



Variabilidade do gene da proteína capsidial de três espécies virais que infectam videiras no Brasil

Paula Radaelli¹, Thor V.M. Fajardo², Osmar Nickel², Marcelo Eiras³ & Gilvan Pio-Ribeiro¹

¹Departamento de Agronomia Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brasil; ²Embrapa Uva e Vinho, 95700-000, Bento Gonçalves, RS, Brasil; ³Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, 04014-002, São Paulo, SP, Brasil

Autor para correspondência: Thor V.M. Fajardo, e-mail: thor@cnpuv.embrapa.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade de três vírus (*Rupestris stem pitting-associated virus* - RSPaV, *Grapevine leafroll-associated virus 2* - GLRaV-2 e *Grapevine fanleaf virus* - GFLV) que infectam videiras no Brasil, através da caracterização molecular do gene da proteína capsidial (CP). Foram amplificados fragmentos que compreendem os genes completos da CP de nove isolados de RSPaV (780 pb), seis de GLRaV-2 (597 pb) e três de GFLV (1515 pb) por RT-PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para cada espécie viral. Os DNAs amplificados foram clonados e sequenciados. Os isolados de RSPaV foram reunidos em quatro grupos pela análise filogenética das sequências obtidas com valores de identidade de nucleotídeos (nt) que variaram de 81 a 99%. Para GLRaV-2, dois grupos foram definidos a partir das sequências de nt, com valores de identidade que variaram de 88 a 99% e, para GFLV, foram definidos dois grupos, com valores de identidade de nt que variaram de 89 a 98%. Os diferentes isolados das três espécies virais estudadas também foram detectados utilizando-se hibridização com sondas não-radioativas, marcadas com digoxigenina, possibilitando identificar de forma inequívoca as amostras infectadas, independentemente dos isolados virais empregados para síntese das sondas.

Palavras-chave: RSPaV, GLRaV-2, GFLV, RT-PCR, *Vitis* spp., sonda não-radioativa.

ABSTRACT

Coat protein gene variability of three viral species infecting grapevines in Brazil

The purpose of this study was to evaluate the variability of three viruses (*Rupestris stem pitting-associated virus* - RSPaV, *Grapevine leafroll-associated virus 2* - GLRaV-2 and *Grapevine fanleaf virus* - GFLV) infecting grapevines in Brazil, through molecular characterization of the coat protein (CP) gene. DNA fragments were amplified comprising the complete CP genes of nine isolates of RSPaV (780 bp), six of GLRaV-2 (597 bp) and three of GFLV (1515 bp) by RT-PCR, using specific primers for each viral species. The amplified DNA fragments were cloned and sequenced. RSPaV isolates were clustered into four groups by phylogenetic analysis of the nucleotide (nt) sequences of the CP gene, showing identity values ranging from 81 to 99%. For GLRaV-2, two groups were defined from nt sequences, with identity values ranging from 88 to 99% and for GFLV, two groups were defined with identity values ranging from 89 to 98%. The isolates of each viral species studied here were detected by non-radioactive probes labeled with digoxigenin, allowing unambiguous identification of infected samples, independent of the isolate used as template for probe synthesis.

Keywords: RSPaV, GLRaV-2, GFLV, RT-PCR, *Vitis* spp., non-radioactive probes.

INTRODUÇÃO

No Brasil, dentre as doenças virais da videira (*Vitis* spp.), as caneluras do tronco, o enrolamento da folha e a degenerescência apresentam-se como aquelas de maior relevância, seja pela expressiva incidência ou pelos danos que causam (Fajardo et al., 2003). “*Rupestris stem pitting* - RSP”, doença conhecida por “caneluras do tronco de *Rupestris*”, faz parte do complexo viral do “lenho rugoso

da videira”, e caracteriza-se por induzir alterações no lenho das videiras, com reflexos negativos na qualidade dos frutos e na produção (Martelli, 1993; Credi, 1997). O *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV), família *Flexiviridae*, gênero *Foveavirus*, agente causal das caneluras do tronco de *Rupestris*, possui partículas alongadas e flexuosas com cerca de 800 x 12 nm, CP de 28 kDa e genoma de RNA de fita simples e senso positivo com 8726 nucleotídeos (nt), organizado em cinco ORFs. A ORF5 (nt 7770 a 8549) codifica o gene CP (Meng et al., 1998; Zhang et al., 1998; Fauquet et al., 2005).

Infecções mistas com outros vírus são comumente detectadas em videira, o que dificulta a definição das propriedades biológicas das diferentes variantes deste vírus

Parte da Tese de Doutorado da primeira autora. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife PE. 2009.

(Meng et al. 1999, Meng et al., 2005b). Recentemente, Nakaune et al. (2008) enfatizaram a diversidade viral associada ao lenho rugoso, destacando a importância de estudos de variabilidade genética por meio de análises de sequência de isolados de RSPaV.

O enrolamento da folha da videira (agente causal: *Grapevine leafroll-associated virus*, GLRaV) é mundialmente uma das mais importantes doenças virais da cultura, causando, em *V. vinifera* L., declínio, enrolamento e alteração de cor das folhas, com reduções da produção e da qualidade das bagas. Podem estar envolvidas no complexo viral causador desta doença até nove espécies (GLRaV-1 a -9), destacando-se, pela incidência e danos que ocasionam, as espécies GLRaV-1 e GLRaV-3 (família *Closteroviridae*, gênero *Ampelovirus*) e GLRaV-2, a única espécie do complexo classificada na família *Closteroviridae*, gênero *Closterovirus* (Fajardo et al., 2003; Fauquet et al., 2005). O GLRaV-2 também se destaca pelos sintomas específicos que pode induzir, pois está associado aos sintomas de incompatibilidade da enxertia e de declínio em vinhedos jovens (Abou Ghanem-Sabanadzovic et al., 2000; Martelli et al., 2002; Bertazzon & Angelini, 2004; Meng et al., 2005a). O GLRaV-2 possui partículas alongadas e flexuosas, genoma de RNA de fita simples e senso positivo com 16.494 nt e oito ORFs. A ORF6 codifica a CP (22 kDa) (Abou-Ghanem et al., 1998; Meng et al., 2005a; Beuve et al., 2007).

Embora diversos isolados de GLRaV-2 e algumas variantes biológicas deste vírus tenham sido identificadas em diferentes genótipos de videira, ainda há carência de trabalhos de caracterização molecular mais abrangentes, o que limita a definição de oligonucleotídeos mais apropriados ao diagnóstico (Beuve et al., 2007). Os dois primeiros isolados sequenciados de GLRaV-2, das cultivares Pinot Noir e Semillon, foram obtidos nos EUA e exibiram grande variabilidade molecular em relação ao isolado "H4" deste vírus (Meng et al., 2005a).

A degenerescência da videira, causada pelo *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), ocorre em praticamente todos os países vitícolas causando danos consideráveis (Pearson & Goheen, 1988). No Brasil, a incidência desta doença é restrita, se comparada às duas viroses anteriormente mencionadas (Kuniyuki et al., 1994). O GFLV, família *Comoviridae*, gênero *Nepovirus*, possui partículas isométricas de 30 nm de diâmetro, o genoma viral é composto por dois RNAs de fita simples e senso positivo, que são encapsulados em partículas distintas. A CP, de 54 kDa, é codificada pelo RNA 2.

A transmissão dessas três espécies virais ocorre através da enxertia utilizando-se gemas infectadas, enquanto a dispersão das viroses se dá por meio de material propagativo infectado. Apenas o GFLV apresenta transmissão por vetores (nematóides) (Pearson & Goheen, 1988).

A alta variabilidade genética de espécies virais dificulta a obtenção de ferramentas moleculares universais de

detecção e identificação. Já se demonstrou que a indexação por RT-PCR de videiras infectadas com determinado isolado viral, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para outro isolado, pode resultar em falso-negativo (Bertazzon & Angelini, 2004). Tais resultados servem para ressaltar a importância do estudo da variabilidade viral visando-se à implementação de técnicas mais sensíveis e precisas para a detecção, a exemplo do uso da hibridização molecular (sondas) e da RT-PCR. O objetivo deste trabalho foi estudar a variabilidade dessas três espécies virais (RSPaV, GLRaV-2 e GFLV) no Brasil, por meio da caracterização molecular do gene CP.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados virais

Os nove isolados virais de RSPaV foram obtidos de diferentes videiras mantidas em casa de vegetação na Embrapa Uva e Vinho (Bento Gonçalves, RS), sendo que os isolados CF195 e CF195-2 são provenientes da mesma planta. Os seis isolados de GLRaV-2 e dois de GFLV (RUP e IAC) foram obtidos de plantas cedidas pelo Dr. Hugo Kuniyuki (IAC-Campinas, SP). O terceiro isolado de GFLV (RS) foi obtido de material mantido em videiras em casa de vegetação na Embrapa Uva e Vinho. A relação de todos os isolados utilizados neste trabalho encontra-se na Tabela 1. É possível que as plantas-fonte dos isolados estudados estivessem infectadas com outras espécies virais que infectam a videira, porém isto não foi analisado.

Extração de RNA total

A extração de RNA total, a partir de 100 mg de fragmentos de lenho ou de nervuras e pecíolos de folhas maduras de videiras infectadas com RSPaV ou GLRaV-2 e folhas de brotações novas para GFLV, foi realizada utilizando-se o kit "RNeasy Plant Mini" (Qiagen), triturando-se o tecido vegetal em nitrogênio líquido e seguindo as instruções do fabricante, ou pelo método de adsorção em sílica (Rott & Jelkmann, 2001).

Síntese do cDNA e RT-PCR

Procedeu-se à síntese do cDNA viral e às reações de PCR conforme descrito por Fajardo et al. (2000). Os oligonucleotídeos empregados na RT-PCR encontram-se descritos na Tabela 2. Para o isolado 420A de RSPaV foram utilizados os oligonucleotídeos RSP52/RSP53 e para os demais isolados os oligonucleotídeos RSPaV-V1/RSPaV-C1. Para as amplificações do gene CP completo do GFLV foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos com sobreposição parcial de sequências de nt nos fragmentos amplificados (Tabela 2). As reações de PCR foram submetidas a 35 ciclos de amplificação, consistindo de desnaturação (94°C/50 s), pareamento (50°C/50 s) e extensão (72°C/1 min). Os produtos das amplificações foram analisados em géis de agarose 1,2%, preparados em tampão TBE, pH 8,0. Os fragmentos de DNA de tamanho

TABELA 1 - Relação dos isolados virais de RSPaV, GLRaV-2 e GFLV utilizados no trabalho e suas origens

Vírus	Isolado	Cultivar	Procedência	Nucleotídeos do gene da CP (pb)	Código no GenBank
RSPaV	CF195	Cabernet Franc	campo experimental/Bento Gonçalves, RS	780	EF636803
RSPaV	CF207	Cabernet Franc	campo experimental/Bento Gonçalves, RS	780	EF636804
RSPaV	MG	Moscato Giallo	quarentena/Bento Gonçalves, RS	780	EF690380
RSPaV	PN	Pinot Nero	quarentena/Bento Gonçalves, RS	780	EF690381
RSPaV	MH	Moscato de Hamburgo	quarentena/Bento Gonçalves, RS	780	EF690382
RSPaV	CF208	Cabernet Franc	campo experimental/Bento Gonçalves, RS	780	EF690383
RSPaV	CF210	Cabernet Franc	campo experimental/Bento Gonçalves, RS	780	EF690384
RSPaV	420A	420A	programa limpeza clonal/Bento Gonçalves, RS	780	EU040204
RSPaV	CF195-2	Cabernet Franc	campo experimental/Bento Gonçalves, RS	780	EU204913
GLRaV-2	M/C	Mission/Concord	São Roque, SP	597	EU053125
GLRaV-2	L/I	LN33/Isabel	São Roque, SP	597	EU053126
GLRaV-2	SE	Seibel	São Roque, SP	597	EU204909
GLRaV-2	IT	Itália	Capão Bonito, SP	597	EU204910
GLRaV-2	MH	Moscatel de Hamburgo	Jundiá, SP	597	EU204911
GLRaV-2	RI	Riesling	Videira, SC	597	EU204912
GFLV	RS	Prosecco Tondo	coleção cultivares/Bento Gonçalves, RS	1515	EU038294
GFLV	RUP	Rupestris du Lot/Maria (IAC 514-6)	Janaúba, MG	1515	EU258680
GFLV	IAC	IAC 766/106-8 (Riparia do Traviú)	Jundiá, SP	1515	EU258681

TABELA 2 - Relação dos oligonucleotídeos utilizados para as ampliações dos isolados virais de RSPaV, GLRaV-2 e GFLV

Vírus	Oligonucleotídeo	Seqüência 5' - 3'	Orientação	Fragmento amplificado (pb)	Referência
RSPaV	RSPaV-V1	ATGGCAAGTCAA ATTGGGAAAC	senso	780 (gene CP)	este trabalho
RSPaV	RSPaV-C1	TCATTCATGTGTAACATTGAA	antisenso		
RSPaV	RSP52	TGAAGGCTTTAGGGGTTAG	senso	905 (gene CP e região que flanqueia)	Rowhani et al. (2000)
RSPaV	RSP53	CTTAACCCAGCCTTGAAATG	antisenso		
GLRaV-2	GLR2CP1	ATGGAGTTGATGTCCGAC	senso	597 (gene CP)	Abou Ghanem-
GLRaV-2	GLR2CP2	TACATAACTTCCCTTCTACC	antisenso		Sabanadzovic et al. (2000)
GFLV	5_CP_GFLV	CTTCCTCAACTTGAGGCTG	senso	549 (5' terminal CP)	Brandt et al. (1995)
GFLV	GFLV(c)	CCAAAGTTGGTTCCCAAGA	antisenso		Rowhani et al. (1993)
GFLV	GFLV-int-cp-v1	CTTGGGAAACCACTTTGG	senso	1067 (meio e 3')	este trabalho
GFLV	EV00N1-GFLVr	CACATATATACTTGGGTCTTTTAA	antisenso	terminal CP)	Vigne et al. (2004)

esperado foram eluídos utilizando-se o kit “Perfectprep Gel Cleanup” (Eppendorf), de acordo com as especificações do fabricante.

Clonagem, seleção de clones recombinantes e análise das sequências

Os fragmentos de DNA foram ligados aos vetores pGEM-T Easy (Promega) para RSPaV e GFLV e pCR 2.1 (Invitrogen) para GLRaV-2, de acordo com as instruções dos respectivos fabricantes. As reações de ligação foram utilizadas na transformação, por choque térmico, de células competentes de *Escherichia coli* DH5 α ou TOP10. O DNA plasmidial das colônias bacterianas transformadas foi extraído utilizando-se o kit “Flexi Prep” (Amersham Biosciences) e a confirmação da presença dos fragmentos correspondentes aos genes das CPs virais, nos plasmídeos recombinantes, foi realizada por digestão com a enzima de restrição *EcoRI*. O sequenciamento automático de nt resultou na obtenção das sequências completas dos genes CP dos isolados virais estudados.

As sequências de nt foram alinhadas com o auxílio do programa Clustal X 1.8. As comparações com outras sequências (nt e aminoácidos deduzidos) do GenBank foram obtidas utilizando-se o programa BLASTn do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Os alinhamentos múltiplos e as inferências filogenéticas foram realizados para as sequências completas de nt do gene CP de cada vírus (RSPaV, GLRaV-2 e GFLV) utilizando o programa Mega 4.1 (Tamura et al., 2007). Foram incluídas nas análises as sequências do gene CP de isolados estrangeiros depositadas no banco de dados GenBank e que apresentaram maiores identidades de nucleotídeos com os isolados estudados, as sequências do gene CP do isolado tipo de cada espécie viral e, para os grupos externos das árvores, foram utilizadas as espécies tipo de cada gênero: *Apple stem pitting virus* (ASPV, *Foveavirus*), *Beet yellows virus* (BYV, *Closterovirus*) e *Tobacco ringspot virus* (TRSV, *Nepovirus*). As árvores foram obtidas por meio de análise de máxima parcimônia e “bootstrap” com 2000 replicações.

Sondas não-radioativas

Na síntese das sondas utilizou-se o kit “DIG DNA Labeling” (Roche), seguindo-se as recomendações do fabricante, e usando-se como molde o gene CP de cada vírus, obtido pela digestão dos plasmídeos recombinantes com *EcoRI* ou pela amplificação dos genes CP, presentes nestes plasmídeos. Para RSPaV foram produzidas sondas a partir da marcação dos genes CP dos isolados CF210, MG e MH; para GLRaV-2 utilizaram-se sondas marcadas dos isolados M/C e L/I; e para GFLV foi marcado o gene CP do isolado RS. Como controle positivo foi usado DNA correspondente ao gene CP dos vírus detectados e, como controle negativo, RNA total extraído de videiras comprovadamente sadias.

Para a hibridização “dot-blot”, os RNAs totais (10-40 μ L) foram aplicados em membrana de náilon (Roche) com auxílio do aparelho “Bio-dot” (BioRad) e fixados

à membrana durante 2 h a 80°C. A pré-hibridização foi conduzida a 68°C por 2 h em solução padrão contendo SDS 0,02%, reagente bloqueador 1% (Roche), SSC 5X (SSC 1X = citrato de sódio 0,03 M pH 7,0, NaCl 0,3 M) e N-lauroylsarcosina 0,1%. Em seguida procedeu-se às hibridizações a 68°C por 15 h com as respectivas sondas para a detecção de cada vírus, previamente desnaturadas (15 min a 95°C) e diluídas em solução de pré-hibridização. Seguiram-se as lavagens com SSC 2X contendo SDS 0,1% (2x por 5 min/temperatura ambiente), SSC 0,1X com SDS 0,1% (2x por 15 min/68°C) e com tampão maléico (ácido maléico 0,1 M, NaCl 0,15M, pH 7,5) contendo Tween-20 a 0,3% (1x por 10 min/temperatura ambiente). As membranas foram bloqueadas por uma hora a temperatura ambiente em tampão maléico com reagente bloqueador a 1% (Roche). À solução bloqueadora foi acrescido anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Roche), incubando-se por 30 min a temperatura ambiente. Duas lavagens foram realizadas com tampão maléico acrescido de Tween-20 a 0,3% por 15 min e uma lavagem com tampão Tris-HCl 0,1M pH 9,5, NaCl 0,1M por 5 min. A revelação foi realizada com a adição de substrato quimioluminescente CDP-Star (Roche) sobre a membrana e posterior exposição da mesma a um filme de raio X por 20 min.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RSPaV

Nas reações de RT-PCR foram utilizados os oligonucleotídeos RSPaV-V1/RSPaV-C1, desenhados com base no acesso NC_001948 de RSPaV (GenBank), ou RSP52/RSP53, possibilitando a amplificação do gene CP completo do RSPaV, com 780 pb (nt 7771 ao 8550 do acesso NC_001948) e 259 aminoácidos deduzidos (aad) a partir de todos os nove isolados. Através da análise da identidade de nt desses isolados de RSPaV, pôde-se verificar a formação de quatro agrupamentos distintos, à semelhança de outros trabalhos (Lima et al. 2006; Meng et al., 2006; Nolasco et al., 2006; Nakaune et al. 2008). Os isolados CF208, CF210, MG, MH, 420A e CF195-2 do grupo I (Figura 1A) apresentam identidade de nt, entre si, de 97 a 99% (Tabela 3). Os grupos II, III e IV contêm, respectivamente, os isolados CF207, PN e CF195 (Figura 1A). O grupo I apresentou identidade de nt de cerca de 95-96%, 92-93% e 81%, respectivamente, com os grupos II, III e IV. Por sua vez, o grupo II apresentou 92% de identidade com o grupo III e 84% com o grupo IV. Por último, o grupo III mostrou, aproximadamente, 81% de identidade de nt com o grupo IV (Tabela 3).

Nolasco et al. (2006), em Portugal, ao analisar isolados de RSPaV obtiveram quatro grupos (1, 2a, 2b e 3), com base na sequência do gene CP, concluindo que os isolados estudados apresentaram grande variabilidade. A menor identidade de nt encontrada foi de 81%. Meng et al. (2006), nos Estados Unidos, através da análise de parte do gene CP de 24 isolados de RSPaV, dividiram tais isolados

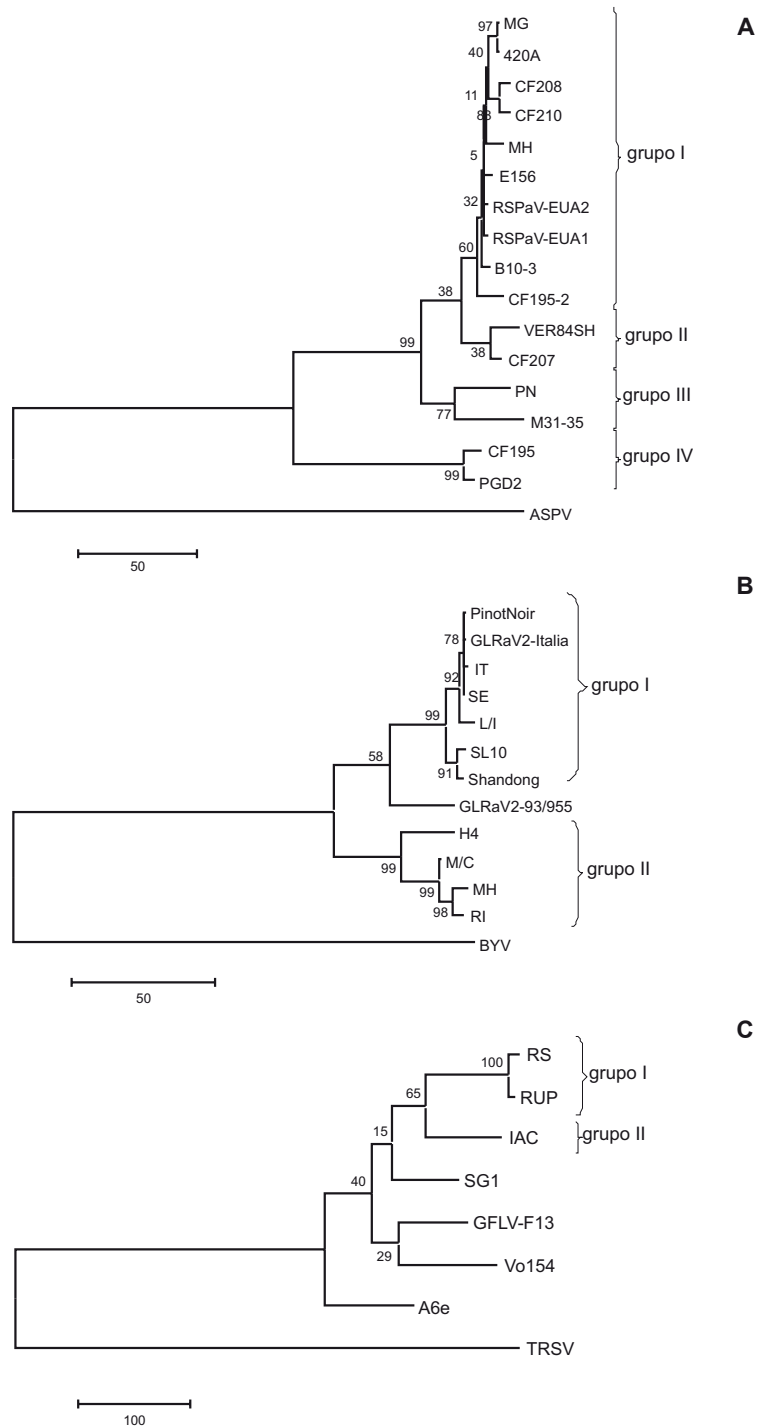


FIGURA 1 – Árvores filogenéticas não enraizadas, obtidas com o programa MEGA 4.1, baseadas nas sequências completas de nucleotídeos do gene da proteína capsidial dos isolados de (A) *Rupestis stem pitting associated virus*, RSPaV, (B) *Grapevine leafroll associated virus 2*, GLRaV-2 e (C) *Grapevine fanleaf virus*, GFLV, com a demarcação de distintos grupos, considerando-se os isolados estudados. Valores percentuais de “bootstrap” são mostrados nos ramos. As barras indicam número de substituições de nucleotídeos por sítio (100 = 0,1 e 50 = 0,05). Códigos de nucleotídeos dos isolados estrangeiros no GenBank e país. **RSPaV**: PGD2 (DQ364984, Itália), VER84 SH (DQ364992, Itália), B10-3 (AY927681, Portugal), M31-35 (AY927673, Portugal), E156 (AY927677, Portugal), RSPaV-EUA1 (NC_001948, EUA), RSPaV-EUA2 (AF026278, EUA); **GLRaV-2**: H4 (AY697863, Itália), SL10 (DQ911147, China), Pinot Noir (AF039204, EUA), Shandong (AY842932, China), GLRaV2-Italia (Y14131, Itália), 93/955 (NC_007448, África do Sul); **GFLV**: SG1 (DQ362921, Itália), Vo154 (DQ922668, Eslovênia), A6e (AY370944, França), F13 (NC_003623, França). Para os grupos externos das árvores foram utilizadas as espécies tipo de cada gênero: *Apple stem pitting virus* (ASPV, *Foveavirus*, NC_003462), *Beet yellows virus* (BYV, *Closterovirus*, NC_001598), *Tobacco ringspot virus* (TRSV, *Nepovirus*, NC_005096). Os códigos de acesso no GenBank dos isolados estudados neste trabalho encontram-se na Tabela 1.

TABELA 3 - Identidade (%) das seqüências de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) dos genes da proteína capsial dos diferentes isolados de RSPaV, GLRaV-2 e GFLV caracterizados*

Nome isolado	CF195	CF207	CF208	CF210	PN	MG	MH420A	CF195-2	M/C	L/I	SE	IT	MH	RI	RS	RUP	IAC
CF195	—	92,6	89,5	90,3	88,0	91,5	90,3	91,5	89,5								
CF207	84,3	—	95,3	95,3	93,0	98,0	96,9	98,0	95,7								
CF208	81,1	95,7	—	96,9	93,8	96,5	95,3	96,5	94,9								
CF210	81,4	96,0	98,7	—	93,8	96,5	95,3	96,5	94,9								
PN	81,6	92,0	93,7	93,9	—	94,2	93,4	94,2	92,2								
MG	81,5	96,4	98,3	98,3	93,5	—	98,0	99,2	96,9								
MH	81,5	96,2	97,8	97,9	93,4	98,4	—	98,0	95,7								
420A	81,5	96,4	98,3	98,3	93,5	99,7	98,4	—	96,9								
CF195-2	81,5	95,6	97,3	97,5	92,9	97,6	97,5	97,6	—								
M/C									—	93,4	95,4	94,9	97,4	98,4			
L/I									89,2	—	97,9	97,4	90,9	92,4			
SE									89,4	98,8	—	99,4	92,9	94,4			
IT									89,1	98,4	99,6	—	92,4	93,9			
MH									98,1	87,4	88,2	88,2	—	97,9			
RI									98,3	88,1	88,9	88,9	98,4	—			
RS															—	99,2	94,8
RUP															98,8	—	95,2
IAC															89,8	90,2	—

* Códigos dos acessos depositados no GenBank relacionados na Tabela 1.

em quatro grupos (I, II, III e IV). A análise filogenética do gene CP de 65 isolados japoneses de RSPaV por Nakaune et al. (2008) também permitiu a obtenção de quatro grupos (1, 2a, 2b e 3), demonstrando que este vírus apresenta expressiva variabilidade. Os isolados pertencentes ao grupo 3 apresentaram maior divergência, com identidade na seqüência de nt de 87,4% quando comparados a outros isolados. Destaca-se que os agrupamentos definidos nestes trabalhos não são baseados em critérios únicos e pré-definidos, como nomenclatura e porcentagem de identidade. No presente trabalho verificou-se a existência de significativa variabilidade entre os isolados de RSPaV estudados (Tabela 3), confirmando resultados semelhantes dos trabalhos anteriormente mencionados.

Em relação aos valores de identidade de aad dos isolados de RSPaV estudados, também foram definidos quatro agrupamentos, formados pelos mesmos isolados da definição baseada na identidade de nt. O grupo I apresentou identidade de aad, entre seus membros de 94 a 99%, e de cerca de 95-98%, 92-94% e 89-91%, respectivamente, com os grupos II, III e IV. Por sua vez, o grupo II apresentou cerca de 93% de identidade com os grupos III e IV e, por

último, o grupo III apresentou 88% de identidade com o grupo IV (Tabela 3).

Observou-se elevada porcentagem de identidade nas seqüências de nt e de aad entre todos os isolados de RSPaV deste estudo e isolados de RSPaV depositados em banco de dados, inclusive em relação àqueles mais divergentes (Figura 1A). Os isolados estudados do grupo I apresentaram maiores identidades de seqüência de aad (96,9% a 99,2%) com os isolados B10-3, E156 e dois isolados provenientes dos EUA (RSPaV-EUA1, RSPaV-EUA2). Os isolados CF207 (grupo II), PN (grupo III) e CF195 (grupo IV) apresentaram maiores identidades de aad com os isolados VER84SH (98,8%), M31-35 (95,3%) e PGD2 (98%), respectivamente.

GLRaV-2

Amplificou-se, para os seis isolados, um fragmento de DNA que compreende o gene CP completo do GLRaV-2, com 597 nt e 198 aad, situados entre os nt 14579 e 15175 do acesso NC_007448. Pela análise das seqüências de nt obtidas, pôde-se verificar a formação de dois agrupamentos, grupo I compreendendo os isolados L/I, SE e IT com

identidade de nt de 98-99% entre seus membros, e o grupo II, formado pelos isolados M/C, MH e RI (Figura 1B) com identidade de nt entre seus membros de 98%. A identidade de nt entre os isolados dos dois grupos é de 87-89% (Tabela 3). Em relação às sequências de aad dos isolados de GLRaV-2 também foram definidos dois agrupamentos (I e II), formados pelos mesmos isolados mencionados acima, que apresentaram cerca de 97-99% e 90-95% de identidade de sequência de aad, respectivamente, dentro e entre os membros dos grupos (Tabela 3).

Observou-se elevada porcentagem de identidade de sequências de nt e de aad entre os seis isolados de GLRaV-2 estudados e isolados depositados em banco de dados (Figura 1B). Os membros do grupo II de GLRaV-2 apresentaram identidades de sequência de aad que variam de 94 a 96% com um isolado italiano (H4). Abou Ghanem-Sabanadzovic et al. (2000) descreveram que o isolado H4 é uma variante biológica do GLRaV-2, distinto de outros isolados transmitidos mecanicamente do mesmo vírus, devido a diferenças nas reações em hospedeiras herbáceas e diferença na sequência do gene CP. Ao contrário de outro isolado de GLRaV-2, Semillon (Sem), o isolado H4 induz lesões locais necróticas em *Nicotiana clevelandii*, além de infecção sistêmica e, em *N. occidentalis*, induz sintomas mais severos. O isolado H4 diferiu em aproximadamente 12% na sequência de nt do gene CP em relação aos isolados Sem e Pinot Noir (PN) (Abou Ghanem-Sabanadzovic et al., 2000). Já os isolados estudados do grupo I apresentaram maiores identidades de nt e de aad (97,9% a 99,4%) com os isolados Pinot Noir, GLRaV-2-Italia, SL10 e Shandong (Figura 1B).

Meng et al. (2005a) mostraram que um isolado americano ("94/979") apresentou 99% de identidade de nt com os isolados PN e Sem, sugerindo que esses três isolados são idênticos e formariam um grupo. O segundo isolado ("93/955") caracterizado por estes autores diferiu em 7,4% de nt quando comparado ao isolado "PN" e 11,1% com o isolado "H4" e formaria assim outro grupo, conforme corroborado pelos resultados apresentados na Figura 1B.

GFLV

Foram amplificados dois fragmentos de DNA para cada um dos três isolados, com sobreposição entre eles de 20 nt, resultando na sequência completa do gene CP (1515 nt e 504 aad). O gene CP está situado na extremidade 3' do RNA 2, entre os nt 2048 e 3559 do acesso NC_003623. Na análise das sequências de nt e de aad observou-se a formação de dois agrupamentos (Tabela 3, Figura 1C). O grupo I é formado pelos isolados RS e RUP, que apresentam, entre si, cerca de 98 e 99% de identidade de nt e de aad, respectivamente, e o grupo II é composto pelo isolado IAC. A identidade de nt e aad verificada entre os membros dos dois grupos foi de 89-90% e de 94-95%, respectivamente (Tabela 3). Observou-se alta porcentagem de identidade de sequências de nt e

de aad entre os isolados de GFLV estudados e isolados depositados em banco de dados (Figura 1C). Destaca-se que os dois isolados do grupo I (RS e RUP) apresentaram maiores valores de identidade de aad (cerca de 96%) com os isolados italiano (SG1) e francês (F13).

Pourrahim et al. (2007) conduziram estudo de variabilidade de cinco isolados iranianos de GFLV, que apresentaram, entre si, 98,7 a 100% de identidade de nt. Entretanto, na comparação com outros isolados, a identidade variou de 83,7 a 87,5% (este último valor resultante da comparação com o isolado italiano SG1), agrupando-se os isolados iranianos separadamente de isolados de outras origens geográficas. Pompe-Novak et al. (2007) estudaram a diversidade genética presente no RNA2 de nove isolados de GFLV da Eslovênia. As sequências destes isolados e de outros sete (seis franceses e um alemão) resultaram na definição de três grupos, com valores de identidade de 87-91% de nt e 93-96% de sequência de aad. Neste trabalho, os isolados Vo154 (Eslovênia), A6e e F13 (França) apresentaram maiores identidades de aad (cerca de 96%) com o isolado IAC (grupo II).

A detecção por RT-PCR de diferentes isolados virais com a utilização de apenas um par de oligonucleotídeos por espécie viral (dois, no caso do GFLV, para cobrir a amplificação de todo o gene CP e outra exceção para o isolado 420A), provavelmente foi possível em função da condição pouco restritiva (baixa temperatura de pareamento) nas reações de amplificação. A definição da variabilidade existente entre isolados locais de três espécies virais permite a definição de "ferramentas" (ex. sequências de oligonucleotídeos, regiões do genoma viral mais ou menos conservadas) para a posterior implementação de métodos diagnósticos mais precisos e sensíveis.

Hibridização molecular com sondas não-radioativas

Nos testes de hibridização "dot-blot" foram utilizadas sondas homólogas e heterólogas (entre isolados diferentes), visando-se à detecção das três espécies virais estudadas. Foi possível detectar todos os isolados virais caracterizados, com evidente contraste das reações entre amostras infectadas e sadias (Figura 2). As sondas para RSPaV, sintetizadas pela marcação dos isolados CF210, MG e MH (todos do grupo I), resultaram na hibridização de todos os nove isolados de RSPaV (Figura 2A). Isto comprova a eficiência da hibridização, conduzida em condição de baixa stringência, permitindo a detecção mesmo daqueles isolados de RSPaV que apresentaram baixa porcentagem de identidade (cerca de 81% de identidade de nt com os demais), a exemplo do isolado CF195 (Tabela 3, Figura 2A).

Para GLRaV-2, as sondas marcadas a partir dos isolados L/I (grupo I) e M/C (grupo II) permitiram a detecção de todos os seis isolados de GLRaV-2 caracterizados (Figura 2B), independente dos valores de

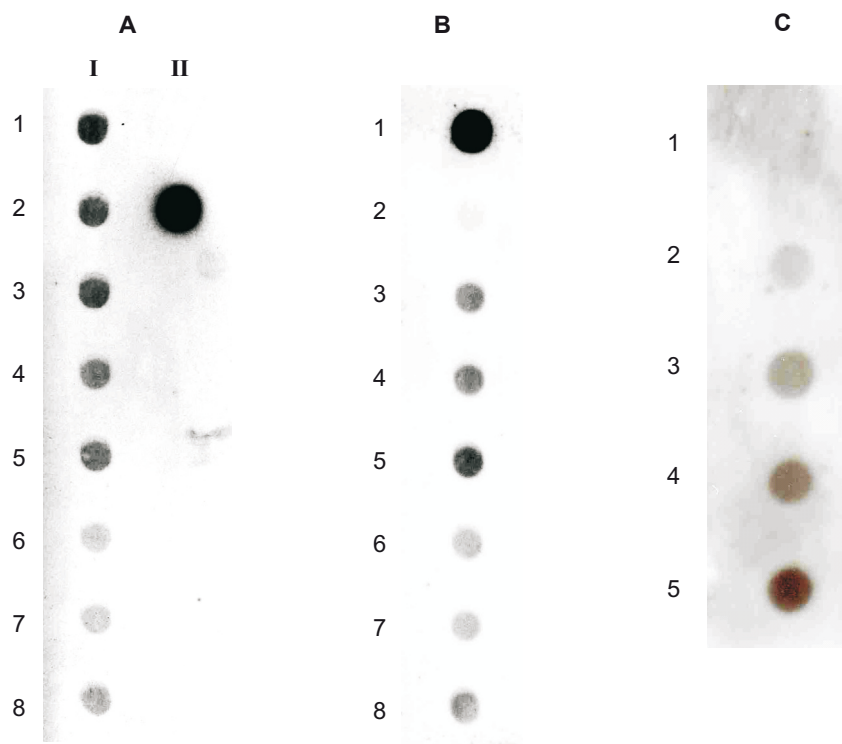


FIGURA 2 - Hibridizações “dot-blot” entre sondas não-radioativas marcadas com digoxigenina e RNA total extraído de videiras. **A.** Sonda para RSPaV, isolado CF210; amostras infectadas com os isolados 420A (1.I), infecção dupla CF195 e CF195-2 (2.I), CF207 (3.I), CF208 (4.I), CF210 (5.I), PN (6.I), MG (7.I), MH (8.I); controle negativo (1.II), controle positivo (2.II); **B.** Sonda para GLRaV-2, isolado L/I; controle positivo (1); controle negativo (2); amostras infectadas com os isolados L/I (3), M/C (4), SE (5), IT (6), RI (7) e MH (8); **C.** Sonda para GFLV, isolado RS; amostra sadia (1), amostras infectadas com os isolados IAC (2), RUP (3) e RS (4), controle positivo (5).

identidade verificados entre os isolados ou do grupo no qual o isolado foi enquadrado (Figura 1B). Por último, resultado semelhante foi verificado em relação ao GFLV. A sonda foi obtida pela marcação do isolado RS (grupo I) e permitiu a detecção dos três isolados caracterizados, incluindo o isolado IAC (grupo II) (Figura 2C).

Percebe-se pelos resultados obtidos que a hibridização com sonda não-radioativa pode viabilizar a detecção de diferentes isolados virais em videira de modo eficiente e sensível, tanto em reações homólogas como heterólogas, constituindo-se também em um método de diagnóstico aplicável para um número maior de amostras. Essa versatilidade e sensibilidade das sondas não-radioativas também foi demonstrada por Moreira et al. (2005) para a detecção do *Grapevine virus A* (GVA) e do *Grapevine virus B* (GVB) em videiras.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Hugo Kuniyuki, Instituto Agronômico de Campinas – IAC, pelo envio das amostras infectadas

com GLRaV-2 e dos isolados de GFLV caracterizados e a Marcos Fernando Vanni (Embrapa Uva e Vinho) pelo apoio laboratorial. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão da bolsa de estudos à primeira autora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abou-Ghanem N, Sabanadzovic S, Minafra A, Saldarelli P, Martelli GP (1998) Some properties of *Grapevine leafroll-associated virus 2* and molecular organization of the 3' region of the viral genome. *Journal of Plant Pathology* 80:37-46.
- Abou Ghanem-Sabanadzovic N, Sabanadzovic S, Castellano MA, Boscia D, Martelli GP (2000) Properties of a new isolate of *Grapevine leafroll-associated virus 2*. *Vitis* 39:119-121.
- Bertazzon N, Angelini E (2004) Advances in the detection of *Grapevine leafroll-associated virus 2* variants. *Journal of Plant Pathology* 86:283-290.

- Beuve M, Sempé L, Lemaire O (2007) A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detecting *Grapevine leafroll-associated virus 2* variants in grapevine. *Journal of Virological Methods* 141:117-124.
- Brandt S, Ibl M, Himmler G (1995) Coat protein gene sequence of an Austrian isolate of *Grapevine fanleaf virus*. *Archives of Virology* 140:157-164.
- Credi R (1997) Characterization of grapevine rugose wood disease sources from Italy. *Plant Disease* 82:1288-1292.
- Fajardo TVM, Kuhn GB, Eiras M, Nickel O (2000) Caracterização parcial de um isolado do *Grapevine fanleaf virus*. *Fitopatologia Brasileira* 25:505-511.
- Fajardo TVM, Kuhn GB, Nickel O (2003) Doenças virais. In: Fajardo TVM (Ed.) *Uva para processamento: fitossanidade - Frutas do Brasil* 35. Brasília. Embrapa Informação Tecnológica. pp. 45-62.
- Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball AL (Eds.) (2005) *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London. Elsevier Academic Press.
- Kuniyuki H, Vega J, Martins FP, Costa AS (1994) Mosaico da videira Traviú, uma doença causada pelo vírus da folha em leque em São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 19:224-230.
- Lima MF, Alkowni R, Uyemoto JK, Golino D, Osman F, Rowhani A (2006) Molecular analysis of a California strain of *Rupestris stem pitting-associated virus* isolated from declining Syrah grapevines. *Archives of Virology* 151:1889-1894.
- Martelli GP (1993) Rugose wood complex. In: Martelli GP (Ed.) *Graft-transmissible disease of grapevines - Handbook for detection and diagnosis*. Rome. FAO. pp. 45-53.
- Martelli GP, Agranovsky AA, Bar-Joseph M, Boscia D, Candresse T, Coutts RHA, Dolja VV, Falk BW, Gonsalves D, Jelkmann W, Karasev AV, Minafra A, Namba S, Vetten HJ, Wisler GC, Yoshikawa N (2002) The family *Closteroviridae* revised. *Archives of Virology* 147:2039-2044.
- Meng B, Pang SZ, Forsline PL, McFerson JR, Gonsalves D (1998) Nucleotide sequence and genome structure of *Grapevine rupestris stem pitting associated virus-1* reveal similarities to *Apple stem pitting virus*. *Journal of General Virology* 79:2059-2069.
- Meng B, Johnson R, Peressini S, Forsline PL, Gonsalves D (1999) *Rupestris stem pitting associated virus-1* is consistently detected in grapevines that are infected with rupestris stem pitting. *European Journal of Plant Pathology* 105:191-199.
- Meng B, Lin C, Goszczynski DE, Gonsalves D (2005a) Genome sequences and structures of two biologically distinct strains of *Grapevine leafroll-associated virus 2* and sequence analysis. *Virus Genes* 31:31-41.
- Meng B, Lin C, Wang W, Goszczynski D, Gonsalves D (2005b) Complete genome sequences of two new variants of *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* and comparative analyses. *Journal of General Virology* 86:1555-1560.
- Meng B, Rebelo AR, Fisher H (2006) Genetic diversity analyses of *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* reveal distinct population structures in scion versus rootstock varieties. *Journal of General Virology* 87:1725-1733.
- Moreira AE, Gaspar OJ, Kuniyuki H (2005) Detecção do *Grapevine virus A* e *Grapevine virus B* por hibridização “dot-blot” com sondas moleculares não radioativas. *Fitopatologia Brasileira* 30:538-542.
- Nakaune R, Inoue K, Nasu H, Kakogawa K, Nitta H, Imada J, Nakano M (2008) Detection of viruses associated with rugose wood in Japanese grapevines and analysis of genomic variability of *Rupestris stem pitting-associated virus*. *Journal of General Plant Pathology* 74:156-163.
- Nolasco G, Santos C, Petrovic N, Santos MT, Cortez I, Fonseca F, Boben J, Nazaré Pereira AM, Sequeira O (2006) *Rupestris stem pitting-associated virus* isolates are composed by mixtures of genomic variants which share a highly conserved coat protein. *Archives of Virology* 151:83-96.
- Pearson RC, Goheen AC (Eds.) (1988) *Compendium of grape diseases*. St. Paul MN. APS Press.
- Pompe-Novak M, Gutierrez-Aguirre I, Vojvoda J, Bias M, Tomazic I, Vigne E, Fuchs M, Ravnikar M, Petrovic N (2007) Genetic variability within RNA2 of *Grapevine fanleaf virus*. *European Journal of Plant Pathology* 117:307-312.
- Pourrahim R, Farzadfar SH, Golnaraghi AR, Ahoonmanesh A (2007) Partial molecular characterization of some *Grapevine fanleaf virus* isolates from North-East of Iran. *Journal of Phytopathology* 155:754-757.
- Rott ME, Jelkmann W (2001) Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: Adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR) and modification of an RNA extraction protocol. *European Journal of Plant Pathology* 107:411-420.
- Rowhani A, Chay C, Golino DA, Falk BW (1993) Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of *Grapevine fanleaf virus* in grapevine tissue. *Phytopathology* 83:749-753.
- Rowhani A, Zhang YP, Chin J, Minafra A, Golino DA, Uyemoto JK (2000) *Grapevine rupestris stem pitting associated virus*: population diversity, titer in the host and possible transmission vector. Extended Abstracts, 13th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine: Adelaide, Australia, pp. 37-38.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Vigne E, Komar V, Fuchs M (2004) Field safety assessment of recombination in transgenic grapevines expressing the coat protein gene of *Grapevine fanleaf virus*. *Transgenic Research* 13:165-179.
- Zhang YP, Uyemoto JK, Golino DA, Rowhani A (1998) Nucleotide sequence and RT-PCR detection of a virus associated with *Grapevine rupestris stem-pitting disease*. *Phytopathology* 88:1231-1237.