da helicase (RSP13 e RSP14) ou da região central da CP (RSP21 e RSP22), Meng et al. (2006) realizaram uma análise da diversidade genética de 24 isolados de GRSPaV, obtidos de cultivares de copa e porta-enxerto. Os dois pares de primers apresentaram um espectro semelhante no que diz respeito aos tipos de variantes virais que foram detectados, sendo os quatro grupos de variantes designados I a IV.

O vírus PNRSV é mundialmente distribuído, causando doenças em fruteiras de caroço e roseira. De acordo com Fiore et al. (2008), o mesmo tem sido detectado em vários países da América do Sul e em diferentes espécies de hospedeiros, há poucos dados da caracterização molecular do PNRSV em isolados de *Prunus* spp.

O PNRSV pertencem à família *Bromoviridae*. No subgrupo três do gênero *Ilarvirus*, todos os membros caracterizam-se por uma mesma organização genômica, consistindo de uma fita simples tripartida de RNA (Figura 1). Os RNAs 1 e 2 codificam as subunidades de replicase P1 e P2, respectivamente, enquanto que o gene RNA3, que foi o gene isolado neste

trabalho, é bicistrônico codifica a proteína de movimento (MP ou P3) e a proteína capsial (CP), ao qual o MP tem como função movimento através do plasmodesma e a CP função estrutural, o último gene é sintetizado a partir de um RNA subgenômico (sgRNA4) proveniente do RNA3. Todos RNAs genômicos contém uma estrutura cap em sua extremidade 5' e no final uma cauda poliA no 3' (PALLAS et al., 2012).

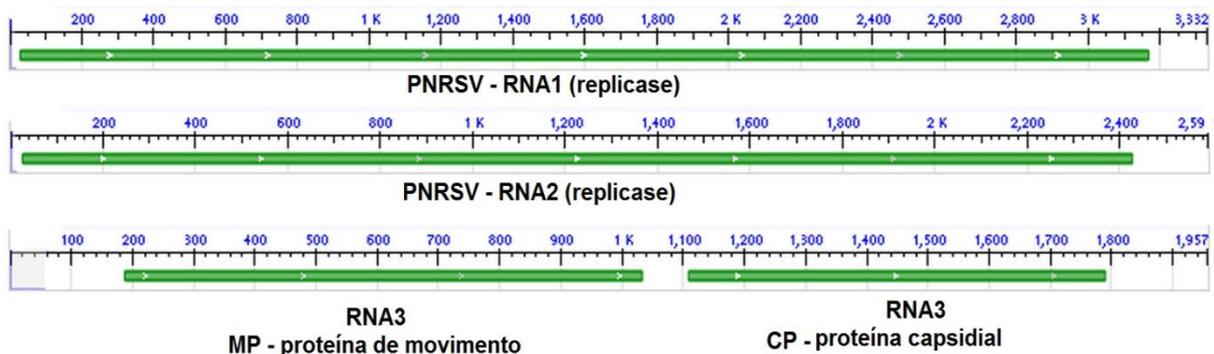


Figura 1. Organização genômica do vírus PNRSV. Os RNA1 e RNA2 codificam para a replicação, RNA3 codifica as proteínas de movimento (MP) e capsial (CP). CP tem função estrutura (partícula viral) e MP formação do complexo ribonucleoprotéico para movimento viral pelo plasmodesma.

Diferentes isolados de PNRSV têm sido caracterizados e agrupados filogeneticamente em três subgrupos, PV32-I, PV96-II e PE5-III (APARICIO et al., 1999; HAMMOND, 2003). Análises de diferentes isolados revelaram falta de associação entre padrões de nucleotídeos específicos ou aminoácidos e a origem do hospedeiro, sintomatologia ou área geográfica. No entanto, a maioria dos isolados dos filogrupos PV96-II e PV32-I, tende a exibir sintomas latente/suave ou clorótico/necrótico, respectivamente (APARICIO et al., 1999; HAMMOND, 2003). Análises moleculares da codificação das sequências de CP e MP revelaram que ambas as proteínas são altamente conservadas, apesar do tipo de hospedeiro e origem geográfica dos isolados inicialmente comparados (APARICIO et al., 1999).

Dessa forma, os objetivos desse trabalho foram avaliar variáveis agronômicas relacionadas ao vigor da planta, tais como, peso fresco do cacho, °Brix, peso de ramos podados, diâmetros do tronco do porta-enxerto e da copa, em videiras assintomáticas e sintomáticas para viroses do enrolamento da folha (GLRaV-1, ao -4 estirpe -5) e do lenho rugoso (GVA, GVB, GVD, GRSPaV), além do levantamento de vírus em matrizeiros comerciais para os vírus GRSPaV, GVA, GVB, GfKv e GLRaV-3 e caracterizar molecularmente isolados de GRSPaV, GVA, GLRaV-2, de plantas sintomáticas e assintomáticas em videiras e PNRSV em roseira e levantamento de PNRSV em pessegueiro.

5. Referências bibliográficas

ALABI, O. J.; POOJARI, S.; SARVER, K.; MARTIN, R. R.; NAIDU, R. A. Complete genome sequence analysis of an American isolate of grapevine virus E. **Virus Genes**, Boston, v. 46, p. 563-566, 2013.

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**, Boston, v. 43, p. 102-110, 2011.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2013.136 p.

APARICIO, E.; MYRTA, A.; DI TERLIZZI, B.; PALLAS, V. Molecular variability among isolates of *Prunus* necrotic ringspot virus from different *Prunus* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v. 89, p. 991–999, 1999.

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**, Davis, v. 63, p. 73-79, 2012.

BASSO, M. F., FAJARDO, T. V. M., PIO-RIBEIRO, G., EIRAS, M.; ZERBINI, F. M. Avanços e perspectivas no estudo das doenças virais e subvirais em videira com ênfase na realidade brasileira. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 22, p.160-207, 2014.

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**, Brasília, v. 35, p. 351-359, 2010.

BATTEY, N. H.; SIMMONDS, P. E. Phylloxera and the grapevine: a sense of common purpose? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, p. 3029–3031, 2005.

- BERTAMINI, M.; MUTHUCHELIAN, K.; NEDUNCHEZHIAN, N. Effect of Grapevine leafroll on the photosynthesis of field grown grapevine plants (*Vitis vinifera* L. cv. *Lagrein*). **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, p. 145-152, 2004.
- BOSCIA, D.; GREIF, C.; GUGERLI, P.; MARTELLI, G. P.; WALTER, B.; GONSALVES, D. Nomenclature of grapevine leafroll-associated putative closteroviruses. **Vitis**, Siebeldingen, v. 34, p. 171–175, 1995.
- 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**, Davis, v. 50, 1999. p. 4044.
- CAMARGO, U. A.; TONIETTO, J.; HOFFMANN, A. Progressos na viticultura brasileira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, volume especial, p. 144-149, 2011.
- CASATI, P.; MINAFRA, A.; ROWHANI, A.; BIANCO, P. A. Further data on the molecular characterization of *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus*. In: PROCEEDINGS OF THE 14th CONGRESS OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUS AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE (ICVG), 2003, Locorotondo. **Abstracts...** Locorotondo: ICGV, 2003. 130 p.
- CATARINO, A. M.; FAJARDO, T. V. M.; EIRAS, M.; PIO-RIBEIRO, G.; NICKEL, O. Detection and partial molecular characterization of isolates of *Grapevine leafroll-associated virus 4* and *Grapevine rupestris vein feathering virus*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 2013. Viçosa. **Anais...** Viçosa: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2013.
- 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**, Davis, v. 48, p. 7-12, 1997.
- CRETAZZO, E.; PADILHA, C.; CARAMBULA, C.; HITA, I.; SALMERÓN, E.; CIFRE, J. Comparison of the effects of different virus infections on performance of three Majorcan

grapevine cultivars in field conditions. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 156, p. 1-12, 2010.

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**, Passo Fundo, v. 17, p. 305-339, 2009.

DOMINGO, E.; BARANOWSKI, E.; RUIZ-JARABO, C. M.; MARTIN-HERNANDEZ, A. M.; SAIZ, J. C.; ESCARMIS, C. Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 4, p. 521-527, 1998.

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Uvas Viníferas para Processamento em Regiões de Clima Temperado**. Embrapa Uva e Vinho, 2003. (Sistema de Produção, n.4). Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/index.htm>>. Acesso em: 12 mar. 2014.

FAJARDO, T. V. M. Controle de Doenças Causadas por Vírus. In: GARRIDO, L. R., HOFFMANN, A.; SILVEIRA, S. V. (Eds). Boas Práticas Agrícolas - BPA. Uva para Processamento – v. 4. Boas Práticas Agrícolas na Viticultura: Manejo de Pragas e Doenças. Programa de Desenvolvimento da Cadeia Produtiva de Vinhos, Espumantes e Sucos de Uva. Brasília: **SEBRAE**; Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho: IBRAVIN, p. 53-74, 2011.

FAJARDO, T. V. M., EIRAS, M., NICKEL, O., DUBIELA, C. R., SOUTO, E. R. Detection and partial molecular characterization of *Grapevine fleck virus*, *Grapevine virus D*, *Grapevine leafroll-associated virus 5* and *6* infecting grapevines in Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, p. 2127-2130, 2012.

IORE, N.; FAJARDO, T. M. V.; PRODAN, S.; HERRANZ, M. C.; APARICIO, F.; MONTEALEGRE, J.; ELENA, S. F.; PALLÁS, V.; SÁNCHEZ-NAVARRO, J. Genetic

diversity of the movement and coat protein genes of South American isolates of *Prunus necrotic ringspot virus*. **Archives of Virology**, New York, v. 153, p. 909-919, 2008.

FORNS, X.; PURCELL, R. H.; BUKH, J. Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus. **Trends in Microbiology**, London, v. 70, p. 402-410, 1999.

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

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

GOSZCZYNSKI, D. E.; GOSZCZYNSKI, G. G. F.; PIETERSEN, G. Western blot reveals that grapevine virus A and B are serologically related. **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 144, p. 581-583, 1996.

GOSZCZYNSKI, D. E.; JOOSTE, A. E. C. Application of single strand conformation polymorphism (SSCP) technique for the analysis of molecular heterogeneity of grapevine virus A. **Vitis**, v. 41, p. 77-82, 2002.

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

GREIF, C.; GARAU, R.; BOSCIA, D.; PROTA, V. A.; FIORI, M.; BASS, P.; WALTER, B.; PROTA U. The relationship of *Grapevine leafroll-associated closterovirus 2* with a graft incompatibility condition of grapevine. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 34, p. 167-173, 1995.

GUGERLI, P.; RAMEL, M. E. Grapevine leafroll associated virus II analyzed by monoclonal antibodies. In: PROCEEDINGS OF THE 11th CONGRESS OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUS AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE (ICVG), 1993, Montreux. **Extended Abstracts**... Montreux: ICVG, 1993. p. 23-24.

HAMMOND, R.W. Phylogeny of isolates of *Prunus necrotic ringspot virus* from the Ilarvirus ringtest and identification of group-specific features. **Archives of Virology**, New York, v. 148, p. 1195–1210, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA** [on line].. Banco de dados agregados. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2014. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp>>. Acesso em: 12 mar. 2014.

JARUGULA, S.; ALABI, J.O.; MARTIN, R.R.; NAIDU, R.A. Genetic variability of natural populations of *Grapevine leafroll-associated virus 2* in Pacific Northeast vineyards, **Phytopathology**, St. Paul, v. 100, p. 698-707, 2010.

KUHN, G. B.; FAJARDO, T. V. M. **Importância da origem do material de propagação na qualidade da muda de videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. 8p. (Circular Técnica 50).

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

LIMA, M. F.; FAJARDO, T. M. V. Doenças causadas por vírus. In: LIMA, M. F; MOREIRA, F. R.B. (ed.) **Uva de mesa: fitossanidade**. 2. ed. Brasília: Embrapa, 2012. p. 43-58 (Frutas do Brasil, 14).

MALOSSINI, U.; CICCOTTI, A. M.; BRAGAGNA, P.; VINDIMIAN, M. E.; MOSER, S.; VERSINI, G.; NICOLINI, G. Changes in agronomical and oenological performances of clones of the grapevine cv. Gewürztraminer after GFLV elimination by heat therapy. In: PROCEEDINGS OF THE 14th ICVG, MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUS AND VIRUS-FREE DISEASES OF THE GRAPEVINE, 2003, Locorotondo. **Abstract...** Locorotondo: ICVG, 2003. p. 252–255.

MANNINI, F.; AGRAMANTE, N.; CUOZZO, D.; CREDI, R. Effetto del risanamento da accartocciamento fogliare (GLRaV-3) sul comportamento produttivo e sulla qualità delle uve di un clone di Moscato Bianco (*Vitis vinifera* L.). **Italus Hortus**, Bari, v. 14, p. 204–207, 2007.

MANNINI, F.; CREDI, R.; ARGAMANTE, N. Changes in field performance of clones of the grapevine cv. Nebbiolo after virus elimination by heat therapy. In: 6th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON GRAPE BREEDING, 1994, Yalta. **Abstract...** Yalta: International Symposium on Grape Breeding, 1994. p. 117-122.

MARTELL, M.; ESTEBAN, J. T.; QUER, J.; GENESCA, J.; WEINER, A.; ESTEBAN, R.; GUARDIA, J.; GOMEZ, J. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. **Journal of Virology**, Washington, v. 66, p. 3225-3229, 1992.

MARTELLI, G. P. Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 96 (1S), 2014. 136 p.

MARTELLI, G. P. Grapevine Virology Highlights: 2010-2012. In: PROCEEDINGS OF THE 11th CONGRESS OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUS AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE (ICVG), 2012, Davis. **Extended Abstract...** Davis: ICVG, 2012. p.13-31.

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

MARTELLI, G. P.; JELKMANN, W. Genus *Foveavirus*. In: REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. (Eds.). **Virus Taxonomy - Classification and Nomenclature of Viruses**. San Diego: Academic Press, 2000. p. 985-989.

MENG, B.; GONSALVES, D. *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus: A decade of research and future perspectives*. **Plant Viruses**, v. 1, p. 52-62, 2007.

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

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**, Dordrecht, v. 120, p. 137-144, 2008.

NAIDU, R.; ROWHANI, A.; FUCHS, M.; GOLINO, D.; MARTELLI, G.P. Grapevine leafroll: A complex viral disease affecting a high-value fruit crop. **Plant Disease**, St. Paul, v. 98, p. 1172-1185, 2014.

PALLAS, V.; APARICIO, F.; HERRANZ, M. C.; AMARI, K.; SANCHEZ-PINA, M. A.; MYRTA, A.; SANCHEZ-NAVARRO, J. A. Ilarviruses of *Prunus* spp.: A continued concern for fruit trees. **Phytopathology**, St. Paul, v. 102, p. 1108-1120, 2012.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A.; MELLO, L. M. R. de. A viticultura brasileira: realidade e perspectivas. In: VITICULTURA E ENOLOGIA – ATUALIZANDO CONCEITOS. 1º SIMPÓSIO MINEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, Andradas, 2002. **Anais...2002**. p. 17-32.

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**, Brasília, v. 34, p. 297-305, 2009.

ROSSINCK, M. J. Plant RNA virus evolution. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 6, p. 406-409, 2003.

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, Davis, v. 62, p. 207-213, 2011.

ROSA, C.; ROWHANI, A. Etiology of “Rugose Wood Complex”. In: PROCEEDINGS OF THE 1st ANNUAL NATIONAL VITICULTURE RESEARCH CONFERENCE, 2007, Davis. **Proceedings**... Davis: University of California, 2007. p. 77-78.

ROWANI, A.; ZHANG, Y. P.; CHIN, J.; MINAFRA, A.; GOLINO, D. A.; UYEMOTO, J. K. *Grapevine rupestris stem pitting associated virus*: population diversity, titer in the host and possible transmission vector. In: PROCEEDINGS OF THE 13th CONGRESS OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUS AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE (ICVG), 2000, Adelaide. **Abstracts**... Adelaide: ICVG, 2000a.

ROWHANI, A.; ZHANG, Y. P.; GOLINO, D. A.; UYEMOTO, J. K. Isolation and partial characterization of two new viruses from grapevine. In: PROCEEDINGS OF THE 13th CONGRESS OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUS AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE (ICVG), 2000, Adelaide. **Abstracts**... Adelaide: ICVG, 2000b.

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

SANTOS, C.; SANTOS, M. T.; CORTEZ, I.; BOBEN, J.; PETROVIC, N.; PEREIRA, A. N.; SEQUEIRA, O. A.; NOLASCO, G. Analysis of the genomic variability and design of an asymmetric PCR ELISA assay for the broad detection of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus. In: PROCEEDINGS OF THE 14th CONGRESS OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUS AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE (ICVG), 2003, Locorotondo. **Abstracts**... Locorotondo: ICVG, 2003. p. 126-127.

SCHNEIDER, W. L.; ROOSSINCK, M. J. Evolutionary related sind bis-like plant viruses maintain different levels of population diversity in a common host. **Journal of Virology**, Washington, v. 74, p. 3130-3134, 2000.

SCHNEIDER, W. L.; ROOSSINCK, M. J. Genetic diversity in RNA viral Quasispecies is controlled by host-virus interactions. **Journal of Virology**, Washington, v. 75, p. 6566-6571, 2001.

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

TERLIZZI, F.; CREDI, R. Partial molecular characterization of Italian *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* isolates. In: PROCEEDINGS OF THE 14th CONGRESS OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUS AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE (ICVG), 2003, Locorotondo. **Abstracts...** Locorotondo: ICVG, 2003. p. 133-134.

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

WALTERS, T. W.; DECKER- WALTERS, D. S.; POSLUSZNY, U. Understanding grape (*Vitis, Vitaceae*) cultivar phylogenies. **Economic Botanic**, New York, v. 44, p. 129-131, 1990.

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

CAPÍTULO II

Efeitos de vírus sobre características agronômicas em vinhedos e incidência viral em matrizeiros

1 **Efeitos de vírus sobre características agronômicas em vinhedos e incidência viral em**
2 **matrizeiros**

3
4 Monique Bezerra Nascimento⁽¹⁾, Thor Vinícius Martins Fajardo⁽²⁾, Marcelo Eiras⁽³⁾, Ana
5 Beatriz Costa Czermainski⁽²⁾, Osmar Nickel⁽²⁾, Gilvan Pio-Ribeiro⁽¹⁾
6

7 ⁽¹⁾Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Av. Dom
8 Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900 Recife, PE, Brasil. E-mail:
9 moniqueb.nascimento@hotmail.com, gilvanpio@uol.com.br ⁽²⁾Embrapa Uva e Vinho, Caixa
10 Postal 130, CEP 95700-000 Bento Gonçalves, RS, Brasil. E-mail: thor.fajardo@embrapa.br,
11 osmar.nickel@embrapa.br, ana.czermainski@embrapa.br ⁽³⁾Instituto Biológico, Centro de
12 Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP
13 04014-002 São Paulo, SP, Brasil. E-mail: eiras@biologico.sp.gov.br
14

15 Resumo - Os objetivos deste trabalho foram avaliar variáveis agronômicas relacionadas ao
16 vigor da planta, em videiras assintomáticas e sintomáticas para viroses, além do levantamento
17 de vírus em matrizeiros comerciais. Foram conduzidos experimentos em vinhedos das
18 cultivares Niágara Rosada e Merlot e levantamento viral, com indexação de duzentas e setenta
19 plantas de vinte e nove cultivares em matrizeiros. Todas as plantas foram indexadas por RT-
20 PCR em tempo real para *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine*
21 *virus D* (GVD), *Grapevine leafroll-associated virus-1* ao -4, -4 estirpe 5 (GLRaV-1 ao -4, -4
22 estirpe 5), *Grapevine rupestris stem-pitting associated virus* (GRSPaV) nos vinhedos e nos
23 matrizeiros para GRSPaV, GVA, GVB, *Grapevine fleck virus* (GFkV) e GLRaV-3. As
24 variáveis agronômicas avaliadas foram peso fresco do cacho, teor de sólidos solúveis totais,
25 peso de ramos podados ou diâmetros do tronco do porta-enxerto e da copa. Os efeitos
26 negativos foram mais pronunciados nas plantas sintomáticas quando comparadas com as

1 assintomáticas, frequentemente, estavam infectadas. Nos matrizeiros, foi observada alta
2 incidência de GRSPaV e GVA, constituindo-se fontes de inóculo destes patógenos para os
3 vinhedos formados por esses materiais.

4 Termos para indexação: produção, danos, perdas, enrolamento da folha, lenho rugoso.

5

6 **Virus effects on agronomic characteristics in vineyards and viral incidence in grapevine**
7 **nurseries**

8 Abstract - The objectives of this work were to evaluate agronomic variables related to the
9 enological quality of grapes and plant vigor in the virus-infected asymptomatic and
10 symptomatic vines. Experiments with the cultivars Niagara Rosada and Merlot and a virus
11 survey in commercial grapevine nurseries, including two hundred and seventy indexed plants,
12 of twenty-nine cultivars, were performed. All plants were indexed by real-time RT-PCR for
13 *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine virus D* (GVD), *Grapevine*
14 *leafroll rupestris-associated virus-1 to -4, -4 strain 5* (GLRaV-1 to -4, GLRaV-4 strain 5),
15 GRSPaV in vineyards and for GRSPaV, GVA, GVB, *Grapevine fleck virus* (GFkV) and
16 GLRaV-3 in nurseries. The evaluated variables were average weight of Berry, °Brix, weight
17 of pruned branches or trunk diameters of rootstock and canopy. The negative effects were
18 more intense in symptomatic plants in comparison with the asymptomatic ones. In
19 commercial nurseries, high incidence of GRSPaV and GVA was found, consist sources of
20 inoculum this pathogen for vineyards with these materials.

21 Index terms: production, damages, losses, leafroll, rugose wood

22 **Introdução**

23 São conhecidas cerca de 60 espécies virais capazes de infectar a videira (*Vitis* sp.),
24 constituindo importante ameaça à vitivinicultura. Este cenário é decorrente da forma de
25 transmissão desses patógenos, realizada por meio de propagação vegetativa, de vetores ou
26 mecanicamente. O principal método de manejo aplicado para as viroses da videira baseia-se

1 em estratégias de prevenção por meio da utilização de material propagativo comprovadamente
2 livre de patógenos. Outras práticas de manejo, que incluiriam o plantio de cultivares e/ou
3 porta-enxertos resistentes a vírus, não se aplicam, uma vez que não há resistência genética a
4 vírus em cultivares comerciais de videira (Olivier et al., 2011; Basso et al., 2014). Como
5 ainda é muito frequente a incidência de vírus nas principais regiões vitícolas brasileiras
6 (Catarino et al., 2015) e devido à indisponibilidade de cultivares de videira resistentes a vírus,
7 uma quarta alternativa seria, em determinadas situações, a convivência, temporária, com os
8 vírus.

9 Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios que se replicam exclusivamente pela
10 utilização de constituintes químicos das células hospedeiras. Assim, infectam as células que
11 compõem os diferentes tecidos da hospedeira e comprometem a integridade funcional do
12 organismo infectado. Esse processo infeccioso resultará em diferentes níveis de danos, com
13 distintos reflexos sobre a qualidade e quantidade da produção, dependendo de diversos
14 fatores, dentre os quais a gama e a intensidade dos sintomas manifestados pela hospedeira ou
15 mesmo a ausência de sintomas, no caso de infecções latentes ou assintomáticas (Basso et al.,
16 2014).

17 O fato de a videira ser uma planta perene, com longo período de exposição dos
18 vinhedos em campo e ser propagada vegetativamente, por meio de enxertia e por estacas,
19 facilita a disseminação de patógenos e favorece o aparecimento de doenças complexas, pelo
20 acúmulo de diferentes espécies ou estirpes virais em uma mesma planta ou vinhedo. Os
21 sintomas variam com as condições ambientais, estágio fenológico da planta, práticas de
22 manejo, estado nutricional da planta, espécie(s) e/ou estirpe(s) virais, cultivar da hospedeira e
23 tempo decorrido desde a infecção (Basso et al., 2010a).

24 Os efeitos da infecção viral na videira podem se manifestar de formas mais específicas
25 ou abrangentes, resultando, via de regra, em impactos econômicos para a atividade vitícola.
26 As plantas infectadas podem apresentar alterações na expressão de genes, redução do

1 potencial fotossintético, aumento na taxa de respiração e redução dos teores de clorofila
2 (Fajardo et al., 2004; Espinoza et al., 2007; Brar et al., 2008; Basso et al., 2010b).
3 Especificamente, os efeitos negativos da infecção viral em videiras consistem em redução no
4 teor de sólidos solúveis totais do mosto, maturação irregular e incompleta da uva, redução na
5 qualidade e no rendimento da produção e, em casos mais severos de infecção,
6 enfraquecimento e atraso das brotações, redução da longevidade e declínio das plantas
7 infectadas (Giribaldi et al., 2011). Os objetivos deste trabalho foram avaliar variáveis
8 agronômicas relacionadas ao vigor da planta, em videiras assintomáticas e sintomáticas para
9 viroses, além do levantamento de vírus em matrizeiros comerciais.

10 **Material e Métodos**

11 **Isolados obtidos.** Os levantamentos amostrais foram efetuados em vinhedos de duas
12 cultivares (cvs.) e em cinco matrizeiros comerciais de vinte e nove cultivares. As plantas de
13 cada amostra foram selecionadas de forma intencional (não-probabilística), observando-se a
14 uniformidade dentro e entre as duas amostras da mesma cultivar.

15 Foram avaliadas nos vinhedos comerciais 20 videiras com sintomas de virose e outras
16 20 plantas completamente assintomáticas, das cvs. Niágara Rosada (*V. labrusca*) (6 anos,
17 enxertada em P1103) e Merlot (*V. vinifera*) (12 anos, enxertada em P779), em Flores da
18 Cunha e Caxias do Sul, Rio Grande do Sul (RS), respectivamente. A parte aérea da cv. N.
19 Rosada sintomática não exibia qualquer sintoma de virose, já o porta-enxerto dessas plantas
20 apresentava severas caneluras, engrossamento e rachaduras na casca. A parte aérea da cv.
21 Merlot sintomática exibia enrolamento e avermelhamento das folhas. As coletas foram
22 realizadas na safra 2014 e as plantas identificadas em fevereiro/2014. As variáveis
23 agronômicas, avaliadas foram: sólidos solúveis totais, peso fresco do cacho, peso de ramos
24 podados e diâmetros do tronco do porta-enxerto e da copa.

25 Para as determinações no fruto, foi colhido um cacho por planta. Efetuou-se a
26 comparação das médias amostrais de plantas sintomáticas e assintomáticas, por cultivar,

1 através do teste t bilateral.

2 O experimento nos matrizeiros constituiu-se de levantamentos amostrais efetuados em
3 cinco matrizeiros comerciais (MC1-5) de videira de vinte e nove cultivares em onze
4 municípios do estado do RS. Amostras coletadas aleatoriamente em MC1-5, foram
5 selecionadas cinco amostras, de ramos e folhas de cada cultivar, totalizando 270 amostras.
6 Não levou em consideração a presença ou não de sintomas durante a coleta das amostras.

7 **Vírus avaliados.** Todas as videiras foram indexadas visando-se identificar as espécies
8 virais eventualmente associadas àquelas assintomáticas e aos sintomas observados. As plantas
9 da cv. N. Rosada foram avaliadas para *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB),
10 *Grapevine virus D* (GVD), *Grapevine rupestris stem-pitting associated virus* (GRSPaV) e as
11 da cv. Merlot para *Grapevine leafroll-associated virus-1* ao *-4*, *-4* estirpe 5 (GLRaV-1 ao *-4*, -
12 4 estirpe 5). Todas as amostras dos cinco matrizeiros comerciais foram avaliadas para a
13 detecção das espécies virais GRSPaV, GVA, GVB, *Grapevine Fleck virus* (GFkV) e GLRaV-
14 3.

15 **Síntese do cDNA e RT-PCR.** Procedeu-se à síntese do cDNA viral e às reações de
16 PCR conforme descrito por Fajardo et al. (2003). Os oligonucleotídeos para a amplificação
17 por RT-PCR convencional foram definidos com base em trabalhos anteriores: RSPaV-
18 v1/RSPaV-c1 para GRSPaV (Radaelli et al., 2009); 766/C1197 para GVA (Minafra et al.,
19 1992) e V2CPf/V2CPr1 para GLRaV-2 (Bertazzon & Angelini, 2004). Para as amplificações
20 do gene da capa proteica do GRSPaV foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos. As
21 reações de PCR foram submetidas a 35 ciclos de amplificação, compostos de desnaturação
22 (94°C/50s), pareamento(50°C/50s) e extensão (72°C/1min). Os produtos das amplificações
23 foram analisados em géis de agarose 1,2%, preparado em tampão TBE, pH 8,0.

24 **RT-PCR em tempo real.** A extração de RNA total, a partir de um grama de raspa do
25 lenho de ramos maduros de videiras, foi realizada triturando-se o tecido vegetal em nitrogênio
26 líquido, e seguindo-se o protocolo de adsorção em sílica (Radaelli et al., 2009). Videira

1 comprovadamente sadia foi utilizada como controle negativo. Como controle positivo das
2 reações foi utilizado RNA extraído de videiras, infectadas com as espécies virais avaliadas,
3 mantidas em casa de vegetação. Os oligonucleotídeos e as sondas utilizados nas reações de
4 RT-PCR em tempo real (Taqman®) foram desenhados com base em trabalhos publicados
5 para a detecção dos vírus GVA, GVB, GVD, GRSPaV, GFkV, GLRaV-1 ao -4, GLRaV-4
6 estirpe 5 (Osman et al., 2007; Osman & Rowhani, 2008).

7 Todas as sondas foram marcadas na extremidade 5' com os fluoróforos 6-FAM ou VIC
8 para permitir a detecção simultânea de dois vírus na mesma amostra e com TAMRA, na
9 extremidade 3'. As condições das reações de RT-PCR em tempo real foram descritas
10 previamente (Dubielá et al., 2013), consistindo em ensaios do tipo presença/ausência,
11 utilizando-se o kit *TaqMan Master Mix One-Step RT-PCR* e o termociclador *StepOnePlus*
12 *Real-time PCR System* (Applied Biosystems). Os dados das reações foram analisados
13 quantitativamente e graficamente, utilizando-se o *StepOne Software v2.3* (Applied
14 Biosystems), pela determinação do C_q (ciclo quantitativo). Valores de C_q abaixo de 35
15 representam resultados positivos, sendo que quanto maior a concentração viral na amostra,
16 menor será o valor do C_q.

17 **Resultados e Discussão**

18 Nas plantas da cv. N. Rosada detectaram-se GVA, GVD e GRSPaV na quase
19 totalidade das plantas avaliadas, assintomáticas e sintomáticas, além de GVB em uma planta
20 sintomática. A figura 1 ilustra a curva de amplificação (C_T) dos isolados testados. Os três
21 vírus mais frequentes estão associados à virose do lenho rugoso. Videiras com esta virose
22 apresentam engrossamento da casca e caneluras (ranhuras) na superfície do lenho, além de
23 vigor reduzido (Rosa et al., 2011). Este efeito foi constatado, na cv. N. Rosada sintomática,
24 que apresentou maior diâmetro do tronco do P1103, visto que este porta-enxerto é bastante
25 afetado pelos vírus do lenho rugoso. Já em relação ao diâmetro do tronco da N. Rosada, o
26 efeito foi ao contrário. Como esta cv. de copa é tolerante aos vírus do lenho rugoso, e o porta-

1 enxerto nesta combinação estava assintomático, o desenvolvimento vegetativo da copa não foi
2 prejudicado. Estes efeitos não foram verificados na cv. Merlot infectada com os vírus do
3 enrolamento da folha. Na cv. Merlot, os principais vírus detectados foram GLRaV-2, GLRaV-
4 3 (sintomática) e GLRaV-4 e menor incidência do GLRaV-4 estirpe 5. O vírus GLRaV-3 não
5 foi detectado nas plantas assintomáticas e GLRaV-1 e GLRaV-2 não foram detectados em
6 nenhuma planta (Tab. 1). Não houve amplificação dos isolados testados, conforme Fig. 1G e
7 1H. Para GLRaV-2, quando realizou-se a RT-PCR convencional houve amplificação dos
8 isolados avaliados em plantas assintomáticas e sintomática, respectivamente (Fig. 2). Isso
9 ocorreu, provavelmente, pela sonda da PCR em tempo real utilizada para a detecção do
10 GLRaV-1 e GLRaV-2, visto que houve uma variabilidade menor nas regiões onde foram
11 desenhados os primers para a PCR “convencional”, que amplificou os fragmentos esperados
12 para os isolados.

13 Em relação à avaliação das variáveis agronômicas, foram verificadas diferenças
14 significativas, em favor das plantas sem sintomas, nas seguintes variáveis (% da redução em
15 relação plantas sintomáticas com às plantas assintomáticas), cv. N. Rosada: peso fresco do
16 cacho (15,4%), peso de ramos podados (42,3%), diâmetro do tronco do porta-enxerto (-
17 7,98%) e diâmetro do tronco da copa (12,1%) e, cv. Merlot: sólidos solúveis totais (10,7%).
18 Nos experimentos 1 e 4 das 5 variáveis avaliadas diferiram significativamente entre plantas
19 assintomáticas e sintomáticas para as cvs. Merlot e N. Rosada, respectivamente, como mostra
20 tabela 2.

21 Como todas as variáveis avaliadas estão relacionadas ao vigor da planta e à
22 quantificação dos efeitos negativos da infecção viral é possível concluir que videiras
23 assintomáticas da cv. N. Rosada, mesmo que infectadas, apresentam desempenho agrônomico
24 superior ao verificado em videiras sintomáticas infectadas. Assim, é recomendável o manejo,
25 a colheita e a vinificação em separado das uvas provenientes de videiras assintomáticas,
26 visando a elaboração de produtos (ex. suco, vinho) de melhor qualidade. Como a cv. Merlot

1 estava infectada com os vírus do enrolamento da folha, que afetam principalmente a
2 fotossíntese (Basso et al., 2010b), a única diferença significativa observada ocorreu no teor de
3 sólidos solúveis totais (açúcares gerados no processo fotossintético) entre plantas
4 assintomáticas, menos prejudicadas por esses vírus, em comparação as plantas sintomáticas
5 (Tab. 2).

6 Os resultados obtidos salientam que videiras momentaneamente assintomáticas,
7 mesmo que infectadas, ainda apresentam desempenho agrônomo superior ao de videiras
8 sintomáticas infectadas. Porém, como já demonstrado, a utilização de material propagativo
9 certificado, livre de vírus, ainda é a melhor opção para se obter o máximo do potencial
10 produtivo da cultivar e para reduzir perdas ocasionadas por vírus (Naidu et al., 2014).
11 Mannini et al. (2012) demonstraram as vantagens advindas de vinhedos estabelecidos com
12 material propagativo livre de vírus em relação às variáveis vigor, produtividade, taxa
13 fotossintética e teor de sólidos solúveis. Giribaldi et al. (2011) realizaram estudo de
14 performance agrônoma entre videiras sadia e infectada com GLRaV-1, GVA e GRSPaV e
15 verificaram diminuições significativas na brotação, na fertilidade e na produtividade das
16 plantas infectadas em comparação ao controle sadio.

17 Entre os matrizeiros detectaram-se maiores incidências de GVA e GRSPaV do total
18 testado, com menor incidência de GFkV seguido por GLRAV-3. Apenas o vírus GVB não foi
19 detectado em nenhuma das 270 amostras avaliadas. Do total dos MC1-5, em 46,7% das
20 amostras avaliadas não detectou-se a presença de nenhum dos cinco vírus testados (Tab. 3).
21 Na reação duplex por RT-PCR TaqMan® para GRSPaV e GVB, respectivamente, observou-
22 se a curva de amplificação (C_T) dos isolados testados para os vírus (Fig. 3C e 3D). Na reação
23 duplex para GVA e GFkV, houve amplificação para os isolados testados para o vírus GVA
24 (Fig. 3G), que apresentou maior incidência entre os matrizeiros analisados e GFkV (Fig. 3H).
25 Nas Fig. 3L e 3M, observou-se a C_T formada nas amostras para o vírus GLRaV-3 do MC1 e
26 MC5, respectivamente.

1 Nos matrizeiros observou uma maior incidência dos vírus associados a virose do lenho
2 rugoso da videira, o GVA e o GRSPaV, sendo que as cvs. mais afetadas por estes vírus foram
3 Cabernet Sauvignon, Concord clone 30, N. Rosada, Riesling Itálico, Tannat, Malbec e as
4 cultivares de porta-enxerto P1103, 101-14 e SO4 (Tab. 3). Segundo Basso et al (2014),
5 observa-se uma maior frequência da virose do lenho rugoso em cv. viníferas, e em alguns
6 porta-enxertos os sintomas da doença são nítidos, como no caso do P1103.

7 Observou baixa incidência do GFkV no material testado (Tab. 3). Outro vírus em
8 menor porcentagem em relação aos outros vírus testados foi o GLRaV-3 (Tab. 3). Este vírus é
9 o agente do enrolamento das folhas, de grande importância econômica, sendo o principal vírus
10 deste complexo, tendo sido detectado nas cultivares C. Sauvignon, Itália, N. Rosada, Bordô
11 comum, Bordô precoce, Trebbiano toscano.

12 No Brasil, observa-se predominantemente videiras das cultivares americanas e
13 híbridas que são consideradas tolerantes ao GLRaV-3. Este vírus causa leve enrolamento das
14 folhas nas cvs. N. Rosada, N. Branca e Concord, por vezes, percebe necrose entre as nervuras
15 principais. Os sintomas típicos observados em cultivares mais suscetíveis são folhas com
16 coloração avermelhada, textura coriácea, seguido do enrolamento dos bordos das folhas para
17 baixo. Já em cultivares viníferas tintas os sintomas são folhas com coloração vermelho-
18 violácea, ao longo das nervuras principais permanecem a cor verde, como na cv. C.
19 Sauvignon. Nas cultivares de uvas brancas, as folhas apresentam sintomas leves de coloração
20 amarelo-pálida (Lima & Fajardo, 2012). Cultivares usadas como porta-enxerto não expressam
21 sintomas foliares. Assim plantas infectadas pelo vírus podem passar despercebidos,
22 favorecendo a sua disseminação através da formação das mudas (Basso et al., 2010a).

23 A principal forma de transmissão do GLRaV-3 é através de diversas espécies de
24 cochonilha, com grande importância no sentido de dispersão da doença em condições
25 naturais, e sua disseminação é favorecida pela presença de inoculo no local. Segundo Golino
26 (1993), o manejo preventivo no campo faz-se através da seleção sanitária com eliminação de

1 fontes de inóculo e a realização do monitoramento e o controle de vetores, como insetos e
2 nematóides. Plantas deixadas na área após a realização de *roguing* de limpeza, como foi
3 observado no local de coleta das amostras, pode servir como inóculo na área de produção dos
4 matrizeiros, além de aumentar a dispersão de insetos vetores. De acordo com Demangeat et al.
5 (2010) recomenda-se tomar cuidado na remoção de resto culturais ou de poda, a fim de evitar
6 a dispersão destes insetos vetores.

7 Programas que objetivam produzir, manter e propagar material vegetativo livre de
8 vírus requerem métodos de diagnose que sejam sensíveis e eficientes (Beuve et al., 2007). O
9 método de PCR em tempo real tem sido utilizado com sucesso, pois apresenta resultados de
10 forma mais precisa e rápida, os resultados gerados são apresentados de forma quantitativa em
11 gráficos (Saponari et al., 2008). Neste trabalho, observou-se que a indexação por RT-PCR em
12 tempo real apresentou consistência em seus resultados, onde as amostras de 16 a 18 da cv.
13 P1103 foram positivas para o vírus GVA e negativas para GVB. Assim como, a cv. Concord
14 clone 30 (amostras de 21 a 25), as indexações para GRSPaV e GVA foram positivas, aos
15 demais vírus testados as mesmas deram negativas, ou seja, normalmente três ou mais
16 amostras da mesma cv. apresentavam-se infectadas pelo vírus (ou sadias). Desta maneira,
17 pode-se ter uma maior confiabilidade nos resultados.

18 Os resultados obtidos dos matrizeiros comerciais apresentaram alta incidência de
19 mudas infectadas, como estas mudas provem de matrizeiros, esperava-se que estes
20 apresentassem uma incidência menor de vírus, porém, apenas 46,7% do total do MC1-5
21 exibiram resultados satisfatórios, nenhuma infecção para os vírus testados (Tab. 3). Isso
22 representa que menos da metade do material analisado está livre das principais viroses que
23 acometem os vinhedos e diminui consideravelmente a produção e a qualidade das uvas.

24 Deste modo, os resultados obtidos dos matrizeiros comerciais demonstram a
25 necessidade de modificar os programas de indexação dos matrizeiros, alertando aos viveiristas
26 os benefícios de adquirir mudas de locais credenciados e regularmente fiscalizados pelas

1 Secretárias Estaduais da Agricultura (Embrapa, 2003).

2 O impacto econômico das viroses na produção da videira pode ser significativamente
3 reduzido pela remoção de plantas infectadas de dentro do vinhedo (*roguing*) se a incidência
4 da infecção for moderada (até 25%). Com incidência superior a esta taxa, a melhor alternativa
5 seria a completa substituição do vinhedo (Atallah et al., 2012). A implementação dessa
6 recomendação, certificação de mudas livres e erradicação, associada aos resultados do
7 presente trabalho, demonstram satisfatório desempenho agrônomo de videiras
8 assintomáticas, poderia adiar a necessidade de renovação completa e precoce de vinhedos,
9 trazendo economia para o produtor. Com base na diferença entre valores de peso fresco do
10 cacho, para plantas assintomáticas e sintomáticas e, considerando-se 50 cachos/planta e
11 densidade de 2000 plantas/ha, o decréscimo na produtividade da cv. N. Rosada sintomática
12 seria de 5169 kg/ha em relação às plantas assintomáticas. Como as videiras permanecem por
13 longo tempo em campo, as idades dos vinhedos estudados variaram de 6 a 12 anos, a
14 possibilidade de reinfecção por vírus em campo tende a ser expressiva e, muitas vezes, não é
15 possível cultivar um vinhedo completamente sadio após alguns anos.

16 **Agradecimentos**

17 A Celito Guerra, Daniel Grohs, Daniel Souza, Gisele Perissutti, Henrique P. dos Santos e
18 Marcos Vanni (Embrapa Uva e Vinho), pelo apoio técnico em diferentes etapas desse
19 trabalho.

20 **Referências**

21 ATALLAH, S. S.; GÓMEZ, M. I.; FUCHS, M. F.; MARTINSON, T. E. Economic impact of
22 grapevine leafroll disease on *Vitis vinifera* cv. Cabernet franc in Finger Lakes vineyards of
23 New York. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.63, p.73-79, 2012.
24 BASSO, M.F.; FAJARDO, T.V.M.; EIRAS, M.; AYUB, R.A.; NICKEL, O. Detecção e
25 identificação molecular de vírus associados a videiras sintomáticas e assintomáticas. **Ciência**
26 **Rural**, v.40, p.2249-2255, 2010a.

- 1 BASSO, M.F.; FAJARDO, T.V.M.; SANTOS, H.P.; GUERRA, C.C.; AYUB, R.A.;
2 NICKEL, O. Fisiologia foliar e qualidade enológica da uva em videiras infectadas por vírus.
3 **Tropical Plant Pathology**, v.35, p.351-359, 2010b.
- 4 BASSO, M.F., FAJARDO, T.V.M., PIO-RIBEIRO, G., EIRAS, M.; ZERBINI, F.M. Avanços
5 e perspectivas no estudo das doenças virais e subvirais em videira com ênfase na realidade
6 brasileira. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.22, p.160-207, 2014.
- 7 BERTAZZON, N.; ANGELINI, E. Advances in the detection of *Grapevine leafroll-*
8 *associated virus 2* variants. **Journal of Plant Pathology**, v.86, p.283-290, 2004.
- 9 BEUVE, M.; SEMPÉ, L.; LEMAIRE, O. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for
10 detecting *Grapevine leafroll-associated virus 2* variants in grapevine. **Journal of Virological**
11 **Methods**, v. 141, n. 2, p.117-124, 2007.
- 12 BRAR, H.S.; SINGH, Z.; SWINNY, E.; CAMERON, I. Girdling and grapevine leafroll-
13 associated viruses affect berry weight, colour development and accumulation of anthocyanins
14 in Crimson Seedless grapes during maturation and ripening. **Plant Science**, v.175, p.885-897,
15 2008.
- 16 CATARINO, A.M.; FAJARDO, T.V.M.; PIO-RIBEIRO, G.; EIRAS, M.; NICKEL, O.
17 Incidência de vírus em videiras no Nordeste brasileiro e caracterização molecular parcial de
18 isolados virais locais. **Ciência Rural**, v.45, n.3, 2015 (no prelo). DOI: 10.1590/0103-
19 8478cr20140587.
- 20 DEMANGEAT, G.; KOMAR, V.; VAN-GHELDER, C.; VOISIN, R.; LEMAIRE, O.;
21 ESMENJAUD, D; FUCHS, M. Transmission competency of single female *Xiphinema index*
22 lines for *Grapevine fanleaf virus*. **Phytopathology**, v. 100, p.384-389, 2010.
- 23 DUBIELA, C.R.; FAJARDO, T.V.M.; SOUTO, E.R.; NICKEL, O.; EIRAS, M.; REVERS,
24 L.F. Simultaneous detection of Brazilian isolates of grapevine viruses by TaqMan real-time
25 RT-PCR. **Tropical Plant Pathology**, v.38, p.158-65, 2013.

- 1 EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Uvas**
2 **Viníferas para Processamento em Regiões de Clima Temperado**. Embrapa Uva e
3 Vinho, 2003. (Embrapa Uva e Vinho. Sistema de Produção, 4). Disponível em:
4 <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasViniferasRegioesClim](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/index.htm)
5 [aTemperado/index.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/index.htm)>. Acesso em: 10 dez. 2015.
- 6 ESPINOZA, C.; VEGA, A.; MEDINA, C.; SCHLAUCH, K.; CRAMER, G.; ARCE-
7 JOHNSON, P. Gene expression associated with compatible viral diseases in grapevine
8 cultivars. **Functional and Integrative Genomics**, v.7, p.95-110, 2007.
- 9 FAJARDO, T.V. M.; EIRAS, M.; SANTOS, H.P.; NICKEL, O.; KUHN, G.B. Detecção e
10 caracterização biológica e molecular de *Rupestris stem-pitting associated virus* e seu efeito na
11 fotossíntese de videiras. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.209-214, 2004.
- 12 FAJARDO, T. V. M.; KUHN, G. B.; NICKEL, O. Doenças virais In: FAJARDO, T. V. M.
13 (Ed.). Uva para processamento – Fitossanidade. Série Frutas do Brasil 35. Brasília: **Embrapa**
14 **Informação Tecnológica**, p. 45-62, 2003.
- 15 GIRIBALDI, M.; PURROTTI, M.; PACIFICO, D.; SANTINI, D.; MANNINI, F.;
16 CACIAGLI, P.; ROLLE, L.; CAVALLARIN, L.; GIUFFRIDA, M.G.; MARZACHI, C. A
17 multidisciplinary study on the effects of phloem-limited viruses on the agronomical
18 performance and berry quality of *Vitis vinifera* cv. Nebbiolo. **Journal of Proteomics**, v.75,
19 p.306-315, 2011.
- 20 GOLINO, D. A. Potential interactions between rootstock and grapevine latent viruses.
21 **American Journal Enology and Viticulture**, v. 44, p. 148-152, 1993.
- 22 LIMA, M.F.; FAJARDO, T.V.M. Doenças causadas por vírus. In: LIMA, M.F.; MOREIRA,
23 F.R.B. (Eds Técnicos). Uva de Mesa: Fitossanidade. **Frutas do Brasil**, 14. 2 ed., revista e
24 ampliada. Brasília: Embrapa. p. 43-58, 2012.
- 25 MANNINI, F.; MOLLO, A.; CREDI, R. Field performance and wine quality modification in
26 a clone of *Vitis vinifera* cv. Dolcetto after GLRaV-3 elimination. **American Journal of**

- 1 **Enology and Viticulture**, v.63, p.144-147, 2012.]
- 2 MINAFRA, A., HADIDI, A.; MARTELLI, G.P. Detection of grapevine closterovirus A in
3 infected grapevine tissue by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Vitis**, v.31,
4 p.221-227, 1992.
- 5 NAIDU, R.; ROWHANI, A.; FUCHS, M.; GOLINO, D.; MARTELLI, G. P. Grapevine
6 leafroll: A complex viral disease affecting a high-value fruit crop. **Plant Disease**, v.98,
7 p.1172-1185, 2014.
- 8 OLIVER, J.E.; FUCHS, M. Tolerance and resistance to viruses and their vectors in *Vitis* sp.:
9 A virologist's perspective of the literature. **American Journal of Enology and Viticulture**,
10 v.62, p.438-451, 2011.
- 11 OSMAN, F.; LEUTENEGGER, C.; GOLINO, D.; ROWHANI, A. Real-time RT-PCR
12 (TaqMan) assays for the detection of *Grapevine leafroll associated viruses* 1-5 and 9.
13 **Journal of Virological Methods**, v.141, p.22-29, 2007.
- 14 OSMAN, F.; ROWHANI, A. Real-time RT-PCR (TaqMan) assays for the detection of viruses
15 associated with Rugose wood complex of grapevine. **Journal of Virological Methods**, v.154,
16 p.69-75, 2008.
- 17 RADAELLI, P.; FAJARDO, T.V.M.; NICKEL, O.; EIRAS, M.; PIO-RIBEIRO, G.
18 Variabilidade do gene da proteína capsidial de três espécies virais que infectam videiras no
19 Brasil. **Tropical Plant Pathology**, v.34, p.297-305, 2009.
- 20 ROSA, C.; JIMENEZ, J.F.; MARGARIA, P.; ROWHANI, A. Symptomatology and effects of
21 viruses associated with Rugose wood complex on the growth of four different rootstocks.
22 **American Journal of Enology and Viticulture**, v.62, p.207-213, 2011.
- 23 SAPONARI, M.; MANJUNATH, K.; YOKOMI, R. K. Quantitative detection of Citrus
24 tristeza virus in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan). **Journal**
25 **of Virological Methods**, v.147, p.43-53, 2008.

Tabela 1. Resultados sobre infecção viral (número plantas infectadas / número plantas indexadas) obtidos a partir da indexação viral para GVA, GVB, GVD, GRSPaV-1, GLRaV-3, GLRaV-4 e GLRaV-4 estirpe 5 por RT-PCR em tempo real das cultivares Niágara Rosada e Merlot e RT-PCR “convencional” para o GLRaV-2, cultivar Merlot

Cultivar	Sintomas	Vírus (Amostras positivas para os vírus testados / Total)								
		GVA	GVB	GVD	GRSPaV	GLRaV-1	GLRaV-2	GLRaV-3	GLRaV-4	GLRaV-4 estirpe 5
N. Rosada	-	17/20 (85%)	0/20 (0%)	18/20 (90%)	15/20 (75%)	--	--	--	--	--
	+	17/20 (85%)	1/20 (5%)	17/20 (85%)	19/20 (95%)	--	--	--	--	--
Merlot	-	--	--	--	--	0/20 (0%)	17/20 (85%)	0/20 (0%)	15/20 (75%)	5/20 (25%)
	+	--	--	--	--	0/20 (0%)	3/20 (15%)	11/20 (55%)	19/20 (95%)	7/20 (35%)
“-”	planta	assintomática,		“+”	planta	sintomática,		“—”	não	determinado

Tabela 2. Valores de sólidos solúveis totais, peso fresco do cacho, peso de ramos podados, diâmetro do tronco do porta-enxerto e da copa de uvas das cultivares Niágara rosada (*Vitis labrusca*) e Merlot (*V. vinifera*) de videiras infectadas e aparentemente saudáveis (videiras sintomáticas e

Variável	Niágara Rosada		Signifi- cância	Merlot		Signifi- cância	assinto- máticas), , infectad as com diferent es vírus.
	Assintomática	Sintomática		Assintomática	Sintomática		
Sólidos solúveis totais (°Brix)	15,51 ± 0,21	14,97 ± 0,20	ns	19,02 ± 0,20	16,98 ± 0,23	**	
Peso fresco do cacho (g)	334,12 ± 10,03	282,43 ± 15,62	**	294,83 ± 18,23	256,81 ± 13,97	ns	
Peso de ramos podados (g)	2791 ± 98,19	1609,55 ± 110,82	**	1285 ± 78,2	1157,7 ± 90,17	ns	
Diâmetro do tronco do porta-enxerto (mm)	43,99 ± 1,15	47,81 ± 1,36	*	43,41 ± 1,23	42,41 ± 0,97	ns	
Diâmetro do tronco da copa (mm)	38,74 ± 0,9	34,03 ± 0,77	**	34,33 ± 1,05	36,22 ± 1,11	ns	

Média ± erro padrão; amostras de 20 plantas

Teste t bilateral para a diferença entre as médias amostrais, por cultivar: ns (não significativo) = $P > 0,05$; * = $P \leq 0,05$; ** = $P \leq 0,01$

Tabela 3. Resultados sobre infecção viral (número plantas infectadas / número plantas indexadas) obtidos a partir da indexação viral por RT-PCR em tempo real das 25 cultivares dos cinco matrizeiros comerciais (MC1-5) e sua respectiva localização nos municípios do estado do Rio Grande do Sul onde foram coletados as amostras

Matrizeiros comerciais (MC)	Localização	Cultivar	Vírus (Quantidade de amostras infectadas)					Nenhuma Infecção
			GRSPaV	GVA	GVB	GFkV	GRLaV-3	
MC1	Nova Prata	P1103	1	1	0	0	0	3
		SO4	0	1	0	0	0	4
		Alvarinho	1	1	0	0	0	3
		Prosecco	0	0	0	0	0	5
		Trebbiano Toscano	4	1	0	1	1	1
	Veranópolis	Rebo	0	0	0	0	0	5
		Cabernet Sauvignon	5	2	0	1	2	1
		Itália,	4	2	0	1	2	1
		Bordô	1	0	0	1	1	1
		P1103	1	4	0	0	0	3
		Concord cl.30	3	4	0	0	0	3
		Concord	0	2	0	0	0	4
		Niágara Branca	0	0	0	0	0	5
		Niágara Rosada	0	0	0	0	0	5
Isabel Precoce	0	0	0	0	0	5		
(Quantidade de amostras infectadas / Quantidade total de amostras)			20/75 (26,7%)	18/75 (24,0%)	0/75 (0%)	4/75 (5,3%)	6/75 (8,0%)	45/75 (60%)
MC2	Cotiporã	161-49	2	3	0	0	0	3
		P1103 (Embrapa 6 anos)	4	5	0	0	0	3
		Riesling Itálico	4	4	0	0	0	3
		Chardonnay	2	4	0	0	0	3
		Isabel Precoce	1	4	0	0	0	3
		Niágara Rosada	0	4	0	0	0	4
		SO4	3	5	0	0	0	3
		Concord cl.30	3	5	0	0	0	3
		Cabernet Sauvignon	1	3	0	0	0	3
		Grano D'oro	0	1	0	0	0	4
		Isabel	3	0	0	0	0	4
P1103 (Embrapa 3 anos)	3	5	0	0	0	3		
(Quantidade de amostras infectadas / Quantidade total de amostras)			26/60 (43,3%)	43/60 (71,7%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	13/60 (21,7%)
MC3	Garibaldi	Concord Ferrari	0	1	0	0	0	4
		Niágara Rosada	0	0	0	1	2	3
		Bordô Precoce	0	1	0	0	1	4
		Concord cl.30	0	3	0	0	0	4
		Bordô comum	0	3	0	4	1	2
		Isabel 1	0	2	0	2	0	3
		Isabel Precoce	0	3	0	1	0	3
	Carlos Barbosa	P1103**	0	1	0	0	0	
	Concord 2-V Ferrari	0	0	0	0	0		
(Quantidade de amostras infectadas / Quantidade total de amostras)			0/55 (0%)	14/55 (25,5%)	0/55 (0%)	8/55 (14,5%)	4/55 (7,3%)	13/60 (21,7%)
MC4	Vacaria	P1103***	4	2	0	0	0	3
	Lagoa Vermelha	Chardonnay cl. Entave 95	2	1	0	0	0	3
	Farroupilha	Niágara Rosada	3	0	0	0	0	4
	Fagundes Varela	Concord cl.30	0	0	0	0	0	5
	Caxias do Sul	Bordô	2	0	0	0	0	4
	Cotiporã	Isabel Precoce	0	2	0	0	0	4
(Quantidade de amostras infectadas / Quantidade total de amostras)			11/35 (31,4%)	5/35 (14,3%)	0/35 (0%)	0/35 (0%)	0/35 (0%)	20/35 (57,1%)

		101-14	3	4	0	0	0	3
		Malbec	4	4	0	0	0	3
		Tannat cl. 717	4	4	0	0	0	3
		Syrah	3	2	0	0	0	3
MC5	Muitos Capões	Tempranillo	4	1	0	1	0	2
		Sauvignon Blanc	5	1	0	3	0	2
		Pinot Noir	2	2	0	0	0	3
		Cabernet Sauvignon	0	1	0	0	0	4
		Merlot cl. 347	4	0	0	1	0	3
(Quantidade de amostras infectadas / Quantidade total de amostras)			29/45 (64,4%)	19/45 (42,2%)	0/45 (0%)	5/45 (11,1%)	0/45 (0%)	12/45 (26,7%)
TOTAL (Quantidade de amostras infectadas / Quantidade total de amostras)			86/270 (31,8%)	99/270 (36,7%)	0/270 (0%)	17/270 (6,3%)	10/270 (3,7%)	126/270 (46,7%)

* Número de plantas infectadas / número de plantas indexadas, 5 amostras por cultivar dos matrizeiros comerciais (MC1-5).

** 15 amostras indexadas por cultivar do VC3; ***10 amostras indexadas por cultivar

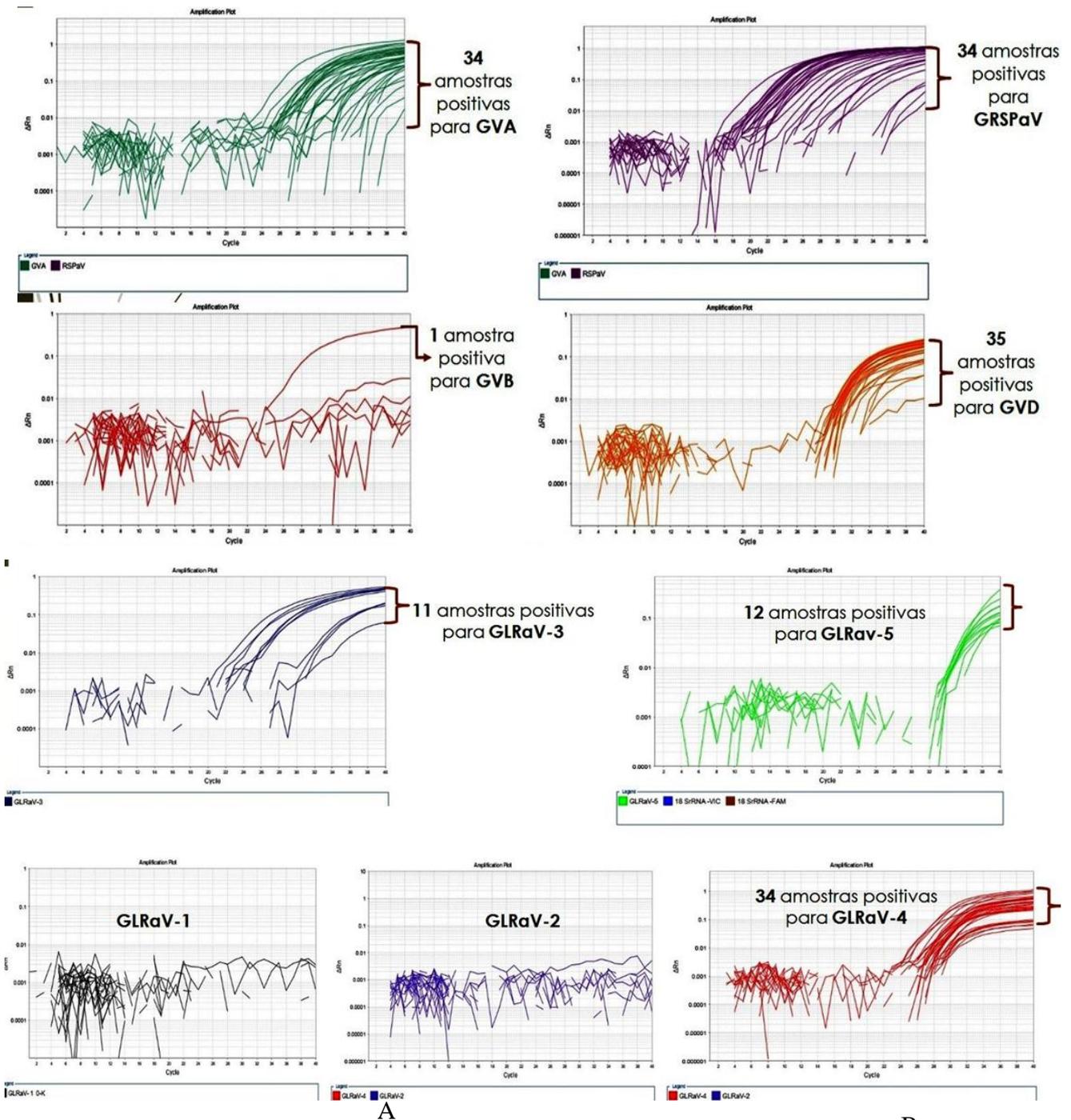


Figura 1. A. Gráficos de RT-PCR em tempo real (TaqMan). **A.** Curvas de amplificação para o vírus GVA cv. N. Rosada; **B.** Amplificação de GRSPaV cv. N. Rosada; **C.** Amplificação de 1 amostra para GVB cv. N. Rosada; **D.** Amplificação de GVD cv. N. Rosada; **E.** Amplificação para GLRaV-3 cv. Merlot; **F.** Amostras amplificadas para GLRaV-5 cv. Merlot; **G.** Nenhuma amplificação para GLRaV-1 cv. Merlot; **H.** Nenhuma curva de amplificação para GLRaV-2 cv. Merlot; **I.** Curva de amplificação para GLRaV-4. As linhas horizontais indicam o threshold e a intercessão dessas linhas determinam os valores C_T no eixo X, eixo Y (ΔRn = normalizada intensidade fluorescente) e eixo X (número de ciclos).

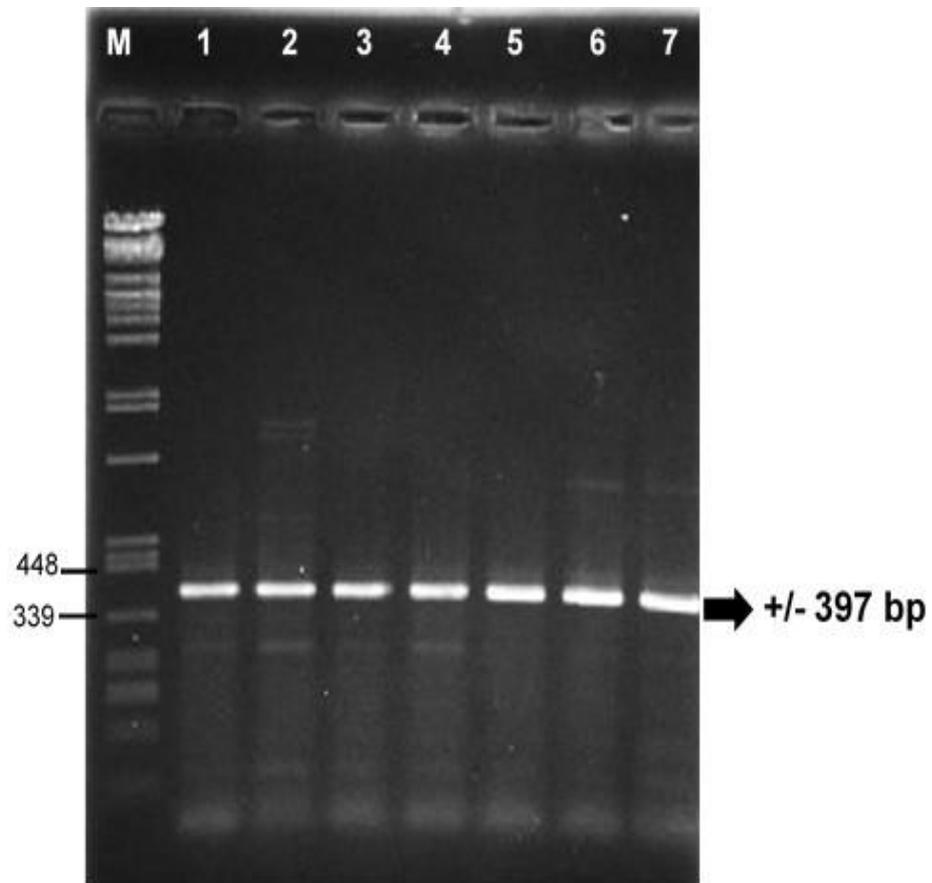


Figura 2. Padrão eletroforético em gel de agarose (1,2%). **M:** marcado λ DNA/PSTI; **1 a 7:** isolados da cv. Merlot avaliados para GLRaV-2, que amplificou os fragmentos esperados de 397 bp.

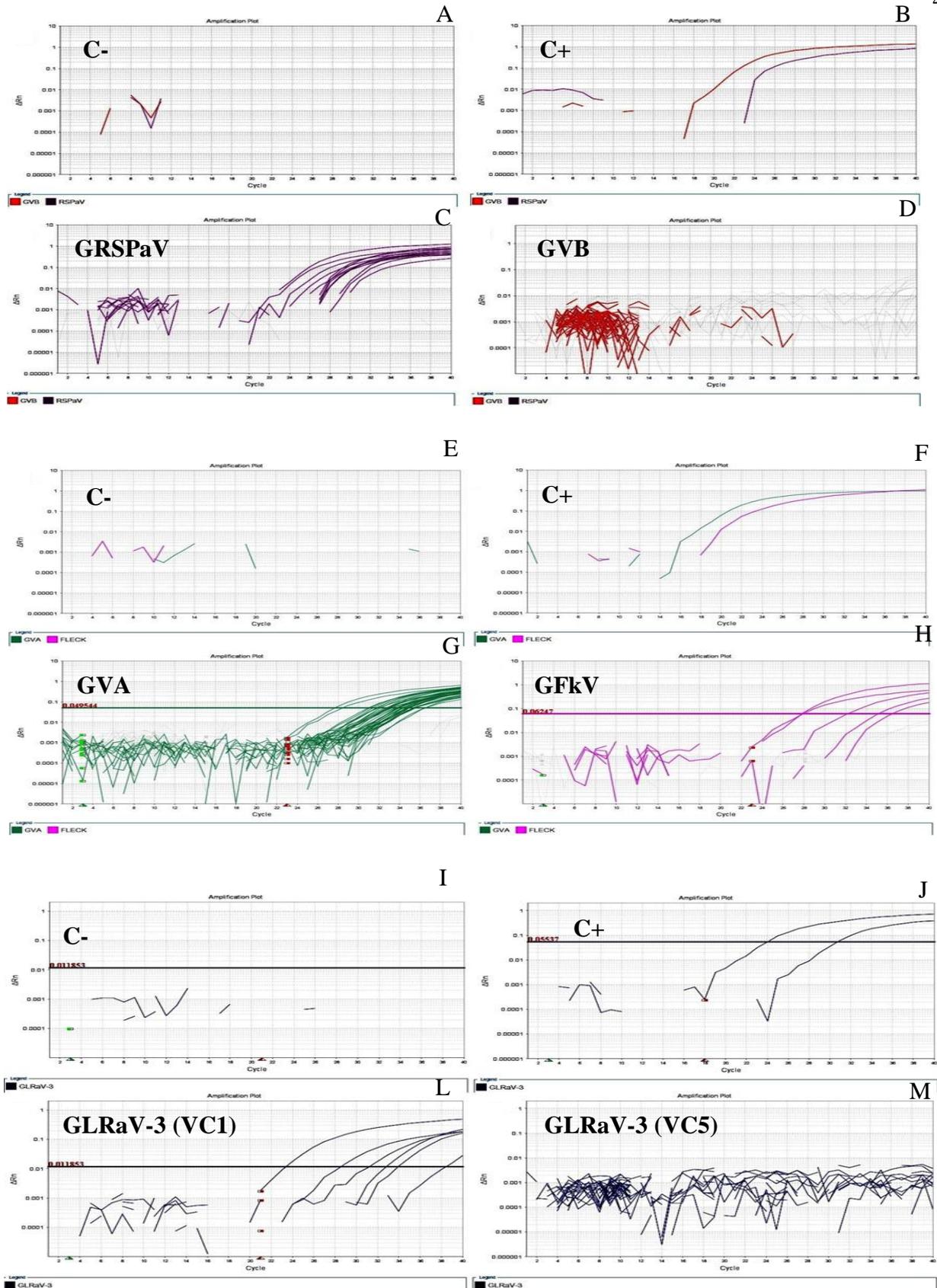


Figura 3. Resultados gráficos da RT-PCR em tempo real (TaqMan). **A.** Curvas duplex para controles negativos para GRSPaV e GVB; **B.** Curvas duplex para controles positivos para GRSPaV e GVB; **C.** Amplificação para GRSPaV (VC1); **D.** Amplificação para GVB (VC3); **E.** Curvas duplex para controle negativo para GVA e GfKv; **F.** Curvas duplex para controles positivos para GVA e GfKv; **G.** Amplificação para GVA (VC2); **H.** Amplificação para GfKv (VC5); **I.** Curva simplex para controle negativo GLRaV-3; **J.** Curva simplex para controle positivo GLRaV-3; **L.** Amplificação para GLRaV-3 (VC1); **M.** Amplificação para GLRaV-3 (VC5). Curva de amplificação para GLRaV-4. As linhas horizontais indicam o threshold e a intercessão dessas linhas determinam os valores C_T no eixo X, eixo Y (ΔR_n = normalizada intensidade fluorescente) e eixo X (número de ciclos).

CAPÍTULO III

Caracterização de isolados de vírus em videira e roseira e levantamento de PNRSV em pessegueiro

1
2 **Caracterização de isolados de vírus em videira e roseira e levantamento de PNRSV em**
3 **pessegueiro**
4

5 Monique Bezerra Nascimento⁽¹⁾, Thor Vinícius Martins Fajardo⁽²⁾, Gilvan Pio-Ribeiro⁽¹⁾

6 ⁽¹⁾Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Av. Dom Manoel de
7 Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900 Recife, PE, Brasil. E-mail:
8 moniqueb.nascimento@hotmail.com, gilvanpio@uol.com.br ⁽²⁾Embrapa Uva e Vinho, Caixa Postal
9 130, CEP 95700-000 Bento Gonçalves, RS, Brasil. E-mail: thor.fajardo@embrapa.br.
10

11 Resumo - O objetivo deste trabalho foi caracterizar molecularmente isolados de *Grapevine rupestris*
12 *stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *Grapevine virus A* (GVA) e *Grapevine leafroll rupestris-*
13 *associated virus-2* (GLRaV-2) em videira (*Vitis* sp.), e *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) em
14 roseira (*Rosa* spp.). Além do levantamento de 58 genótipos de pessegueiro (*Prunus persica*) e sete
15 outras espécies/híbridos de *Prunus* spp. avaliadas para o vírus PNRSV por RT-PCR “convencional”
16 e RT-PCR em tempo real. A identificação das espécies virais GRSPaV, GVA e GLRaV-2 e PNRSV
17 foi realizada por RT-PCR em tempo real. Os isolados de GRSPaV e GVA, obtidos de Niágara
18 Rosada, e GLRaV-2, obtido de Merlot, demonstraram altas porcentagens de identidade. Nas
19 amostras de *Prunus* spp. houve baixa incidência do vírus PNRSV no material testado. O presente
20 trabalho constituiu-se da primeira caracterização molecular dos genes completos da capa proteica
21 (CP) e proteína de movimento (MP) de PNRSV da roseira no Brasil.

22 Termos de indexação: lenho rugoso, enrolamento da folha, PNRSV.

23 **Characterization of isolates of viruses in grapevine, rose and lifting of PNRSV in peach tree**

24 Abstract - the objective of this work was to characterize molecularly isolates of *Grapevine rupestris*
25 *stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine leafroll-associated*
26 *virus-2* (GLRaV-2) in grapevine (*Vitis* spp.) and *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) in rose
27 (*Rosa* spp.). In addition to the survey of 58 genotypes of peach (*Prunus persica*) and seven other

1 species/hybrids of *Prunus* spp. evaluated for PNRSV virus by RT-PCR "conventional" and real-
2 time RT-PCR. The identification of the virus species GRSPaV-2, GVA and GLRaV-2 was made by
3 real time RT-PCR. The isolates of GRSPaV and GVA, from plants of Niagara Rosada and GLRaV-
4 2 from of Merlot, showed high percentages of nucleotide identity. In the samples of *Prunus* there
5 was low incidence of the virus in the material tested of PNRSV. This work was the first molecular
6 characterization of complete genes of coat protein (CP) and movement protein (MP) of PNRSV
7 from rose in Brazil.

8 Index terms: rugose wood, grapevine leafroll, PNRSV

9 **Introdução**

10 A videira (*Vitis* spp.) é propagada vegetativamente e este sistema, muitas vezes, leva à
11 acumulação de agentes virais nas plantas de campo, promovendo a sua disseminação e induzindo
12 perdas no rendimento (Martelli, 2014).

13 No Brasil, as viroses de maior relevância para a videiras, devido à expressiva incidência e
14 aos danos são pertencentes a dois complexos, o lenho rugoso e o enrolamento da folha (Kuhn &
15 Fajardo, 2004).

16 O enrolamento da folha, causado pelo vírus *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV), é
17 uma das viroses mais importantes que afetam a videira a nível mundial, em razão de sua alta
18 incidência e os prejuízos causados à produção (Fajardo et al., 2011). O vírus pertence à família
19 *Closteroviridae*, compreendendo dois gêneros que possuem importantes vírus, *Closterovirus* inclui
20 apenas o GLRaV-2, e o *Ampelovirus* que é composto pelos demais vírus associados ao enrolamento
21 da folha da videira.

22 Um do mais incidente e importante vírus que atacam as videiras no Brasil e em outros países
23 é o *Grapevine ruspestris stem-pitting associated virus* (GRSPaV) (Radaelli et al., 2009). O
24 GRSPaV junto com o *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB) e *Grapevine virus D*
25 (GVD) formam o complexo do lenho rugoso, doença caracterizada por alterações no lenho (Fajardo
26 et al., 2012).

27 *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) ocorre mundialmente infectando muitas espécies

1 lenhosas. Porém é a mais importante economicamente para as fruteiras de caroço (*Prunus* spp.). O
2 PNRSV causa manchas anelares em pessegueiro, cerejeira, roseiras e lúpulo e doenças de mosaico
3 em macieiras, ameixeiras e roseiras (Fajardo et al., 2004).

4 O mosaico da roseira está associado a pelo menos um desses três vírus, que é constituído
5 principalmente pelo *Apple mosaic virus* (ApMV) vírus que causa o mosaico da macieira, o PNRSV,
6 responsável pela mancha anelar necrótica de *Prunus*, e ao vírus do mosaico da *Arabis* da videira,
7 *Arabis mosaic virus* (ArMV), que podem ocorrer isoladamente ou em infecções mistas (Alexandre
8 & Duarte, 2010).

9 No estado do Rio Grande do Sul, uma das viroses mais comuns no pessegueiro é a mancha
10 anelar necrótica de *Prunus* (Fajardo et al., 2004). Apesar da importância econômica de PNRSV as
11 fruteiras de caroço no Brasil, a caracterização molecular de isolados de PNRSV, exceto os
12 infectando pêssego, não existe.

13 O PNRSV e o ApMV pertencem à família *Bromoviridae*, subgrupo três do gênero *Ilarvirus*.
14 Todos os membros dessa família caracterizam-se por uma mesma organização genômica
15 consistindo de uma fita simples tripartida de RNA. Os RNAs 1 e 2 codificam as subunidades de
16 replicase P1 e P2, respectivamente, enquanto que o gene RNA3 é bicistrônico e codifica a proteína
17 de movimento (MP ou P3) e a proteína capsidial (CP). A proteína MP tem como função principal
18 movimento através do plasmodesma e a proteína CP função estrutural. O último gene é sintetizado a
19 partir de um RNA subgenômico (sgRNA4) proveniente do RNA3. Todos os RNAs genômicos
20 contêm uma estrutura cap em sua extremidade 5' e uma cauda poliA na 3' (Pallas et al., 2012).

21 O ArMV pertence à família *Secoviridae*, gênero *Nepovirus*. Além de causar doença em
22 roseira, está associado à doença degenerativa da videira em vários países da Europa (Martelli,
23 2014).

24 Os ilarvírus são considerados patógenos latentes quando infectam árvores frutíferas. Assim
25 sua importância econômica é alta em relação a incidência dessa virose. PNRSV causa perdas
26 significativas das culturas, de acordo com o tipo de hospedeiro infectado. Há relatos que o PNRSV
27 é responsável por perdas de rendimento acima de 15% em cereja doce e mais de 100% em pêssego

1 (Pallas et al., 2012). Em roseiras infectadas observam-se deformações em flores, folhas e fruto;
2 atraso na maturação; redução do crescimento e da produtividade em até 40% (Alexandre & Duarte,
3 2009; Paduch-cichal & Sala-Rejczak, 2011). As roseiras infectadas apresentam ainda diminuição do
4 vigor, redução significativa no número e tamanho das flores e peso fresco e seco da mesma, o que
5 as tornam menos produtivas (Alexandre & Duarte, 2010).

6 A caracterização dos vírus que infectam fruteiras de importância econômica é significativo,
7 não somente do ponto de vista taxonômico, mas, é requerido essencialmente para o
8 desenvolvimento de métodos de detecção mais precisos e sensíveis, através do conhecimento sobre
9 variabilidade genética, que permite selecionar regiões genômicas conservadas para detecção de
10 vírus de forma mais confiável.

11 Assim, os objetivos deste trabalho foram: caracterizar molecularmente a sequência completa
12 do gene da proteína capsidial (CP) de isolados de GRSPaV e sequências parciais do gene da
13 proteína CP de isolados de GVA e GLRaV-2, obtidos de videira; caracterizar a sequência dos genes
14 completos da proteína CP e da proteína de movimento (MP) de isolados de PNRSV, obtidos de
15 roseira e realizar levantamento de PNRSV em pessegueiro.

16 **Material e Métodos**

17 **Isolados obtidos.** Foram avaliadas 20 plantas sintomáticas (sint.) e assintomáticas (assint.) de
18 videiras, das cultivares (cvs.) Niágara Rosada (*V. labrusca*) (6 anos, enxertada em P1103) e Merlot
19 (*V. vinifera*) (12 anos, enxertada em P779), de dois vinhedos localizados em Flores da Cunha e
20 Caxias do Sul no estado do Rio Grande do Sul (RS).

21 Em roseiras foram coletadas amostras a partir de folhas sintomáticas e assintomáticas,
22 plantadas nas bordas de um vinhedo em Lagoa Vermelha (RS). Foram testadas cinquenta e oito
23 genótipos de pessegueiro (*Prunus persica*) e sete outras espécies/híbridos de *Prunus* spp.,
24 provenientes da Embrapa Clima Temperado de Pelotas (RS) para o vírus PNRSV.

25 **Vírus avaliados.** As amostras de videira cultivar (cv.) N. Rosada foram avaliadas para a
26 presença de GVA, GVB, GVD e GRSPaV e as da cv. Merlot para GLRaV-1 ao -4, GLRaV-4
27 estirpe 5. Realizou-se a caracterização molecular de alguns genes completos ou parciais de isolados

1 virais de GRSPaV, GVA e GLRaV-2. Nas roseiras foram feitas detecções para três vírus, ApMV,
2 ArMV e PNRSV, e a obtenção de genes completos da CP e MP de PNRSV e os isolados obtidos
3 caracterizados molecularmente. Além da identificação por RT-PCR “convencional” e RT-PCR em
4 tempo real das 65 amostras de Prunus.

5 **Extração de RNA total.** Para extração de RNA total, foi utilizado um grama de raspas do
6 lenho de ramos maduros de videiras assintomáticas e sintomáticas, e um grama de folhas de
7 pessegueiro. Para videira e pessegueiro, o tecido vegetal foi triturando em nitrogênio líquido,
8 seguindo o protocolo de adsorção em sílica (Radaelli et al., 2009). Para a roseira, a extração de
9 RNA total utilizou-se o kit *plant mini RNeasy* (Qiagen), a partir de 100 mg de folhas assintomáticas
10 e sintomáticas.

11 **Síntese de cDNA e RT-PCR “convencional”.** Síntese de cDNA e reações de PCR foram
12 realizados de acordo com Fajardo et al. (2003). Os produtos da RT-PCR foram analisadas em géis
13 de agarose 1,2%, preparados em tampão TBE pH 8,0, corados com brometo de etídeo (0,05%) e
14 visualizados em transiluminador de luz UV. As bandas correspondentes a fragmentos de tamanhos
15 esperados foram recortadas dos géis e eluídas com a utilização do kit *Wizard SV Gel e PCR Clean-*
16 *Up System* (Promega). Os oligonucleotídeos usados para RT-PCR One-Step foram: **proteína**
17 **capsidial (CP) do PNRSV:** v1 (5’ATGGTTTGCCGAATTTGCAAT3’), c1
18 (5’CTATATCTCAAGCAGGTCTTCATC3’), **proteína de movimento (MP) do PNRSV:** v1
19 (5’ATGGCCGGTGTCAGTAAAAAC3’), c1 (5’TCAAGCACTTCCAGAACTACC3’), **proteína**
20 **CP do ArMV:** H428 (5’GCGGCGGATTGGGAGTT3’), C867 (5’CGATGGTAGG
21 GGGAGCGTATT3’), **proteína CP do ApMV:** v1 (5’ATGGTCTGCAA GTACTGTAA3’), c1
22 (5’TCATAATTCTAACAAATCTT3’). Os oligonucleotídeos para a amplificação de GRSPaV,
23 GVA e GLRaV-2 foram definidos com base em trabalhos anteriores: RSPaV-v1/RSPaV-c1 para
24 GRSPaV (Radaelli et al., 2009); 766 / C1197 para GVA (Minafra et al., 1992) e V2CPf/V2CPr1
25 para GLRaV-2 (Bertazzon & Angelini, 2004).

26 **RT-PCR em tempo real.** Além de caracterizar molecularmente os vírus GRSPaV, GVA e
27 GRLaV-2, avaliou-se a eficiência da RT-PCR em tempo real para detectar diferentes isolados destas

1 três espécies. Os oligonucleotídeos e as sondas utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real
2 (Taqman) foram desenhados com base em trabalhos publicados para a detecção dos vírus GVA,
3 GRSPaV, GLRaV-2 (Osman et al., 2007; Osman & Rowhani, 2008). Para o vírus PNRSV foram
4 utilizadas as sondas com base em trabalhos de Marbot et al. (2003): 10F:
5 TTCTTGAAGGACCAACCGAGAGG; 10R: GCTAACGCAGGTAAGATTTCCAAGC e MGB
6 sonda: [VIC] ATGTCTTGCTGGTCGATG [NFQ].

7 Todas as sondas foram marcadas na extremidade 5' com os fluoróforos 6-FAM ou VIC para
8 permitir a detecção simultânea de dois vírus na mesma amostra e com TAMRA, na extremidade 3'.
9 As condições das reações de RT-PCR em tempo real foram descritas previamente (Dubielá et al.,
10 2013), consistindo em ensaios do tipo presença/ausência, utilizando-se o kit *TaqMan Master Mix*
11 *One-Step RT-PCR* e o termociclador *StepOnePlus Real-time PCR System* (Applied Biosystems). Os
12 dados das reações foram analisados quantitativamente e graficamente, utilizando-se o *StepOne*
13 *Software v2.3* (Applied Biosystems), pela determinação do Cq (ciclo quantitativo). Valores de Cq
14 abaixo de 35 representam resultados positivos, sendo que quanto maior a concentração viral na
15 amostra, menor será o valor do Cq.

16 **Clonagem e seleção dos clones recombinantes.** Os fragmentos de DNA eluídos foram
17 ligados ao vetor pGEM-T Easy (Promega) e estes foram utilizados na transformação de células
18 competentes de *Escherichia coli* DH5 α por meio de choque térmico. O DNA plasmidial das
19 colônias bacterianas transformadas foi extraído utilizando-se o kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA*
20 *Purification System* (Promega). A confirmação da presença dos fragmentos virais clonados nos
21 plasmídeos recombinantes foi realizada por digestão com a enzima de restrição *EcoRI*. Procedeu-se
22 ao sequenciamento automático de nucleotídeos de dois clones por isolado viral caracterizado.

23 **Análises das seqüências *in silico*.** Procedeu-se ao sequenciamento automático de
24 nucleotídeos de dois clones por isolado viral caracterizado. Os alinhamentos múltiplos das
25 seqüências de nucleotídeos (nt) e de aminoácidos deduzidos (aad) e a geração das matrizes de
26 identidade foram realizados com o auxílio dos programas Clustal X 1.8 e BioEdit 7.2.3. (Hall,
27 1999). Nas análises foram incluídas as seqüências completas (GRSPaV) ou parciais (GVA e

1 GLRaV-2) da proteína capsidial (CP) e completas de PNRSV dos genes da proteína CP e proteína
2 MP dos isolados caracterizados neste trabalho, isolados homólogos caracterizados no Brasil, além
3 do isolado-tipo da espécie viral e de uma sequência *outgroup*, disponíveis no banco de dados
4 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). O peso molecular das proteínas virais foi calculado usando a
5 ferramenta ExPASy. O estudo de relacionamento filogenético foi desenvolvido com auxílio do
6 programa MEGA 5.2, através do método de máxima parcimônia (Tamura et al., 2011).

7 **Resultados e Discussão**

8 Na cv. N. Rosada a incidência do vírus GVA foi 85% em plantas sint. e assint., GRSPaV 95%
9 sint. e 75% assint. e na cv. Merlot a incidência de GLRaV-2 nas plantas foi de 15% em sint. e 85%
10 assint.

11 O gene completo da proteína capsidial do GRSPaV dos isolados NiagRos4 e NiagRos5, com 780
12 nucleotídeos (nt.) e 259 aminoácidos deduzidos (aad.), foi amplificado por RT-PCR a partir de duas
13 amostras da cv. N. Rosada.

14 A identidade de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos entre os isolados NiagRos4
15 (assintomático) e NiagRos5 (sintomático) foi de 99,6%. As sequências de nucleotídeos desses dois
16 isolados (NiagRos4: GenBank KJ848784 e NiagRos5: KJ848785) apresentaram baixa identidade (81,9-
17 83,9%) com dois isolados de videira brasileiros (CF195 e IS2a) e alta identidade (90,8-98,2%) quando
18 comparados com outros nove isolados de videira nacionais (CF207, MG, PN, MH, CF208, CF210,
19 420A, CF195-2, CS1). A identidade de aad. entre os isolados NiagRos4 e NiagRos5 e esses 11 isolados
20 brasileiros variou entre 92,2% e 99,2%.

21 A grande proximidade entre os dois isolados estudados (NiagRos4 e NiagRos5) e o
22 relacionamento filogenético com 11 isolados brasileiros são mostrados na Fig. 1A.

23 O gene parcial da proteína capsidial do GVA, isolados NiagRos2 e NiagRos10, com 451
24 nucleotídeos e 140 aad, foi amplificado por RT-PCR a partir de duas amostras da cv. N. Rosada. A
25 identidade, entre os isolados NiagRos2 (sintomático) e NiagRos10 (assintomático), foi de 93,3% e
26 97,8%, para nucleotídeos e aad, respectivamente. As sequências de nucleotídeos desses dois isolados
27 (NiagRos2: GenBank KJ848782 e NiagRos10: KJ848783) apresentaram identidades entre 77,5% e

1 91,2%, com quatro isolados de videira brasileiros (IT-BA, GVA-RS, GVA-SP, PC40).

2 A identidade de aad entre os isolados NiagRos2 e NiagRos10 e esses quatro isolados de videira
3 nacionais variou entre 88,5% e 97,8%. A grande proximidade entre os dois isolados estudados
4 (NiagRos2 e NiagRos10) e o relacionamento filogenético com quatro isolados brasileiros são mostrados
5 na Fig. 1B.

6 A sequência parcial da proteína capsidial do GLRaV-2, isolados Mer8 e Mer31, com 397
7 nucleotídeos e 131 aad, foi amplificada por RT-PCR a partir de duas amostras da cv. Merlot. A
8 identidade entre os isolados Mer8 (sintomático) e Mer31 (assintomático) foi de 98,4% e 97,7%, para
9 nucleotídeos e aad, respectivamente. As sequências de nucleotídeos desses dois isolados (Mer8:
10 GenBank KJ958525 e Mer31: KJ958526) apresentaram identidades entre 86,6% e 98,9%, com oito
11 isolados brasileiros (M/C, L/I, SE, IT, MH, RI, CS2, IS3). A identidade de aad entre os isolados Mer8 e
12 Mer31 e esses oito isolados nacionais variou entre 91,6% e 100%. A grande proximidade entre os dois
13 isolados estudados (Mer8 e Mer31) e o relacionamento filogenético com oito isolados brasileiros são
14 mostrados na Fig. 1C.

15 Em conjunto, as análises das sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos dos isolados de
16 GRSPaV, GVA e GLRaV-2, obtidos a partir de videiras sintomáticas e assintomáticas, demonstraram
17 altas porcentagens de identidade entre si e também com isolados homólogos, conseqüentemente não
18 poderiam explicar as diferenças de expressão de sintomas (ou a ausência deles) verificadas entre os dois
19 grupos de plantas avaliadas. Apesar da limitada abrangência do estudo de variabilidade viral, os
20 resultados sugerem que os sintomas observados em videira (ou sua ausência) poderiam estar
21 relacionados a outros fatores (ex. diferentes períodos desde a infecção viral entre plantas, isolados
22 latentes) ou associados a outras regiões ou domínios no genoma viral diferentes dos fragmentos
23 sequenciados. Estudos anteriores demonstraram a existência de isolados latentes dos vírus GRSPaV
24 (Gambino et al., 2012), GVD (Rosa et al., 2011) e GLRaV-2 (Poojari et al., 2013) em videiras.

25 Com a utilização dos oligonucleotídeos para ApMV e ArMV não houve amplificação por RT-PCR
26 das amostras testadas. Contudo, para PNRSV em roseira foram amplificados dois fragmentos de DNA
27 com 681 bp e 852 bp compreendendo o gene completo das proteínas CP e MP de PNRSV,

1 respectivamente, e as duas ORFS (Open Reading Frame) na RNA3 de PNRSV, com 226 e 283 aad.,
2 respectivamente. A massa molecular da CP e MP de PNRSV, isolado Rose-Br foram de 25,3 KDa e
3 30,98 KDa. As duas sequências obtidas da CP e MP foram depositadas no GenBank, com código
4 KJ958526 e KM212170, das ORFs da CP e MP de PNRSV, respectivamente.

5 O alinhamento da sequência obtida do nucleotídeo da CP para PNRSV, isolado Rose-Br,
6 com outras sete sequências de PNRSV de roseira da Índia, Polônia e China disponível no GenBank,
7 apresentaram alta identidade variando entre 97,3% a 98,6%, sugerindo que há uma limitação na
8 variabilidade entre as CPs dos isolados analisados. Quando a comparação foi realizada com o gene
9 da CP de PNRSV entre, isolado Rose-Br e as sequências de nucleotídeo da CP de PNRSV de três
10 isolados de pêssigo brasileiro (EF565264, EF565265, EF565266), ampla variedade de identidades
11 foram verificadas (94,1% a 97,5%).

12 Análises filogenéticas da sequência da capa proteica de PNRSV de roseira e de *Prunus*
13 exibiram a formação de três grupos monofiléticos definidos por grupos de PNRSV (PV 32, PV 96 e
14 PE5) (Fig. 2).

15 O alinhamento entre a sequência de nucleotídeo de PNRSV, isolado Rose-Br, e duas
16 sequências de isolados de PNRSV da roseira da Índia e Polônia disponíveis no GenBank revelou
17 alta identidade, variando de 96% a 96,7% (Fig. 2A).

18 Comparações entre sequências de nucleotídeos das proteínas de MP da Índia (AJ697737) e
19 Polônia (DQ003584) apresentaram 98,9%. Quando a comparação entre a MP de PNRSV, isolado
20 Rose-Br e a MP de PNRSV das sequências de nucleotídeos de três isolados brasileiro de
21 pessegueiro (EF565241, EF565242, EF565243), ampla relação de identidade foi verificada (93,5%
22 a 96,5%), conforme Fig. 2B.

23 Análises filogenéticas de PNRSV da proteína de movimento das sequências de roseira e
24 *Prunus* também exibiram a formação de três grupos monofiléticos previamente definido por grupos
25 de PNRSV (PV32, PV96 e PE5). Todos os três isolados de roseira de PNRSV foram agrupados
26 como PV32, juntos com outros isolados de PNRSV das espécies *Prunus* spp. (cerejeira,
27 damasqueiro, pessegueiro e ameixeira) (Fig. 2B).

1 A massa molecular das proteínas CP e MP de PNRSV, isolado Rose-Br foi de 25,3 KDa e
2 30,98 KDa, respectivamente, algo semelhante ao que foi relatado por Guo et al. (1995) para
3 PNRSV de *Prunus mahaleb*. Isolados de PNRSV de roseira já foram detectados e caracterizados
4 molecularmente na Índia (Kulshrestha et al., 2013), Polônia (Paduch-Cichal & Sala-Rejczak, 2011),
5 França (Moury et al., 2001) e entre outros países.

6 Os isolados de PNRSV de roseira foram agrupados como PV32, apresentando dois
7 aminoácidos repetidos (6 nt: 119A/GTAG/AGA124) no primeiro terço da CP vindo de uma
8 duplicação de duas anteriores. Kulshrestha et al. (2013) realizaram análises das sequências de CP,
9 concluindo que o isolado de PNRSV na Índia pertence ao grupo PV32 dos isolados de PNRSV.
10 Além das características específicas já estabelecidas para os membros do grupo PV32 (Aparicio et
11 al., 1999), a especificidade do grupo e hospedeiro foram também características identificadas.

12 A presença de metionina na posição 90 no alinhamento da sequência do aminoácido do gene
13 da CP de PNRSV (pertencente ao grupo PV32), foi identificada como característica específica
14 conservada para os isolados de PNRSV da roseira, incluindo o isolado brasileiro (KJ958527).

15 Embora muitas das variabilidades observadas no primeiro terço da CP relatadas por
16 Aparicio et al. (1999), os resíduos dos aminoácidos nesta região, que pensava-se ser funcionalmente
17 importante no ciclo de replicação do vírus, eram estritamente conservadas. Nenhuma correlação
18 clara entre a variabilidade molecular, sequência primária do gene para a MP ou CP, propriedades
19 biológicas, a origem geográfica, especificidade de hospedeiros ou na sintomatologia pode ser
20 observada (Aparicio et al., 1999; Scott et al., 1998), assim vale mencionar a proximidade do
21 agrupamento do isolado de PNRSV da roseira (Fig. 2).

22 Análises de diferentes isolados revelaram uma falta de associação entre nucleotídeos
23 específicos ou aminoácidos padrões e origem dos hospedeiros, sintomatologia ou área geográfica,
24 embora a maioria dos isolados dos filogrupos PV93 e PV32 tendem demonstrar sintomas
25 latentes/leves ou cloróticas/necróticas. Análises moleculares do código de sequências do CP e MP
26 revelaram que ambas as proteínas são altamente conservadas, independentemente do hospedeiro e
27 origem geográfica dos isolados (Fiore et al., 2008). Os resultados obtidos consideram que o isolado

1 de PNRSV da roseira, junto com as análises filogenéticas são muito semelhantes aos obtidos por
2 Fiore et al. (2008) de PNRSV para alguns hospedeiros de *Prunus*.

3 Todos os três isolados de roseira de PNRSV foram agrupados como PV32, junto com outros
4 isolados de PNRSV da espécie *Prunus* spp (cerejeira, damasqueiro, pessegueiro e ameixeira).
5 Isolados de PNRSV classificados como grupo PE5 tem comprimento de 855 nucleotídeos na
6 sequência da proteína MP (extra 793ACT795) em vez de 852 bp dos grupos PV32 e PV36. Moury
7 et al. (2001) analisaram que todos os 27 isolados infecciosos de roseira testados em mudas de *P.*
8 *persica*, considerando que três dos quatro isolados de PNRSV de *Prunus* testados eram fracos
9 infecciosamente em plantas de *Rosa indica*. Estes dados evidenciaram adaptação de isolados de
10 PNRSV de *Prunus* spp., mas não de roseira, como suas plantas hospedeiras. No entanto, as
11 comparações das sequências de gene da capa proteica de isolados de roseira indicaram que eles não
12 formam um grupo filogenético distintos e demonstram relações estreitas com isolados de *Prunus*
13 spp.

14 Outro resultado obtido neste trabalho foi a incidência de PNRSV infectando prunus. Os
15 resultados para RT-PCR “convencional” demonstraram que as amostras 14, 28, 34 e 50 foram
16 positivas para PNRSV de prunus (Fig. 3C) com 6,2% de plantas infectadas e por RT-PCR em
17 tempo real apenas a amostra 14 foi positiva para PNRSV (Fig. 3A e 3B). De acordo com Moury et
18 al. (2001), o desenvolvimento da doença do mosaico da roseira em casa de vegetação foi muito
19 lento, assim sendo fácil de erradicar o PNRSV através de seleção sanitária. O contraste dos
20 resultados obtidos pelos dois métodos pode ser explicado pela variabilidade das sequências de
21 nucleotídeos nas regiões dos primers e sondas da PCR em tempo real e convencional, havendo
22 menor variabilidade nas regiões onde foram desenhados os primers para a PCR convencional. Em
23 ambos os resultados a incidência deste vírus foi baixa nas avaliações da coleção de germoplasma.

24 A caracterização das espécies virais que infectam *Prunus* spp. e *Vitis* spp. contribui para o
25 desenvolvimento de ferramentas de diagnose mais sensíveis e específicas, e também correlaciona
26 tais informações como sintomatologia, virulência, transmissão e entre outras propriedades
27 biológicas apresentadas pelo vírus, além disso, no presente trabalho foi realizado a primeira

1 caracterização molecular dos genes completos da CP e MP de um isolado brasileiro de PNRSV de
2 roseira.

3 O conhecimento da variabilidade viral permite selecionar regiões genômicas conservadas
4 para a detecção viral de forma mais confiável. Além da formação de um “banco” de genes virais
5 com uso em Biologia Molecular.

6 **Agradecimentos**

7 A Daniel Grohs, Marcos Vanni (Embrapa Uva e Vinho), pelo apoio técnico em diferentes etapas
8 deste trabalho. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) a primeira
9 autora agradece pela concessão da bolsa de estudo.

10 **Referências**

- 11 ALEXANDRE, M.A.V.; DUARTE, L.M.L. Identificação do *Prunus necrotic ringspot virus* em
12 roseira. **Tropical Plant Pathology**, v.34, p.S274, 2009.
- 13 ALEXANDRE, M.A.V.; DUARTE, L.M.L. **Mosaico da roseira**. São Paulo: Instituto Biológico,
14 2010, n. 128. (Boletim Técnico, 128).
- 15 APARICIO, F.; MYRTA, A.; DI TERLIZZI, B.; PALLAS, V. Molecular variability among isolates
16 of *Prunus necrotic ringspot virus* from different *Prunus* spp. **Phytopatology**, v.89, p.991-999,
17 1999.
- 18 BERTAZZON, N.; ANGELINI, E. Advances in the detection of *Grapevine leafroll-associated virus 2*
19 variants. **Journal of Plant Pathology**, v.86, p.283-290, 2004.
- 20 DUBIELA, C.R.; FAJARDO, T.V.M.; SOUTO, E.R.; NICKEL, O.; EIRAS, M.; REVERS, L.F.
21 Simultaneous detection of Brazilian isolates of grapevine viruses by TaqMan real-time RT-PCR.
22 **Tropical Plant Pathology**, v.38, p.158-65, 2013.
- 23 FAJARDO, T.V.M.; EIRAS, M.; MACIEL, S.C.; DANIELS, J.; NICKEL, O. Detecção e
24 caracterização molecular parcial de *Prune dwarf virus* e *Prunus necrotic ringspot virus* em
25 pessegueiro. **Summa Phytopatology**, v. 30, n. 2, p.287-289, 2004.
- 26 FAJARDO, T.V.M., EIRAS, M., NICKEL, O., DUBIELA, C.R., SOUTO, E.R. Detection and
27 partial molecular characterization of *Grapevine fleck virus*, *Grapevine virus D*, *Grapevine leafroll-*

- 1 *associated virus 5 and 6 infecting grapevines in Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, p. 2127-*
2 *2130, 2012.*
- 3 FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O.; EIRAS, M. **Detecção caracterização molecular dos genes da**
4 **proteína capsidial de ilarvírus e ampelovírus que infectam fruteiras temperadas.** Santa Maria:
5 *Revista de Ciência Rural*, v. 41, n. 1, 2011.
- 6 FAJARDO, T.M.V; NICKEL, O.; EIRAS, M.; KUHN, G.B. Detecção de um isolado de Grapevine
7 virus A e caracterização do gene da proteína capsidial. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 5, p. 521-
8 527, 2003.
- 9 FIORE, N.; FAJARDO, T.M.V.; PRODAN, S.; HERRANZ, M.C.; APARICIO, F.;
10 MONTEALEGRE, J. ELENA, SF.; PALLAS, V.; SÁNCHEZ-NAVARRO, J. Genetic diversity of
11 the movement and coat protein genes of South American isolates of *Prunus necrotic ringspot virus*.
12 **Archives of Virology**, v. 153, p. 909-919, 2008.
- 13 GAMBINO, G.; CUOZZO, D.; FASOLI, M.; PAGLIARANI, C.; VITALI, M.; BOCCACCI, P.;
14 PEZZOTTI, M.; MANNINI, F. Co-evolution between *Grapevine rupestris stem pitting-associated*
15 *virus* and *Vitis vinifera* L. leads to decreased defense responses and increased transcription of genes
16 related to photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v.63, p.5919-5933, 2012.
- 17 GUO, D.; MAISS, E.; ADAM, G.; CASPER, R. *Prunus necrotic ringspot ilarvirus*: nucleotide
18 sequence of RNA3 and the relationship to other ilarvirus based on coat protein comparison.
19 **Journal of General Virology**, v. 76, p. 1073-1079, 1995.
- 20 HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for
21 Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95-98, 1999.
- 22 KUHN, G. B.; FAJARDO, T.V.M. Importância da origem do material de propagação na qualidade
23 da muda de videira. Circular Técnica 50. **Embrapa Uva e Vinho**, Bento Gonçalves. 2004. 8p.
- 24 KULSHRESTHA, S.; HALLAN, V.; SHARMA, A.; SETH, C.A.; CHAUHAN, A.; ZAIDI, A.A.
25 Molecular characterization and intermolecular interaction of coat protein of *Prunus necrotic*
26 *ringspot virus*: implications for virus assembly. **Indian Journal of Virology**, v.24, p.235-241,
27 2013.

- 1 MARBOT, S.; SALMON, M.; VENDRAME, M.; HUWAERT, A.; KUMMERT, J.; DUTRECQ,
2 O.; LEPOIVRE, P. Development of Real-Time RT-PCR Assay for Detection of *Prunus* necrotic
3 ringspot virus in Fruit Trees. **Plant Disease**, v.87, n.11, p.1344-1348, 2003.
- 4 MARTELLI, G.P. Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents.
5 **Journal of Plant Pathology**, Bari, v.96 (1S), 2014. 136 p.
- 6 MINAFRA, A.; HADIDI, A.; MARTELLI, G.P. Detection of grapevine closterovirus A in infected
7 grapevine tissue by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Vitis**, v.31, p.221-227, 1992.
- 8 MOURY, B.; CARDIN, L.; ONESTO, J.P.; CANDRESSE, T.; POUPET, A. Survey of *Prunus*
9 *necrotic ringspot virus* in rose and its variability in rose and *Prunus* spp. **Phytopathology**, v.91,
10 p.84-91, 2001.
- 11 OSMAN, F.; LEUTENEGGER, C.; GOLINO, D.; ROWHANI, A. Real-time RT-PCR (TaqMan)
12 assays for the detection of *Grapevine leafroll associated viruses* 1-5 and 9. **Journal of Virological**
13 **Methods**, v.141, p.22-29, 2007.
- 14 OSMAN, F.; ROWHANI, A. Real-time RT-PCR (TaqMan) assays for the detection of viruses
15 associated with Rugose wood complex of grapevine. **Journal of Virological Methods**, v.154, p.69-75,
16 2008.
- 17 PADUCH-CICHAL, E.; SALA-REJCZAK, K. Biological and molecular characterization of *Prunus*
18 *necrotic ringspot virus* isolates from three rose cultivars. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.33,
19 p.2349-2354, 2011.
- 20 PALLAS, V.; APARICIO, F.; HERRANZ, M.C; AMARI, K.; SANCHEZ-PINA, M.A.; MYRTA,
21 A.; SANCHEZ-NAVARRO, J.A. Ilarviruses of *Prunus* spp.: A continued concern for fruit trees.
22 **Phytopathology**, v.102, n. 12, p.1108-1120, 2012.
- 23 POOJARI, S.; ALABI, O.J.; NAIDU, R.A. Molecular characterization and impacts of a strain of
24 *Grapevine leafroll-associated virus 2* causing asymptomatic infection in a wine grape cultivar.
25 **Virology Journal**, v.10, p.324-328, 2013.
- 26 RADAELLI, P.; FAJARDO, T.V.M.; NICKEL, O.; EIRAS, M.; PIO-RIBEIRO, G. Variabilidade do
27 gene da proteína capsidial de três espécies virais que infectam videiras no Brasil. **Tropical Plant**

1 **Pathology**, v.34, p.297-305, 2009.

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

5 SCOTT, S.W.; ZIMMERMAN, M.T.; GE, X.; MACKENZIE, D.J. The coat proteins and putative
6 movement proteins of isolates of *Prunus necrotic ringspot virus* from different host species and
7 geographic origins are extensively conserved. **European Journal of Plant Pathology**, p.104,
8 p.155-161, 1998.

9 TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5:
10 molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and
11 maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, p.2731-2739, 2011.

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

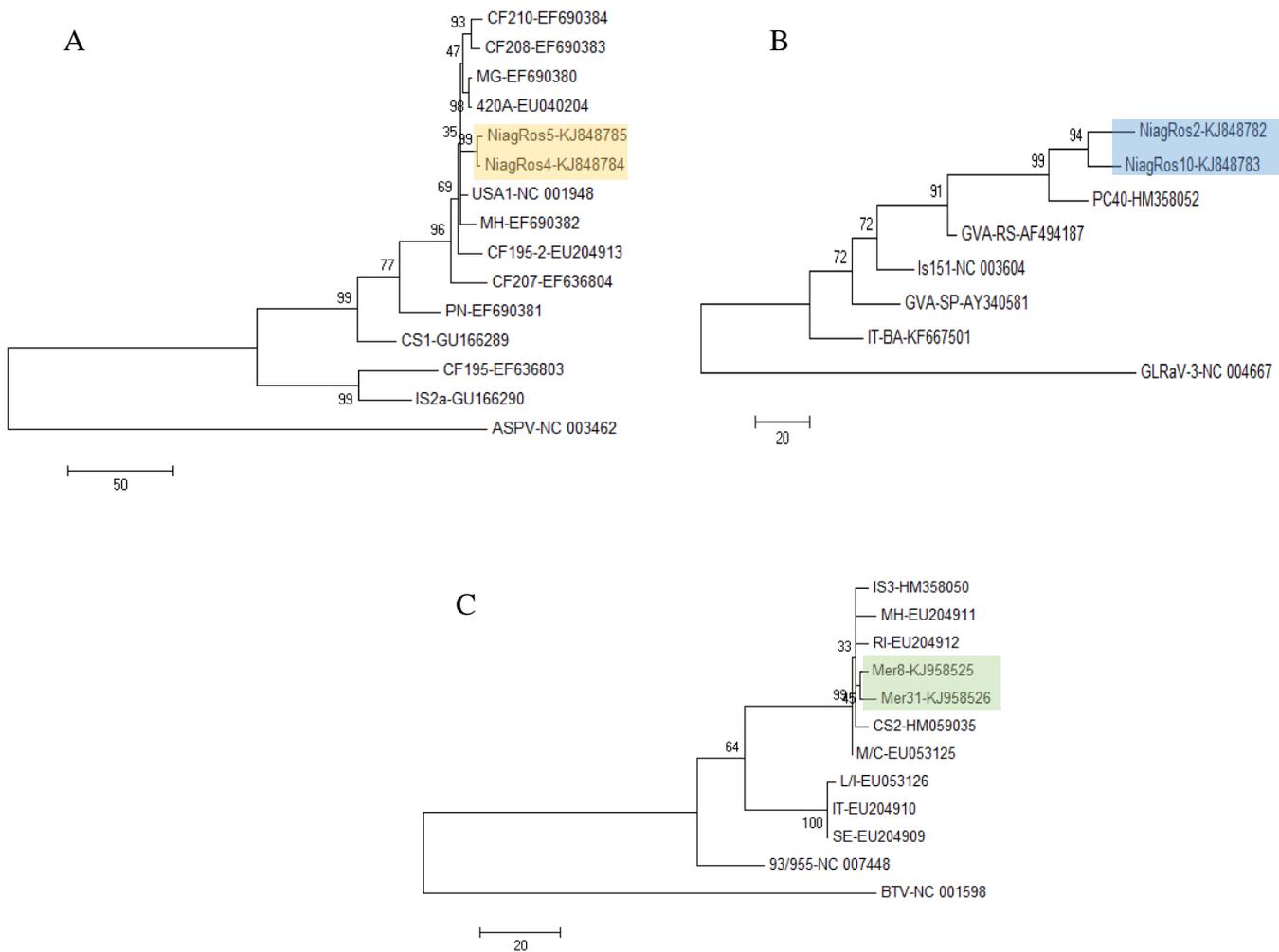
25

26

27

28

29



1

2

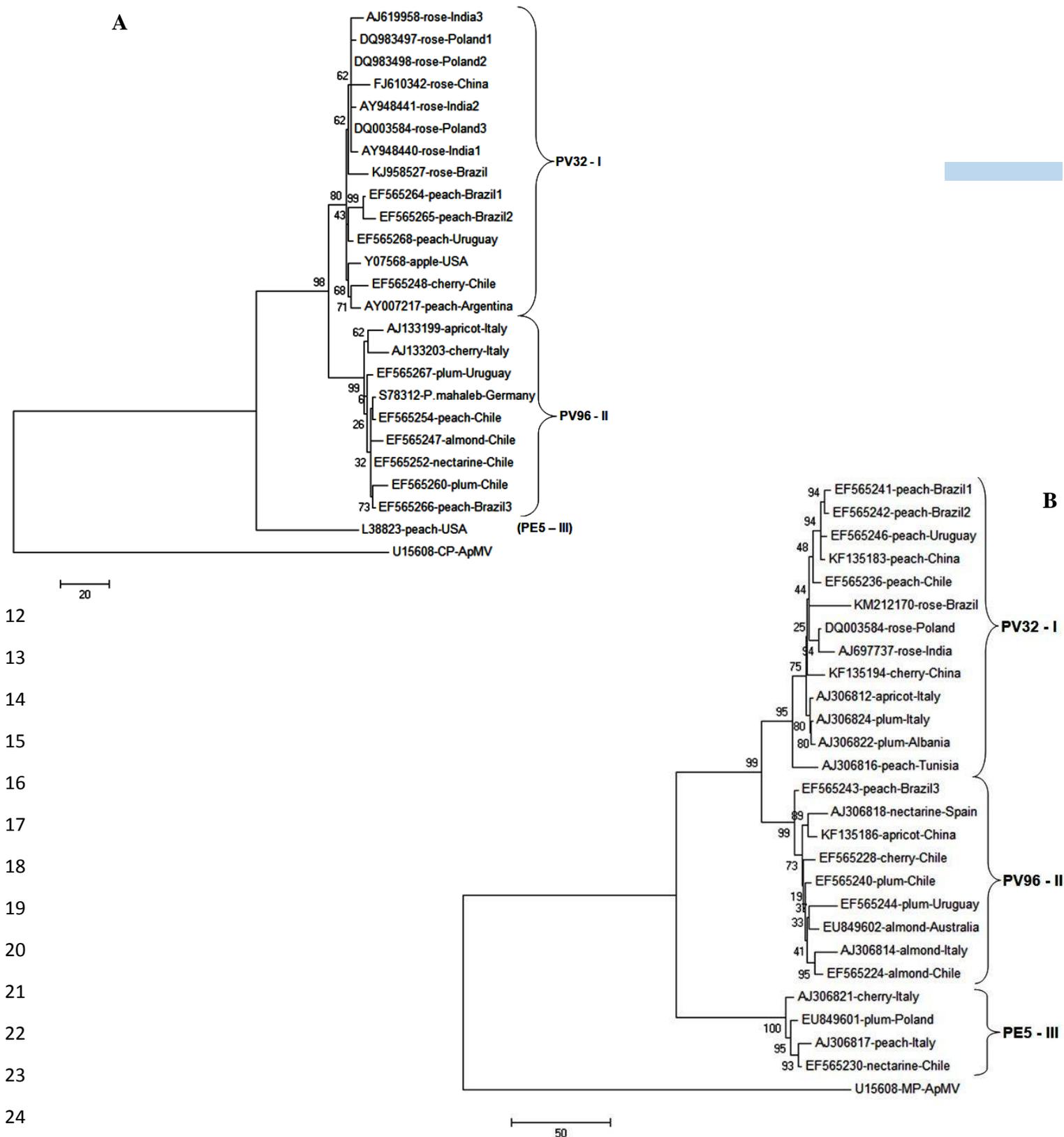
3

4

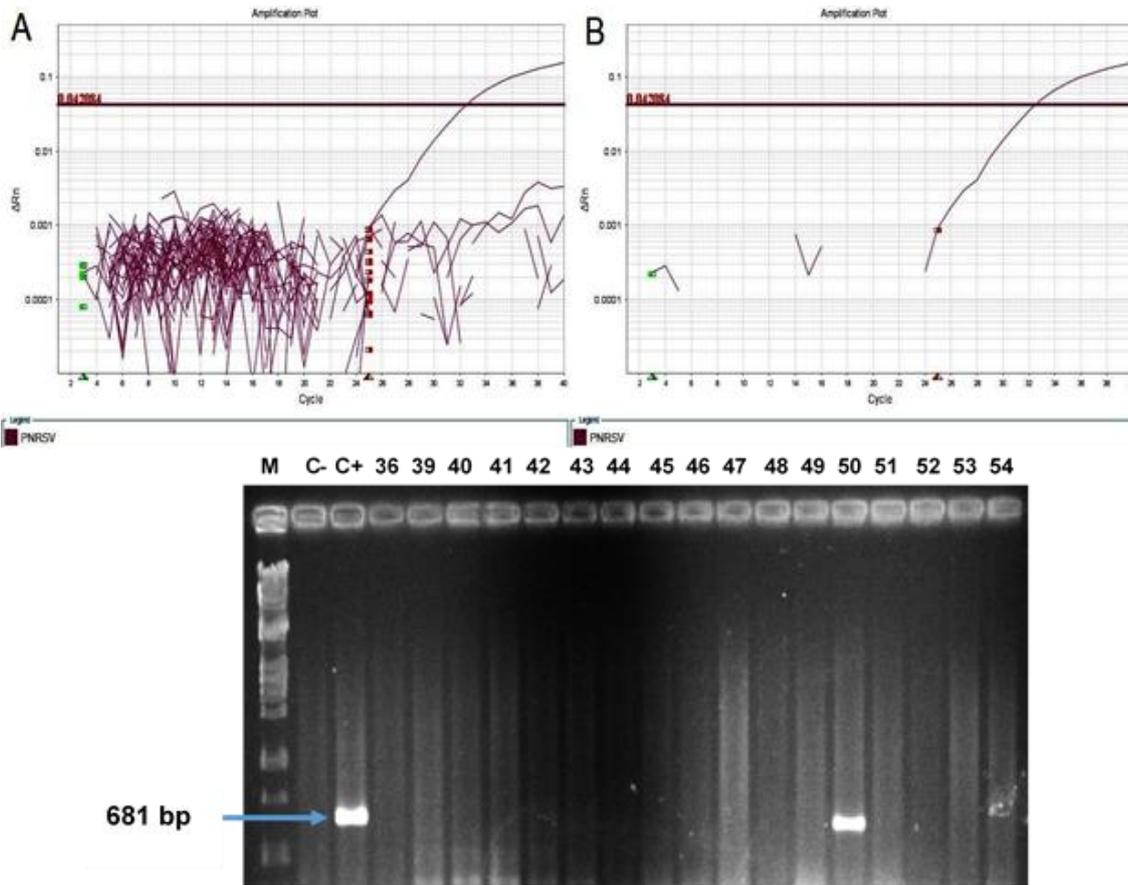
5

6 **Figura 1.** Árvores filogenéticas, obtidas com o programa MEGA 5.2, através do método de máxima parcimônia com
 7 bootstrap de 10000 réplicas, baseadas nas sequências completas (780 pb) de nucleotídeos do gene da proteína capsidial
 8 de 13 isolados brasileiros de GRSPaV (A) e parciais de nucleotídeos da CP (451 pb) de 6 isolados brasileiros de GVA
 9 (B) e da CP (397 pb) de 10 isolados brasileiros de GLRaV-2 (C). Valores percentuais de bootstrap são mostrados nos
 10 ramos. As barras indicam número de substituições de nucleotídeos por sítio. Os códigos de acesso dos isolados no
 11 GenBank estão mencionados após o nome do isolado viral. Isolados caracterizados nesse trabalho: NiagRos4, NiagRos
 12 5 (GRSPaV), NiagRos2, NiagRos 10 (GVA), Mer8, Mer31 (GLRaV-2). Além dos isolados locais foram incluídos os
 13 isolados-tipo de cada espécie viral (GRSPaV: USA1-NC_001948 dos EUA; GVA: Is151-NC_003604 da Itália;
 14 GLRaV-2: 93/955-NC_007448 da África do Sul). Para os grupos externos foram utilizadas as espécies-tipo dos
 15 gêneros: *Foveavirus* (*Apple stem pitting virus*, ASPV, NC_003462), *Ampelovirus* (*Grapevine leafroll-associated virus*
 16 *3*, GLRaV-3, NC_004667) e *Closterovirus* (*Beet yellows virus*, BYV, NC_001598), respectivamente.

17



25 **Figura 2.** Árvore filogenética de três isolados de PNRSV de rosa e algumas espécies de *Prunus*, obtido com o programa
 26 MEGA 5.2, pelo método da máxima parcimônia com bootstrap de 10.000 repetições, baseado em sequências completas
 27 de nucleotídeos do gene da capa proteica (A) e genes da proteína de movimento (B). Código de acesso das sequências
 28 depositados no GenBank são também informadas, bem como a classificação de PNRSV em três grupos. ApMV é o
 29 outgroup.



1

Figura 3. Resultado gráfico da amplificação por RT-PCR em tempo real (TaqMan) de 65 amostras de *Prunus* do BAG da Embrapa (Pelotas) (A); Destaque da amplificação da amostra 14 (B); RT-PCR “convencional” das amostras de pessegueiros com primers para CP de PNRSV (C). M: Marcador λDNA/PSTI; C-: controle negativo para PNRSV; C+: controle positivo para PNRSV; 36-54: amostras de pessegueiro.

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

1. Nas condições avaliadas, videiras assintomáticas estão frequentemente infectadas por vírus.
2. Videiras infectadas por vírus, de forma assintomática, são afetadas negativamente pelo patógeno, porém em menor intensidade quando comparadas com as sintomáticas.
3. A análise molecular comparativa entre isolados de GRSPaV, GVA e GLRaV-2, de plantas sintomáticas e assintomáticas, demonstrou alta identidade de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos entre isolados homólogos e, dificilmente, pode explicar as diferenças na expressão ou ausência de sintomas em videiras.
4. A constatação de alta incidência dos vírus GRSPaV e GVA em plantas de matrizeiros comerciais caracteriza estes materiais como importante fonte de inóculo na formação de vinhedos
5. Nos genótipos analisados, o *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) ocorre em baixa incidência em pessegueiro.
6. A caracterização de um isolado de PNRSV, incluindo genes completos da proteína capsidial (CP) e proteína de movimento (MP), realizados nesse trabalho, foi a primeira com um isolado obtido de roseira no Brasil.
7. A proximidade genética entre os isolados de PNRSV de prunus e roseira, sugere a possibilidade de disseminação do vírus entre cultivos ou a geração de eventos de recombinação viral.

