

Detecção e Caracterização Molecular Parcial do *Grapevine fleck virus* em Videiras

Thor V.M. Fajardo¹, Marcelo Eiras², Paula G. Schenato^{3*}, Osmar Nickel¹ & Gilmar B. Kuhn¹

¹Embrapa Uva e Vinho, Cx. Postal 130, CEP 95700-000, Bento Gonçalves, RS, e-mail: thor@cnpuv.embrapa.br; ²Centro de Sanidade Vegetal, Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, SP; ³Universidade de Caxias do Sul - CARVI, Bento Gonçalves, RS

(Aceito para publicação em 25/03/2004)

Autor para correspondência: Thor V.M. Fajardo

ABSTRACT

Detection and partial molecular characterization of *Grapevine fleck virus* in grapevines

This paper reports the serological detection and partial molecular characterization of *Grapevine fleck virus* (GFkV) in

grapevine (*Vitis* spp.) samples from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. The GFkV was detected mainly in grape indicator cv. Rupestris du Lot showing fleck disease after biological indexing.

A mancha das nervuras é uma virose que apresenta alta incidência e, por ser latente em praticamente todas as cultivares de copa e porta-enxerto de videira (*Vitis* spp.), faz parte dos programas de seleção sanitária da maioria dos países vitícolas. É causada pelo *Grapevine fleck virus* (GFkV), família *Tymoviridae* (Martelli *et al.*, Arch. Virol. 147:1837. 2002), gênero *Maculavirus* (Martelli *et al.*, Arch. Virol. 147:1847. 2002). O GFkV não possui vetor conhecido, não é transmitido mecanicamente, sendo disseminado pelo material propagativo infetado. A cultivar de porta-enxerto *Vitis rupestris* Scheele cv. Rupestris du Lot é utilizada como indicadora desta virose, apresentando, como sintomas característicos, manchas translúcidas nas folhas, sem formas definidas e que acompanham as nervuras (Kuhn, Fitopatol. Bras. 17:435. 1992). O objetivo deste trabalho foi detectar sorologicamente o GFkV em videiras cv. Rupestris du Lot, mantidas em casa de vegetação na Embrapa Uva e Vinho, exibindo sintomas característicos da doença, e caracterizar parcialmente este isolado viral.

No TAS-ELISA (Boscia *et al.*, Plant Pathology 44: 160.1995) utilizou-se anti-soro comercial contra GFkV (Agritest, Itália). As amostras de folhas novas do porta-enxerto cv. Rupestris du Lot sintomáticas foram trituradas em nitrogênio líquido e tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 8,2, NaCl a 0,8%, PVP 40000 a 2%, PEG 6000 a 1% e Tween 20 a 0,05%. Foram consideradas infetadas as amostras cuja absorbância foi de, no mínimo, duas vezes a verificada nas amostras sadias. O RNA total foi extraído a partir de folhas novas de plantas sintomáticas, utilizando-se o "RNeasy Plant Mini Kit" (Qiagen). Na RT-PCR foram utilizados os oligonucleotídeos FkV1 / FkV2, específicos para GFkV (Sabanadzovic *et al.*, Vitis 35:137. 1996). O fragmento de DNA amplificado foi eluído do gel, ligado ao vetor pGEM-T Easy (Promega), clonado em

Escherichia coli DH5 α e sequenciado (dois clones). As seqüências obtidas de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos foram comparadas com outras depositadas no banco de dados GenBank.

Todas as amostras avaliadas por TAS-ELISA reagiram positivamente com o anti-soro contra GFkV. A partir das mesmas amostras amplificou-se um fragmento de DNA de tamanho esperado: 245 bp, contendo parte do gene da replicase do GFkV (ORF1), entre os nucleotídeos 5573 e 5817, e em relação ao acesso AJ309022 (Sabanadzovic *et al.* J. G. Virology 82:2009. 2001). As seqüências obtidas de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos (81 aa) (Figura 1) apresentaram maiores correspondências, 93,5% e 100%, respectivamente, com o isolado italiano MT48 do GFkV (GenBank AJ309022/CAC84400).

Estes resultados confirmam a presença do GFkV em videiras indexadas positivas, por enxertia em indicadora para a virose da mancha das nervuras. A técnica de RT-PCR juntamente com o ELISA constituem-se em ferramentas úteis para rápida e sensível detecção desse vírus em videiras, especialmente em atividades de monitoramento de campos de plantas-matrizes.

```
AGTACCTCCTCCACCGCACCCCGTCTCGTCTCCGGCGACGACTCCCTCG 51
  Y L L H R T P V L V S G D D S L
TCGACCGTGTCCCTCCTATGAACCCCTTCCTGGCCCGCCCTAGCCCCCTCT 102
V D R V P P M N P S W P A L A P L
TCGCCCTCAAGCCCAAGCCCGAGACCTCCCCCTTTGGCCTTTCTGCGGCT 153
F A L K P K P E T S P F G L F C G
ACTTCGTGGCCCGCGCGCAGTCCGCGCCCGCGTGCCTTTTCGCCA 204
Y F V G P A G A V R A P R A L F A
AGCTTGCCATCGCCCTCGAGGACGGCTCTCTGCCCGAGAAA 245
K L A I A L E D G S L P E K
```

FIG. 1 - Seqüência parcial de nucleotídeos (superior) e aminoácidos deduzidos (inferior) do gene da replicase do *Grapevine fleck virus* (GFkV).

*Bolsista da FAPERGS