

Bento Gonçalves, RS / Novembro, 2024

Sintomas, detecção sorológica e molecular e variabilidade genética do vírus do enrolamento da folha da videira 3

Thor Vinícius Martins Fajardo⁽¹⁾ e Amanda dos Santos Ogliari⁽²⁾⁽¹⁾ Pesquisador, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. ⁽²⁾ Estagiária, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS

Embrapa Uva e Vinho
Rua Livramento, nº 515
Caixa Postal 130
95701-008 Bento Gonçalves, RS
www.embrapa.br/uva-e-vinho
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente

Henrique Pessoa dos Santos

Secretária-executiva

Renata Gava

Membros

*Fernando José Hawerth,**Mauro Celso Zanús, Joelsio**José Lazzarotto, Jorge Tonietto,**Thor Vinícius Martins Fajardo,**Alessandra Russi, Edgardo**Aquiles Prado Perez, Fábio**Ribeiro dos Santos, Luciana**Elena Mendonça Prado, Michele**Belas Coutinho Pereira**e Rochelle Martins Alvorcem*

Revisão de texto

Renata Gava

Normalização bibliográfica

Rochelle Martins Alvorcem

(CRB-10/1810)

Projeto gráfico

Leandro Sousa Fazio

Publicação digital: PDF

Todos os direitos
reservados à Embrapa.

Resumo – O enrolamento da folha da videira é a mais importante virose da videira em todo o mundo. O principal agente causal da doença é o vírus do enrolamento da folha da videira 3 (grapevine leafroll-associated virus 3, GLRaV-3), o qual pode causar expressivos danos às plantas. Diferentes tipos de testes diagnósticos podem apresentar características distintas quanto à sensibilidade, especificidade, praticidade e confiabilidade na detecção viral. Os objetivos do estudo foram implementar o diagnóstico do GLRaV-3 em videiras com diferentes testes sorológico e molecular; promover a caracterização molecular parcial de isolados do vírus e analisar o efeito da variabilidade genética no diagnóstico viral. De oitenta videiras analisadas, foi possível detectar o GLRaV-3 por ELISA em 47,5% das plantas, por RT-PCR convencional em 82,5% e por RT-qPCR, em 90%. As sequências de nucleotídeos do gene da proteína capsidial de dois isolados do GLRaV-3 apresentaram 99,4% de identidade entre si. Quatro isolados brasileiros do grupo II (ISAB-BR, TC-BR, IS2 e Pet-4) apresentaram baixa identidade de nucleotídeos (92,5 a 93,4%) em relação a 16 isolados do grupo I, que inclui os dois isolados caracterizados. Os resultados demonstraram diferenças na sensibilidade entre os testes e também na capacidade de reconhecimento do vírus (proteína capsidial ou RNA viral), refletindo na eficiência de detecção do vírus por cada teste. Diferenças na sequência de nucleotídeos podem resultar em diferenças na proteína traduzida e, conseqüentemente, diferenças no reconhecimento antígeno-anticorpo ou no pareamento entre iniciadores/sonda e o RNA viral em testes sorológicos ou moleculares, respectivamente.

Termos para indexação: indexação, ELISA, RT-PCR, RT-qPCR, variabilidade viral.

Symptoms, serological and molecular detection, and genetic variability of grapevine leafroll-associated virus 3

Abstract – Grapevine leafroll is the most important grapevine virus disease worldwide. The main causal agent of the disease is grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3), which can cause significant damage to the vine. Different types of diagnostic tests may present different sensitivity, specificity, practicality, and reliability in viral detection. The objectives of this study were to

implement GLRaV-3 diagnosis in grapevines using different serological and molecular tests; to perform the partial molecular characterization of virus isolates and analyze the effect of genetic variability on viral diagnosis. Out of eighty vines analyzed, GLRaV-3 was detected by ELISA in 47.5% of the plants, by conventional RT-PCR in 82.5% and by RT-qPCR in 90%. The nucleotide sequences of the coat protein gene of two GLRaV-3 isolates showed 99.4% nucleotide identity to each other. Four Brazilian isolates classified in group II (ISAB-BR, TC-BR, IS2 and Pet-4) exhibited low nucleotide identity (92.5% to 93.4%) to 16 isolates from group I, which includes the two characterized isolates. The results demonstrated differences in sensitivity among the tests and also in their capacity to recognize the virus (capsid protein or viral RNA), reflecting the detection efficiency of the test. Differences in the nucleotide sequence may result in differences in the translated protein and, therefore, differences in antigen-antibody recognition or pairing between primers/probe and viral RNA in serological or molecular tests, respectively.

Index terms: indexing, ELISA, RT-PCR, RT-qPCR, viral variability.

Introdução

A videira (*Vitis* spp.) é uma das principais frutíferas plantadas no Brasil com área de cultivo de cerca de 75.000 ha e apresenta expressiva importância socioeconômica, particularmente para o estado do Rio Grande do Sul (Mello; Machado, 2022). No entanto, é uma cultura suscetível a vários patógenos, com destaque para os patógenos virais. No mundo, foram identificados 101 vírus que infectam videiras, sendo que cerca de um terço deles pode causar danos ou está associado a doenças economicamente importantes (Fuchs, 2023). No Brasil, foram relatados pelo menos 21 vírus infectando essa cultura (Basso et al., 2017). A maioria dos vírus que infecta a videira tem apenas o gênero *Vitis* como hospedeira natural e, muitas vezes, não é possível atribuir os sintomas a um único vírus, pois infecções virais múltiplas são frequentes em videiras.

A principal virose da videira no Brasil e no mundo é o enrolamento da folha que tem como principal agente causal o vírus do enrolamento da folha da videira 3 (grapevine leafroll-associated virus 3, GLRaV-3), cuja espécie é classificada no gênero *Ampelovirus* e na família *Closteroviridae* (Naidu et al., 2015; Fajardo; Eiras, 2022). A partícula viral

do GLRaV-3 é alongada e flexuosa com cerca de 1800 x 12 nm de comprimento e diâmetro, respectivamente. É um vírus de RNA de fita simples, senso positivo, com cerca de 18.500 nucleotídeos e 13 fases abertas de leitura (ORFs, *open reading frames*, em inglês). A proteína capsidial (CP) que recobre a partícula viral tem 35 kDa e é codificada pela ORF6 que possui 942 nucleotídeos (nt) (Maree et al., 2013; Burger et al., 2017). O GLRaV-3 é transmitido de maneira semi-persistente por cochonilhas da família *Pseudococcidae*, com destaque para aquelas pertencentes aos gêneros *Planococcus* e *Pseudococcus* e da família *Coccidae*, destacando os gêneros *Pulvinaria* e *Parthenolecanium* (Herrbach et al., 2017).

O impacto das principais viroses da videira inclui redução na vida útil do vinhedo e na quantidade e qualidade das uvas produzidas, podendo resultar em perdas econômicas na atividade vitivinícola. O efeito negativo das viroses é potencializado pelo fato de a videira ser uma espécie lenhosa e perene, propagada vegetativamente por gemas, estacas e mudas e pelo intercâmbio de material propagativo de baixa qualidade fitossanitária (Maliogka et al., 2015; Basso et al., 2017).

Alguns sintomas associados às infecções virais em videira são diminuição do vigor da planta, produção reduzida e brotação irregular. O sintoma característico da infecção pelo GLRaV-3 é o enrolamento para baixo dos bordos das folhas da videira, observado principalmente nas cultivares europeias de *V. vinifera* a partir da metade do ciclo vegetativo da cultura. Normalmente, nas viníferas tintas e brancas infectadas, o limbo foliar apresenta uma coloração avermelhada ou amarelada atípica, respectivamente, sendo que o tecido próximo às nervuras permanece verde (Basso et al., 2017; Fajardo; Eiras, 2022). Em videiras americanas (*V. labrusca*) e híbridas, como por exemplo, cultivares de porta-enxertos, os sintomas característicos da virose do enrolamento da folha podem ser pouco perceptíveis ou estarem ausentes (infecção latente), devido a certo nível de tolerância que estes genótipos apresentam. Isto dificulta a avaliação visual do vinhedo e a percepção dos efeitos prejudiciais ocasionados pelas doenças virais, evidenciando a necessidade do emprego de testes diagnósticos para determinar a condição sanitária das plantas. Os sintomas da infecção viral também podem variar em função das condições ambientais, do estágio de desenvolvimento e da condição nutricional da planta, do tempo transcorrido desde a infecção, da espécie/cultivar de videira infectada, além do vírus e da variabilidade

genética viral (Fajardo et al., 2021). Estes fatores explicam o fato de, em determinadas situações, a infecção viral não ser notada, pois os sintomas podem ser pouco evidentes (Basso et al., 2017). Também, comumente se verifica distribuição irregular do vírus em videiras infectadas, relativa baixa concentração do vírus e flutuação do título (concentração) viral, tanto ao longo do ciclo da planta (variação sazonal) quanto em seus diferentes tecidos (Fiore et al., 2009). Isto pode ter implicações relevantes para o diagnóstico viral.

É impossível curar uma planta infectada por vírus no campo. As possibilidades de controle são comuns a todas as viroses, destacando-se o manejo, que visa eliminar fontes de inóculo viral, e o controle de vetores. A principal medida de controle baseia-se em estratégias de prevenção por meio da utilização de materiais propagativos livres de patógenos virais (Basso et al., 2017). Desta forma, é importante desenvolver, adaptar e/ou recomendar a utilização de testes diagnósticos que apresentem sensibilidade, especificidade, praticidade, rapidez e custo acessível para a detecção e identificação viral em videiras. Para abordar esses aspectos é necessário conhecer melhor o patógeno viral, principalmente a sua variabilidade genética.

As ferramentas de diagnóstico viral têm evoluído constantemente, no princípio com a utilização da indexação biológica em plantas indicadoras, avançou para o emprego de testes sorológicos e alcançou os testes moleculares (Fajardo; Nickel, 2015). O diagnóstico sorológico se caracteriza pelo emprego de anticorpos específicos capazes de reconhecer a proteína capsial que reveste a partícula viral. Um dos métodos sorológicos mais comuns para detecção de vírus em plantas é o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ou ensaio de imunoadsorção enzimática. Dentre os métodos moleculares, ou seja, aqueles baseados na detecção de ácido nucleico, a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) é o mais utilizado. A amplificação seletiva e direcionada de um fragmento do genoma do vírus, compreendido entre dois iniciadores, é realizada a partir do RNA viral. Uma variação amplamente utilizada é a RT-PCR quantitativa ou em tempo real (RT-qPCR), cuja principal vantagem é a altíssima sensibilidade (Dubiel et al., 2013).

Os objetivos deste estudo foram implementar o diagnóstico do GLRaV-3 em videiras empregando diferentes testes, como o sorológico e o molecular; promover a caracterização molecular parcial de isolados do vírus e analisar como a variabilidade genética pode afetar o diagnóstico viral.

Material e métodos

Amostras indexadas

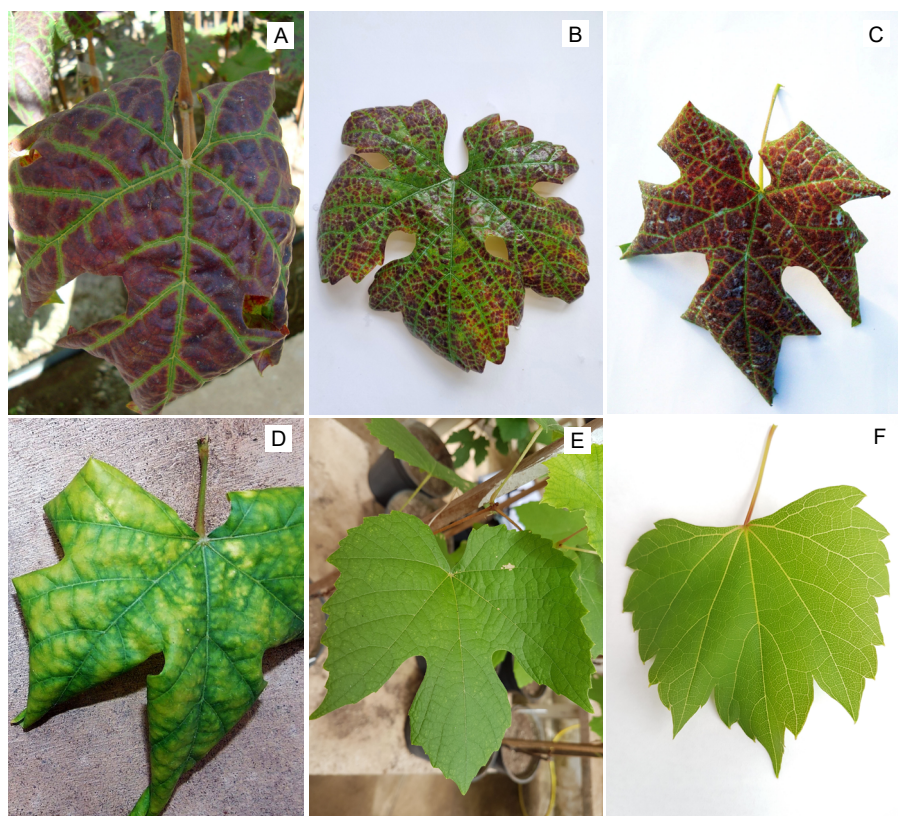
Oitenta acessos de videiras que compõe uma coleção de materiais com viroses, mantida em caneteiros suspensos em telado na Embrapa Uva e Vinho (Bento Gonçalves, RS), foram indexados para o GLRaV-3. As plantas indexadas compreenderam 29 amostras da cultivar Cabernet Franc, 24 de 'Cabernet Sauvignon', 23 de 'Merlot', duas de 'Itália', uma de 'Isabel' e outra do porta-enxerto 'Paulsen 1103' (Figura 1), conforme detalhado na Tabela 1. As cultivares Itália, Isabel e P1103 foram mantidas em vasos em casa de vegetação. As cultivares de copa encontravam-se enxertadas nas seguintes cultivares de porta-enxerto: R110, SO4, Kober 5BB, P1103, R99, 101-14 e 420A. No mês de março, com as folhas das videiras completamente desenvolvidas, todos os acessos (3 a 6 plantas/acesso) foram avaliados visualmente quanto a presença de sintomas foliares semelhantes a viroses.

Indexação viral por ELISA direto (DAS-ELISA)

Para o teste sorológico ELISA direto (Clark et al., 1986), foram utilizados como antígeno, os extratos das videiras (Tabela 1), testando-os com antissoro (imunoglobulina G, IgG) contra o GLRaV-3. Os controles negativo e positivo dos testes consistiram de extratos obtidos de videiras sadias ou infectadas com GLRaV-3, respectivamente, além de controles técnicos fornecidos com o kit sorológico ou a proteína capsial (CP) do vírus expressa em *Escherichia coli*.

Placas de poliestireno para microtitulação com 96 poços foram recobertas com 200 µL de antissoro comercial contra o GLRaV-3, diluído 1:100 em tampão de revestimento (0,05 M carbonato de sódio, pH 9,6). Então, as placas foram mantidas a 37 °C por 4 horas. As placas foram lavadas três vezes com tampão PBS-T (0,14 M NaCl + 2 mM KH₂PO₄ + 8 mM Na₂HPO₄ + 2 mM KCl) pH 7,4, acrescido de 0,05% (V/V) Tween 20. Um grama de raspa de ramos dormentes de videira, colhidos em agosto (Figura 2), foi triturado em presença de nitrogênio líquido e, depois, foram adicionados três mL de tampão de extração da amostra [0,5 M Tris-HCl, pH 8,2, 0,8% (p/V) NaCl, 2% (p/V) PVP 40000, 1% (p/V) PEG 6000, 0,05% (V/V) Tween 20], diluição 1:4, filtrando-se o extrato vegetal em gaze. Após, cada cavidade da placa recebeu 200 µL do extrato vegetal diluído (Figura 3).

As placas com os extratos vegetais foram mantidas a 4 °C por 12 horas e lavadas com tampão PBS-T. Em seguida, adicionaram-se 200 µL de



Fotos: Thor Vinícius Martins Fajardo

Figura 1. Sintomas representativos nas videiras amostradas das cultivares Cabernet Franc (A), Cabernet Sauvignon (B), Merlot (C), Itália (D), Isabel (E) e P1103 (F) indexadas para o GLRaV-3.

conjugado (IgG contra o vírus ligada à enzima fosfatase alcalina), diluído 1:100 em tampão PBS-T, acrescido de 2% (p/V) polivinilpirrolidona (PVP) e 0,2% (p/V) albumina de ovo. Após incubação por 4 horas, procedeu-se a nova lavagem e, então, adicionou-se o substrato da enzima, p-nitrofenil fosfato, diluído em tampão dietanolamina a 10% (p/V), pH 9,8 (Figura 3). A reação desenvolveu-se à temperatura ambiente, no escuro, e os valores de absorbância a 405 nm foram determinados, após 2 horas, em uma leitora de ELISA. A amostra com leitura de absorbância igual ou superior a duas vezes a leitura do controle sadio foi considerada infectada.

Indexação viral por RT-PCR convencional

As extrações de RNA total das 80 amostras de videiras (Tabela 1) foram realizadas utilizando-se o protocolo de adsorção em sílica (Rott; Jelkmann, 2001) a partir de um grama de raspas do lenho de ramos dormentes (Figura 2). Todas as amostras foram indexadas por RT-PCR convencional (*end-point* PCR) com um par de iniciadores desenhados para parear internamente no gene da proteína capsidial (CP) do GLRaV-3: 2236S (senso), 5'AGA-TATATGAAGTTGTCCCC3' e 2237aS (antisense),

5'ACTTTCGGTTTATGGGTACC3'. Em relação ao isolado Pir65 de GLRaV-3, acesso PP497041 do GenBank, o fragmento de DNA amplificado se estende do nucleotídeo 26 ao 395, resultando em um amplicon de 370 pares de bases (pb). Na reação para a síntese do cDNA, utilizaram-se a enzima transcriptase reversa M-MLV e 4 µL (cerca de 400 ng) do RNA total, incubando-se a reação a 37 °C por 1 hora. Após, realizou-se a PCR com uma enzima Taq DNA polimerase do tipo 'Hot Start', seguindo-se as recomendações dos fabricantes. O ciclo de amplificação foi composto pela desnaturação inicial (94 °C/15 min), 35 ciclos (94 °C/50 s, 50 °C/50 s e 72 °C/50 s) e uma extensão final (72 °C/10 min).

Os produtos da RT-PCR foram resolvidos em géis de agarose 1,5% (p/V) preparados em tampão TBE pH 8,0, corados com brometo de etídeo e visualizados em transiluminador de luz UV-B. Os amplicons observados, correspondentes ao fragmento de DNA de tamanho esperado, indicam a detecção do GLRaV-3.

A caracterização viral foi realizada com dois isolados do GLRaV-3 obtidos de dois acessos da cultivar Itália, amostras 79 e 80 (Figura 4), sendo nomeados isolados Pir65 e Garib, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados obtidos para a detecção do vírus GLRaV-3 em videiras com três testes diagnósticos, ELISA, RT-PCR e RT-qPCR.

Amostra	Cultivar	Localização da planta	Sintoma foliar de virose	ELISA (Absorbância a 405 nm)	RT-PCR convencional (370 pb)	RT-qPCR (valores de Ct)
	Controle negativo	CV1		- (0,195)	-	- (40,00)
	Controle positivo	CV1		+ (0,508)	+++	+ (21,31)
1	Cabernet Sauvignon	E1-F1-214	+	- (0,210)	++	- (40,00)
2	Merlot	E1-F5-320	+	- (0,213)	++	- (38,40)
3	Merlot	E1-F6-322	+	- (0,210)	++	- (37,86)
4	Merlot	E1-F7-321	+	- (0,205)	+++	- (36,51)
5	Merlot	E1-F8-331	+	- (0,189)	++	- (37,16)
6	Merlot	E1-F9-360	+	+ (2,444)	+++	+ (17,93)
7	Cabernet Franc	E1-F9-359	+	+ (2,865)	+++	+ (20,51)
8	Cabernet Sauvignon	E1-F10-313	+	- (0,215)	-	+ (26,14)
9	Cabernet Sauvignon	E1-F10-369	+	+ (1,633)	+++	+ (19,82)
10	Cabernet Franc	E1-F11-366	+	- (0,208)	++	+ (27,11)
11	Merlot	E1-F12-237	+	- (0,209)	++	+ (33,03)
12	Cabernet Franc	E1-F14-217	+	- (0,197)	++	+ (32,77)
13	Cabernet Sauvignon	E1-F15-31	+	- (0,176)	+	+ (32,57)
14	Cabernet Sauvignon	E1-F19-122	+	+ (0,509)	+	+ (20,30)
15	Merlot	E1-F20-86	+	+ (1,175)	+++	+ (20,37)
16	Cabernet Franc	E1-F21-171	+	+ (1,135)	++	- (40,00)
17	Merlot	E1-F24-585	+	+ (1,909)	+++	+ (18,04)
18	Cabernet Sauvignon	E1-F26-591	+	- (0,203)	+++	+ (27,50)
19	Merlot	E1-F29-598	+	+ (0,639)	+++	+ (18,29)
20	Cabernet Sauvignon	E1-F31-604	+	+ (3,561)	+++	+ (19,51)
21	Cabernet Franc	E1-F33-027	+	- (0,172)	-	+ (32,32)
22	Cabernet Franc	E1-F33-030	+	- (0,202)	-	+ (32,16)
23	Cabernet Sauvignon	E1-F34-3	+	- (0,194)	-	+ (32,12)
24	Cabernet Franc	E1-F36-A	+	- (0,188)	+	+ (33,49)
25	Cabernet Franc	E1-F36-B	+	- (0,189)	++	+ (33,98)
26	Cabernet Franc	E1-F36-C	+	- (0,197)	+++	- (35,50)
27	Cabernet Franc	E1-F37-E	+	- (0,208)	++	+ (34,46)
28	Cabernet Franc	E1-F37-F	+	- (0,227)	++	+ (32,35)
29	Cabernet Franc	E1-F38-H	+	- (0,167)	++	+ (33,96)
30	Cabernet Franc	E1-F39-L	+	- (0,187)	++	- (35,11)
31	Cabernet Franc	E1-F39-M	+	- (0,185)	++	+ (34,93)
32	Cabernet Franc	E1-F40-N	+	+ (1,185)	+++	+ (20,21)

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Amostra	Cultivar	Localização da planta	Sintoma foliar de virose	ELISA (Absorbância a 405 nm)	RT-PCR convencional (370 pb)	RT-qPCR (valores de Ct)
33	Cabernet Franc	E1-F40-O	+	+ (0,605)	++	+ (22,23)
34	Cabernet Franc	E1-F40-P	+	- (0,202)	++	+ (30,85)
35	Cabernet Sauvignon	E1-F41-482	+	+ (0,782)	+++	+ (20,77)
36	Cabernet Franc	E1-F43-375	+	+ (0,516)	++	+ (20,53)
37	Cabernet Sauvignon	E1-F43-484	+	- (0,191)	++	+ (20,56)
38	Cabernet Sauvignon	E1-F46-224	+	+ (0,555)	+++	+ (21,30)
39	Cabernet Franc	E1-F48-176	+	+ (0,568)	+++	+ (19,51)
40	Merlot	E1-F50-51	+	+ (0,529)	++	+ (22,44)
41	Cabernet Franc	E2-F1-374	+	- (0,215)	+	+ (30,98)
42	Merlot	E2-F4-381	+	- (0,209)	+	+ (31,66)
43	Merlot	E2-F7-391	+	- (0,328)	++	+ (33,22)
44	Cabernet Sauvignon	E2-F8-393	+	+ (1,915)	+	+ (32,62)
45	Cabernet Franc	E2-F8-394	+	+ (0,477)	+++	+ (21,87)
46	Merlot	E2-F10-399	+	- (0,225)	+++	+ (16,11)
47	Cabernet Sauvignon	E2-F10-400	+	+ (0,604)	+++	+ (20,62)
48	Cabernet Franc	E2-F10-401	+	+ (0,488)	+	+ (26,01)
49	Cabernet Franc	E2-F12-560	+	+ (1,844)	+++	+ (18,72)
50	Cabernet Sauvignon	E2-F15-415	+	+ (0,516)	-	+ (30,95)
51	Merlot	E2-F15-416	+	+ (0,586)	++	+ (19,81)
52	Cabernet Sauvignon	E2-F16-418	+	+ (0,620)	+++	+ (20,45)
53	Cabernet Sauvignon	E2-F23-440	+	+ (3,603)	+++	+ (19,81)
54	Cabernet Franc	E2-F24-442	+	- (0,360)	-	+ (21,79)
55	Cabernet Franc	E2-F24-443	+	+ (0,556)	++	+ (18,10)
56	Merlot	E2-F26-447	+	+ (0,705)	-	+ (22,04)
57	Merlot	E2-F26-448	+	- (0,347)	+++	+ (20,99)
58	Merlot	E2-F29-457	+	- (0,206)	-	+ (30,63)
59	Merlot	E2-F35-473	+	- (0,199)	+	+ (32,43)
60	Merlot	E2-F38-573	+	+ (0,525)	++	+ (22,27)
61	Cabernet Sauvignon	E2-F40-490	+	+ (3,549)	+++	+ (19,46)
62	Merlot	E2-F41-575	+	- (0,359)	+	+ (30,36)
63	Cabernet Sauvignon	E2-F46-577	+	- (0,205)	-	+ (21,44)
64	Cabernet Franc	E2-F50-519	+	+ (0,693)	+	+ (22,44)
65	Cabernet Sauvignon	E2-F52-525	+	+ (0,824)	++	+ (20,44)
66	Merlot	E2-F54-531	+	+ (0,709)	++	+ (20,37)
67	Cabernet Sauvignon	E2-F55-533	+	- (0,204)	-	+ (29,51)

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Amostra	Cultivar	Localização da planta	Sintoma foliar de virose	ELISA (Absorbância a 405 nm)	RT-PCR convencional (370 pb)	RT-qPCR (valores de Ct)
68	Cabernet Franc	E2-F55-534	+	- (0,213)	-	+ (30,52)
69	Cabernet Franc	E2-F55-535	+	- (0,198)	-	+ (32,98)
70	Cabernet Sauvignon	E3-F1-536	+	- (0,347)	+	+ (21,99)
71	Cabernet Sauvignon	E3-F4-545	+	+ (0,511)	+	+ (19,85)
72	Cabernet Sauvignon	E3-F24-24A	+	+ (1,848)	-	+ (28,84)
73	Merlot	E3-F25-25A	+	- (0,198)	++	+ (18,94)
74	Cabernet Sauvignon	E3-F26-26A	+	+ (0,924)	+	+ (23,28)
75	Merlot	E3-F27-27A	+	+ (1,188)	+	+ (15,95)
76	Cabernet Franc	E3-F29-29A	+	- (0,202)	+++	+ (23,36)
77	P1103	CV1-quadra 4	-	- (0,206)	++	+ (32,40)
78	Isabel	CV1-quadra 16	-	- (0,272)	-	+ (34,50)
79	Itália	CV1-Pirovano 65	+	+ (1,044)	+++	+ (19,57)
80	Itália	CV1-Garibaldina	+	+ (4,000)	+	+ (19,17)
Infeção (plantas infectadas /total)			78/80 (97,5%)	38/80 (47,5%)	66/80 (82,5%)	72/80 (90%)

(-) Sem sintoma, amostra sadia ou amplificação negativa para GLRaV-3.

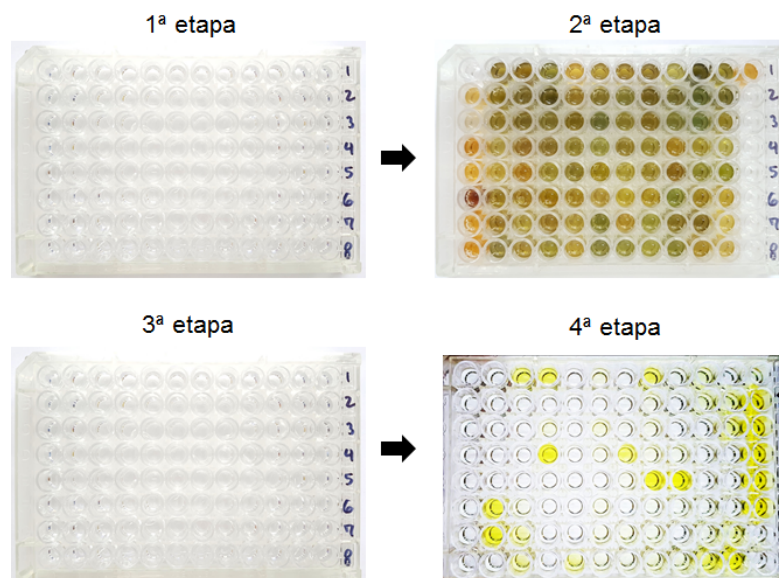
(+) Com sintoma, amostra infectada ou amplificação positiva para GLRaV-3.

Na RT-PCR convencional (+, ++, +++ amplificação do DNA com baixa, média ou alta intensidade, respectivamente).



Fotos: Thor Vinícius Martins Fajardo

Figura 2. Amostras de ramos dormentes de videiras (A) e etapas do processamento (B, C) para obtenção de extrato vegetal utilizado no teste ELISA ou RNA total utilizado nos testes RT-PCR e RT-qPCR, visando-se a detecção do GLRaV-3.



Fotos: Thor Vinícius Martins Fajardo

Figura 3. Etapas do teste ELISA direto para a detecção do vírus GLRaV-3. Adição do IgG contra o vírus (1ª etapa), extrato vegetal (2ª etapa), conjugado (3ª etapa) e revelação (4ª etapa) com a execução de procedimentos de lavagem da placa entre cada etapa.

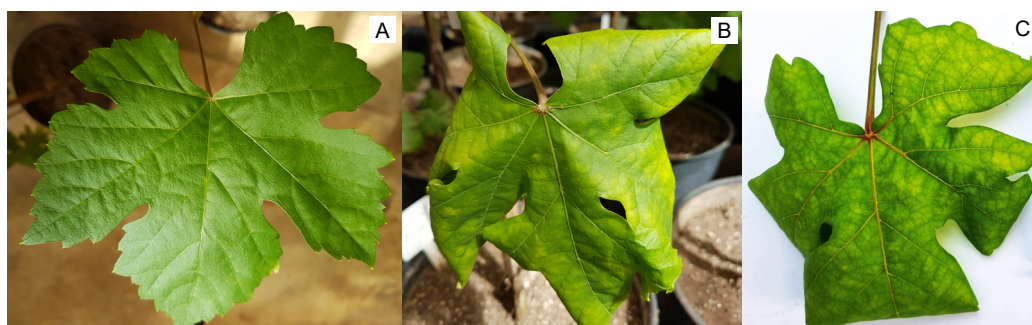
O gene completo da CP dos isolados com 942 pb foi amplificado por RT-PCR utilizando-se os iniciadores 8504V (senso), 5'ATGGCATTGAACTGAA-ATT3' e 9445C (antisenso), 5'CTACTTCTTTTGCA-ATAGTT3' (Ling et al., 2004), clonado, sequenciado e analisado para determinar a variabilidade viral.

Indexação viral por RT-PCR em tempo real (RT-qPCR)

As extrações de RNA total das 80 amostras (Tabela 1), utilizadas na indexação por RT-PCR, também foram empregadas na indexação por RT-qPCR. Neste caso, os iniciadores utilizados, 56F/ 285R definidos por Osman et al. (2007), amplificam um fragmento de DNA de 230 pb, situado na sequência codificadora da proteína de choque térmico 70 (*heat*

shock protein 70, HSP70) do GLRaV-3. A sonda do tipo TaqMan utilizada na reação de RT-qPCR (181P) também foi definida por Osman et al. (2007) e marcada com os fluoróforos VIC/TAMRA.

As reações de RT-qPCR foram conduzidas em placas de 96 poços usando um kit comercial, conforme descrito: 3 μ L do tampão de reação 4X, contendo transcriptase reversa, inibidor de RNase, DNA polimerase, dNTPs, aditivos contra inibidores da reação e referência passiva ROX; 0,6 μ L da mistura de iniciadores e sonda (400 nM iniciadores e 80 nM de sonda por reação); 3 μ L de RNA total (cerca de 300 ng) para um volume final de 12 μ L (Dubiel et al., 2013). As reações foram conduzidas em um termociclador com sistema apropriado para excitação e detecção de fluorescência, conforme descrito:



Fotos: Thor Vinícius Martins Fajardo

Figura 4. Sintomas de enrolamento dos bordos foliares para baixo exibidos pela videira 'Itália'. Planta sadia (A) e infectada com o GLRaV-3, isolados Pir65 (B) e Garib (C).

45 °C por 35 min (transcrição reversa), 95 °C por 10 min (ativação da Taq DNA polimerase), seguindo-se 40 ciclos a 95 °C por 15 s (desnaturação) e 60 °C por 1 min (pareamento e extensão). As reações foram analisadas quantitativa e graficamente com auxílio de *software* do equipamento, determinando-se o ciclo limiar (Ct, *cycle threshold*, em inglês). Valores de Ct iguais ou inferiores a 35 foram considerados como resultados positivos.

Clonagem e variabilidade viral

Os fragmentos de DNA em gel de agarose com 942 pb, correspondentes ao gene da proteína capsidial dos isolados de GLRaV-3, foram purificados do gel usando um kit comercial e ligados a T-vector para clonar produtos de PCR. A seguir, as ligações foram utilizadas na transformação de células competentes de *Escherichia coli* Top 10 por meio de choque térmico (Moura et al., 2018). O DNA plasmidial das colônias bacterianas transformadas foi extraído utilizando-se um kit comercial e a confirmação da inserção dos fragmentos de DNA clonados nos plasmídeos recombinantes foi realizada por PCR, conforme descrito anteriormente. O sequenciamento de nucleotídeos dos clones recombinantes foi realizado pelo método de terminadores de cadeia (Sanger).

Os alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos ou de aminoácidos deduzidos e a geração da matriz de identidades foram realizados utilizando-se softwares apropriados de bioinformática (Hall, 1999; Larkin et al., 2007). Os alinhamentos das sequências foram visualizados com auxílio de programa de bioinformática para essa finalidade (Nicholas; Nicholas, 1997). As sequências de nucleotídeos dos dois isolados de GLRaV-3 estudados, 17 sequências de isolados brasileiros de GLRaV-3, previamente obtidas e disponíveis no GenBank e uma sequência do isolado-tipo de GLRaV-3 (Tabela 2) foram alinhadas e as identidades entre elas foram obtidas visando-se estudo de variabilidade viral.

Nas análises filogenéticas foram incluídas dezenove sequências completas do gene da proteína capsidial (CP), correspondentes aos isolados brasileiros de GLRaV-3 caracterizados até o momento, além do isolado-tipo do vírus (NY1) e o vírus GLRaV-1 como grupo externo (outgroup) da árvore filogenética (Tabela 2). As relações filogenéticas foram obtidas utilizando-se programa para análises filogenéticas (Kumar et al., 2018) pelo método Neighbor-joining (NJ), modelo Kimura de dois parâmetros e 1000 replicações.

Resultados e discussão

Todas as cultivares europeias (*V. vinifera*), ou seja, as cultivares Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Merlot e Itália, manifestaram sintomas foliares característicos de infecção viral. Já nas cultivares americana (*V. labrusca*) Isabel e híbrida de porta-enxerto 'P1103' não foram observados sintomas foliares de viroses, assim a presença de sintomas nos acessos avaliados foi de 97,5% (78/80) (Figura 1, Tabela 1). Sintomas foliares semelhantes à virose do enrolamento da folha foram observados na avaliação visual, consistindo em enrolamento para baixo dos bordos foliares e avermelhamento ou amarelamento das folhas, em cultivares tintas ou brancas, respectivamente, com as nervuras principais permanecendo verdes. Outros sintomas observados foram bolhosidades no limbo foliar, que também apresentava consistência quebradiça (Figura 1).

Não obstante a presença de infecções virais múltiplas seja comum na videira, o mais importante vírus da cultura é o GLRaV-3, principal agente causal da virose do enrolamento da folha, assim, as indexações com diferentes testes diagnósticos foram direcionadas para esse vírus. A avaliação visual (em março) e a amostragem (material da poda em agosto) coincidem com as épocas de expressão evidente dos sintomas foliares e título viral adequado do GLRaV-3 para a indexação de videiras, respectivamente (Osman et al., 2018; Fajardo et al., 2021). Estes dois períodos correspondem, no ciclo da cultura da videira, à segunda metade do ciclo vegetativo e ao repouso da videira, respectivamente, no sul do Brasil.

Foi possível detectar a infecção pelo GLRaV-3 utilizando ELISA em 38 plantas das 80 indexadas (taxa de infecção de 47,5%) a partir dos ramos dormentes da poda. Das amostras positivas para GLRaV-3 em ELISA, 37,9% (11/29) eram 'Cabernet Franc', 62,5% (15/24) 'Cabernet Sauvignon', 43,5% (10/23) 'Merlot' e 100% (2/2) 'Itália', todas exibiam sintomas de viroses. No entanto, nenhuma amostra assintomática, das cultivares Isabel e P1103, foi positiva para o GLRaV-3 por ELISA. Dentre as 38 videiras infectadas, apenas 16 plantas (42,1%) apresentaram títulos virais elevados, ou seja, leituras de absorbância superior a 1 (Figura 5, Tabela 1).

Considerando-se as 80 videiras analisadas, foi possível detectar o GLRaV-3 com RT-PCR convencional em 66 plantas (82,5%) e com RT-qPCR em 72 plantas (90%) (Tabela 1). Resultados representativos da detecção do GLRaV-3 por meio da RT-PCR convencional, ou seja, amplificação do fragmento de

Tabela 2. Relação de 19 isolados brasileiros de GLRaV-3 utilizados no trabalho, o isolado-tipo do vírus e informações sobre suas origens.

Isolado viral	Sequência obtida	Tamanho em nucleotídeos	Código de acesso no GenBank ⁽¹⁾	Hospedeira	Procedência	Referência
Pir65	Proteína capsidial	942	PP497041	<i>Vitis vinifera</i> cv. Itália	Bento Gonçalves (RS)	Este estudo
Garib	Proteína capsidial	942	PP497042	<i>V. vinifera</i> cv. Itália	Bento Gonçalves (RS)	Este estudo
Pet-1	Proteína capsidial	942	DQ680141	<i>V. vinifera</i> cv. Alicante Bouschet	Petrolina (PE)	Fajardo et al. (2007)
Pet-2	Proteína capsidial	942	DQ680142	<i>V. vinifera</i> cv. Alicante Bouschet	Petrolina (PE)	Fajardo et al. (2007)
Pet-3	Proteína capsidial	942	DQ062152	<i>V. vinifera</i> cv. CG 351	Petrolina (PE)	Fajardo et al. (2007)
Pet-4	Proteína capsidial	942	AY753208	<i>V. vinifera</i> cv. Petite Syrah	Petrolina (PE)	Fajardo et al. (2007)
IS2	Proteína capsidial	942	HM059034	<i>V. labrusca</i> cv. Isabel	Bento Gonçalves (RS)	Basso et al. (2010)
RC-PE	Proteína capsidial	942	KJ704369	<i>V. vinifera</i> cv. Ruby Cabernet	Petrolina (PE)	Catarino et al. (2015)
NR-BR	Proteína capsidial	942	KX499443	<i>V. labrusca</i> cv. Niagara Rosada	São Roque (SP)	Moura et al. (2018)
MARG-BR	Proteína capsidial	942	KX499444	Híbrida cv. BRS Margot	São Roque (SP)	Moura et al. (2018)
CH-BR	Proteína capsidial	942	KX499445	<i>V. vinifera</i> cv. Chardonnay	São Roque (SP)	Moura et al. (2018)
TN-BR	Proteína capsidial	942	KX499446	<i>V. vinifera</i> cv. Touriga Nacional	São Roque (SP)	Moura et al. (2018)
VI-BR	Proteína capsidial	942	KX499447	Híbrida cv. BRS Violeta	São Roque (SP)	Moura et al. (2018)
MS-BR	Proteína capsidial	942	KX499448	<i>V. vinifera</i> cv. Moscato Setubal	São Roque (SP)	Moura et al. (2018)
ISAB-BR	Genoma completo	18020	KX701860	<i>V. labrusca</i> cv. Isabel	Bento Gonçalves (RS)	Fajardo et al. (2017)
TC-BR	Genoma completo	18498	KX756668	<i>V. labrusca</i> cv. Tardia de Caxias	Bento Gonçalves (RS)	Fajardo et al. (2017)
TRAJ-BR	Genoma completo	18313	KX756669	<i>V. vinifera</i> cv. Trajadura	Bento Gonçalves (RS)	Fajardo et al. (2017)
NUB-BR	Genoma completo	18498	MK804765	Híbrida cv. Núbia	Bento Gonçalves (RS)	Fajardo et al. (2020)
PL-BR	Genoma completo	18368	OR546046	Cochonilha <i>Pseudococcus longispinus</i>	Bento Gonçalves (RS)	Fajardo et al. (2024)
NY1	Genoma completo	17919	AF037268	<i>Vitis</i> sp.	EUA	Ling et al. (2004)

⁽¹⁾ NCBI/GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

DNA de 370 pb, e da RT-qPCR são mostrados nas Figuras 6 e 7, respectivamente. Como os extratos de RNA total utilizados em ambas as indexações moleculares foram os mesmos, provavelmente as diferenças observadas entre os resultados possam ser atribuídas aos diferentes pares de iniciadores utilizados em cada teste e, também, à diferença de sensibilidade entre os testes, uma vez que a RT-qPCR é mais sensível que a RT-PCR convencional por utilizar sondas de hidrólise do tipo TaqMan (Fajardo; Nickel, 2015).

Três testes diagnósticos foram avaliados para a detecção do GLRaV-3 e observou-se elevada concordância entre os resultados obtidos pelos testes moleculares (RT-PCR e RT-qPCR) e considerável divergência entre o teste sorológico ELISA e os testes moleculares (Tabela 1). As técnicas moleculares, como a RT-PCR e suas variantes, superam o ELISA em sensibilidade na detecção viral, particularmente em relação aos vírus que se concentram nos tecidos floemáticos, a exemplo do GLRaV-3 em videiras. Não obstante a menor sensibilidade do ELISA, este teste possui relevância em função da praticidade, sendo empregado para o diagnóstico viral em várias culturas (Fajardo; Nickel, 2015). Marais et al. (2024) também observaram diferenças nos resultados da detecção viral de diferentes vírus.

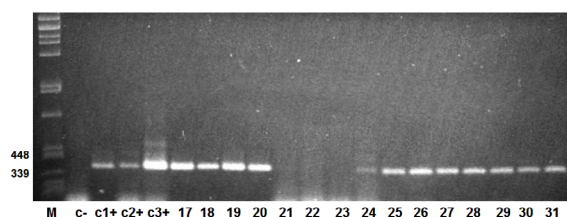


Foto: Thor Vinícius Martins Fajardo

Figura 6. Gel da amplificação por RT-PCR para GLRaV-3 com os iniciadores 2236S/ 2237aS, a partir das amostras de videira 17 a 31 (Tabela 1). Fragmento amplificado de 370 pb. Marcador de peso molecular (M), controle sadio (c-), controles infectados com o GLRaV-3 (c1+ ao c3+).

O ELISA teve desempenho mais baixo, com taxa geral de detecção de 68,7%, seguido pela RT-PCR (82,5%). O desempenho da RT-PCR refletiu a incapacidade de amplificação de alguns isolados como consequência de mutações pontuais que afetam os sítios de ligação dos iniciadores, ou seja, a PCR foi afetada pela diversidade genética viral. Esse resultado se assemelha aos obtidos no presente trabalho.

Apenas oito amostras sintomáticas, indexadas por RT-qPCR, apresentaram resultados negativos para o GLRaV-3, comprovando que a maioria dos sintomas inicialmente observados, de fato, correspondiam à virose do enrolamento da folha causada

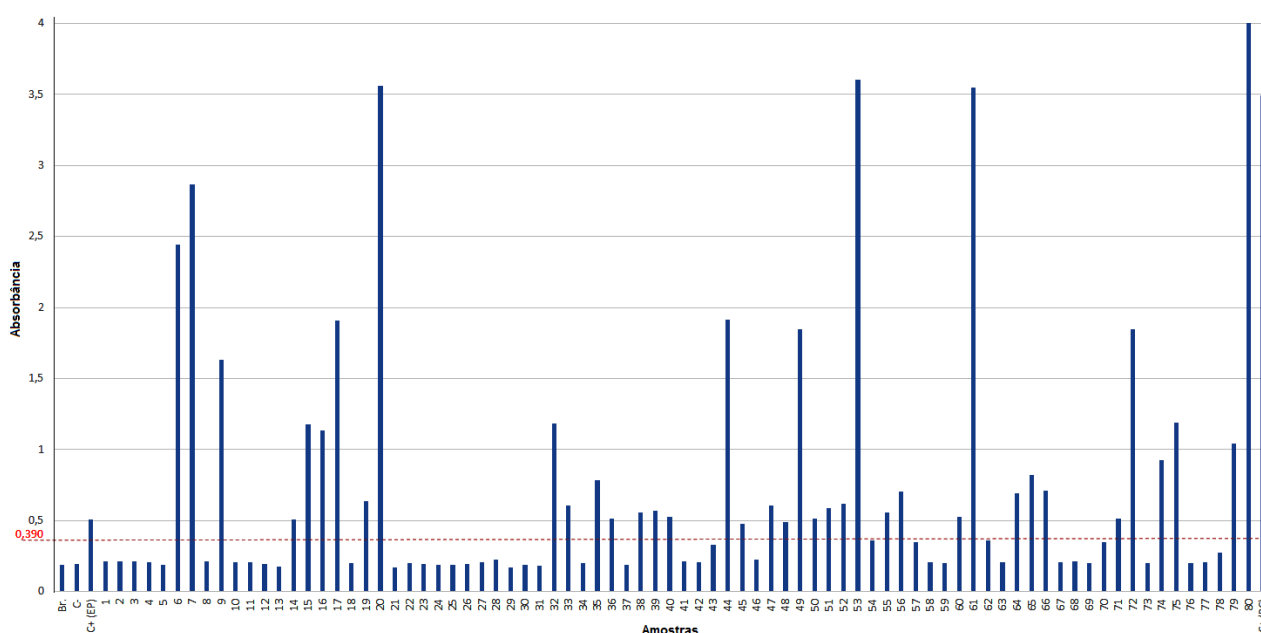


Figura 5. Representação gráfica das leituras de absorvância em ELISA das amostras de videira testadas para o vírus GLRaV-3. Barras acima da linha tracejada indicam amostras positivas (valor igual ou superior a 2x a leitura do controle sadio). Controle negativo branco, tampão (Br-); controle negativo, extrato foliar de planta sadio (C-); controle positivo, extrato de planta infectada (C+(EP)); controle positivo, proteína capsidial do GLRaV-3 (C+(PC)).

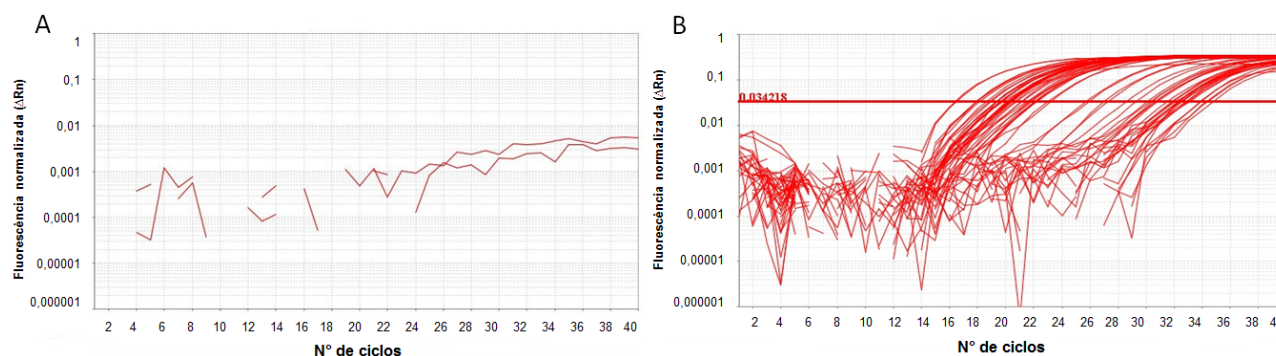


Figura 7. Resultados das indexações por RT-qPCR para GLRaV-3, amostras negativas (A) e amostras positivas (B). Nas curvas de amplificação da RT-qPCR, o eixo Y corresponde à fluorescência normalizada (ΔRn) e o eixo X, ao número de ciclos da PCR.

pelo GLRaV-3 (Figuras 1 e 4, Tabela 1). Nas amostras sintomáticas e negativas para GLRaV-3, provavelmente outros vírus ou variantes genéticas do GLRaV-3 (Fajardo et al., 2023), não detectados com os iniciadores/sonda utilizados na RT-qPCR, sejam responsáveis pelos sintomas.

Em condições ideais de realização de um teste diagnóstico, ou seja, 100% de sensibilidade e 100% de especificidade, tem-se um de dois resultados: o teste é positivo, portanto, a planta tem a doença, ou o teste é negativo, assim a planta não tem a doença. Decorrente desses resultados, geram-se quatro possibilidades: verdadeiro positivo (a planta tem a doença e o teste foi positivo); verdadeiro negativo (a planta não tem a doença e o teste foi negativo); falso-positivo (a planta não tem a doença e o teste foi positivo); e falso-negativo (a planta tem a doença e o teste foi negativo) (Guimarães, 1985). Baseado nessa consideração e na comparação dos resultados obtidos pelos três testes diagnósticos para uma mesma amostra (Tabela 1), não seria tecnicamente adequado simplesmente classificar um determinado resultado como “incorreto”, ou seja, um falso-positivo ou falso-negativo sem uma interpretação dos resultados. Tal consideração fundamenta-se no princípio que determinado teste pode não apresentar 100% de sensibilidade e 100% de especificidade. Por exemplo, o anticorpo utilizado para detectar o GLRaV-3 poderia reconhecer determinado isolado do vírus e outro não; da mesma maneira, os iniciadores e a sonda utilizados poderiam parear com determinado isolado, promovendo sua detecção, e outro não. Assim, os resultados obtidos refletem, a princípio, os reagentes e insumos utilizados na realização do teste diagnóstico, juntamente com a condição da amostra e seriam válidos apenas para a diagnose realizada, ou seja, não seriam extrapoláveis ou a extrapolação seria com ressalvas.

Na organização genômica do GLRaV-3 verifica-se que o gene da proteína capsial (CP) está posicionado no terminal 3' do RNA viral (Figura 8A). A partir da amplificação do gene completo da proteína capsial de dois isolados do GLRaV-3 (Figura 8B) foram obtidas as respectivas sequências do gene da CP com 942 nucleotídeos. Estas sequências foram depositadas no banco de dados GenBank com os códigos de acesso PP497041 (isolado Pir65) e PP497042 (isolado Garib) (Tabela 2). O alinhamento múltiplo entre as sequências obtidas, um isolado brasileiro do GLRaV-3 divergente (TC-BR, acesso KX756668) e os iniciadores utilizados na amplificação do gene completo da CP (8504V/9445C) e do fragmento de 370 pb da CP (2236S/2237aS) demonstra a existência de nucleotídeos divergentes inclusive nas posições de pareamento desses iniciadores (Figura 9). Essas observações suportam a possibilidade de amplificação (detecção) de um determinado isolado e outro não, pela complementaridade parcial entre os iniciadores e/ou sonda e o RNA viral.

Adicionalmente, o alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos deduzidos do gene da proteína capsial dos isolados Pir65 (WXH81181) e Garib (WXH81182), além de dois isolados brasileiros previamente caracterizados (TC-BR, AOS89847 e ISAB-BR, AOS89859) demonstra a existência de aminoácidos divergentes no gene da proteína capsial em 12 posições de um total de 313 aminoácidos deduzidos (cerca de 4%) (Figura 10). Isto possivelmente poderia explicar, em parte, os resultados diferentes de detecção verificados entre os testes sorológico e moleculares (Tabela 1).

Visando avançar no estudo da variabilidade genética de isolados locais do GLRaV-3, 17 isolados brasileiros previamente caracterizados foram comparados como dois isolados (Pir65 e Garib)

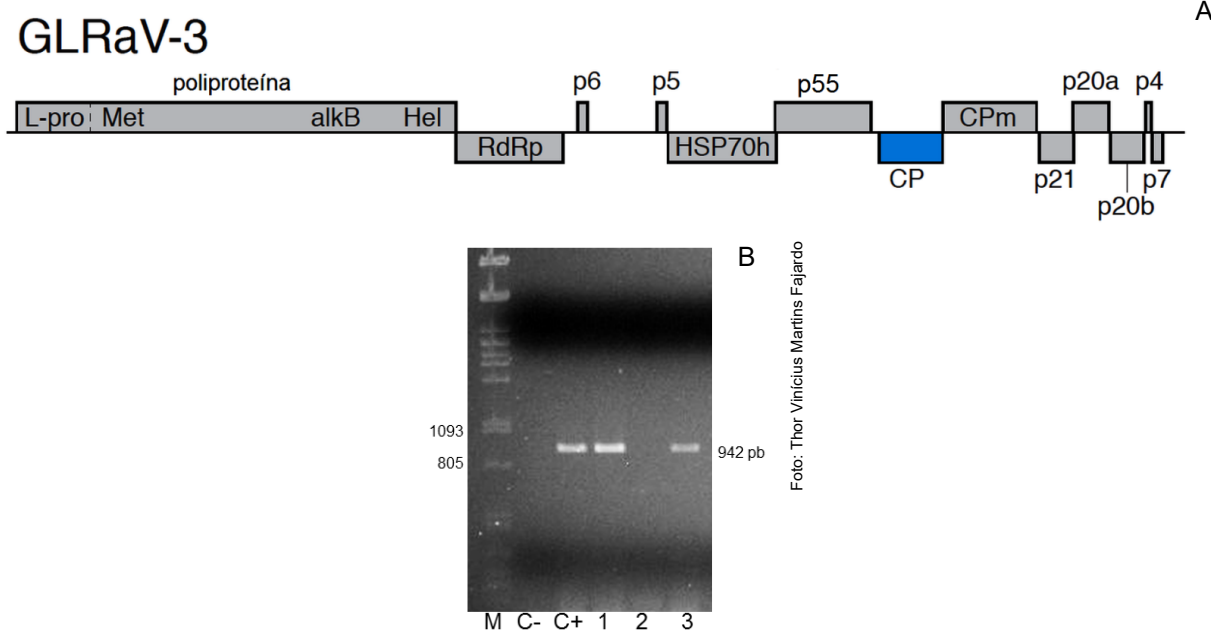


Figura 8. Organização genômica do GLRaV-3 com 13 ORFs (*open reading frames*, fases abertas de leitura) e as respectivas identificações, destacando o gene da proteína capsidial (CP), em azul (A) e detecção viral: gel de agarose com cDNAs amplificados por RT-PCR (942 pb) correspondendo ao gene completo da proteína capsidial dos dois isolados do GLRaV-3 (B). Marcador de peso molecular (M), controle sadio (C-), controle positivo (C+) e amostras analisadas (1 a 3).

PP497041	ATGGCATTGAACTGAAATAGGGCAGATATATGAAGTCGTCCCGAAAAATATTGAGAGTTAGAGTAGGGGATGCGGCACAAGGAAATTTAGTAAGGCGAGTTCTTAAAGTACGTTAAGGACGGGACACAGGCG	138
PP497042	ATGGCATTGAACTGAAATAGGGCAGATATATGAAGTCGTCCCGAAAAATATTGAGAGTTAGAGTAGGGGATGCGGCACAAGGAAATTTAGTAAGGCGAGTTCTTAAAGTACGTTAAGGACGGGACACAGGCG	138
KX756668	ATGGCGTTTGAAGTAAATAGGGCAGATATATGAAGTCGTCCCGAAAAATATTGAGAGTTAGAGTAGGGGATGCGGCACAAGGAAATTTAGTAAGGCGAGTTCTTAAAGTACGTTAAGGACGGGACACAGGCG	138
8504V	ATGGCATTGAACTGAAAT	
2236S	AGATATATGAAGTTGTCCCG	
PP497041	GAATTAACGGGAATCGCGTAGTGGCCGAAAAATACGTATTGCGCCACAGCAGCTTTGGCTACAGCGCGCAGGAGCCACTAGGCAGCCACCAAGCAAGTGGTGAACCAAGGAAACCGATATAGGGGTAGTGCCG	276
PP497042	GAATTAACGGGAATCGCGTAGTGGCCGAAAAATACGTATTGCGCCACAGCAGCTTTGGCTACAGCGCGCAGGAGCCACTAGGCAGCCACCAAGCAAGTGGTGAACCAAGGAAACCGATATAGGGGTAGTGCCG	276
KX756668	GAGTTAACAGGAATCGCTGTAGTGGCCGAAAAATACGTATTGCGCCACAGCAGCTTTAGCTACAGCGCGCAGGAGCCACTAAGCAGCCGACCAAGCAAGTGGTGAACCAAGGAAACCGATATAGGGGTAGTGCCG	276
PP497041	GAATCGGAGACTCTCACACCAATAAGTTGGTTTTTCGAGAAAGATCCAGACAAGTTCTTGAAGACTATGGGCAAGGGAATAGCTTTGGACTTGACGGGAGTTACCCACAACCGGAAAGTTATTACGAGCCAGGGAAA	414
PP497042	GAATCTGAGACTCTCACACCAATAAGTTGGTTTTTCGAGAAAGATCCAGACAAGTTCTTGAAGACTATGGGCAAGGGAATAGCTTTGGACTTGACGGGAGTTACCCACAACCGGAAAGTTATTACGAGCCAGGGAAA	414
KX756668	GAATCTGAGACTCTTACACCAATAAGCTGGTTTTTCGAGAAAGATCCAGACAAGTTCTTAAAGACTATGGGTAAGGGGATAGCTTTGGACTTAACGGGGTTACCCATAACCGGAAAGTTATTACGAGCCAGGGAAA	414
2237aS	GTATACCCATTAACCGGAAAGT	
PP497041	GTATCAGTAGAGGTGGCAATGAAGATTAAATGCTGCATTGATGGAGCTGTGTAAGAAAGTTATGGGCGCCGATGACGCGAGCAATTAAGCAAAATTTCTTGTACGTGATGCAGATTGGCTGCACGTTCTTTACATCG	552
PP497042	GTATCAGTAGAGGTGGCAATGAAGATTAAATGCTGCATTGATGGAGCTGTGTAAGAAAGTTATGGGCGCCGATGACGCGAGCAATTAAGCAAAATTTCTTGTACGTGATGCAGATTGGCTGCACGTTCTTTACATCG	552
KX756668	GTATCAGTAGAGGTAGCAATGAAGATTAAATACCGCATTTGTTAGAGCTGTGTAAGAAAGTTATGGGCTCCGATGACACAACCAAGCAAAATTTCTTGTACGTGATGCAGATTGGCTGCACGTTCTTTACATCG	552
PP497041	TCTTCGACGGAGTTCAAAGAGTTTGACTACATAGAAACCGATGATGGAAGAAGATATATGCGGTGTGGGTATATGATTGCATTAAACAGCTGCTGCTTCGACGGGTTATGAAAACCGGTAAGGCAGTATCTAGCG	690
PP497042	TCTTCGACGGAGTTCAAAGAGTTTGACTACATAGAAACCGATGATGGAAGAAGATATATGCGGTGTGGGTATATGATTGCATTAAACAGCTGCTGCTTCGACGGGTTATGAAAACCGGTAAGGCAGTATCTAGCG	690
KX756668	TCTTCGACGGAGTTCAAAGAGTTTGACTACATAGAAACCGATGATGGAAGAAGATATATGCGGTGTGGGTATATGATTGCATTAAACAGCTGCTGCTTCGACGGGTTATGAAAACCGGTAAGGCAGTATCTAGCG	690
PP497041	TACTTCACCAACCTTCATCACGGCGACCTGAATGGTAACTAGTATGATGAACGAGAAGTTATGGCAGCAGTGGATACCAACCGAAATCTTTCCGTACACGATAGACTGCGTTGCTCAACGTCAGTATCTGTT	828
PP497042	TACTTCACCAACCTTCATTCACGGCGACCTGAATGGTAACTAGTATGATGAACGAGAAGTTATGGCAGCAGTGGATACCAACCGAAATCTTTCCGTACACGATAGACTGCGTTGCTCAACGTCAGTATCTGTT	828
KX756668	TACTTCACGCCACCTTCATCACGGCGACCTGAATGGTAACTAGTATGATGAACGAGAAGTTATGGCAGCAGTGGATACCAACCGAAATCTTTCCGTACGCGATTGACTGCGTTGCTCGACGTCAGTATCTGTT	828
PP497041	AACACGACGCAATACAGCATGGAATTTAGCTAGACAGCAGGCGTTTGAAGAACAAGAGCTAACGCGCGATACACCTTACACACGCTCTTCCACTATTGCAAGAAAGTAG	942
PP497042	AACACGACGCAATACAGCATGGAATTTAGCTAGACAGCAGGCGTTTGAAGAACAAGAGCTAACGCGCGATACACCTTACACACGCTCTTCCACTATTGCAAGAAAGTAG	942
KX756668	AATAACGACCAATACAGCATGGAATTTAGCTAGACAGCAGGCGTTTGAAGAATAAGAGCGGTACGCGCGATACACCTTACACACGCTCTTCCACTATTGCAAGAAAGTAG	942
9445C	AACTATTGCAAGAAAGTAG	

Figura 9. Caracterização do gene da proteína capsidial do GLRaV-3: alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos obtidas para o gene da proteína capsidial dos isolados Pir65 (PP497041) e Garib (PP497042), além de um isolado brasileiro previamente caracterizado do grupo II (TC-BR, acesso KX756668) e os iniciadores utilizados para a amplificação do gene da CP completo (8504V/9445C) e do fragmento parcial da CP de 370 pb (2236S/2237aS). Posições com nucleotídeos divergentes estão destacadas dentro das partes coloridas.

caracterizados neste trabalho e com o isolado-tipo do GLRaV-3 (NY1) (Tabela 2). Estas comparações resultaram na formação de dois agrupamentos distintos. Os isolados dos grupos I (Pir65, Garib, Pet-1, Pet-2, Pet-3, RC-PE, NR-BR, MARG-BR, CH-BR, TN-BR, VI-BR, MS-BR, TRAJ-BR, NUB-BR e PL-BR) e II (ISAB-BR, TC-BR, IS2 e Pet-4), grupos definidos conforme Maree et al. (2015), apresentaram

identidades de nucleotídeos de 99 a 100%, e 97,7 a 99,8%, quando as comparações envolveram isolados do próprio grupo. Já os isolados do grupo I, que incluem os dois isolados caracterizados neste trabalho, apresentaram identidades de nucleotídeos de 92,5 a 93,4% em relação aos isolados do grupo II (Tabela 3). As sequências de nucleotídeos do gene da proteína capsidial dos isolados brasileiros

WXH81181 (Pir65)	MAFELKLGQIYEVVPENNLVRVGDAAQGFASKASFLKYVKDGTQAELTGIAVVPEKYVFATAALATAAQ	70
WXH81182 (Garib)	MAFELKLGQIYEVVPENNLVRVGDAAQGFASKASFLKYVKDGTQAELTGIAVVPEKYVFATAALATAAQ	70
AOS89847 (TC-BR)	MAFELKLGQIYEVVPENNLVRVGDAAQGFASKASFLKYVKDGTQAELTGIAVVPEKYVFATAALATAAQ	70
AOS89859 (ISAB-BR)	MAFELKLGQIYEVVPENNLVRVGDAAQGFASKASFLKYVKDGTQAELTGIAVVPEKYVFATAALATAAQ	70
WXH81181 (Pir65)	EPFRQPPAQVVEPQETDIGVVPESSETLTPNKLVEKDPDKFLKTMGKGIALDLTGVTGTHPKVINEPGKVS	140
WXH81182 (Garib)	EPFRQPPAQVVEPQETDIGVVPESSETLTPNKLVEKDPDKFLKTMGKGIALDLTGVTGTHPKVINEPGKVS	140
AOS89847 (TC-BR)	EPFKQPTTQVVEPPEADIGVVPESSETLTPNKLVEKDPDKFLKTMGKGIALDLTGVTGTHPKVINEPGKVS	140
AOS89859 (ISAB-BR)	EPFKQPTTQVVEPPEADIGVVPESSETLTPNKLVEKDPDKFLKTMGKGIALDLTGVTGTHPKVINEPGKVS	140
WXH81181 (Pir65)	VEVAMKINAALMELCKKVMGADDAATKTFFLYVMQIACTFFTSSSTEFKEFDYIETDDGKKIYAVWVYD	210
WXH81182 (Garib)	VEVAMKINAALMELCKKVMGADDAATKTFFLYVMQIACTFFTSSSTEFKEFDYIETDDGKKIYAVWVYD	210
AOS89847 (TC-BR)	VEVAMKINTALVELCKKVMGSDDTTTKTKFFLYVMQIACTFFTSSSTEFKEFDYIETDDGKKIYAVWVYD	210
AOS89859 (ISAB-BR)	VEVAMKINTALVELCKKVMGSDDTTTKTKFFLYVMQIACTFFTSSSTEFKEFDYIETDDGKKIYAVWVYD	210
WXH81181 (Pir65)	CIKQAAASTGYENPVRQYLAFTPTFITATLNGKLVMEKVMQAHGVPPKFFPYTIDCVRPTYDLFNND	280
WXH81182 (Garib)	CIKQAAASTGYENPVRQYLAFTPTFITATLNGKLVMEKVMQAHGVPPKFFPYTIDCVRPTYDLFNND	280
AOS89847 (TC-BR)	CIKQAAASTGYENPVRQYLAFTPTLITATLNGKLVMEKVMQAHGVPPKFFPYAIDCVRPTYDLFNND	280
AOS89859 (ISAB-BR)	CIKQAAASTGYENPVRQYLAFTPTLITATLNGKLVMEKVMQAHGVPPKFFPYAIDCVRPTYDLFNND	280
WXH81181 (Pir65)	ILAWNLRQQAFRNKTVTADNTLHNVFQLLQKK	313
WXH81182 (Garib)	ILAWNLRQQAFRNKTVTADNTLHNVFQLLQKK	313
AOS89847 (TC-BR)	ILAWNLRQQAFRNKTVTADNTLHNVFQLLQKK	313
AOS89859 (ISAB-BR)	ILAWNLRQQAFRNKTVTADNTLHNVFQLLQKK	313

Figura 10. Caracterização do gene da proteína capsidial do GLRaV-3: alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos deduzidos do gene da proteína capsidial dos isolados Pir65 (WXH81181) e Garib (WXH81182), além de dois isolados brasileiros previamente caracterizados (TC-BR, acesso AOS89847 e ISAB-BR, acesso AOS89859). Posições com aminoácidos deduzidos divergentes estão destacadas com cores claras.

de GLRaV-3 pertencentes aos grupos I e II apresentaram identidades de 98,6 a 99,4% e de 92,3 a 92,8% com o isolado-tipo NY1 de GLRaV-3 (Tabela 3). Em geral, convencionou-se que valores de identidade de nucleotídeos superiores a 90% no gene da proteína capsidial demarcam isolados distintos de um mesmo vírus. As identidades de nucleotídeos verificadas entre os diferentes isolados brasileiros de GLRaV-3, incluindo os isolados Pir65 e Garib da cultivar Itália, refletiram na análise filogenética realizada, ou seja, confirmou-se a formação de dois agrupamentos bem definidos (Figura 11). A constatação de variabilidade genética entre diferentes isolados de GLRaV-3 também foi registrada em outros trabalhos (Fajardo et al., 2023, 2024).

Os resultados demonstraram diferenças de sensibilidade entre os métodos de diagnóstico e também diferenças na capacidade de reconhecimento do vírus (proteína capsidial ou RNA viral), o que afeta a eficiência de detecção do vírus. Diferenças na

sequência de nucleotídeos podem originar diferenças na proteína traduzida e, consequentemente, diferenças no reconhecimento antígeno-anticorpo ou no pareamento entre iniciadores/sonda e o RNA viral nas reações de RT-PCR ou RT-qPCR envolvendo diferentes isolados virais.

As infecções virais podem afetar severamente a qualidade e a quantidade da produção de uvas. Por isso, o desenvolvimento, a adaptação e/ou a implementação de técnicas diagnósticas que considerem a variabilidade genética dos isolados e estirpes de um vírus de planta é um enfoque relevante. Tentativas de controle de doenças de plantas, incluindo as viroses, que não estejam fundamentadas em suficiente informações sobre os agentes causais, sua disseminação e as características dos patógenos, geralmente resultarão em controle deficiente ou em fracasso. Assim, qualquer tentativa de se estabelecer um controle para uma doença de planta deve ser sempre precedida de um diagnóstico confiável.

Tabela 3. Identidades, em porcentagem, das sequências de nucleotídeos do gene completo da proteína capsidial (942 pb) entre diferentes isolados brasileiros do GLRaV-3 e também o isolado-tipo do vírus.

Isolados	Código GenBank	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	PP497041	-																			
2	PP497042	99,3	-																		
3	DQ680141	99,6	99,6	-																	
4	DQ680142	99,5	99,5	99,8	-																
5	DQ062152	99,4	99,6	99,7	99,6	-															
6	KJ704369	99,4	99,4	99,7	99,6	99,5	-														
7	KX499443	99,4	99,6	99,7	99,6	99,7	99,5	-													
8	KX499444	99,4	99,6	99,7	99,6	99,7	99,5	99,7	-												
9	KX499445	99,4	99,6	99,7	99,6	99,7	99,5	100	99,7	-											
10	KX499446	99,5	99,3	99,6	99,5	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	-										
11	KX499447	99,3	99,5	99,6	99,5	99,6	99,4	99,6	99,6	99,6	99,3	-									
12	KX499448	99,0	98,8	99,1	99,0	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	99,0	99,2	-								
13	KX756669	99,7	99,5	99,8	99,7	99,6	99,6	99,6	99,6	99,7	99,5	99,2	-								
14	MK804765	99,3	99,3	99,6	99,5	99,4	99,4	99,4	99,4	99,3	99,3	98,8	99,5	-							
15	OR546046	99,5	99,3	99,6	99,5	99,4	99,4	99,4	99,4	99,5	99,3	99,0	99,7	99,3	-						
16	KX701860	92,8	92,8	93,2	93,0	92,9	93,2	92,9	93,2	92,9	93,0	93,0	92,9	93,0	93,2	92,8	-				
17	KX756668	92,9	92,9	93,3	93,2	93,0	93,3	93,0	93,3	93,0	93,2	93,0	93,2	93,3	92,9	99,8	-				
18	HM059034	92,5	92,5	92,8	92,7	92,6	92,8	92,6	92,8	92,7	92,7	92,6	92,7	92,6	92,5	98,9	98,8	-			
19	AY753208	93,0	93,0	93,4	93,3	93,2	93,4	93,2	93,4	93,2	93,3	93,3	93,2	93,3	93,4	93,0	97,9	98,0	97,7	-	
20	AF037268	99,1	99,1	99,4	99,3	99,2	99,2	99,2	99,2	99,2	99,1	99,1	98,6	99,3	99,1	99,1	92,6	92,7	92,3	92,8	-

As informações sobre os isolados brasileiros de GLRaV-3 e os códigos de acessos no GenBank encontram-se listados na Tabela 2. As sequências dos isolados brasileiros caracterizados neste trabalho possuem os códigos de acesso no GenBank PP497041 (Pir65) e PP497042 (Garib) e para a sequência de referência foi utilizado o isolado NY1 do GLRaV-3 (AF037268). As cores distintas indicam os agrupamentos filogenéticos obtidos.

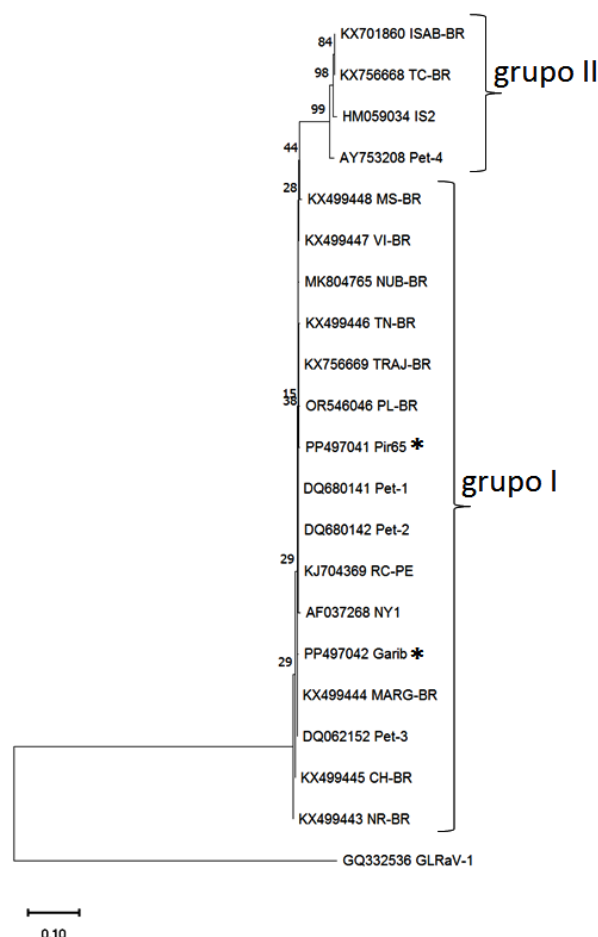


Figura 11. Análise filogenética baseada nas sequências completas de nucleotídeos do gene da proteína capsidial do GLRaV-3. Valores percentuais de *bootstrap* estão indicados. As sequências dos isolados brasileiros caracterizados neste trabalho (PP497041 e PP497042) estão identificadas com um asterisco (*). Os grupos filogenéticos indicados (I e II) correspondem aos filogrupos previamente descritos por Maree et al. (2015). Para o isolado-tipo, foi utilizado o isolado NY1 do GLRaV-3 (AF037268) e para o grupo externo da árvore (*outgroup*), GLRaV-1 (*Ampelovirus*, GQ332536). Os códigos de acesso de nucleotídeos e os nomes dos isolados no GenBank estão indicados. A barra indica número de substituições de nucleotídeos por sítio.

Conclusão

Os resultados demonstraram especificidades relacionadas ao diagnóstico viral em videira infectada com o GLRaV-3. Para mitigar efeitos indesejados que possam afetar o diagnóstico viral, recomenda-se a realização da indexação utilizando o tipo de tecido vegetal indicado e criteriosa escolha do teste diagnóstico baseada na sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, praticidade e confiabilidade para a detecção de uma ampla gama de isolados virais.

Agradecimentos

Ao pesquisador aposentado Osmar Nickel e ao técnico Marcos Fernando Vanni da Embrapa Uva e Vinho e a Gabriela de Moura Carson do IFRS, Campus Bento Gonçalves, RS, pelas discussões técnicas e apoio na realização dos testes laboratoriais de indexação viral. Ao CNPq, pela concessão da bolsa de iniciação científica a autora, estudante da UERGS/BG. Este trabalho foi financiado pela Embrapa, projeto SEG 20.20.01.002.00.00.

Referências

- BASSO, M. F.; FAJARDO, T. V. M.; EIRAS, M.; AYUB, R. A.; NICKEL, O. Detecção e identificação molecular de vírus associados a videiras sintomáticas e assintomáticas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 11, p. 2249-2255, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010001100001>.
- BASSO, M. F.; FAJARDO, T. V. M.; SILDARELLI, P. Grapevine virus diseases: economic impact and current advances in viral prospection and management. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. 1, e-411, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452017411>.
- BURGER, J. T.; MAREE, H. J.; GOUVEIA, P.; NAI-DU, R. A. Grapevine leafroll-associated virus 3. In: MENG, B.; MARTELLI, G. P.; GOLINO, D. A.; FUCHS, M. (ed.). **Grapevine viruses: Molecular biology, diagnostics and management**. Cham, Switzerland: Springer, 2017. p. 167-195. DOI: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-57706-7_8.
- CATARINO, A. de M.; FAJARDO, T. V. M.; PIO-RIBEIRO, G.; EIRAS, M.; NICKEL, O. Incidência de vírus em videiras no Nordeste brasileiro e caracterização molecular parcial de isolados virais locais. **Ciência Rural**, v. 45, n. 3, p. 379-385, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20140587>.
- CLARK, M. F.; LISTER, R. M.; BAR-JOSEPH, M. ELISA techniques. **Methods in Enzymology**, v. 118, p. 742-766, 1986. DOI: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(86\)18114-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(86)18114-6).
- DUBIELA, C. R.; FAJARDO, T. V. M.; SOUTO, E. R.; NICKEL, O.; EIRAS, M.; REVERS, L. F. Simultaneous detection of Brazilian isolates of grapevine viruses by TaqMan real-time RT-PCR. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 2, p. 158-165, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1982-56762013000200011>.
- FAJARDO, T. V. M.; BERTOCCHI, A. A.; NICKEL, O. Determination of the grapevine virome by high-throughput sequencing and grapevine viruses detection in Serra Gaúcha, Brazil. **Revista Ceres**, v. 67, n. 2, p. 156-163, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/0034-737X202067020010>.
- FAJARDO, T. V. M.; DIANESE, E. C.; EIRAS, M.; CERQUEIRA, D. M.; LOPES, D. B.; FERREIRA, M. A. S. V.; MARTINS, C. R. F. Variability of the coat protein gene of Grapevine leafroll-associated virus 3 in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 335-340, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582007000400008>.
- FAJARDO, T. V. M.; EIRAS, M. Doenças virais em videiras. In: BUENO JÚNIOR, C. (org.). **Doenças e pragas em videiras**. São Paulo, SP: Instituto Biológico, 2022. p. 61-103. (Instituto Biológico. Boletim Técnico, 33). DOI: [10.31368/2594-6080b33002022](https://doi.org/10.31368/2594-6080b33002022).
- FAJARDO, T. V. M.; GRYNBERG, P.; TOGAWA, R. C.; SILVA, J. M. F.; SILVA, F. N. da; NICKEL, O. Analyses of mealybug (*Pseudococcus longispinus*) virome reveal grapevine viruses diversity. **Tropical Plant Pathology**, v. 49, p. 449-458, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-024-00647-3>.
- FAJARDO, T. V. M.; MENEZES-NETTO, A. C.; NICKEL, O. Incidência de viroses em videiras no Vale do Rio do Peixe (Brasil) e parâmetros de amostragem para indexação viral em videiras. **Revista Brasileira de Viticultura e Enologia**, v. 13, p. 22-31, 2021. Disponível em: <https://www.enologia.org.br/default/uploads/revista/revista-90.pdf?1a553b24dc211405479d9b7819945130>. Acesso em: 14 jun. 2024.
- FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O. **Técnicas de detecção e estudo de vírus em plantas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2015. 8 p. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado técnico, 179). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1027297>. Acesso em: 14 jun. 2024.
- FAJARDO, T. V. M.; PERES, C. A.; NICKEL, O. Real-time RT-PCR high-resolution melting curve analysis to detect and differentiate Brazilian variants of grapevine viruses. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, v. 38, n. 2, p. 188-195, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1051/ctv/ctv20233802188>.
- FAJARDO, T. V. M.; SILVA, F. N.; EIRAS, M.; NICKEL, O. High-throughput sequencing applied for the identification of viruses infecting grapevines in Brazil and genetic variability analysis. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, n. 4, p. 250-260, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0142-8>.
- FIORE, N.; PRODAN, S.; PINO, A. M. Monitoring grapevine viruses by ELISA and RT-PCR throughout the year. **Journal of Plant Pathology**, v. 91, n. 2, p. 489-493, 2009. DOI: [10.4454/jpp.v91i2.984](https://doi.org/10.4454/jpp.v91i2.984).

- FUCHS, M. Grapevine virology highlights: 2018-2023. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUS AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE, 20., 2023, Thessaloniki, Greece. **Proceedings** [...]. Greece: ICVG, 2023. p. 18-26. Disponível em: <https://icvg.org/data/ICVG20Abstracts.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2024.
- GUIMARÃES, M. C. S. Exames de laboratório: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, n. 2, p. 117-120, 1985. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/hRFhfHyKSvjWSDs6QqTGJpf/?format=pdf>. Acesso em: 14 jun. 2024.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HERRBACH, E.; ALLIAUME, A.; PRATOR, C. A.; DANE, K. M.; COOPER, M. L.; ALMEIDA, R. P. P. Vector transmission of grapevine leafroll-associated viruses. In: MENG, B.; MARTELLI, G. P.; GOLINO, D. A.; FUCHS, M. (ed.). **Grapevine viruses: Molecular biology, diagnostics and management**. Cham, Switzerland: Springer, 2017. p. 483-503. DOI: https://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7_24.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018. DOI: <https://dx.doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; McGETTIGAN, P. A.; McWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007. DOI: <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>.
- LING, K.-S.; ZHU, H.-Y.; GONSALVES, D. Complete nucleotide sequence and genome organization of Grapevine leafroll-associated virus 3, type member of the genus Ampelovirus. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 7, p. 2099-2102, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.80007-0>.
- MALIOGKA, V. I.; MARTELLI, G. P.; FUCHS, M.; KATIS, N. I. Control of viruses infecting grapevine. **Advances in Virus Research**, v. 91, p. 175-227, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.11.002>.
- MARAI, A.; GENTIT, P.; BRANS, Y.; RENVOISÉ, J. P.; FAURE, C.; SAISON, A.; COUSSEAU, P.; CASTAING, J.; CHAMBON, F.; PION, A.; CALADO, G.; LEFEBVRE, M.; GARNIER, S.; LATOUR, F.; BRESSON, K.; GRASSEAU, N.; CANDRESSE, T. Comparative performance evaluation of double-stranded RNA high-throughput sequencing for the detection of viral infection in temperate fruit crops. **Phytopathology**, v. 114, n. 7, p. 1701-1709, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-23-0480-R>.
- MAREE, H. J.; ALMEIDA, R. P. P.; BESTER, R.; CHOOI, K. M.; COHEN, D.; DOLJA, V. V.; FUCHS, M.; GOLINO, D. A.; JOOSTE, A. E. C.; MARTELLI, G. P.; NAIDU, R. A.; ROWHANI, A.; SALDARELLI, P.; BURGER, J. T. Grapevine leafroll-associated virus 3. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, article 82, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00082>.
- MAREE, H. J.; PIRIE, M. D.; OOSTHUIZEN, K.; BESTER, R.; REES, D. J. G.; BURGER, J. T. Phylogenomic analysis reveals deep divergence and recombination in an economically important grapevine virus. **PLoS One**, v. 10, n. 5, e0126819, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126819>.
- MELLO, L. M. R. de; MACHADO, C. A. E. **Vitivinicultura brasileira: panorama 2021**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2022. 17 p. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 226). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1149674>. Acesso em: 14 jun. 2024.
- MOURA, C. J. M. de; FAJARDO, T. V. M.; EIRAS, M.; SILVA, F. N. da; NICKEL, O. Molecular characterization of GSyV-1 and GLRaV-3 and prevalence of grapevine viruses in a grape-growing area. **Scientia Agricola**, v. 75, n. 1, p. 43-51, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-992X-2016-0328>.
- NAIDU, R. A.; MAREE, H. J.; BURGER, J. T. Grapevine leafroll disease and associated viruses: a unique pathosystem. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, p. 613-634, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045946>.
- NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS, H. B. Jr. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments, 1997. Distributed by the author. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>.
- OSMAN, F.; GOLINO, D.; HODZIC, E.; ROWHANI, A. Virus distribution and seasonal changes of Grapevine leafroll-associated viruses. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 69, n. 1, p. 70-76, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5344/ajev.2017.17032>.
- OSMAN, F.; LEUTENEGGER, C.; GOLINO, D.; ROWHANI, A. Real-time RT-PCR (TaqMan®) assays for the detection of Grapevine leafroll associated viruses 1-5 and 9. **Journal of Virological Methods**, v. 141, n. 1, p. 22-29, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.035>.
- 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. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1011264400482>.

