CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO

LEVANTAMENTO DE VÍRUS QUE INFECTAM VIDEIRAS NO BRASIL POR MEIO DE RT-PCR EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

Cláudia Fernanda Carraro Lemes

Lajeado, novembro de 2015

Cláudia Fernanda Carraro Lemes

LEVANTAMENTO DE VÍRUS QUE INFECTAM VIDEIRAS NO BRASIL POR MEIO DE RT-PCR EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

Monografia apresentada na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, na linha de formação específica em Ciências Biológicas Bacharelado, do Centro Universitário UNIVATES, como parte da exigência para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Walter Orlando Beys da Silva

Lajeado, novembro de 2015

Cláudia Fernanda Carraro Lemes

LEVANTAMENTO DE VÍRUS QUE INFECTAM VIDEIRAS NO BRASIL POR MEIO DE RT-PCR EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

A Banca examinadora abaixo aprova a Monografia apresentada na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, na linha de formação específica em Ciências Biológicas Bacharelado, do Centro Universitário UNIVATES, como parte da exigência para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas:

Prof. Dr. Walter Orlando Beys da Silva – orientador
Centro Universitário UNIVATES

Ma. Andressa Dametto
Centro Universitário UNIVATES

Prof. Dr. Raul Antonio Sperotto
Centro Universitário UNIVATES

Lajeado, novembro de 2015

À memória de minha mãe, por ter me ensinado a lutar pelos meus objetivos e por me motivar a nunca desistir.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela Sua presença e força que me permite ir além do que julgo poder chegar, abrindo meus caminhos, guiando meus passos, me fortalecendo nas conquistas e me ensinando nas derrotas.

À memória de minha mãe, por ter sido uma guerreira, pelo seu amor incondicional dedicado a mim e ao meu irmão e por muito me incentivar a estudar.

Ao meu irmão Maurício, por ser uma pessoa de quem tenho muito orgulho e pelos anos de convivência, que me tornaram uma pessoa melhor.

À minha cunhada Maria Luiza pelas palavras de fé e compreensão, por sempre ter um sorriso no rosto e por acreditar que todas as coisas são possíveis.

Ao meu esposo Adriano por ser meu companheiro nas batalhas, pela coragem no dia-a-dia e por nunca se deixar abater por nada.

À minha tia Gézica e minha prima Emanuelle que, mesmo longe, sempre encontraram uma forma de se fazerem presentes na minha vida me apoiando e proporcionando momentos de sorrisos e descontração.

À Embrapa Uva e Vinho e ao Dr. Thor Vinícius Martins Fajardo pela oportunidade de estágio no laboratório de Virologia Vegetal, por permitir a realização deste trabalho e pelos preciosos conhecimentos repassados.

Ao técnico do laboratório de Virologia Vegetal Marcos Fernando Vanni e a todas as colegas do laboratório que conheci durante o estágio, pela ajuda e aprendizado.

Ao professor orientador Dr. Walter Orlando Beys da Silva pelo suporte e empenho em fazer sempre o melhor.

À professora Dra. Gisele Eliane Perissutti pelo apoio nestes anos, pela amizade sincera, pelos preciosos conselhos, por me incentivar a seguir em frente e pelo carinho com que lida com os alunos.

À professora Dra. Elisete Maria de Freitas por me inspirar com sua dedicação, competência e esforço em tudo o que faz.

À UNIVATES pela oportunidade de conclusão deste curso e a todos os professores que contribuíram para a minha formação.

Aos antigos colegas do Grupo Vipal, pela amizade sincera, pela parceria de muitos anos e passado o tempo, tendo seguido caminhos diferentes, ainda podemos nos encontrar e ter a sensação de que nunca nos separamos.

“Coragem é a confiança que o homem tem em situações difíceis, é o que faz viver lutando e enfrentando os problemas e as barreiras que colocam medo, é a força positiva para combater momentos tenebrosos da vida”.

Dicionário Houaiss

“Todo aquele que se dedica ao estudo da ciência chega a convencer-se de que, nas leis do Universo, se manifesta um Espírito sumamente superior ao do homem e perante o qual nós, com os nossos poderes limitados, devemos humilhar-nos.”

Albert Einstein

RESUMO

A cultura da videira é praticada em diversas regiões do Brasil, sedo que os vinhedos ocupam uma área de, aproximadamente, 80.000 hectares no país, com uma produção anual de cerca de 1.400.000 toneladas. Por ser propagada vegetativamente, a videira é suscetível a infecções por patógenos, entre eles, os vírus, ocasionando danos significativos à produção e à qualidade da uva, refletindo em prejuízos econômicos. O complexo do lenho rugoso é formado por *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), família *Betaflexiviridae*, gênero *Foveavirus,* não transmissível mecanicamente e cujo vetor não é conhecido. Também são causadores desta doença os vírus *Grapevine virus* A (GVA) e *Grapevine virus* B (GVB), ambos da família *Betaflexiviridae*, gênero *Vitivirus*, transmitidos por cochonilhas. Outro vírus que infecta videiras causando a doença do enrolamento da folha são *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV-2) da família *Closteroviridae*, gênero *Closterovirus*, cujo vetor é desconhecido, *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV-3) da família *Closteroviridae*, gênero *Ampelovirus* e *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV-4); transmitidos por cochonilhas. A doença da degenerescência da videira tem como agente causal *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), da família *Secoviridae*, gênero *Nepovirus*, transmitido por nematoides. O vírus *Grapevine fleck virus* (GFkV) é responsável pela virose da Mancha das nervuras e pertence à família *Tymoviridae*, gênero *Maculavirus* e seu vetor é desconhecido. O objetivo desta Monografia foi identificar a diversidade e a incidência dos vírus que infectam videiras no Brasil por meio de RT-PCR em tempo real. Novecentos e vinte e quatro amostras foram obtidas de diferentes regiões do Brasil. Os RNAs totais das amostras foram extraídos através do método de adsorção em sílica, e posteriormente analisados por meio de RT-PCR em tempo real. Nas plantas avaliadas, a incidência de GVA foi 30,3%, GVB 3,5%, GFkV 26,4%, GRSPaV 36,1%, GLRaV-2 18,4%, GLRaV-3 9,1% e GLRaV-4 69%. A técnica de RT-PCR em tempo real mostrou-se adequada para o diagnóstico das sete espécies virais em um grande número de amostras. A proposição de técnicas de manejo e controle mais eficientes para os vírus deve ser considerada, além da utilização de material propagativo sadio para plantio nos vinhedos.

Palavras-chave: Viroses; Videiras; Fitossanidade; Diagnóstico; RT-PCR em tempo real.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cultivar Petit Syrah no início (A) e final (B) do ciclo vegetativo.....17

Figura 2 – Cachos de uva de cultivares viníferas tintas (A) e brancas (B) sadias e infectadas pela doença do enrolamento da folha.....24

Figura 3 - Incompatibilidade de enxertia causada pela doença do enrolamento da folha.....24

Figura 4 - Expressão de sintomas da doença do enrolamento das folhas, observados nas folhas da base dos ramos evoluindo para as folhas da extremidade. 25

Figura 5 – Enrolamento da folha de cultivar vinífera tinta (A) e de cultivar vinífera branca (B).....25

Figura 6 – Ramos apresentando intumescimento e corte transversal da região intumescida.....27

Figura 7 – Descoloração na lâmina foliar inclusive das nervuras, podendo evoluir para enrolamento dos bordos da folha para baixo, ocorrendo em cultivares europeias e americanas, infectadas pela doença do intumescimento dos ramos.....27

Figura 8 – Sintomas das caneluras do tronco da videira, induzidos por GRSPaV (A e B) e com sintomas induzidos por GVA (C).....28

Figura 9 - Porta-enxerto cultivar Paulsen 1103 visualmente sadio (à esquerda) e cultivar Niágara rosada infectada (à direita), exibindo caneluras no tronco.....29

Figura 10 – Videiras infectadas com a doença da degenerescência apresentam sintomas foliares como deformações e distribuição anormal das nervuras, bordas pontiagudas, redução na área foliar, clorose nas nervuras e mosaico amarelo (A). Nos ramos da videira, pode-se observar encurtamento dos entrenós, achatamentos e nós duplos (B).....30

Figura 11 – Os frutos de videiras infectadas com a doença da degenerescência apresentam-se como bagas pequenas, sem desenvolvimento e desuniformes.....30

Figura 12 – Folha de videira sadia (A); folha de videira infectada com a doença da mancha das nervuras, exibindo sintomas como manchas translúcidas (B).....31

Figura 13 – Representação do funcionamento da RT-PCR em tempo real.....36

Figura 14 – Sede da Embrapa Uva e Vinho localizada no município de Bento Gonçalves, RS.....38

Figura 15 – Representação gráfica de uma reação de RT-PCR em tempo real, mostrando uma curva de emissão de fluorescência (*threshold cycles*) C_T.....44

Figura 16 – Curvas de detecção de vírus, por RT-PCR em tempo real, de reações realizadas com amostras, água, RNA total de videira sadia e comprovadamente infectada.....52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais vírus que infectam videiras e seus respectivos modos de transmissão.....22

Tabela 2 – Relação dos oligonucleotídeos e sondas utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real (TaqMan), de sete vírus que infectam a videira.....41

Tabela 3 – Detalhamento do número de amostras avaliadas em cada placa de RT-PCR em tempo real e do número de amostras com resultado positivo para cada vírus.....45

Tabela 4 – Descrição do número total de amostras indexadas para cada vírus, o número total de plantas infectadas com os respectivos vírus e o cálculo percentual das infecções.....47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CH_5N_3HCl cloridrato de guanidina

DNA Ácido Desoxirribonucléico (do inglês, *Desoirribonucleic Acid)*

dNTPs desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EDTA ácido etilenodiamino tetra-acético

KOAc acetato de potássio

NaCl cloreto de sódio

NaOAc acetato de sódio

nM nanômetros

pH potencial hidrogeniônico

PVP polivinilpirrolidona

RNA Ácido Ribonucléico (do inglês, *Ribonucleic Acid*)

Rpm rotação por minuto

RT-PCR *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

SDS dodecil sulfato de sódio

Tris – HCl tris-hidroxilamina-aminometano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
1.1 Produção e transferência de materiais vegetais propagativos de videira ... 18

2 OBJETIVOS 19
2.1 Objetivo geral 19
2.2 Objetivos específicos 19

3 CARACTERIZAÇÃO GERAL DOS VÍRUS 20

4 DOENÇAS VIRAIS QUE INFECTAM VIDEIRAS 21
4.1 Enrolamento da folha da videira 23
4.2 Complexo do lenho rugoso 26
4.2.2 Intumescimento dos ramos ("*Corky bark*") 26
4.2.3 Caneluras do tronco da videira 28
4.3 Degenerescência da Videira 29
4.4 Mancha das nervuras das folhas da videira 31

5 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE VÍRUS EM PLANTAS 33
5.1 Indexação biológica 33
5.2 Métodos sorológicos 34
5.3 Métodos Moleculares 35
5.3.1 Transcrição Reversa associada à Reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) 35
5.3.2 RT-PCR em tempo real 35

6 MATERIAL E MÉTODOS 38
6.1 Local da realização do trabalho 38
6.2 Material biológico utilizado no trabalho 39
6.3 Extração de RNA total 39
6.4 Indexação de amostras para sete espécies de vírus que infectam videiras por meio de RT-PCR em tempo real 40

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO 45

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS 55

REFERÊNCIAS.....57

1 INTRODUÇÃO

A videira, pertencente à família Vitaceae e ao gênero *Vitis*, tem sido cultivada há milhares de anos e está difundida em todos os continentes. No Brasil, os vinhedos ocupam uma área de, aproximadamente, 80.000 hectares, com uma produção anual de cerca de 1.400.000 toneladas (REETZ et al., 2015). Na viticultura brasileira utiliza-se uma ampla variedade de cultivares, sendo mais de 120 cultivares europeias (*Vitis vinifera* L.) e mais de 40 cultivares americanas (*Vitis labrusca* L.) (CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011). A introdução recente de novos materiais de videiras tem aumentado a diversidade e a qualidade da uva, porém, estes normalmente têm apresentado maior suscetibilidade a diversos patógenos.

A maioria dos agentes patogênicos invade o interior das plantas através da superfície foliar, como ocorre com alguns fungos, ou através da superfície radicular, como os nematoides, através de ferimentos, a exemplo dos fungos, vírus, bactérias e nematoides e através dos estômatos, como fungos, bactérias e vírus (CAMPOS; RESENDE; SILVA, 2011).

Atualmente são conhecidas cerca de 60 espécies de vírus capazes de infectar videiras, os quais constituem importante ameaça à vitivinicultura (BASSO et al., 2014). Esta perspectiva é decorrente da forma de transmissão destes patógenos, realizada por meio de propagação vegetativa, insetos vetores e, em alguns casos, mecanicamente (MALIOGKA et al., 2015). Até o momento não há comprovação científica da transmissão viral por instrumentos usados no manejo da videira, a exemplo de tesouras de poda.

Com os avanços nos métodos de detecção dos vírus e agentes subvirais, verificou-se que a maioria das ocorrências desses patógenos em videira ocorre na

forma de infecções mistas, sendo este mais um desafio para o diagnóstico e o controle das doenças resultantes. Estas viroses causam grande impacto econômico pela redução no rendimento, na qualidade e longevidade dos vinhedos (BASSO et al., 2010a).

Os únicos métodos de controle aplicados para as viroses da videira, baseiam-se em estratégias de prevenção, por meio da utilização de material propagativo (mudas, estacas ou gemas) comprovadamente livre destes patógenos (LIMA, 2009). Uma vez infectada, é impossível curar a planta adotando-se métodos tradicionais, como aqueles utilizados para outros patógenos, a exemplo de fungos e bactérias. A obtenção de novas plantas sadias, a partir de plantas infectadas, só é possível por meio de limpeza clonal, cultura de tecidos e termoterapia (FAJARDO et al., 2004).

O fato de a videira ser uma planta perene, com longo período de exposição dos vinhedos em campo e ser propagada vegetativamente, por meio de diferentes tipos de enxertia e por estacas, facilita a disseminação de patógenos e favorece o aparecimento de doenças complexas, pelo acúmulo de diferentes espécies ou estirpes virais em uma mesma planta ou vinhedo (FAJARDO et al., 2007). Uma alternativa para aumentar o período produtivo dos vinhedos seria o plantio de cultivares e/ou porta-enxertos mais tolerantes a viroses ou resistentes aos vetores, porém, ainda são poucas as cultivares que apresentam estas características (MONIS; CONSTABLE; HABILI, 2010; BASSO et al., 2014).

Para o sucesso do setor vitivinícola, os parreirais devem ser implantados utilizando-se mudas de plantas com qualidade certificada, considerando a origem das plantas matrizes utilizadas para a propagação, acompanhadas de um Certificado Fitossanitário de Origem, evitando com isso a disseminação de doenças virais (LEÃO; SOARES, 2010).

Embora nem sempre despertem a atenção dos viticultores, os sintomas exibidos pelas plantas infectadas por vírus podem ser visualmente confundidos com deficiências nutricionais ou com alterações induzidas por outros patógenos, contribuindo para a disseminação inadvertida via propagação vegetativa (GARRIDO et al., 2008; BASSO et al., 2014). Dependendo da combinação entre cultivar e espécie viral, os primeiros sintomas característicos podem ser perceptíveis somente 2 a 3 anos após a infecção (LIMA; FAJARDO, 2012). Os sintomas variam com as

condições ambientais, estádio fenológico da planta, práticas de manejo, fertilidade do solo, espécie e estirpe virais e com a cultivar da videira (FAJARDO et al., 2007). A maioria dos sintomas de viroses é facilmente reconhecível em cultivares suscetíveis, em especial, no final do ciclo vegetativo, antes da queda das folhas. A Figura 1 ilustra esta situação e corresponde a cultivar Petit Syrah, no início do ciclo vegetativo no mês de setembro de 2014 e no final do ciclo, no mês de abril de 2015, infectada pela doença viral do enrolamento da folha.

Figura 1 – Cultivar Petit Syrah no início (A) e final (B) do ciclo vegetativo.

A B

Fonte: Thor Fajardo (2014, 2015)

Em plantas muito afetadas, os sintomas podem ser evidentes a partir da floração, porém são mais comuns em época próxima à maturação da uva (CABALEIRO; SEGURA, 2006).

O crescente avanço no conhecimento sobre a ocorrência de vírus em videira, a compreensão da dinâmica destes patógenos na cultura, a prática de indexação de materiais propagativos sadios, a evolução dos métodos diagnósticos para detecção viral e os resultados oriundos das pesquisas têm contribuído para o aperfeiçoamento do cultivo da videira. Além disso, a elucidação do panorama da disseminação e prevalência destes patógenos no Brasil são de suma importância para futuras medidas de manejo visando o controle destas pragas e consequentemente diminuir o impacto econômico inerente à infecção.

1.1 Produção e transferência de materiais vegetais propagativos de videira

A Embrapa Uva e Vinho atua na melhoria da qualidade fitossanitária das cultivares protegidas, lançadas pelo melhoramento da Unidade e as cultivares de domínio público, que historicamente são demandadas pelo setor vitivinícola brasileiro. Essas cultivares, após sua introdução na Embrapa Uva e Vinho, são submetidas a um sistema contínuo de limpeza e checagem fitossanitária, priorizando os principais vírus que infectam a videira. Desta forma, todo o material vegetativo disponibilizado pela Embrapa Uva e Vinho tem garantia sanitária comprovada contra os principais vírus que afetam a cultura (Embrapa Uva e Vinho, 2013).

Para cultivares de domínio público, é verificada sua normalidade agronômica e comprovada a sua identidade varietal. Depois de finalizada as etapas de desenvolvimento, os materiais propagativos são transferidos ao escritório da Embrapa Produtos e Mercados, na cidade de Canoinhas (SC), para que sejam registradas as plantas básicas, formando o jardim clonal de matrizes (borbulheira). Para adquirí-las, o viveirista precisa estar com seu registro vigente no Registro Nacional de Sementes e Mudas (RENASEM) e no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e solicitar a reserva de materiais. Os materiais protegidos Embrapa (BRS Carmem, BRS Clara, BRS Cora, BRS Isis, BRS Linda, BRS Magna, BRS Margot, BRS Morena, BRS Núbia, BRS Violeta e BRS Vitória), são repassados somente aos viveiristas licenciados, através de edital (Embrapa Uva e Vinho, 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Diante da importância socioeconômica da viticultura, dos efeitos danosos das viroses e da necessidade de ferramentas de diagnóstico viral sensíveis, o objetivo deste trabalho foi identificar a diversidade e a incidência de vírus que infectam videiras no Brasil por meio de RT-PCR em tempo real.

2.2 Objetivos específicos

a) extrair RNA total de novecentos e vinte e quatro amostras de videiras de diferentes regiões brasileiras;

b) analisar as amostras por meio da ferramenta de diagnóstico molecular RT-PCR em tempo real;

c) identificar os vírus *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV); *Grapevine virus A* (GVA); *Grapevine virus B* (GVB); *Grapevine fleck virus* (GFkV); *Grapevine leafroll – associated virus 2* (GLRaV-2); *Grapevine leafroll – associated virus* 3 (GLRaV-3); *Grapevine leafroll – associated virus* 4 (GLRaV-4).

3 CARACTERIZAÇÃO GERAL DOS VÍRUS

Vírus são parasitas intracelulares obrigatórios que utilizam as estruturas celulares de um hospedeiro para a própria replicação, não possuindo as estruturas celulares necessárias para o metabolismo (FIELDS, 2002; LOPES, 2004; SILVA; SASSON; CALDINI, 2011). Possuem uma estrutura simples, sendo o material genético constituído por DNA ou RNA de fita simples ou dupla, além de um capsídeo proteico que envolve o genoma viral, sendo transferido para as células hospedeiras. Alguns vírus também podem ser envelopados (LOPES, 2004; SILVA; SASSON; CALDINI, 2011).

A maioria dos vírus que infecta plantas possuem RNA de fita simples (LOPES, 2004) e são chamados de retrovírus, pois a enzima transcriptase reversa permite a produção de DNA a partir da molécula de RNA viral. Cópias de RNA virais são produzidas a partir do DNA molde (SILVA; SASSON; CALDINI, 2011).

Ao infectar células vivas hospedeiras suscetíveis, podendo ser de animais, plantas ou bactérias, eles aderem-se à superfície da célula e introduzem o material genético viral. Posteriormente é produzido o ácido nucléico e as proteínas que os constituem, formando uma nova partícula infecciosa, replicada nestas células (LOPES, 2004). Como consequência da infecção, os vírus podem provocar alterações graves no metabolismo da célula parasitada. Quando não estão infectando uma célula, são metabolicamente inertes (SILVA; SASSON; CALDINI, 2011). Além disso, cada espécie de vírus possui diferentes cepas, diferenciadas pela virulência e, consequentemente, impacto no seu hospedeiro alvo (FIELDS, 2002).

4 DOENÇAS VIRAIS QUE INFECTAM VIDEIRAS

De todas as viroses já relatadas em videira, um grupo restrito se destaca por sua importância econômica em nível mundial (BASSO et al., 2014). São doenças com sintomas típicos resultantes de infecções simples ou múltiplas de espécies virais das seguintes famílias: a) *Closteroviridae* - enrolamento da folha; b) *Betaflexiviridae* - lenho rugoso; c) *Secoviridae* - degenerescência da videira; d) *Tymoviridae* - mancha das nervuras. No Brasil e em países vizinhos como Argentina e Chile, a maior relevância é para as patologias do enrolamento da folha e do lenho rugoso (FIORE et al., 2008; RADAELLI et al., 2009; BASSO et al., 2010b; VOLPE et al., 2010; FIORE et al., 2011).

É comum a ocorrência de infecções múltiplas com vírus pertencentes a diferentes famílias, causando um quadro sintomatológico complexo e variável dependendo das espécies envolvidas, além de agentes subvirais, porventura também presentes. A presença de sintomas normalmente varia em função da idade do tecido da planta infectada, correlacionando-se, na maioria das vezes, com a concentração viral, por isso, tecidos maduros, comparativamente aos jovens, tendem a apresentar sintomas e maior concentração viral (CABALEIRO; SEGURA, 2006; TSAI; DAUGHERTY; ALMEIDA, 2012). Além disso, a infecção viral pode acelerar o envelhecimento das plantas, inibir ou retardar a biossíntese de clorofila, devido a deterioração dos cloroplastos, desequilibrando as funções fisiológicas da planta, interferindo no fluxo de fotoassimilados. Assim, as taxas de fotossíntese apresentam valores bem abaixo do normal, pois infecções transmitidas por vírus inibem os processos fisiológicos relacionados com a fixação do gás carbônico (SAMPOL et al., 2003; FAJARDO et al., 2004; BERTAMINI; MUTHUCHELIAN; NEDUNCHEZHIAN, 2004; BASSO et al., 2014).

A maioria dos vírus que infectam videiras apresenta genoma constituído de RNA fita simples, senso positivo, revestido por um capsídeo, formando partículas virais não envelopadas. Sem exceção, todos esses patógenos são disseminados por meio da propagação vegetativa da videira e, alguns deles, através de vetores (BASSO et al., 2014) (TABELA 1).

Tabela 1 – Principais vírus que infectam videiras e seus respectivos modos de transmissão

Vírus	**Transmissão mecânica (inoculação)**	**Transmissão por vetor**	**Transmissão por propagação vegetativa**
Grapevine fanleaf virus (GFLV)	+	Nematoide	+
Grapevine fleck virus (GFkV)	–	–	+
Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV)	–	–	+
Grapevine virus A (GVA)	*	Cochonilha	+
Grapevine virus B (GVB)	*	Cochonilha	+
Grapevine leafroll-associated virus 2 (GLRaV-2)	*	–	+
Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3)	–	Cochonilha	+
Grapevine leafroll-associated virus 4 (GLRaV-4)	–	Cochonilha	+

Fonte: Adaptado de Dubiela et al. (2013); Basso et al. (2014).

Legenda: (+) = transmissão positiva para o modo referenciado; (-) = transmissão negativa para o modo referenciado; (*) = transmissão mecânica após várias tentativas.

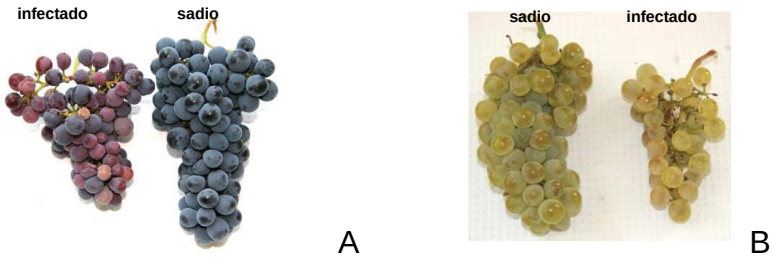
Quanto às taxas de diversidade e variabilidade genética, destaca-se a recente identificação de novas espécies ou estirpes virais resultantes de eventos de recombinação ou acúmulo de mutações ao longo do tempo (ITO; IEKI; OZAKI, 2002; BOULILA, 2011;). Evidências de coevolução ou adaptação entre espécies de vírus e a videira também já foram relatadas, indicando a ampla disseminação e o sucesso desses patógenos em infectar seu hospedeiro (GAMBINO et al., 2012).

4.1 Enrolamento da folha da videira

Os vírus do enrolamento das folhas da videira são membros da família *Closteroviridae*, sendo denominados *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2), gênero *Closterovirus*, cujo vetor é desconhecido e *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1), *Grapevine leafroll-associated virus 3 (*GLRaV-3), *Grapevine leafroll-associated virus 4* (GLRaV-4), gênero *Ampelovirus*, transmitidos por cochonilhas, além de outras estirpes caracterizadas e numeradas de 1 a 9 (NAIDU; O'NEAL; WALSH, 2008; FUCHS et al., 2009; NAIDU et al., 2014; MALIOGKA et. al., 2015). Esta virose apresenta-se como infecções mistas de várias estirpes em uma mesma cultivar hospedeira ou com outros vírus (NAIDU; O'NEAL; WALSH, 2008), podendo resultar de propagação vegetativa e enxertia entre diferentes materiais de copa e porta-enxerto (NAIDU et al., 2014).

O enrolamento da folha da videira é a virose mais propagada no Brasil e nos demais países vitícolas (FAJARDO, et al., 2007), sendo considerada, economicamente, a mais destrutiva, responsável por aproximadamente 60% das perdas nos vinhedos devido ao baixo rendimento das videiras infectadas (NAIDU; O'NEAL; WALSH, 2008). Os frutos produzidos por videiras infectadas possuem desuniformidade no crescimento do cacho e das bagas, preenchimento irregular do cacho, descoloração, além da redução do teor nutricional (MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006) (FIGURA 2).

Figura 2 – Cachos de uva de cultivares viníferas tintas (A) e brancas (B) sadias e infectadas pela doença do enrolamento da folha.



A B

Fonte: Naidu; O'Neal; Walsh (2008).

A intensidade da virose está relacionada com a espécie viral em estudo, a espécie e a cultivar da videira, bem como da região geográfica em que ocorre, a idade do vinhedo, estádio da infecção, práticas viticulturais e condições ambientais. Em plantas infectadas causa alterações na anatomia dos tecidos do floema e incompatibilidade de enxertia, podendo ser observado na Figura 3.

Figura 3 - Incompatibilidade de enxertia causada pela doença do enrolamento da folha.

Fonte: Martelli; Boudon-Padieu (2006).

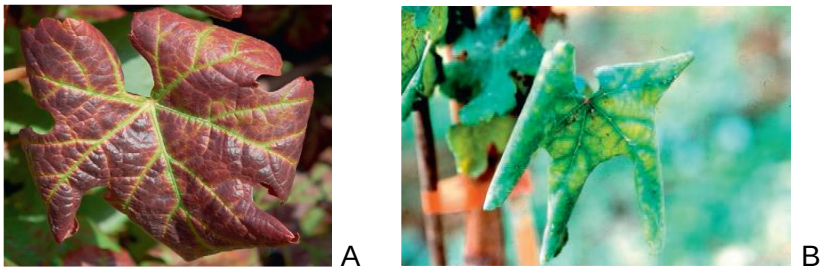
Sintomas foliares como enrolamento dos bordos das folhas para baixo, aparecendo sempre a partir da base dos ramos que evolui para as folhas da extremidade, independente da cultivar avaliada, são mais visíveis ao final do ciclo vegetativo (BASSO et al., 2014) (FIGURA 4). Além disso, o avermelhamento das folhas e textura coriácea das mesmas poderão ser observados, como resposta da planta à infecção causada por vírus (GUTHA et al., 2010).

Figura 4 - Expressão de sintomas da doença do enrolamento das folhas, observados nas folhas da base dos ramos evoluindo para as folhas da extremidade.

Fonte: Naidu; O'Neal; Walsh (2008).

No entanto, a expressão dos sintomas do vírus do enrolamento da folha é muito variável entre as cultivares de videiras (FIGURA 5) tornando difícil identificá-los somente através do diagnóstico visual, podendo ser confundido com deficiência nutricional (NAIDU; O'NEAL; WALSH, 2008).

Figura 5 – Enrolamento da folha de cultivar vinífera tinta (A) e de cultivar vinífera branca (B).



A B

Fonte: Maliogka et al. (2015).

A etapa de formação das mudas pode favorecer a disseminação do vírus, pois as cultivares utilizadas como porta-enxertos não exibem sintomas foliares, o que torna difícil a distinção entre plantas sadias e plantas infectadas (BASSO et al., 2010b). Partículas do vírus são desigualmente distribuídas em videiras, concentrando-se principalmente nos tecidos do floema, em baixas concentrações, e não são transmissíveis de videira para videira por inoculação mecânica, exceto a estirpe GLRaV-2, que pode ser transmitida mecanicamente para a espécie herbácea *Nicotiana benthamiana* (NAIDU; O'NEAL; WALSH, 2008).

4.2 Complexo do lenho rugoso

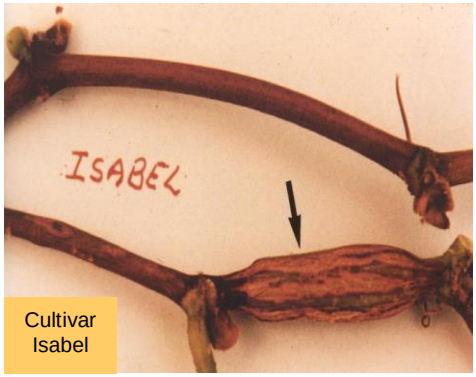
O lenho rugoso é uma das principais viroses da videira e ocorre na maioria dos países vitícolas, resultante da infecção por vírus restritos aos tecidos floemáticos (MARTELLI et al., 2007). A gama de sintomas desta virose pode variar bastante dependendo das espécies virais e dos genótipos do enxerto e porta-enxerto envolvidos. O lenho rugoso é uma virose complexa, apresenta expressiva importância econômica e é constituída por quatro viroses: intumescimento dos ramos ("*Corky bark*"), caneluras do tronco de Rupestris (“*Rupestris stem pitting*”), acanaladura do lenho de Kober (“*Kober stem grooving*”) e acanaladura do lenho de LN33 (“LN33 *stem grooving*”), sendo que as três últimas viroses são genericamente conhecidas por “caneluras do tronco da videira” (BASSO et al., 2014). No Brasil, embora ainda sejam escassos os levantamentos em algumas áreas vitícolas, a ocorrência de sintomas destas viroses tem sido verificada em várias regiões, havendo indicativos de que a incidência das caneluras do tronco seja bem maior do que o intumescimento dos ramos (LIMA; FAJARDO, 2012).

4.2.2 Intumescimento dos ramos ("*Corky bark*")

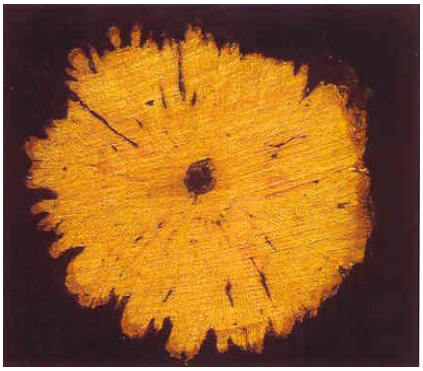
O agente causal do intumescimento dos ramos da videira é o *Grapevine virus B* (GVB), pertencente à família *Betaflexiviridae*, gênero *Vitivirus*, transmitido por cochonilhas (LIMA; FAJARDO, 2012; BASSO et al., 2014). Com certa dificuldade, o GVB pode ser transmitido, pela via mecânica, para *Nicotiana occidentalis* (NICKEL et al., 2002).

O intumescimento dos ramos é responsável por uma deformação nos ramos da videira e engrossamento na região da enxertia (FIGURA 6 A). Ao se fazer um corte transversal na região intumescida, o tecido apresenta um aspecto corticento, de cor marrom, exemplificado na Figura 6 B. Na lâmina foliar ocorre descoloração, inclusive das nervuras, podendo evoluir para enrolamento dos bordos das folhas para baixo (FIGURA 7), com maior evidência no outono, podendo ser observados em cultivares europeias e americanas (MALIOGKA et al., 2015).

Figura 6 – Ramos apresentando intumescimento e corte transversal da região intumescida.



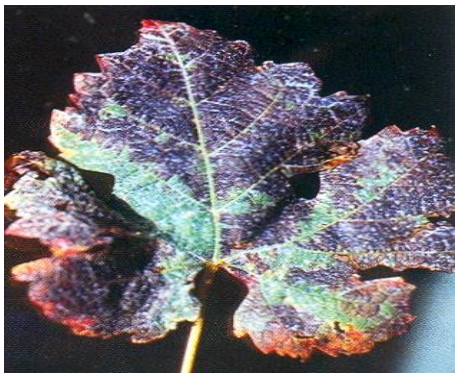
A



B

Fonte: Gilmar Kuhn (2007).

Figura 7 – Descoloração na lâmina foliar inclusive das nervuras, podendo evoluir para enrolamento dos bordos da folha para baixo, ocorrendo em cultivares europeias e americanas, infectadas pela doença do intumescimento dos ramos.



Fonte: Gilmar Kuhn (2007).

Os sintomas desta patologia podem ser observados com menor intensidade também no pecíolo das folhas próximas às regiões mais afetadas dos ramos. Os ramos tendem a se curvar para baixo, sendo facilmente destacados da planta. Quando acometidas por esta doença, as plantas podem definhar gradativamente, quando muito afetadas, e a brotação tende a ser lenta, atrasada e fraca (NICKEL et al., 2002).

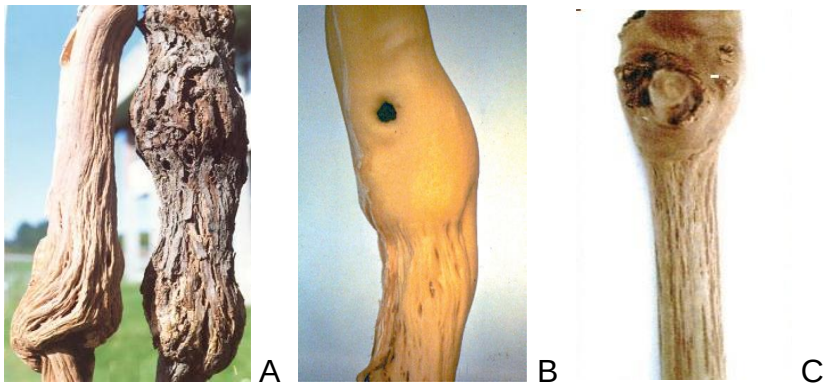
4.2.3 Caneluras do tronco da videira

São genericamente conhecidas por “caneluras do tronco da videira” as infecções causadas por Rupestris (“*Rupestris stem pitting*”) e acanaladura do lenho de Kober (“*Kober stem grooving*”), causadas respectivamente por *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) e *Grapevine virus A* (GVA), pertencentes à família *Betaflexiviridae* e aos gêneros *Foveavirus* e *Vitivirus*, respectivamente. Há ainda a virose acanaladura do lenho de LN33 (“LN33 *stem grooving*”), cujo agente causal ainda é desconhecido (KUHN; FAJARDO; NICKEL, 2002; FAJARDO et al., 2004).

O GRSPaV não é transmitido mecanicamente via inoculação com extrato foliar e não possui vetor conhecido. O GVA pode ser transmitido por cochonilhas e mecanicamente para algumas hospedeiras herbáceas, a exemplo de *Chenopodium quinoa* e *Nicotiana* spp. (MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006; KING et al., 2012).

Os sintomas das caneluras do tronco da videira são observados ao se examinar o lenho das plantas, abaixo da casca. De forma progressiva e com maior intensidade em cultivares viníferas, verifica-se, sobre a superfície do lenho, a formação de reentrâncias longitudinais (caneluras) e afundamento do lenho (FIGURA 8), prejudicando a formação dos vasos condutores de seiva. Com isso, o transporte de nutrientes no interior da planta será comprometido (FAJARDO et al., 2004; MARTELLI, et al., 2007).

Figura 8 – Sintomas das caneluras do tronco da videira, induzidos por GRSPaV (A e B) e com sintomas induzidos por GVA (C).



A B C

Fonte: Gilmar Kuhn (2007); Maliogka et al. (2015); Martelli et al. (2007).

Em algumas combinações entre enxerto e porta-enxerto, os sintomas podem se limitar a um dos componentes, quando o outro é tolerante (LIMA; FAJARDO, 2012), podendo não haver sintomas, em caso de infecções por estirpes latentes (MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006; BASSO et al., 2014) (FIGURA 9).

Figura 9 - Porta-enxerto cultivar Paulsen 1103 visualmente sadio (à esquerda) e cultivar Niágara rosada infectada (à direita), exibindo caneluras no tronco.

Fonte: Thor Fajardo (2010).

4.3 Degenerescência da Videira

O agente causal da degenerescência da videira é o *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), pertencente à família *Secoviridae*, gênero *Nepovirus*. Este foi o primeiro vírus de videira a ser transmitido por inoculação mecânica (MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006; BASSO et al., 2014). Transmitida por nematoides, esta doença viral é uma das mais severas doenças de videira (LINK et al., 2004), produzindo alterações nas folhas e nos ramos e em cultivares americanas pode ser assintomática (BASSO et al., 2014). Os sintomas foliares são deformações e distribuição anormal das nervuras, bordas pontiagudas, redução na área foliar, clorose nas nervuras ou folhas com mosaico amarelo (FIGURA 10 A). Nos ramos pode-se observar encurtamento dos entrenós, achatamentos e nós duplos (FIGURA 10 B), proliferação de gemas e brotação fraca e atrasada. Os frutos apresentam-se como bagas pequenas sem desenvolvimento e desuniformes (FIGURA 11) (BASSO et al., 2014; MALOGKA et al., 2015).

Figura 10 – Videiras infectadas com a doença da degenerescência apresentam sintomas foliares como deformações e distribuição anormal das nervuras, bordas pontiagudas, redução na área foliar, clorose nas nervuras e mosaico amarelo (A). Nos ramos da videira, pode-se observar encurtamento dos entrenós, achatamentos e nós duplos (B).

A

B

Fonte: Maiogka et al. (2015).

Figura 11 – Os frutos de videiras infectadas com a doença da degenerescência apresentam-se como bagas pequenas sem desenvolvimento e desuniformes.

Fonte: Maiogka et al. (2015).

Cultivares tolerantes produzem razoável cultivo, enquanto que cultivares sensíveis são seriamente afetadas, apresentando declínio progressivo, baixa produtividade e baixa qualidade da fruta, curto período produtivo, baixa proporção no enxerto e decrescente resistência para fatores climáticos adversos (MALIOGKA et al., 2015).

A doença da degenerescência da videira possui importância econômica em nível mundial pelos prejuízos que causam à viticultura (MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006; BASSO et al., 2014; MALIOGKA et al., 2015). No entanto, tem apresentado baixa incidência no Brasil, não representando impacto econômico (LIMA; FAJARDO, 2012; BASSO et al., 2014; CATARINO et al., 2015). Por este

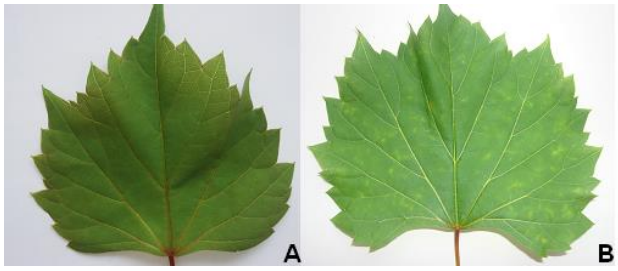
motivo, esta doença viral não foi incluída no levantamento de vírus que infectam videiras no Brasil, neste trabalho.

4.4 Mancha das nervuras das folhas da videira

O agente causal da mancha das nervuras das folhas da videira é o *Grapevine fleck virus* (GFkV), pertencente à família *Tymoviridae*, gênero *Maculavirus*. Esta doença já foi relatada na maioria dos países vitícolas (MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006; BASSO et al., 2014), sendo também encontrado infectando videiras no Brasil (FAJARDO et al., 2004; CATARINO et al., 2015). Não é transmitido mecanicamente e não tem vetor conhecido.

Por ser latente na maioria das cultivares de copa e porta-enxerto de videira, esta virose está incluída nos programas de seleção sanitária da maioria dos países vitícolas (FAJARDO et al., 2004; FAJARDO et al., 2011). Os sintomas, quando presentes, aparecem em folhas jovens e de meia idade (durante a fase de brotação na primavera), sendo definidos como manchas translúcidas sem forma, número e tamanho definidos, contaminando também as nervuras (DUBIELA et al., 2013; BASSO et al., 2014) (FIGURA 12).

Figura 12 – Folha de videira sadia (A); folha de videira infectada com a doença da mancha das nervuras, exibindo sintomas como manchas translúcidas (B).



Fonte: Thor Fajardo (2010).

As infecções podem ser latentes em cultivares europeias, americanas e porta-enxerto, que exercem influência adversa no vigor da planta e na capacidade de enraizamento de enxertos e porta-enxertos. As cepas mais severas induzem também graus variados de degenerescência, podendo as bordas das folhas virarem

para cima. Os danos econômicos são avaliados de acordo com o grau de intensidade da infecção (MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006).

As doenças virais exercem impacto econômico negativo na viticultura brasileira, causando sérios danos nas plantas, nos frutos e, consequentemente, afetando a produção. As concentrações das partículas virais nos tecidos vegetais são variáveis, dificultando a detecção, além da existência de algumas infecções latentes. Portanto, a detecção é um fator chave para elucidar o panorama real da disseminação destes patógenos a fim de se estabelecer medidas planejadas de manejo e controle e, obviamente, evitar perdas e danos nesta importante cultura agrícola.

5 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE VÍRUS EM PLANTAS

As ferramentas de diagnóstico de vírus que infectam videiras têm evoluído ao longo dos anos, demonstrando que a maioria das infecções que ocorre na planta manifestam-se como infecções mistas, desafiando o diagnóstico e o controle das doenças (FAJARDO; NICKEL, 2015).

O diagnóstico viral através da indexação biológica em plantas indicadoras lenhosas ou herbáceas evoluiu para testes sorológicos, como o ELISA, até chegar aos ensaios moleculares, como RT-PCR “convencional” e a RT-PCR em tempo real. Cada um destes métodos apresenta vantagens e significativas limitações (BASSO et al., 2014; MALIOGKA et al., 2015).

5.1 Indexação biológica

Este método consiste em utilizar videiras indicadoras sensíveis e específicas para cada vírus, enxertando nelas gemas de plantas com procedência fitossanitária desconhecida, para que, durante seu desenvolvimento, seja possível observar os sintomas. Pode-se também utilizar plantas indicadoras herbáceas caso os vírus sejam transmitidos mecanicamente (RADAELLI et al., 2006; BASSO et al., 2014; FAJARDO; NICKEL, 2015).

Porém, este método apresenta algumas limitações como, por exemplo, o tempo necessário para expressão dos sintomas, que pode variar entre 2 a 24 meses, além do espaço requerido em campo e em casa de vegetação para a realização dos experimentos (OSMAN et al., 2008; FAJARDO; NICKEL, 2015). Além disso, a baixa concentração viral, a ausência de transmissão mecânica e os sintomas latentes de algumas infecções dificultam o diagnóstico visual. É importante destacar também que algumas plantas indicadoras podem variar a expressão dos

sintomas de acordo com as condições ambientais (BASSO et al., 2014; FAJARDO; NICKEL, 2015).

As limitações do método não superam sua importância, pois de acordo com Maliogka et al., (2015) e Fajardo; Nickel (2015), a enxertia de videiras em espécies indicadoras lenhosas é um passo fundamental, principalmente para a detecção de vírus não caracterizados molecularmente, oferecendo informações sobre as características biológicas do isolado ou espécie viral.

5.2 Métodos sorológicos

Devido à simplicidade, os métodos sorológicos são os mais aplicados para diagnósticos de vírus em plantas e podem complementar o método biológico (FAJARDO; NICKEL, 2015). O método *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA), direto e indireto, é o mais aplicado (BASSO et al., 2014; MALIOGKA et al., 2015).

A especificidade do método depende do reconhecimento de uma proteína específica com anticorpos. A detecção ocorre através da visualização de indicadores luminescentes, radioativos ou fluorescentes, utilizando-se uma microplaca de múltiplos poços onde ocorre a reação (CORDEIRO, 2011; MALIOGKA et al., 2015). “Os anticorpos produzidos contra a proteína capsidial de um determinado vírus são empregados na sua detecção e extratos preparados pela maceração de tecido vegetal infectado em tampão são utilizados como antígeno” (LIMA, 2009). A revelação é feita através de reações enzimáticas (CORDEIRO, 2011).

Dot-ELISA é uma variação do método sorológico, semelhante ao ELISA, porém, o antígeno é ligado a uma membrana de nitrocelulose e a detecção pode ser visualizada através do produto da reação enzimática (FAJARDO; NICKEL, 2015).

As principais limitações dos métodos sorológicos para detecção viral são a sensibilidade, pois a concentração viral nos tecidos infectados é baixa e variável nos diferentes estádios vegetativos da planta (BASSO et al., 2014), ausência de anticorpos para a detecção de alguns vírus importantes e a dificuldade para produzir estes reagentes (OSMAN et al., 2008).

5.3 Métodos Moleculares

5.3.1 Transcrição Reversa associada à Reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

A RT-PCR (do inglês, *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica que tem sido aplicada para diagnóstico de patógenos virais que infectam videiras e que possuem RNA genômico, muitos descritos neste trabalho. Este método semi-quantitativo combina a transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase, tornando-se muito utilizado pela sua sensibilidade, comparado ao método sorológico de ELISA, além de sua rapidez (CORDEIRO, 2011).

A técnica de PCR consiste em produzir milhões de cópias da sequência alvo em um curto período de tempo. O processo utiliza uma DNA polimerase termoestável (*Taq* DNA polimerase) e oligonucleotídeos iniciadores específicos ("*primers*") que se ligam às extremidades 5' e 3' de uma determinada região do genoma a ser amplificada. Finalizado o tempo da reação, é necessária a separação eletroforética dos produtos amplificados para detecção e análise dos fragmentos amplificados de DNA, em géis de agarose. Esse processo ocorre na presença de um corante, como o brometo de etídeo após a incidência de luz ultravioleta, seguido de avaliação visual das bandas correspondentes aos fragmentos amplificados (MACKAY; ARDEN; NITSCHE, 2002; NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; OSMAN et al., 2008).

A PCR convencional necessita de várias etapas para obtenção de produtos, aumentando o risco de contaminação das amostras durante a manipulação (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; OSMAN et al., 2008).

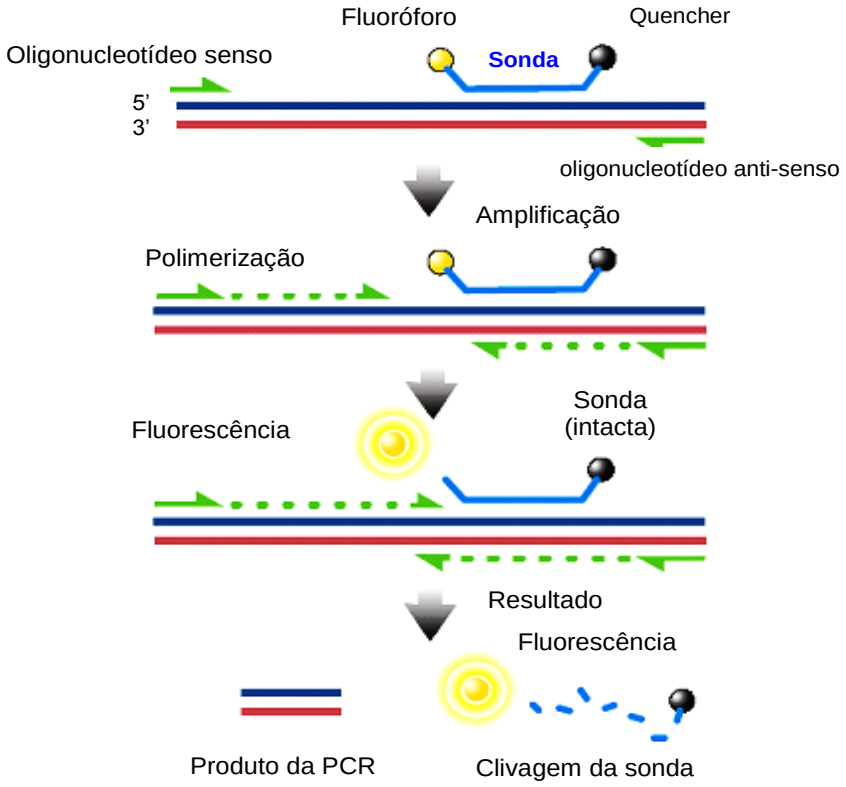
O método da RT-PCR é sensível para o diagnóstico viral, porém, inadequado para análise de muitas amostras, porque requerem avaliação dos produtos da reação em géis (VANNI; FAJARDO; NICKEL, 2013).

5.3.2 RT-PCR em tempo real

A técnica de RT-PCR em tempo real utiliza sondas específicas marcadas com

fluoróforos (TaqMan), que se ligam apenas a amplicons específicos, além do uso de oligonucleotídeos, permitindo a quantificação de ácido nucléico viral, apresentando resultados de uma forma mais precisa e rápida (FAJARDO; NICKEL 2015). Além disso, é possível a detecção simultânea de mais de um vírus infectando a mesma planta hospedeira (BASSO et al., 2014) (FIGURA 13).

Figura 13 – Representação do funcionamento da RT-PCR em tempo real.



Fonte: Novais; Pires-Alves (2004).

Fluoróforos são moléculas que absorvem e emitem luz em comprimento de onda específicos, permitindo o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos. Sondas são fragmentos de DNA marcados com fluoróforos, aplicadas na reação com o objetivo de detectar as sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados. A sonda (TaqMan) possui em suas extremidades um fluoróforo e um bloqueador, que hibridiza com a sequência da fita simples de DNA complementar, alvo para a amplificação. No processo da amplificação, a sonda é degradada pela atividade da *Taq* DNA polimerase, separando o *quencher* do fluoróforo, resultando em aumento da intensidade da fluorescência (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; DUBIELA et al., 2013; FAJARDO; NICKEL, 2015).

A técnica da RT-PCR em tempo real pode ser usada para superar todos os problemas de detecção de vírus em videiras, apresentados pelos métodos anteriormente descritos, sendo cada vez mais utilizada para detecção e quantificação de agentes patogênicos nos tecidos de plantas (MACKAY; ARDEN; NITSCHE, 2002; NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; OSMAN et al., 2008; BAUMGARTNER; BHAT; FUJIYOSHI, 2010; LI et al., 2012; DUBIELA et al., 2013).

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Local da realização do trabalho

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Virologia Vegetal, na Sede da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Uva e Vinho, localizada no município de Bento Gonçalves, RS, sendo representada na Figura 14.

Figura 14 – Sede da Embrapa Uva e Vinho localizada no município de Bento Gonçalves, RS.

Fonte: Embrapa Uva e Vinho (2014).

A Embrapa Uva e Vinho é uma unidade vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que tem por missão viabilizar soluções de pesquisa, desenvolvimento e inovação para a sustentabilidade da vitivinicultura e da fruticultura de clima temperado, em benefício da sociedade brasileira. Atualmente, desenvolve ações de pesquisa com uva, maçã, morango, pera e pêssego.

A Unidade foi criada em 26 de agosto de 1975 e, além da sede, possui duas estações experimentais: a Estação Experimental de Fruticultura de Clima Temperado (EFCT), em Vacaria (RS) e a Estação de Viticultura Tropical (EVT), em Jales (SP).

6.2 Material biológico utilizado no trabalho

O material biológico utilizado neste trabalho foi constituído por fragmentos do lenho, nervuras e pecíolos de folhas de videiras, provenientes de programa de limpeza clonal, experimentos conduzidos no laboratório, amostras de rotina e prestação de serviço de diagnóstico para terceiros, dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Pernambuco. Amostras das cultivares Vitoria, Nubia, Isabel, Chardonnay, Niagara rosada, Niagara branca foram coletadas e encaminhadas ao laboratório e Virologia Vegetal, para posteriormente, serem analisadas quanto a presença ou ausência de vírus.

6.3 Extração de RNA total

O RNA total das amostras de videira foi extraído, pois o RNA viral encontra-se integrado à célula vegetal. O método utilizado foi de adsorção em sílica (ROTT; JELKMANN, 2001) a partir de 1,0 grama do tecido vegetal (fragmentos do lenho, nervuras ou pecíolo foliares) triturado em nitrogênio líquido e pulverizado em 3 mL de tampão de extração (CH_5N_3HCl 4 M, NaOAc 0,2 M, EDTA 25 mM, KOAc 1 M e PVP- 40 2,5%) (MACKENZIE et al.,1997). Transferiu-se 500 µL desta mistura para tubos Eppendorf e acrescentou-se 100 µL de SDS 10%. Em seguida, as amostras foram incubadas a 70 ºC por 10 minutos com agitação intermitente e logo após, mantidas em gelo por 5 minutos. Centrifugou-se a 13.000 rpm (centrífuga 5415 D - Eppendorf®) por 10 minutos. Após, transferiu-se 300 µL da fase aquosa para um novo tubo, adicionando 150 µL de etanol absoluto (EtOH), 300 µL de iodeto de sódio (NaI) 6M e 25 µL de sílica ressuspensa. As amostras foram homogeneizadas por 10 minutos com agitação intermitente à temperatura ambiente e centrifugadas a 6.000 rpm durante 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com a adição de 500 µL de solução tampão de lavagem (10 mM de Tris- HCl pH 7,5; 0,5

mM de EDTA pH 8.0; 50 mM de NaCl; 50 % EtOH), vortexando para ressuspender o pellet. Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas a 6.000 rpm durante 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado novamente, da mesma forma que a etapa anterior, seguida de nova centrifugação à mesma rotação. Novamente o sobrenadante foi descartado e os tubos permaneceram por 30 minutos a 50 °C em banho seco, para secagem do precipitado. O sedimento resultante foi então ressuspendido em 100 µL de água esterilizada e incubado a 70 ºC por 4 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos e 80 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo, sendo armazenados a - 20 °C.

6.4 Indexação para sete espécies de vírus que infectam videiras por meio de RT-PCR em tempo real

No período de 05.08.2014 a 08.07.2015, foram indexadas novecentos e vinte e quatro (924) amostras de videiras, em vinte e duas (22) placas de RT-PCR em tempo real. As amostras foram indexadas para os vírus:

- *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) – trezentos e setenta e quatro (374) amostras;

- *Grapevine virus A* (GVA) – oitenta e nove (89) amostras;

- *Grapevine virus B* (GVB) cento e quarenta e três (143) amostras;

- *Grapevine fleck virus* (GFkV) – trezentos e sete (307) amostras;

- *Grapevine leafroll – associated virus 2* (GLRaV-2) – cento e quarenta e sete (147) amostras;

- *Grapevine leafroll – associated virus* 3 (GLRaV-3) – quinhentos e quatro (504) amostras;

- *Grapevine leafroll – associated virus* 4 (GLRaV-4*)* – cento e cinquenta e cinco (155) amostras*.*

Com o objetivo de explorar a técnica de RT-PCR em tempo real para detecção de vírus de videira, foram realizadas reações simplex ou duplex, envolvendo combinações dos vírus. Videira comprovadamente sadia, proveniente de programa de limpeza clonal para remoção de patógenos, foi utilizada como controle negativo e, como controles positivos das reações, foram utilizados isolados desse vírus identificados e mantidos em casa de vegetação.

Todos os oligonucleotídeos ("*primers*") e as sondas, utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real, para a detecção dos vírus acima citados, constam no trabalho de Osman et al., (2007); Osman; Rowhani (2008); Klaassen et al., (2011) (TABELA 2).

Tabela 2 – Relação dos oligonucleotídeos e sondas utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real (TaqMan), de sete vírus que infectam a videira.

Vírus	**Número de identificação de Oligonucleotídeos e sondas**	**Fluoróforo / *quencher***	**Orientação**	**Gene alvo**	**Sequência do oligonucleotídeo (5'-3')**	**Tamanho do produto (pares de base)**
GRSPaV	RSPaV-52 F1	----	F	CP	AGACGGGAATACCACCAGCTAA	102
	RSPaV-52 F2	----	F		AGACGGGAATTCCACCCGCTAA	
	RSPaV-52 F3	----	F		AGACGGGGATACCACCAGCTAA	
	RSPaV-130 R1	----	R		AGGAAGAAGTCAAAGGCTGCAA	
	RSPaV-130 R2	----	R		AAGAAAAAATCAAAGGCTGCAA	
	RSPaV-75 P1	VIC / TAMRA	P		TGGGCCAAGAAAGGATTTAATGAGAATGAAAAG	
	RSPaV-75 P2	VIC / TAMRA	P		TGGGCCAAGAAAGGGTTTAATGAGAATGAAAAA	
	RSPaV-75 P3	VIC / TAMRA	P		TGGGCCAAGAAGGGATTTAATGAAAATGAGAAA	
GVA	GVA-77 F1	----	F	CP	CGACCGAAATATGTACCTGAATACTC	115
	GVA-77 F2	----	F		CGACCGAACTATGTACCTGAATACTC	
	GVA-192 R1	----	R		TTTGCTAGCTTTAGGACCTACTATATCTACCT	
	GVA-192 R2	----	R		CTTGCTAGCCTTAGGTCCTACTATATCTACCT	
	GVA-104 P	VIC / TAMRA	P		CTTCGGGTACATCGCCTTGGTCGG	
GVB	GVB-92 F1	---	F	CP	CTAGGAGTGCGGCTAAACGAA	110
	GVB-92 F2	---	F		GGAGTGCGGCCAAACGA	
	GVB-92 F3	---	F		CAAGGAGTGCGGCTAAACGAA	

Continua

Conclusão

Vírus	Número de identificação de Oligonucleotídeos e sondas	Fluoróforo / *quencher*	Orientação	Gene alvo	Sequência do oligonucleotídeo (5'-3')	Tamanho do produto (pares de base)
	GVB-202 R1	---	R		CCTTAACCTCGTCCTGTGATATGGT	
	GVB-202 R2	---	R		CCTTCACCTCATCYTGGGATCGTGT	
	GVB-119 P1	6-FAM / TAMRA	P		CTCGTTATGGTCGCTGTTACTGTTGTGGTAG	
	GVB-119 P2	6-FAM / TAMRA	P		ACCGTTACGGCCGTTGTTACTGTTGTGGTAG	
GLRaV-2	GLRaV-2 198 F	---	F	HSP70	CATTATATTCTTCATGCCTCTCAGGAT	116
	GLRaV-2 290 R	---	R		GATGACAACTTCTGTCCGCTATAGC	
	GLRaV-2 233 P	VIC / TAMRA	P		TTGCTACTGATCGACTGTGCAGCTCACA	
GLRaV-3	GLRaV-3 56 F	----	F	HSP70	AAGTGCTCTAGTTAAGGTCAGGAGTGA	230
	GLRaV-3 285 R	----	R		GTATTGGACTACCTTTCGGGAAAAT	
	GLRaV-3 181 P	VIC / TAMRA	P		CAGGTAATAGCGGACTGAGACTGGTGGACA	
GLRaV-4	LR4 hsp-85 F	----	F	HSP70	ATATACATACCAACCGTTGTGGGTATAA	94
	LR4hsp-178 R	----	R		CCCTATAAACTAGCACATCCTTCTCTAGT	
	LR4hsp-120 P	6-FAM / TAMRA	P		TGGAACATATACCATTGGGCTTGGTGCT	
GFkV	239 F	---	F	RdRP	CAACATCGAATGCCAATTTGG	89
	328 R	---	R		GCCAGGCTGTAGTCGGTGTTGT	
	261 P1	6-FAM / TAMRA	P		CCTCTCACGTGCATGCGCATC	
	261 P2	6-FAM / TAMRA	P		CCTCTCACGTGCATGCGGATC	
	261 P3	6-FAM / TAMRA	P		CCTCTGACGTGCATGCGCATC	

Fonte: Osman et al., (2007); Osman; Rowhani, (2008); Klaassen et al., (2011).

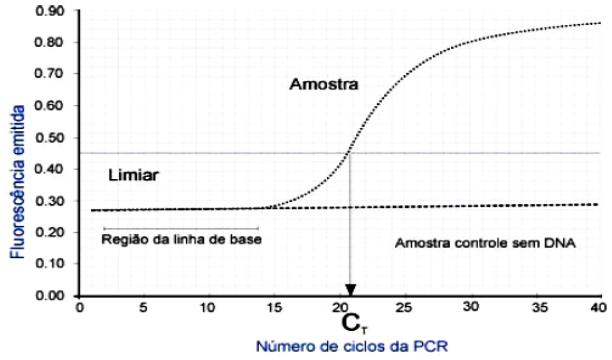
Legenda: F = oligonucleotídeo *"forward*" (viral); R = oligonucleotídeo "*reverse*" (complementar); P = *"probe*" (sonda com fluoróforo); CP (proteína capsidial), HSP70 (proteína de choque térmico 70); RdRP = polimerase RNA dependente RNA; Vírus: *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV); *Grapevine virus A* (GVA); *Grapevine virus B* (GVB); *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2); *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3); *Grapevine leafroll-associated virus 4* (GLRaV-4); *Grapevine fleck virus* (GFkV).

As amostras foram indexadas em ensaios simplex (detecção individual) ou duplex (sondas foram marcadas com o fluoróforo 6-FAM ou VIC na extremidade 5') e com o *quencher* TAMRA (fluoróforo que funciona como bloqueador) na extremidade 3', visando a detecção simultânea de dois vírus na amostra.

Reações de RT-PCR em tempo real, em tubo único ("*one-step*"), foram conduzidas em placas de 96 poços usando o kit *TaqMan Master Mix One-Step* RT-PCR (Applied Biosystems), conforme descrito a seguir: 6,1 μl do "*One-step* RT-PCR *Master Mix*" (Tubo "2X *Master Mix without UNG*", contendo: *AmpliTaq Gold mix* optimizado para o ensaio exonucleásico de sondas TaqMan com *AmpliTaq Gold* DNA polimerase, dNTPs com dUTP, uma referência passiva ROX™ e tampão otimizado); 0,6 μl da mistura de oligonucleotídeos e sonda (415 nM oligonucleotídeos e 85 nM de sonda); 0,3 μl MuLV e inibidor de RNAse (Tubo "40X *MultiScribe and RNase Inhibitor Mix*", contendo: enzima *MultiScribe* para reações de transcrição reversa e inibidor de RNase) e 3 μl de RNA total da planta, previamente extraído, para um volume final de 12 μl (DUBIELA et al., 2013).

As reações foram conduzidas em termociclador com sistema apropriado para emissão e estímulo da fluorescência (equipamento/modelo: StepOnePlus™ Real-Time PCR System Applied Biosystems), conforme descrito a seguir: 45 ºC por 35 min (para transcrição reversa), 95 ºC por 10 min (para ativação da *AmpliTaq Gold*), seguidos de 40 ciclos a 95 ºC por 15 seg (desnaturação) e 60 ºC por 1 min (pareamento e extensão). Os dados da reação foram analisados graficamente, utilizando-se o software *StepOne Software* v2.3 (Applied Biosystems), pela determinação do C_T ("*threshold cycles*"), ciclo limiar. O C_T é o ciclo no qual um significante aumento na fluorescência ocorre (FIGURA 15). Valores de C_T abaixo de 35 representam resultados positivos, confiáveis e reprodutíveis, sendo que quanto maior a concentração viral na amostra, menor será o valor do C_T (DUBIELA et al., 2013). Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência (OSMAN et al., 2008).

Figura 15 – Representação gráfica de uma reação de RT-PCR em tempo real, mostrando uma curva de emissão de fluorescência (*threshold cycles*) C_T.



Fonte: Novais; Pires-Alves (2004).

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O levantamento das infecções de videiras foi obtido através do número total de amostras indexadas para cada vírus, considerando os sintomas ou a ausência dos mesmos, no período de um ano e o total de plantas infectadas com os respectivos vírus. Em algumas placas de RT-PCR em tempo real, as mesmas amostras foram indexadas para mais de um vírus, conforme Tabela 3:

Tabela 3 – Detalhamento do número de amostras avaliadas em cada placa de RT-PCR em tempo real e do número de amostras com resultado positivo para cada vírus.

Placa/amostras		**Número de amostras com resultado positivo para os vírus avaliados**						
Número da placa	**Número de Amostras avaliadas em cada placa**	**GVA**	**GVB**	**GFkV**	**GRSPaV**	**GLRaV-2**	**GLRaV-3**	**GLRaV-4**
151	54	-	0	-	27	-	-	-
152	75	-	-	-	-	-	6	-
153	60	-	-	-	-	-	0	-
154	55	-	-	-	-	-	4	-
155	80	-	-	-	-	-	0	-
156	22	8	2	3	2	-	2	-
157	2	0	0	-	-	-	0	-
158	13	-	-	-	13	-	-	-
159	16	1	2	2	5	-	-	-
162	21	16	1	-	-	-	-	-

Continua

Placa/amostras		Número de amostras com resultado positivo para os vírus avaliados						
Número da placa	**Número de Amostras avaliadas em cada placa**	**GVA**	**GVB**	**GFkV**	**GRSPaV**	**GLRaV-2**	**GLRaV-3**	**GLRaV-4**
163	10	-	-	-	-	-	0	-
164	20	1	0	9	3	-	4	-
165	10	-	-	-	-	-	0	
167	15	-	-	-	-	-	0	-
168	8	1	0	2	1	-	0	1
169	88	-	-	5	6	-	-	-
170	88	-	-	32	22	-	-	-
171	65	-	-	28	56	-	-	-
172	42	-	-	-	-	3	19	36
173	30	-	-	-	-	1	3	12
174	75	-	-	-	-	23	-	58
175	75	-	-	-	-	-	8	-
Total	**924**	**27**	**5**	**81**	**135**	**27**	**46**	**107**

Fonte: A autora (2015).

Legenda: *Grapevine virus A* (GVA); *Grapevine virus B* (GVB); *Grapevine fleck virus* (GFkV); *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV); *Grapevine leafroll – associated virus 2* (GLRaV-2); *Grapevine leafroll – associated virus* 3 (GLRaV-3); *Grapevine leafroll – associated virus* 4 (GLRaV-4); (-) = vírus não avaliado em determinada placa.

A incidência de infecções em videiras foi obtida considerando-se o número total de amostras indexadas para cada vírus e o total de plantas infectadas com os respectivos vírus, conforme Tabela 4:

Tabela 4 – Descrição do número total de amostras indexadas para cada vírus, o número total de plantas infectadas com os respectivos vírus e o cálculo percentual das infecções.

Número de amostras Indexadas para cada vírus	**GVA** 89	**GVB** 143	**GFkV** 307	**GRSPaV** 374	**GLRaV-2** 147	**GLRaV-3** 504	**GLRaV-4** 155
Total de plantas infectadas	27	5	81	135	27	46	107
%	**30,33**	**3,50**	**26,38**	**36,1**	**18,37**	**9,13**	**69,03**

Fonte: A autora (2015).

Legenda: *Grapevine virus A* (GVA); *Grapevine virus B* (GVB); *Grapevine fleck virus* (GFkV); *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV); *Grapevine leafroll – associated virus 2* (GLRaV-2); *Grapevine leafroll – associated virus* 3 (GLRaV-3); *Grapevine leafroll – associated virus* 4 (GLRaV-4); (%) = cálculo percentual das infecções para as amostras avaliadas.

Alguns autores já desenvolveram trabalhos de diagnóstico viral utilizando a técnica de RT-PCR em tempo real (TaqMan). Eun; Seoh; Wong (2000) detectaram e quantificaram simultaneamente dois vírus que infectam orquídeas, *Cymbidium mosaic potexvirus* (CymMV) e *Odontoglossum ringspot tobamovirus* (ORSV). Ling; Wechter; Jordan (2007) procederam com o diagnóstico para detecção de vinte e cinco isolados de *Pepino mosaic virus* (PepMV) coletados em plantios comerciais de tomate. Yokomi; Saponari; Sieburth (2010) identificaram várias estirpes de *Citrus tristeza virus* (CTV), na Califórnia (EUA). Dubiela et al., (2013) fizeram um levantamento de dez vírus em amostras de videiras no Brasil: *Grapevine leafroll – associated virus* (GLRaV-1, -2, -3 e -5), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine virus D* (GVD), *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV). Catarino et al., (2015) realizaram trabalho visando determinar a incidência, por meio de RT-PCR em tempo real, dos vírus que infectam videiras no Nordeste brasileiro: GRSPaV, GVA, GVB, GLRaV-2, -3 e -4), GFkV, GFLV incluindo também no trabalho o vírus *Grapevine rupestris vein feathering virus* (GRVFV). Osman et al., (2013) desenvolveram com êxito esta técnica para detecção dos vírus *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB) e *Grapevine virus D* (GVD), em ensaios simplex ou duplex.

O vírus *Grapevine leafroll – associated virus* 4 (GLRaV-4), agente causal do enrolamento da folha da videira, foi relatado somente no ano de 2012 infectando videiras no Brasil, por Catarino et al., através de um levantamento realizado com quarenta amostras de cultivares comerciais introduzidas no Brasil entre os anos 2000 e 2002, utilizando a técnica de RT-PCR em tempo real. Os autores detectaram a presença de infecção pelo vírus em trinta e nove amostras, das quarenta analisadas. No mesmo trabalho, onze amostras foram submetidas a diagnóstico para o mesmo vírus, porém, por meio de RT-PCR convencional, apresentando como resultado somente duas amostras positivas, confirmando a sensibilidade e especificidade da RT-PCR em tempo real, para diagnóstico viral.

A prevalência do vírus *Grapevine leafroll – associated virus* 4 (GLRaV-4) (69%) neste presente trabalho, deve-se ao fato das hospedeiras cultivadas no Brasil serem mais susceptíveis a este vírus do que aos demais vírus causadores da mesma doença, além da variabilidade genética desta estirpe, acrescida pela transmissão através de vetor (NAIDU et al., 2014). Estes mesmos autores citam ainda outras variações para este vírus, que são GLRaV-4 – Car, GLRaV-4 – Pr, GLRaV-4 - De, GLRaV-4 - 5, GLRaV-4 - 6 e GLRaV-4 - 9, confirmando a variabilidade genética existente.

As cochonilhas (Pseudococcideos), vetores do vírus *Grapevine leafroll – associated virus* 4 (GLRaV-4) são popularmente conhecidas como cochonilhas-farinhentas. Estes insetos ocorrem em vinhedos associados a formigas, que as protegem dos inimigos naturais e auxiliam na sua dispersão, vivendo também em plantas invasoras hospedeiras de cochonilhas no interior dos vinhedos (NAIDU et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015; EMBRAPA UVA E VINHO UZUM, 2015).

No ano de 2015, Catarino et al. também investigaram um grupo de cinquenta amostras e outro grupo de cinquenta e uma amostras e o percentual de infecção com o vírus *Grapevine leafroll – associated virus* 4 (GLRaV-4), foi de 90% para o primeiro grupo e 61% para o segundo grupo, superando as infecções por *Grapevine leafroll – associated virus 2* (GLRaV-2) e *Grapevine leafroll – associated virus* 3 (GLRaV-3).

Basso et al., (2010b) obtiveram resultados negativos para diagnóstico de *Grapevine leafroll – associated virus* 4 (GLRaV-4) no experimento que realizaram

com amostras de videiras no Brasil, utilizando a técnica de RT-PCR convencional. Segundo os autores, até o ano de 2010, o vírus ainda não havia sido relatado no Brasil.

Naidu, O'Neal e Walsh (2008) obtiveram dados através de experimentos conduzidos nos vinhedos de Washington (EUA) e constataram que o vírus *Grapevine leafroll – associated virus* 3 (GLRaV-3) é o mais comum nos locais avaliados, seguido pelos demais vírus do enrolamento da folha. No entanto, esses dados não se aplicam ao Brasil, sendo que os experimentos citados apontam incidências diferentes para os mesmos vírus.

Nascimento et al., (2015) conduziram um estudo para estabelecer a incidência de infecções virais em amostras de videiras no Brasil e detectaram o *Grapevine leafroll – associated virus* 4 (GLRaV-4), por meio de RT-PCR em tempo real, infectando dezenove amostras sintomáticas, de vinte analisadas e quinze amostras assintomáticas, de vinte analisadas. Os demais vírus mais frequentes detectados no trabalho correspondem à doença do complexo do lenho rugoso.

Lima e Fajardo (2012) afirmaram que a incidência das caneluras do tronco em amostras de videiras do Brasil é maior do que o intumescimento dos ramos, sendo possível confirmar tal argumento neste trabalho, em que 36,1 % das amostras estavam infectadas por *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) e 30,3% apresentaram infecção por *Grapevine virus A* (GVA), ambos responsáveis pela virose das caneluras do tronco. Já para *Grapevine virus B* (GVB), agente causal do intumescimento dos ramos, o percentual de amostras infectadas foi 3,5%, confirmando o argumento dos autores Lima e Fajardo (2012). Investigando a incidência dos vírus do complexo do lenho rugoso, Catarino et al., (2015) obtiveram um resultado de 100% para infecções por *Grapevine virus A* (GVA) e 80% para infecções por *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), considerando cinquenta amostras avaliadas para ambas as viroses. Os vírus *Grapevine virus A* (GVA) e *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) são os mais prevalentes do complexo do lenho rugoso, detectados em muitas variedades de videiras (MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006; MARTELLI et al., 2007; CATARINO et al., 2015).

Gambino et al., (2012) constataram a variabilidade genética de *Grapevine*

rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV) por suas estirpes GRSPaV-1, GRSPaV-SG1, GRSPaV-BS e GRSPaV-VS, através de análises de sequências nucleotídicas e presença de diferentes sintomas em plantas indicadoras, além de infecções assintomáticas, como é o caso da estirpe GRSPaV-SG1. Morelli et al., (2011) identificaram outras estirpes, como GRSPV, GRSPaV-SY, GRSPaV-PN e GRSPaV-MG. A variabilidade genética de *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) justifica a prevalência de infecções por este vírus, considerando sua disseminação através de material propagativo infectado, uma vez que não possui vetor conhecido. Stewart e Nassuth (2001) afirmaram que tal vírus é o mais disseminado do complexo do lenho rugoso, confirmando os resultados obtidos neste trabalho, em que as infecções por *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) são mais incidentes, seguidas de infecções por *Grapevine virus A* (GVA).

Grapevine virus A (GVA), assim como *Grapevine leafroll – associated virus* 4 (GLRaV-4), pode ser transmitido por Pseudococcideos, havendo ainda relato de transmissão por Coccidae (FAJARDO et al., 2003). O vírus pode ser detectado em mais de 70% das populações de cochonilhas presentes em videiras, que favorecem sua disseminação, além de estar associado a outras viroses, como a doença do enrolamento das folhas da videira (MARTELLI; CONTI; MINAFRA, 2001; BIOREBA, 2014).

Boscia et al. (1992), compararam isolados de *Grapevine virus A* (GVA) de diferentes origens geográficas e constataram que as populações deste vírus não apresentam variabilidade genética significativa, pois as proteínas capsidiais dos isolados de GVA comparados são muito próximas, não considerando a variabilidade genética como um dos fatores para sua dispersão.

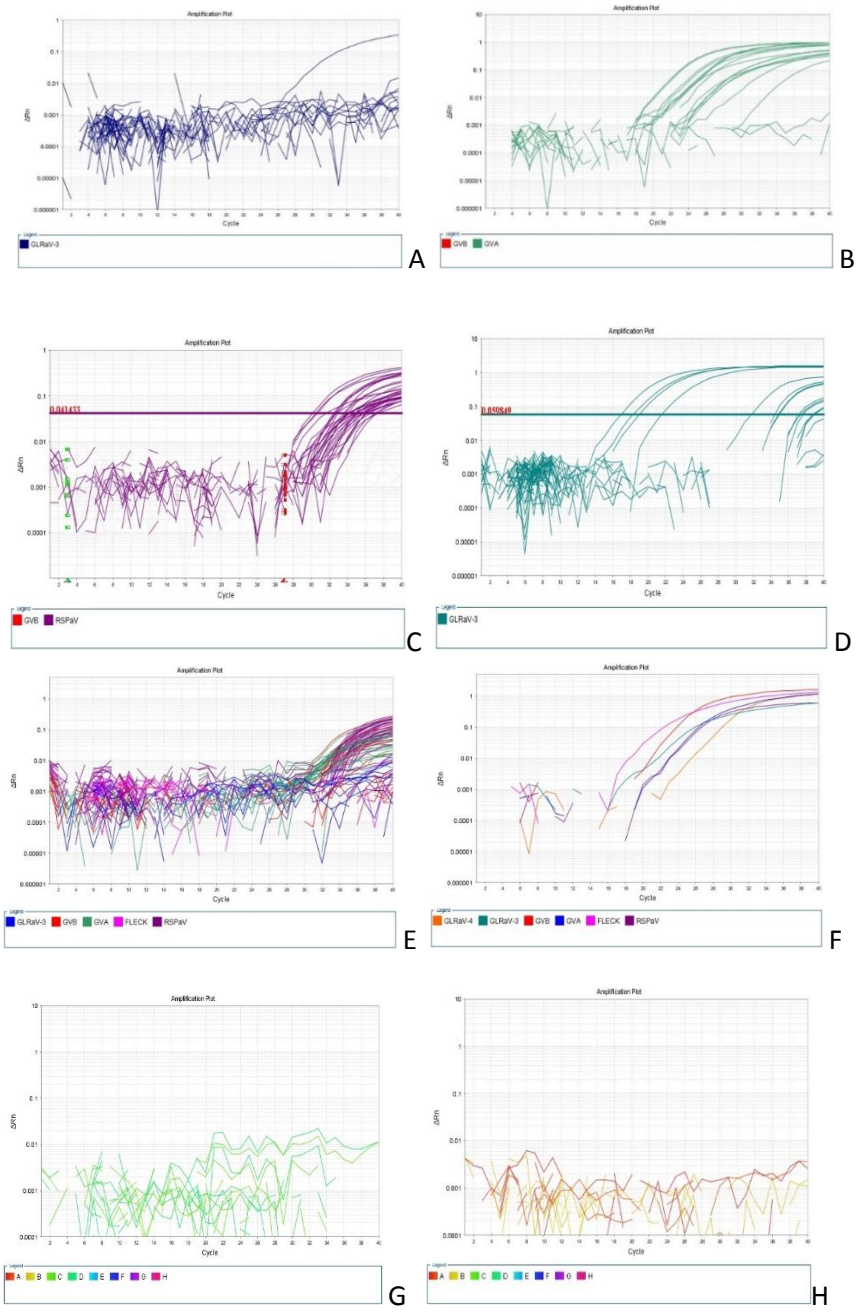
Kuhn; Fajardo; Vanni (2002); Kuniyuki et al. (2003); Catarino et al., (2015); Nascimento et al., (2015) analisaram a infecção por *Grapevine virus A* (GVA) em amostras de videiras no Brasil e detectaram a presença deste vírus, confirmando os resultados obtidos neste trabalho, em que 30,3% das amostras estavam infectadas. Sendo um dos agentes causais das caneluras do tronco, pertencente ao complexo do lenho rugoso, o índice de infecção por GVA contribui para que esta doença seja a segunda mais prevalente infectando videiras, seguida pela mancha das nervuras

(MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006; MARTELLI et al., 2007; CATARINO et al., 2015).

Catarino et al. (2015), realizaram um levantamento de infecções causadas pelo vírus *Grapevine fleck virus* (GFkV), agente causal da mancha das nervuras, em cinquenta amostras de videiras do Brasil e obtiveram como resultado, 32% de plantas infectadas, detectando que a doença da mancha das nervuras é uma das mais incidentes no país. A incidência do vírus *Grapevine fleck virus* (GFkV) também foi avaliada no presente trabalho e 26,4% das amostras estavam infectadas com este vírus. Por ser conhecido como um vírus que produz infecções latentes, sendo unicamente transmitido por enxertia, o material propagativo pode ser avaliado como "sadio" através do diagnóstico visual, resultando na disseminação do vírus (FAJARDO et al., 2004), classificando a doença da mancha das nervuras como uma das mais importantes em videiras (MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006; LIMA, 2009; JONES; NAIDU; NITA, 2012; BASSO et al., 2014). Por isso, a avaliação visual do material propagativo deve ser complementada com o diagnóstico molecular para detecção viral.

Através deste trabalho foi possível realizar a detecção de um vírus (simplex) ou a detecção simultânea de dois vírus (duplex) em uma única reação, por meio de RT-PCR em tempo real, a partir de amostras de RNA total da planta. A visualização gráfica de alguns dos resultados obtidos pode ser demonstrada através da Figura 16.

Figura16 – Curvas de detecção de vírus, por RT-PCR em tempo real, de reações realizadas com amostras, água, RNA total de videira sadia e comprovadamente infectada.



Fonte: Equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR (2014, 2015).

Legenda: (A) = resultado negativo para o vírus *Grapevine leafroll – associated virus* 3 (GLRaV-3) da placa número 163, amplificando somente o controle positivo; (B) = amostras positivas para *Grapevine virus A* (GVA) da placa número 162; (C) = amostras positivas para *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) da placa número 151; (D) = amostras positivas para *Grapevine leafroll – associated*

virus 3 (GLRaV-3); (E) = amostras positivas para os vírus *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) e *Grapevine leafroll – associated virus* 3 (GLRaV-3), da placa número 156; (F) = controles positivos das reações para os vírus *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) e *Grapevine leafroll – associated virus* 3 (GLRaV-3), *Grapevine leafroll – associated virus* 4 (GLRaV-4), da placa número 168; (G) = RNA total de videira sadia livre de vírus; (H) = água estéril utilizada como controle negativo.

A RT-PCR em Tempo Real (TaqMan) quando aplicada para diagnóstico viral em amostras de videiras, apresenta maior sensibilidade, especificidade e rapidez e confiabilidade, capaz de detectar diversos vírus em uma mesma hospedeira, com diferentes localizações geográficas. O desenvolvimento da técnica, que começa a partir da extração de ácidos nucléicos totais (RNA total) da planta, até os resultados finais, podem ser alcançados em menos de 4 horas. Neste método, os resultados podem ser avaliados com base nos valores C_T (*threshold cycles*) (DUBIELA et al., 2013).

A videira, como a maioria das espécies lenhosas, contém altas quantidades de polissacarídeos e compostos fenólicos, que inibem as enzimas usadas para os ensaios moleculares (MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006). Além disso, a baixa concentração viral nos tecidos da planta infectados, a instabilidade das partículas e em alguns casos, infecções latentes, podem resultar falsos negativos (PETROVIC et al., 2003). Por isso, é necessário a aplicação de técnicas de diagnóstico viral visando superar estas limitações (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; DUBIELA et al., 2013; OSMAN et al., 2013). Neste trabalho, foi possível detectar de maneira sensível e precisa, em reações simplex e duplex (com sondas marcadas com os fluoróforos 6-FAM e VIC e o bloqueador TAMRA) por meio de RT-PCR em tempo real, as sete espécies virais já mencionadas e ainda, diferentes vírus infectando a mesma hospedeira.

Considerando a importância agronômica que as viroses exercem sobre a cultura da videira, bem como sua diversidade, o controle das mesmas somente é possível através da utilização de material propagativo sadio, do porta-enxerto e da

cultivar. É fundamental que o plantio de novas mudas ou substituição das mesmas seja realizado com material propagativo certificado, com garantia de sanidade, podendo ser obtidos em estabelecimentos oficiais que reproduzem material sadio sob controle de órgãos oficiais (FAJARDO et al., 2011; FAJARDO; NICKEL, 2015).

As plantas matrizes não podem ser selecionadas apenas através da observação visual dos sintomas, pois podem variar de acordo com a cultivar, condições ambientais, potencial infectivo da espécie viral e estádio fenológico da planta. Além disso, algumas infecções são assintomáticas (MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006; LIMA; FAJARDO, 2012; BASSO et al., 2014). Tratando-se de infecções sintomáticas, a planta manifestará os sintomas somente após alguns anos de plantio e a única solução seria eliminar a planta infectada, replantando uma nova planta comprovadamente sadia, pois uma vez infectada por vírus, é impossível curar a planta no campo (LIMA; FAJARDO, 2012).

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A videira, por ser cultivada em grande escala no Brasil e propagada vegetativamente, está sujeita ao ataque de diversos patógenos, como fungos, nematoides, bactérias e vírus. As viroses causam grande impacto econômico nos vinhedos, por reduzirem o rendimento da planta, comprometendo o desenvolvimento e a qualidade dos frutos. As infecções virais podem surgir como doenças simples ou complexas, em que diversas espécies virais podem infectar uma única hospedeira.

Os vírus mais incidentes em videiras no Brasil, neste trabalho, foram *Grapevine leafroll – associated virus* 4 (GLRaV-4), um dos agentes causais do enrolamento da folha da videira, *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) e *Grapevine virus A* (GVA), pertencentes ao complexo do lenho rugoso, agentes causais das caneluras do tronco da videira e *Grapevine fleck virus* (GFkV), responsável pelas manchas das nervuras. Todos estes vírus são disseminados através do material propagativo e alguns deles possuem vetor, favorecendo sua disseminação e dispersão.

Com as frequentes infecções virais em amostras do Brasil e a presença de infecções mistas em diversas amostras, as ferramentas de diagnóstico viral são cada vez mais necessárias. Além disso, devem atender as necessidades de diagnósticos específicos para um grande número de infecções e amostras em análise. A RT-PCR em tempo real foi aplicada no diagnóstico viral deste trabalho e mostrou-se adequada para a indexação viral rotineira de um grande número de amostras. Assim, foi possível detectar de maneira precisa e sensível, todos os sete vírus em diversas plantas hospedeiras, videiras no Brasil, geograficamente distintas, identificando, inclusive, a presença de infecções múltiplas, em uma mesma planta. A técnica também agregou qualidade na indexação de patógenos virais,

proporcionando sensibilidade, rapidez, confiabilidade e especificidade na análise das amostras.

As estratégias de prevenção são a única forma para controlar as viroses da videira. É de fundamental importância a utilização de material propagativo comprovadamente sadio, certificados por órgãos responsáveis e que garantam sua sanidade, pois, uma vez infectado, o material propagativo disseminará os vírus.

Nesse sentido, os resultados obtidos neste trabalho contribuem para o conhecimento da incidência de vírus em amostras de videiras no Brasil. Além disso, reforçam a necessidade de estratégias para controle e manejo das doenças, além da aplicação de técnicas de diagnóstico viral específicas.

REFERÊNCIAS

BASSO, M. F. et al. Fisiologia foliar e qualidade enológica da uva em videiras infectadas por vírus. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 6, p. 351-359, 2010a.

BASSO, M. F. et al. Detecção e identificação molecular de vírus associados a videiras sintomáticas e assintomáticas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 11, p. 2249-2255, 2010b.

BASSO, M. F. et al. Avanços e perspectivas no estudo das doenças virais e subvirais em videira com ênfase na realidade brasileira. In: **Revisão Anual de Patologia de Plantas,** v. 22, Passo Fundo, p. 1-25, 2014.

BAUMGARTNER, K.; BHAT, R.; FUJIYOSHI, P. A rapid infection assay for Armillaria and real-time PCR quantitation of the fungal biomass in planta. **Fungal Biology,** v. 114, p. 107-119, 2010.

BERTAMINI, M; MUTHUCHELIAN, K; NEDUNCHEZHIAN, N. Effect of Grapevine Leafroll on the Photosynthesis of Field Grown Grapevine Plants (*Vitis vinifera* L. cv. Lagrein). **Journal Phytopathology**, v. 152, p. 145-152, 2004.

Bioreba. *Grapevine virus A* (GVA), 2014. Disponível em: <http://www.bioreba.ch/files/Product_Info/ELISA_Reagents/GVA_DAS_ELISA.pdf>. Acesso em: 06 nov. 2015.

BOSCIA, D. et al. Production, characterization and use of monoclonal antibodies to *Grapevine virus A*. **Archives of Virology**, v. 127, p. 185-194, 992.

BOULILA, M. Selective constraints, molecular recombination structure and phylogenetic reconstruction of isometric plant RNA viruses of the families *Luteoviridae* and *Tymoviridae*. **Biochimie**, n. 93, p. 242-253, 2011.

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

CAMARGO, U. A.; TONIETTO, J.; HOFFMANN, A. Progressos na viticultura brasileira. **Revista Brasileira de Fruticultura.** Jaboticabal, v. 33, n. 1, p. 144-149, 2011.

CAMPOS, M. A.; RESENDE, M. L. V.; SILVA, M. S. Interações moleculares planta-patógeno. In: FALEIRO, F.; ANDRADE, S. R. M.; JUNIOR, F. B. R. **Biotecnologia –**

estado da arte e aplicações na agropecuária. 1. ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011.

CATARINO, A. et al. Primeira detecção de *Grapevine leafroll-associated vírus 4* em amostras de videiras comercialmente introduzidas no Brasil. In: **Encontro de Iniciação Científica, 10º encontro de pós-graduandos da Embrapa uva e vinho**, 6, 2012, Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2012. p. 47.

CATARINO, A. et al. Incidência de vírus em videiras no Nordeste brasileiro e caracterização molecular parcial de isolados virais locais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n.3, p. 379-385, 2015.

CORDEIRO, M. C. R. Biotecnologia e diagnósticos moleculares. In: FALEIRO, F.; ANDRADE, S. R. M.; JUNIOR, F. B. R. **Biotecnologia – estado da arte e aplicações na agropecuária.** 1. ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011.

DUBIELA, C. R. et al. Simultaneous detection of Brazilian isolates of grapevine viruses by TaqMan real-time RT-PCR. **Tropical Plant Pathology**, n. 38, p. 158-165, 2013.

Embrapa Uva e Vinho 2013. Material vegetativo. Produção e transferência de materiais vegetais propagativos de videira. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/prodserv/vegetativo.html>. Acesso em: 08 nov. 2015.

Embrapa Uva e Vinho UZUM. Cochonilha-farinhenta. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/tecnologias/uzum/cocho_farinhenta.html>. Acesso em: 10 nov. 2015.

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

FAJARDO et al. Detecção de um Isolado de *Grapevine virus A* e Caracterização do Gene da Proteína Capsidial. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 521-527, 2003.

FAJARDO, T. V. M. et al. Detecção e caracterização biológica e molecular de *Rupestris stem-pitting associated virus* e seu efeito na fotossíntese de videiras. **Fitopatologia Brasileira**, n. 29, p. 209-214, 2004.

FAJARDO, T. V. M. et al. Expression of *Grapevine leafroll-associated virus 3* coat protein gene in *Escherichia coli* and production of polyclonal antibodies. **Fitopatologia Brasileira,** n. 32, p. 496-500, 2007.

FAJARDO, T. V. M. et al. *Grapevine fleck virus*: Detecção via RT-PCR em tempo real e caracterização molecular do gene da proteína capsidial. XLIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia - Bento Gonçalves RS. In: **Tropical Plant Pathology**, v. 36, 2011, (suplemento).

FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O. Técnicas de detecção e estudo de vírus em plantas. Circular Técnica 179, 2015. Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1027297/1/Comunicad

oTecnico179.pdf>. Acesso em: 06 nov. 2015.

FIELDS, B. N. Biologia dos Vírus. In: SCHAECHTER et al. **Microbiologia: Mecanismos das doenças infecciosas.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 255-269.

FIORE, N. et al. Survey of grapevine viruses in Chile. **Journal of Plant Pathology**, n. 90, p. 125-30, 2008.

FIORE, N. et al. Grapevine viruses in the Atacama Region of Chile. **Journal of Phytopathology**, n. 159, p. 743-750, 2011.

FUCHS, M. et al. Survey for the three major leafroll disease-associated viruses in Finger Lakes vineyards in New York. **Plant Disease**, v. 93, p. 395-401, 2009.

GAMBINO, G. et al. Co-evolution between *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* and *Vitis vinifera* L. leads to decreased defense responses and increased transcription of genes related to photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 5919-5933, 2012.

GARRIDO, L. R. et al. **Manual de identificação e controle de doenças, pragas e deficiências nutricionais da videira**. 1. ed. Bento Gonçalves, Embrapa Uva e Vinho, 2008. 78p.

GUTHA, L. et al. Modulation of flavonoid biosynthetic pathway genes and anthocyanins due to virus infection in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves. **BMC Plant Biology**, 10:187, 2010.

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

JONES, T.J.; NAIDU, R.; NITA, M. Documentation of Grapevine Leafroll associated Virus-2, -3, and Grapevine Fleck Virus in Wine Grape Varieties and Native Grape Species in Virginia. In: **Proceedings of the 17th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG)**, Davis, California, USA, October 7-14, p. 184–185, 2012.

KING, A. M. Q. et al. (Eds). **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2012, 1327p.

KLAASSEN, V. A. et al. *Vitis californica* and *Vitis californica* × *Vitis vinifera* hybrids are hosts for *Grapevine leafroll-associated virus-2* and *-3* and *Grapevine virus A* and *B*. **Plant Disease**, v. 95, p. 657-665, 2011.

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

KUHN, G.B., FAJARDO, T.V.M.; VANNI, M.F. Incidência de viroses em videiras americanas no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 206-207,

2002. (Resumo).

KUNIYUKI, H. et al. Detecção sorológica do *Grapevine virus A* em vinhedos do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 3, 2003 (resumo).

LEÃO, P.; SOARES, J. M. Cultivo da videira – Produção de mudas de videira. Versão eletrônica, 2010. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira_2ed/producao.html>. Acesso em: 06 nov. 2015.

LI, F. et al. Simultaneous detection and differentiation of four closely related sweet potato potyviruses by a multiplex one-step RT-PCR. **Journal of Virological Methods,** v. 186, p. 161-166, 2012.

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

LIMA, M. F. 2009. Detecção e controle de viroses em videiras. Circular Técnica 90. Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br/public_eletronica/downloads/CTE90.pdf>. Acesso em: 06 nov. 2015.

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

LINK, A. P. et al. *Grapevine fanleaf virus*: still a major threat to the grapevine industry. **Journal of Plant Pathology**, v. 86, n. 3, p. 183-1952, 2004.

LOPES, S. **Bio.** 1. ed. São Paulo: Saraiva, 2004.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHE, A. Survey and summary: Real-time PCR in virology. **Nucleics Acids Research,** Oxon, v.30, n.6, p.1292-1305, 2002.

MACKENZIE, D. J. et al. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Plant Disease,** v. 81, p. 222-226, 1997.

MALIOGKA, V. et al. Control of Viruses Infecting Grapevine. In: **Advances in Virus Research: Control of Plant Virus Diseases: Vegetatively Propagated Crops**, v. 91, Burlington: Elsevier Academic Press, 2015, p. 175-227.

MARTELLI, G. P.; CONTI, M.; MINAFRA, A. Descriptions of Plant Viruses. *Grapevine virus A,* 2001. Disponível em: <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=383>. Acesso em: 06 nov. 2015.

MARTELLI, G. P.; BOUDON-PADIEU, E. (Eds.) Directory of infectious diseases of grapevines and viruses and virus-like diseases of the grapevine: bibliographic report 1998-2004. CIHEAM-IAMB. **Options Méditerranéennes,** Série B n. 55, 194 p., 2006.

MARTELLI, G. P. et al. Family *Flexiviridae*: a case study in virion and genome plasticity. **Annual Review Phytopathology**, v. 45, p. 73-100, 2007.

MONIS, J.; CONSTABLE, F.; HABILI, N. Avances en el estúdio de enfermedades de la vid provocadas por virus. **Revista Enología**, v. VII, p. 1-8, 2010.

MORELLI, M. et al. Complete nucleotide sequence of a new variant of grapevine rupestris stem pitting-associated virus from southern Italy. **Archives of Virology**, v. 156, p. 543-546, 2011.

NAIDU, R. et al. Grapevine Leafroll: A Complex Viral Disease Affecting a High-Value Fruit Crop. **Plant Disease**, v. 98, n. 9, p. 1173-1185, 2014.

NAIDU, R.; O'NEAL, S.; WALSH, D., 2008. Grapevine leafroll disease. Washington State University Extension. Disponível em: <http://cru.cahe.wsu.edu/CEPublications/eb2027e/eb2027e.pdf>. Acesso em: 14 set. 2015.

NASCIMENTO, et al. Desempenho agronômico de videiras com e sem sintomas de viroses e comparação molecular de isolados virais. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.50, n.7, p.541-550, 2015.

NICKEL, O. et al. Detection and coat protein gene characterization of an isolate of *Grapevine virus B* from corky bark-affected grapevines in Southern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 279-284, 2002.

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

OLIVEIRA et al. Criação e Multiplicação de *Coccidoxenoides perminutus*, parasitoide de *Planococcus citri*. Circular Técnica 110, 2015. Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1025763/1/CTE110Eudes.pdf>. Acesso em: 06 nov. 2015.

OSMAN, F. et al. Real-time RT-PCR (TaqMan®) assays for the detection of *Grapevine leafroll associated viruses* 1-5 and 9. **Journal of Virological Methods**, v. 141, p. 22-29, 2007.

OSMAN, F. et al. Comparison of low-density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan® RT-PCR in detection of grapevine viruses. **Journal of Virological Methods,** v. 149, p. 292-299, 2008.

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

OSMAN, F. et al. Development and validation of a multiplex quantitative PCR assay for the rapid detection of *Grapevine virus A*, *B* and *D*. **Journal of Virological Methods**, v. 194, p. 138-145, 2013.

PETROVIC, N. et al. First detection of *Rupestris stem pitting associated virus*

particles by antibody to a recombinant coat protein. **Plant Disease**, v. 87, p. 510-514, 2003.

RADAELLI, P. et al. Diagnóstico biológico e molecular e análise da seqüência de nucleotídeos do gene da proteína capsidial de um isolado do Apple stem pitting virus. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 51-56, 2006.

RADAELLI, P. et al. Variabilidade do gene da proteína capsidial de três espécies virais que infectam videiras no Brasil. **Tropical Plant Pathology,** v. 34, p. 297-305, 2009.

REETZ, E. R. et al. **Anuário brasileiro da fruticultura 2014**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Crus, 2015, 104 p.

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

SAMPOL, T. et al. Effects of virus infection in photosynthesis of Banyalbufar Malmsey grapevines. **Libro de Actas, XIII Jornadas GESCO**, Montevideo, Uruguay, p. 275-279, 2003.

SILVA, C. J.; SASSON, S.; CALDINI, N. J. **Biologia.** 5. ed. São Paulo: Saraiva, 2011.

STEWART, S.; NASSUTH, A. RT-PCR Based Detection of *Rupestris stem pitting associated vírus* Within Field-Grown Grapevines Throughout the Year. **Plant Disease**, v. 85, p. 617-620, 2001.

TSAI, C. W.; DAUGHERTY, M. P.; ALMEIDA, R. P. P. Seasonal dynamics and virus translocation of *Grapevine leafroll-associated virus 3* in grapevine cultivars. **Plant Pathology**, v. 61, p. 977-985, 2012.

VANNI, M.F., FAJARDO, T.V.M., NICKEL, O. Implementação da técnica de RT-PCR em tempo real para o diagnóstico viral no Laboratório de Virologia da Embrapa Uva e Vinho. In: **Encontro Nacional sobre metodologias e gestão de laboratórios e V Simpósio sobre procedimentos analíticos e a rastreabilidade dos resultados na agropecuária,** Trabalhos Apresentados, Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2013.

VOLPE, M. L. et al. Incidence of *Grapevine leafroll-associated viruses 1*, *2*, and *3* in Mendoza vineyards. **Tropical Plant Pathology**, v.35, p. 377-380, 2010.

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