

Desempenho agrônomo de videiras com e sem sintomas de viroses, e comparação molecular de isolados virais

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

⁽¹⁾Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Avenida Dom Manoel de Medeiros, s/nº, Dois Irmãos, CEP 52171-900 Recife, PE, Brasil. E-mail: moniqueb.nascimento@hotmail.com, gilvanpio@uol.com.br ⁽²⁾Embrapa Uva e Vinho, Caixa Postal 130, CEP 95700-000 Bento Gonçalves, RS, Brasil. E-mail: thor.fajardo@embrapa.br, osmar.nickel@embrapa.br, ana.czermainski@embrapa.br ⁽³⁾Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, Avenida Conselheiro Rodrigues Alves, nº 1.252, CEP 04014-002 São Paulo, SP, Brasil. E-mail: eiras@biologico.sp.gov.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de viroses em videiras sintomáticas e assintomáticas sobre as variáveis agrônomicas relacionadas ao vigor das plantas e à qualidade enológica da uva, e comparar os isolados virais obtidos nessas duas condições. Realizaram-se dois experimentos com quatro cultivares. Todas as plantas foram indexadas, por meio da reação em cadeia da polimerase via transcrição reversa (RT-PCR) em tempo real, quanto à provável ocorrência dos seguintes vírus: *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine virus D* (GVD), *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV-1 ao -4, GLRaV-4 estirpe 5), *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) e *Grapevine fleck virus* (GFkV). As variáveis avaliadas foram: número de gemas brotadas e não brotadas, número de ramos com ou sem cachos, número total de gemas, número de cachos, massa de cachos frescos, massa total de bagas, massa do engaço, número de bagas por cacho, massa média de baga, sólidos solúveis totais, acidez total titulável, pH, massa de ramos podados ou diâmetros do tronco do porta-enxerto e da copa. Os efeitos negativos foram mais pronunciados nas plantas com sintomas de viroses; no entanto, constatou-se frequentemente que plantas sem sintomas também estavam infectadas. A análise molecular de GRSPaV, GVA e GLRaV-2, isolados de plantas sintomáticas e assintomáticas, resultou em alta percentagem de identidade de nucleotídeos entre isolados homólogos.

Termos para indexação: *Grapevine*, *Vitis*, complexo do lenho rugoso, enrolamento-da-folha, PCR em tempo real.

Agronomic performance of grapevines with and without virus symptoms, and molecular comparison of viral isolates

Abstract – The objective of this work was to evaluate the effect of viroses in symptomatic and asymptomatic grapevines on the agronomic variables related to the plant vigor and the enological quality of grapes, and to compare viral isolates obtained from these two conditions. Two experiments were performed with four cultivars. All plants were indexed by real time, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the probable occurrence of the following viruses: *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine virus D* (GVD), *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV-1 to -4, GLRaV-4 strain 5), *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), and *Grapevine fleck virus* (GFkV). The evaluated variables were: number of buds burst and not burst, number of branches with or without bunches, total number of buds, number of bunches, fresh bunch weight, total berry weight, rachis weight, number of berries per bunch, average berry weight, total soluble solids, total titratable acidity, pH, pruned branch weight, or rootstock and scion trunk diameters. The negative effects were more pronounced on the plants with virus symptoms; however, it was observed that plants without symptoms were also often infected. The molecular analysis of GRSPaV, GVA, and GLRaV-2, isolates from symptomatic and asymptomatic plants, resulted in a high percentage of nucleotide identities between homologous isolates.

Index terms: *Grapevine*, *Vitis*, rugose wood complex, leafroll, real time PCR.

Introdução

Cerca de 60 espécies virais capazes de infectar a videira são conhecidas e constituem importante

ameaça à vitivinicultura (Basso et al., 2014). O principal método de manejo aplicado ao controle de viroses da videira baseia-se em estratégias de prevenção, por meio da utilização de material

propagativo comprovadamente livre de patógenos (Maliogka et al., 2015). Outras práticas de manejo, que incluiriam o plantio de cultivares e porta-enxertos resistentes a vírus, não se aplicam, uma vez que não há resistência genética a vírus em cultivares comerciais de videira (Oliver et al., 2011). Em razão disso e por ser muito frequente a incidência de vírus nas principais regiões vitícolas brasileiras (Catarino et al., 2015), uma alternativa seria, em determinadas situações, a convivência com os vírus no vinhedo. A infecção viral pode resultar em maior ou menor dano, com diferentes reflexos sobre a qualidade e quantidade da produção, a depender de diversos fatores, entre os quais a gama e a intensidade dos sintomas manifestados pela planta hospedeira ou mesmo a ausência de sintomas, no caso de infecções latentes ou assintomáticas (Basso et al., 2014). A expressão de sintomas induzidos por vírus em videiras pode variar com as condições ambientais, estágio fenológico e estado nutricional da planta, práticas de manejo, combinação de espécies e estirpes virais, cultivar da planta hospedeira e tempo decorrido desde a infecção (Basso et al., 2010a; Naidu et al., 2014).

Os efeitos da infecção viral sobre a videira podem-se manifestar de forma abrangente, o que resulta, em geral, em impactos econômicos para a atividade vitícola. As plantas infectadas podem apresentar alterações na expressão de genes, redução do potencial fotossintético, aumento da taxa de respiração e redução dos teores de clorofila (Fajardo et al., 2004; Espinoza et al., 2007; Basso et al., 2010b). Especificamente, os efeitos negativos da infecção viral em videiras consistem em redução do teor de sólidos solúveis totais do mosto, maturação irregular e incompleta da uva, redução da qualidade e do rendimento da produção e, em casos mais severos de infecção, podem ocorrer enfraquecimento e atraso das brotações, redução da longevidade e declínio das plantas infectadas (Giribaldi et al., 2011).

É comum a observação de videiras sintomáticas e assintomáticas quanto a viroses, dentro de um mesmo vinhedo, nas principais regiões vitícolas brasileiras (Basso et al., 2010a). Considerando-se a frequente necessidade de renovação de vinhedos, decorrente da degenerescência das plantas causada por alta taxa de infecção viral; os custos serão invariavelmente elevados. Se videiras assintomáticas, mesmo que infectadas por vírus, apresentarem razoáveis qualidade

e quantidade produtivas, então, essa condição poderia ser explorada como alternativa viável e menos dispendiosa à renovação completa do vinhedo. A opção seria a substituição parcial direcionada apenas às plantas sintomáticas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de viroses em videiras sintomáticas e assintomáticas sobre as variáveis agronômicas relacionadas ao vigor das plantas e à qualidade enológica da uva, e comparar os isolados virais obtidos nessas duas condições.

Material e Métodos

Dois experimentos, constituídos por levantamentos amostrais, foram efetuados em vinhedos comerciais, com quatro cultivares. As plantas foram selecionadas de forma intencional (não probabilística), observando-se a uniformidade dentro e entre as amostras de plantas sintomáticas e de plantas assintomáticas da mesma cultivar.

No primeiro experimento, foram avaliadas 10 plantas de videira (*Vitis vinifera*) com evidentes sintomas de infecção viral, comparativamente a 10 plantas sem nenhum sintoma, em vinhedos de 'Cabernet Franc' (21 anos, enxertada em SO4) e 'Cabernet Sauvignon' (16 anos, enxertada em P1103), ambos situados em Bento Gonçalves, RS. A parte aérea das plantas sintomáticas de ambas as cultivares exibia enrolamento e avermelhamento das folhas. As avaliações foram realizadas na safra 2011, e as plantas foram identificadas em fevereiro/2011, no início da maturação da uva. As 14 variáveis agronômicas, registradas por planta, foram: número de gemas brotadas por planta, número de ramos por planta – com cachos ou sem cachos – número de gemas não brotadas por planta, número total de gemas por planta, número de cachos por planta, massa de cacho fresco, massa total de bagas por cacho, massa do engaço, número de bagas por cacho, massa média de bagas, sólidos solúveis totais, acidez total titulável e pH do mosto.

No segundo experimento, foram avaliadas 20 videiras com sintomas de virose e outras 20 plantas completamente assintomáticas, em vinhedos de 'Niágara Rosada' (*V. labrusca*) – com 6 anos, enxertada em P1103 –, e 'Merlot' (*V. vinifera*) – com 12 anos, enxertada em P779 –, em Flores da Cunha e Caxias do Sul, RS, respectivamente. A parte aérea da cultivar Niágara Rosada sintomática não exibia qualquer

sintoma de virose, no entanto, o porta-enxerto dessas plantas apresentava severas caneluras, engrossamento e rachaduras na casca. A parte aérea da cultivar Merlot sintomática exibia enrolamento e avermelhamento das folhas. As avaliações foram realizadas na safra 2014, e as plantas foram identificadas em fevereiro/2014. As variáveis agrônomicas, registradas por planta, foram: sólidos solúveis totais, massa do cacho fresco, massa de ramos podados e diâmetros do tronco do porta-enxerto e da copa.

Para as determinações no fruto, foram colhidos três cachos por planta, no primeiro experimento, e um cacho por planta no segundo experimento. Efetuou-se a comparação das médias amostrais de plantas sintomáticas e assintomáticas, por cultivar, por meio do teste t bilateral.

Todas as videiras, de ambos os experimentos, foram indexadas, para identificar as espécies virais associadas às plantas assintomáticas e sintomáticas. No primeiro experimento, todas as plantas da 'Cabernet Franc' e 'Cabernet Sauvignon' foram avaliadas quanto à infecção por seis vírus: *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *Grapevine leafroll-associated virus-2* e *-3* (GLRaV-2 e -3) e *Grapevine fleck virus* (GFkV). No segundo experimento, as plantas da 'Niágara Rosada' foram avaliadas quanto à infecção por GVA, GVB, *Grapevine virus D* (GVD) e GRSPaV, e as da 'Merlot' quanto aos vírus GLRaV-1 ao -4 e GLRaV-4 estirpe 5.

A extração de RNA total, a partir de um grama de raspas do lenho de ramos maduros, de cada videira dos experimentos (uma amostra por planta), foi realizada pela trituração do tecido vegetal em nitrogênio líquido, seguindo-se o protocolo de adsorção em sílica (Radaelli et al., 2009). Videiras comprovadamente sadias foram utilizadas como controle negativo. Para o controle positivo das reações, utilizou-se RNA extraído de videiras mantidas em vasos, em casa de vegetação, infectadas com as espécies virais avaliadas. Estas plantas são permanentemente mantidas sob condições controladas e foram indexadas previamente, assim, os vírus que as infectam são conhecidos. Os oligonucleotídeos e as sondas utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real (Taqman) foram desenhados com base em trabalhos publicados para a detecção dos vírus GVA, GVB, GVD, GRSPaV, GLRaV-1 ao

-4, GLRaV-4 estirpe 5 e GFkV (Osman et al., 2007; Osman & Rowhani, 2008).

Todas as sondas foram marcadas com os fluoróforos 6-FAM ou VIC na extremidade 5' – para permitir a detecção simultânea de dois vírus na mesma amostra –, e com TAMRA na extremidade 3'. As condições das reações de RT-PCR em tempo real, descritas previamente (Dubiel et al., 2013), consistiram de ensaios do tipo presença/ausência, tendo-se utilizado o kit TaqMan Master Mix One-Step RT-PCR e o termociclador StepOnePlus Real-time PCR System ambos da Applied Biosystems (Carlsbad, CA, EUA). Os dados das reações foram analisados quantitativa e graficamente, por meio do StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems), pela determinação do C_q (ciclo quantitativo). Valores de C_q abaixo de 35 representam resultados positivos, e quanto maior a concentração viral na amostra, menor é o valor do C_q.

A análise molecular foi desenvolvida com base nas sequências de nucleotídeos de três espécies virais, associadas à virose do lenho rugoso (GRSPaV e GVA) e do enrolamento da folha (GLRaV-2). Os isolados foram obtidos por meio de RT-PCR, a partir do RNA total extraído de amostras coletadas de plantas do experimento no campo. Da 'Niágara Rosada' foram obtidos os isolados de GRSPaV e GVA e da 'Merlot', isolados de GLRaV-2. Foram comparados dois isolados de cada vírus, provenientes de plantas sintomáticas e assintomáticas. Os oligonucleotídeos para a amplificação por RT-PCR convencional foram definidos com base em trabalhos anteriores – RSPaV-v1/RSPaV-c1 para GRSPaV (Radaelli et al., 2009), 766/C1197 para GVA (Minafra et al., 1992), e V2CPf/V2CPr1 para GLRaV-2 (Bertazzon & Angelini, 2004) –, este último par de oligonucleotídeos também foi utilizado na indexação do segundo experimento. A síntese do cDNA e as reações de PCR foram conduzidas conforme metodologia descrita por Radaelli et al. (2009). Os produtos da RT-PCR foram analisados em géis de agarose a 1,2%, preparados em tampão TBE pH 8,0, corados com brometo de etídeo (0,05%) e visualizados em transiluminador de luz UV. As bandas observadas, correspondentes a fragmentos de tamanhos esperados, foram recortadas dos géis e eluídas com a utilização do kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, EUA).

Os fragmentos de DNA eluídos foram ligados ao vetor pGEM-T Easy (Promega) e estes foram

utilizados na transformação de células competentes de *Escherichia coli* DH5 α , por meio de choque térmico (Sambrook & Russel, 2001). O DNA plasmidial das colônias bacterianas transformadas foi extraído, com o kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). A confirmação da presença dos fragmentos virais clonados nos plasmídeos recombinantes foi realizada por digestão com a enzima de restrição *EcoRI* (Sambrook & Russel, 2001). Procedeu-se ao sequenciamento automático de nucleotídeos de dois clones por isolado viral caracterizado. Os alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos (nt) e de aminoácidos deduzidos (aad) e a geração das matrizes de identidade foram realizados com o auxílio dos programas Clustal X 1.8 e BioEdit 7.2.3. (Hall, 1999). Nas análises, foram incluídas as sequências completas (GRSPaV) ou parciais (GVA e GLRaV-2) da proteína capsidial (CP) dos isolados caracterizados no presente trabalho, isolados homólogos caracterizados no Brasil, além do isolado-tipo da espécie viral e de uma sequência outgroup, disponíveis no banco de dados GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, EUA). O estudo de relacionamento filogenético foi desenvolvido com auxílio do programa MEGA 5.2, por meio do método de máxima parcimônia (Tamura et al., 2011).

Resultados e Discussão

No primeiro experimento, nas plantas sintomáticas da 'Cabernet Franc', observaram-se folhas coriáceas e aspecto bolhoso, enrolamento para baixo nos bordos foliares, folhas avermelhadas com as nervuras

principais verdes. Nas plantas sintomáticas da 'Cabernet Sauvignon', observaram-se intenso avermelhamento foliar e formação de tecido corticento na região de inserção do ramo. Não se observaram sintomas relacionados a viroses nas plantas assintomáticas. Na 'Cabernet Franc', detectou-se GRSPaV na quase totalidade das plantas assintomáticas e sintomáticas avaliadas (Tabela 1). O GVB foi detectado na quase totalidade das plantas com sintomas e em apenas duas plantas sem sintomas. A 'Cabernet Sauvignon' apresentou resultados semelhantes aos da 'Cabernet Franc' quanto à ocorrência de GRSPaV e GVB. Em ambas as cultivares, também se detectaram GVA, GFkV e GLRaV-2, em plantas sintomáticas, e GVA, em assintomáticas, porém em menor incidência do que GRSPaV e GVB. O GLRaV-3 não foi detectado em nenhuma planta. Como as amostras indexadas provieram de vinhedos comerciais, as infecções determinadas assemelham-se àquelas obtidas em outros levantamentos (Catarino et al., 2015).

Os efeitos negativos verificados, relacionados à fisiologia da videira e com reflexos significativos sobre algumas variáveis agrônomicas e de qualidade enológica da uva, podem ser, provavelmente, atribuídos à presença do GVB, que apresentou maior incidência em plantas com sintomas. Rosa et al. (2011) mostraram que o GVB induziu efeitos adversos em porta-enxertos de videira, particularmente, quando combinado com outros vírus. A detecção de vírus em plantas sem sintomas pode ser explicada pela alta sensibilidade do teste diagnóstico de RT-PCR e à frequente infecção com isolados latentes, conforme mostrado para o GRSPaV, o que resulta em plantas

Tabela 1. Número de plantas infectadas, obtido a partir da indexação viral por RT-PCR em tempo real e convencional, de 'Cabernet Franc' e 'Cabernet Sauvignon', no primeiro experimento, e 'Niágara Rosada' e 'Merlot', no segundo experimento.

Cultivar	Sintoma ⁽¹⁾	Vírus									
		GVA	GVB	GVD	GRSPaV	GFkV	GLRaV-1	GLRaV-2	GLRaV-3	GLRaV-4	GLRaV-4 strain 5
Cabernet Franc	-	1/10	2/10	--	9/10	0/10	--	0/10	0/10	--	--
	+	0/10	9/10	--	10/10	0/10	--	3/10	0/10	--	--
Cabernet Sauvignon	-	1/10	2/10	--	9/10	0/10	--	0/10	0/10	--	--
	+	2/10	8/10	--	10/10	1/10	--	2/10	0/10	--	--
Niágara Rosada	-	17/20	0/20	18/20	15/20	--	--	--	--	--	--
	+	17/20	1/20	17/20	19/20	--	--	--	--	--	--
Merlot	-	--	--	--	--	--	0/20	16/20	0/20	15/20	5/20
	+	--	--	--	--	--	0/20	3/20	11/20	19/20	7/20

⁽¹⁾- Planta assintomática; + planta sintomática. (--) Não determinado.

assintomáticas (Gambino et al., 2012). Outro motivo poderia ser o menor tempo de infecção em plantas assintomáticas, insuficiente, portanto, para permitir a expressão de sintomas (Maliogka et al., 2015). Plantas assintomáticas infectadas podem levar até três anos para expressar sintomas da infecção viral (Naidu et al., 2014), assim, é possível supor que algumas das plantas assintomáticas avaliadas poderiam exibir sintomas em ciclos de cultivo (safra) posteriores.

A avaliação das variáveis agrônômicas mostrou plantas sintomáticas que apresentaram vigor reduzido, reduções do número de brotos e de cachos por planta e cachos menores (Tabela 2). Verificaram-se diferenças significativas, em favor das plantas sem sintomas, nas seguintes variáveis: número de ramos com cachos – com percentagem de redução em relação às plantas sem sintomas, em 'Cabernet Franc' e 'Cabernet Sauvignon', de 37 e 24%; número de cachos (35 e 35%); massa de cacho fresco (37 e 55%); massa total de bagas por cacho (36 e 55%); massa do engajo (52 e 54%); e número de bagas por cacho (27 e 47%). Na 'Cabernet Franc', ainda foram verificadas diferenças significativas, em favor das plantas sem sintomas, quanto a: número de gemas brotadas (28%); número total de gemas (22%); e sólidos solúveis totais do mosto (cerca de 7%). Na 'Cabernet Sauvignon', houve diferenças significativas quanto à massa média

de baga (13%) e ao número de gemas não brotadas, que foi reduzido em 51% nas plantas com sintomas. Estes resultados mostram que o processo infeccioso viral, juntamente com a expressão de sintomas, nestas cultivares, influenciaram negativamente e, de forma mais expressiva, o desempenho agrônomo, o vigor da planta e algumas variáveis de qualidade enológica da uva (°Brix).

Os impactos da infecção viral sobre o potencial fotossintético de folhas de videiras restringem o acúmulo de reservas e a capacidade de crescimento, refletindo, conseqüentemente, em decréscimos da qualidade da produção e da produtividade (Basso et al., 2010b). De fato as plantas assintomáticas de 'Cabernet Franc' e 'Cabernet Sauvignon', que não expressaram sintomas foliares, mesmo que infectadas, apresentaram melhor desempenho das variáveis agrônômicas e enológicas avaliadas (Tabela 2). Assim, a separação das uvas provenientes de determinadas áreas com plantas assintomáticas dentro de vinhedos infectados, poderia ser avaliada como uma estratégia para a produção com melhor qualidade.

O impacto econômico da virose do enrolamento da folha da videira, em relação à produtividade, é considerável. Atallah et al. (2012) relataram redução de 30-50% na produção e perda econômica de 10%, reflexo da diminuição da qualidade da uva, na ausência

Tabela 2. Variáveis agrônômicas e enológicas de uvas colhidas de videiras 'Cabernet Franc' e 'Cabernet Sauvignon', com e sem sintomas de viroses⁽¹⁾.

Variável	'Cabernet Franc'		Significância	'Cabernet Sauvignon'		Significância
	Sem sintomas	Com sintomas		Sem sintomas	Com sintomas	
Número de gemas brotadas	43,8±9,82	31,3±6,8	**	34,5±4,99	31,6±7,76	ns
Número de ramos com cachos	33,1±10,03	20,8±8,04	**	27,8±3,99	21,1±7,31	*
Número de ramos sem cachos	10,7±6,07	10,5±2,51	ns	6,7±3,13	10,5±7,47	ns
Número de gemas não brotadas	10,5±5,58	10,9±5,53	ns	5,1±3,78	10,4±2,99	**
Número total de gemas	54,3±13,59	42,2±6,7	*	39,6±6,65	42,0±8,52	ns
Número de cachos	57,9±19,24	37,5±18,14	*	60,5±12,21	38,9±17,9	**
Massa do cacho fresco (g)	193,27±43,57	121,38±40,14	**	275,51±49,11	123,11±24,24	**
Massa total de bagas no cacho (g)	179,11±47,92	114,68±38,25	**	258,11±44,87	115,24±23,13	**
Massa do engajo (g)	14,16±10,34	6,69±2,71	*	17,40±7,9	7,87±2,0	**
Número de bagas por cacho	112,77±26,93	81,57±16,7	**	168,30±28,52	88,13±18,26	**
Massa média de baga (g)	0,53±0,06	0,47±0,13	ns	0,51±0,04	0,44±0,08	*
Sólidos solúveis totais (°Brix)	18,84±0,36	17,60±0,78	**	16,43±0,98	15,81±1,67	ns
Acidez total titulável (meq L ⁻¹)	81,39±9,76	92,44±14,41	ns	141,78±19,2	134,86±22,79	ns
pH	3,26±0,05	3,31±0,08	ns	3,17±0,05	3,16±0,1	ns

⁽¹⁾Teste t bilateral da diferença entre as médias amostrais (n = 10 plantas) por cultivar. nsNão significativo. * e **Significativo a 5% e a 1% de probabilidade, respectivamente.

de adoção de medidas de manejo desta virose no cultivo de *V. vinifera*. Com base nas diferenças dos valores de número de cachos por planta e de massa do cacho fresco de plantas assintomáticas e sintomáticas (Tabela 2) e, considerando-se uma densidade de 2.000 plantas por ha, resultaria em decréscimos de 2.933 e 6.583 kg ha⁻¹ na produtividade de plantas sintomáticas em relação às assintomáticas da 'Cabernet Franc' e 'Cabernet Sauvignon', respectivamente.

Alguns dos principais efeitos da infecção viral em videiras são: o amadurecimento irregular dos cachos, a redução da produtividade e a diminuição da cor em uvas tintas (Basso et al., 2010b). O amadurecimento irregular dos cachos pode ocasionar aumento da acidez total titulável do mosto da uva (Giribaldi et al., 2011), entretanto, este efeito não foi significativo nas avaliações realizadas. Em geral, o mosto da uva de plantas infectadas tende a apresentar menor pH do que o de plantas sadias (Basso et al., 2014), porém, essa variável também não apresentou diferença significativa nas condições testadas (Tabela 2). Essas duas variáveis são influenciadas pelas características da infecção viral e pela resposta fisiológica da cultivar à infecção viral. Poojari et al. (2013) não observaram efeitos negativos significativos da estirpe SG de GLRaV-2, sobre a produção e a qualidade da uva da videira 'Sangiovese', que foi assintomática, e mencionam que esses efeitos seriam menos pronunciados.

No segundo experimento, com a 'Niágara Rosada', detectaram-se GVA, GVD e GRSPaV na quase totalidade das plantas assintomáticas e sintomáticas avaliadas, além de GVB em uma planta sintomática (Tabela 1). Os três vírus mais frequentes estão associados ao lenho rugoso da videira. Videiras muito suscetíveis a essa virose, como o porta-enxerto P1103, apresentam engrossamento da casca e caneluras (ranhuras) na superfície do lenho, além de vigor reduzido (Rosa

et al., 2011). Cultivares tolerantes, como Niágara Rosada, podem não exibir sintomas perceptíveis. Este efeito foi constatado na combinação 'Niágara Rosada'/P1103 sintomática, que apresentou maior diâmetro do tronco do porta-enxerto, bastante afetado pelos vírus do lenho rugoso. Na mesma combinação, na ausência de caneluras, portanto, copa e porta-enxerto assintomáticos, verificou-se melhor desenvolvimento do tronco da copa, pois o porta-enxerto assintomático não limitou o desenvolvimento vegetativo da copa. Estes efeitos não foram verificados na 'Merlot' infectada com os vírus do enrolamento da folha (Tabela 3). Na 'Merlot', os principais vírus detectados foram GLRaV-2, GLRaV-3 (plantas sintomáticas) e GLRaV-4, com menor incidência do GLRaV-4 estirpe 5. O GLRaV-3 não foi detectado nas plantas assintomáticas e o GLRaV-1 não foi detectado em nenhuma planta (Tabela 1).

Verificaram-se diferenças significativas, na avaliação das variáveis agrônômicas, em favor das plantas sem sintomas, nas seguintes variáveis: na 'Niágara Rosada' – massa fresca do cacho (redução de 15,4% em relação às plantas sem sintomas), massa de ramos podados (redução de 42,3%), diâmetro do tronco da copa (redução de 12,1%), e diâmetro do tronco do porta-enxerto (aumento de 7,98% no porta-enxerto sintomático); na 'Merlot' – sólidos solúveis totais (redução de 10,7%, em relação às plantas sem sintomas) (Tabela 3). Como todas as variáveis avaliadas estão relacionadas ao vigor da planta e à quantificação dos efeitos negativos da infecção viral, é possível concluir que videiras assintomáticas da 'Niágara Rosada', mesmo que infectadas, apresentam desempenho agrônômico superior ao verificado em videiras sintomáticas infectadas. Assim, o manejo, a colheita e a vinificação, separadamente, das uvas provenientes de videiras assintomáticas, poderiam ser

Tabela 3. Avaliação agrônômica de uvas colhidas de videiras 'Niágara Rosada' e 'Merlot', com e sem sintomas de virose, infectadas com diferentes vírus⁽¹⁾.

Variável	'Niágara Rosada'		Significância	'Merlot'		Significância
	Assintomática	Sintomática		Assintomática	Sintomática	
Sólidos solúveis totais (°Brix)	15,51±0,21	14,97±0,20	ns	19,02±0,20	16,98±0,23	**
Massa do cacho fresco (g)	334,12±10,03	282,43±15,62	**	294,83±18,23	256,81±13,97	ns
Massa de ramos podados (g)	2.791±98,19	1.609,55±110,82	**	1.285±78,2	1.157,7±90,17	ns
Diâmetro do tronco do porta-enxerto (mm)	43,99±1,15	47,81±1,36	*	43,41±1,23	42,41±0,97	ns
Diâmetro do tronco da copa (mm)	38,74±0,9	34,03±0,77	**	34,33±1,05	36,22±1,11	ns

⁽¹⁾Teste t bilateral da diferença entre as médias amostrais (n = 20 plantas) por cultivar. nsNão significativo. * e **Significativo a 5% e a 1% de probabilidade, respectivamente.

avaliados para a elaboração de produtos – como suco e vinho – de melhor qualidade. Como a 'Merlot' estava infectada com os vírus-do-enrolamento-da-folha, que afetam principalmente a fotossíntese (Basso et al., 2010b), a única diferença significativa ocorreu no teor de sólidos solúveis totais, que são açúcares gerados no processo fotossintético, entre plantas assintomáticas, menos prejudicadas por esses vírus, em comparação com as plantas sintomáticas.

Em conjunto, os resultados obtidos nos dois experimentos mostram que videiras assintomáticas, mesmo infectadas ainda apresentam desempenho agrônomico superior ao de videiras sintomáticas infectadas. Porém, como já mostrado, a utilização de material propagativo certificado, livre de vírus, ainda é a melhor opção para obter o máximo do potencial produtivo da cultivar e para reduzir perdas ocasionadas por vírus (Naidu et al., 2014). Mannini et al. (2012) relataram sobre as vantagens advindas de vinhedos estabelecidos com material propagativo livre de vírus, em comparação às variáveis vigor, produtividade, taxa fotossintética e teor de sólidos solúveis. Giribaldi et al. (2011) compararam o desempenho agrônomico entre videiras sadias e infectadas com GLRaV-1, GVA e GRSPaV e verificaram diminuições significativas de brotação, fertilidade e produtividade das plantas infectadas, em comparação ao controle sadio.

O impacto econômico das viroses sobre a produção da videira pode ser significativamente reduzido pela remoção de plantas infectadas de dentro do vinhedo (roguing), se a incidência da infecção for moderada (até 25%) (Atallah et al., 2012). Com incidência superior a esta taxa, a melhor alternativa seria a completa substituição do vinhedo. A implementação dessa recomendação de erradicação, associada aos resultados do presente trabalho, sugere a possibilidade de se avaliar o adiamento da renovação completa e precoce de vinhedos, o que poderia refletir em economia para o produtor. Com base na diferença entre valores de massa do cacho fresco, de plantas assintomáticas e sintomáticas (Tabela 3) e, considerando-se 50 cachos/planta e densidade de 2.000 plantas por hectare, o decréscimo da produtividade da 'Niágara Rosada' sintomática seria de 5169 kg ha⁻¹ em comparação às plantas assintomáticas. Como as videiras permaneceram por longo tempo no campo, com idades dos vinhedos de 6 a 21 anos, a possibilidade de reinfecção por vírus em campo tende a ser expressiva e, muitas vezes, não é possível cultivar um vinhedo completamente sadio,

após alguns poucos anos de sua implantação. Decorre daí o benefício de se tentar explorar a produção de uvas a partir de plantas assintomáticas, que ainda apresentem satisfatórias qualidade e quantidade produtivas, conforme mostrado no presente trabalho. Destaca-se, entretanto, que a manutenção de plantas infectadas em campo, mesmo que assintomáticas, pode servir de fonte de inóculo viral. Para que esta estratégia seja adotada, o manejo dessas plantas deve considerar medidas que limitem a disseminação viral, a exemplo do controle de vetores (Naidu et al., 2014; Maliogka et al., 2015).

O gene completo da proteína capsidial do GRSPaV, dos isolados NiagRos4 e NiagRos5, com 780 nucleotídeos e 259 aminoácidos deduzidos (aad), foi amplificado por RT-PCR a partir de duas amostras de plantas – uma sintomática e outra assintomática – de 'Niágara Rosada'. A identidade entre os isolados NiagRos4 (assintomática) e NiagRos5 (sintomática) foi de 99,6%, para nucleotídeos e aad. As sequências de nucleotídeos destes dois isolados (NiagRos4: GenBank KJ848784 e NiagRos5: KJ848785) apresentaram baixa identidade – 81,9-83,9% – com dois isolados brasileiros (CF195 e IS2a) e alta identidade – 90,8-98,2% – com outros nove isolados nacionais (CF207, MG, PN, MH, CF208, CF210, 420A, CF195-2, CS1) (Figura 1). A identidade de aad entre os isolados NiagRos4 e NiagRos5 e esses 11 isolados brasileiros variou entre 92,2 e 99,2%. Houve grande proximidade entre os dois isolados estudados (NiagRos4 e NiagRos5), além de relacionamento filogenético, um pouco mais distante, com 11 isolados brasileiros (Figura 1 A).

O gene parcial da proteína capsidial do GVA, isolados NiagRos2 e NiagRos10, com 451 nucleotídeos e 140 aad, foi amplificado por RT-PCR a partir de duas amostras de 'Niágara Rosada'. A identidade entre os isolados NiagRos2 (planta sintomática) e NiagRos10 (assintomática) foi de 93,3 e 97,8%, para nucleotídeos e aad, respectivamente. As sequências de nucleotídeos destes dois isolados (NiagRos2: GenBank KJ848782 e NiagRos10: KJ848783) apresentaram identidades entre 77,5 e 91,2% com quatro isolados brasileiros (IT-BA, GVA-RS, GVA-SP, PC40) (Figura 1). A identidade de aad entre os isolados NiagRos2 e NiagRos10 e esses quatro isolados nacionais variou entre 88,5 e 97,8%. Houve grande proximidade entre os dois isolados estudados (NiagRos2 e NiagRos10), além de relacionamento filogenético, um pouco mais distante, com quatro isolados brasileiros (Figura 1 B).

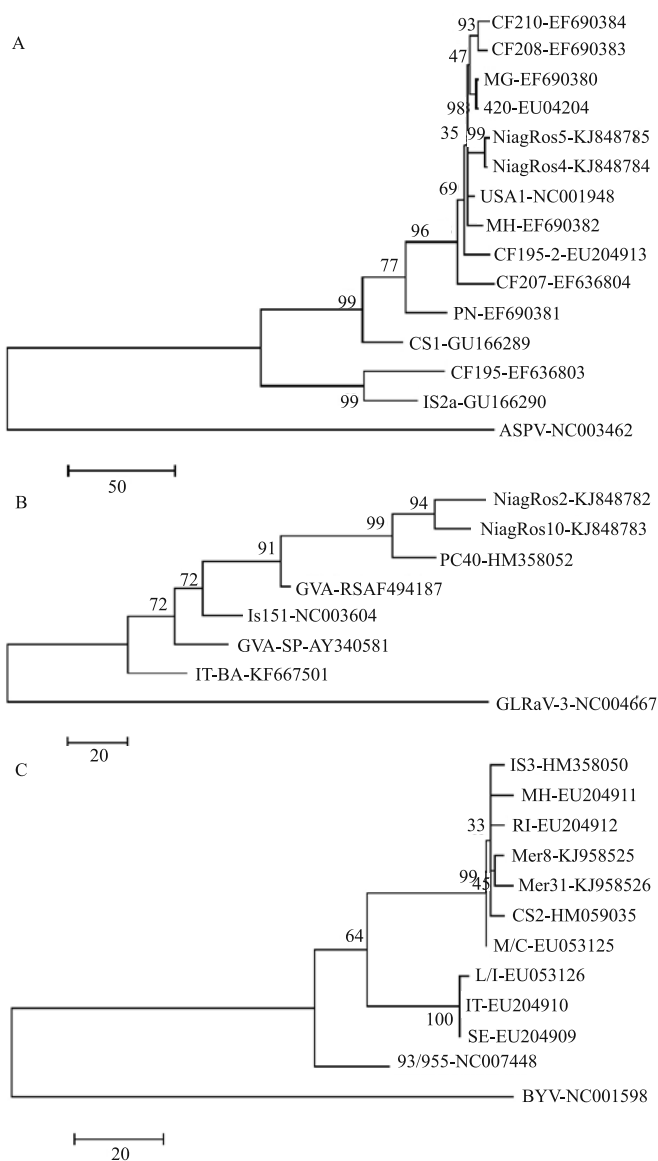


Figura 1. Árvores filogenéticas, obtidas com o programa MEGA 5.2, pelo método de máxima parcimônia com "bootstrap" de dez mil réplicas, baseadas nas sequências completas (780 pb) de nucleotídeos do gene da proteína capsidial de 13 isolados brasileiros de GRSPaV (A), e nas sequências parciais de nucleotídeos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

O gene parcial da proteína capsidial do GLRaV-2, isolados Mer8 e Mer31, com 397 nucleotídeos e 131 aad, foi amplificado por RT-PCR a partir de duas amostras de 'Merlot'. A identidade entre os isolados Mer8 (planta sintomática) e Mer31 (planta assintomática) foi de 98,4 e 97,7%, para nucleotídeos e aad, respectivamente. As sequências de nucleotídeos destes dois isolados (Mer8: GenBank KJ958525 e Mer31: KJ958526) apresentaram identidade entre 86,6 e 98,9% com oito isolados brasileiros (M/C, L/I, SE, IT, MH, RI, CS2, IS3) (Figura 1). A identidade de aad entre os isolados Mer8 e Mer31 e esses oito isolados nacionais variou entre 91,6 e 100%. Houve grande proximidade entre os dois isolados estudados (Mer8 e Mer31), além de relacionamento filogenético, um pouco mais distante, com oito isolados brasileiros (Figura 1 C).

Embora poucas substituições de nucleotídeos no genoma viral ou pequenas divergências de aminoácidos em determinados genes possam alterar propriedades biológicas dos vírus, como gama de hospedeiras e expressão de sintomas (Poojari et al., 2013), tal possibilidade não foi explorada no presente trabalho. As análises das sequências de nucleotídeos e aad dos isolados de GRSPaV, GVA e GLRaV-2, mostraram a associação de dois isolados virais que apresentaram alta homologia entre si (97,7-99,6%) e com isolados homólogos que infectaram videiras sintomáticas e assintomáticas. As diferenças sintomáticas podem estar relacionadas à variabilidade entre diferentes isolados virais, bem como podem estar relacionadas a outros fatores, tais como: período transcorrido desde a infecção viral, isolados latentes, diferença de virulência entre isolados, título viral e efeito sinérgico entre infecções virais múltiplas (Naidu et al., 2014). Gambino et al. (2012), Rosa et al. (2011) e Poojari et al. (2013) mostraram a existência de isolados latentes dos vírus GRSPaV, GVD e GLRaV-2 em videiras. A grande maioria dos trabalhos de avaliação agrônoma compara videiras infectadas por vírus e videiras livres de vírus, normalmente obtidas por meio de cultura de tecidos (Maliogka et al., 2015). O presente trabalho comparou videiras sintomáticas e assintomáticas, independentemente do status fitossanitário, se infectadas ou não por vírus. Tal situação reflete, de forma mais fidedigna, a condição prevalente encontrada em campo, em particular nas regiões vitícolas brasileiras.

Conclusões

1. As plantas de 'Cabernet Franc', 'Cabernet Sauvignon', 'Merlot' e 'Niágara Rosada', que não expressam sintomas foliares ou no porta-enxerto, mesmo que infectadas, apresentam melhor desempenho das variáveis agronômicas e enológicas do que as plantas sintomáticas.

2. Existe alta identidade de nucleotídeos entre isolados homólogos de GRSPaV, GVA e GLRaV-2 de plantas sintomáticas e assintomáticas.

Agradecimentos

À Carla Dubiela, pelo apoio na indexação do primeiro experimento; e a Celito Guerra, Daniel Grohs, Daniel Souza, Gisele Perissutti, Henrique Pessoa dos Santos e Marcos Vanni da Embrapa Uva e Vinho, pelo apoio técnico em diferentes etapas deste trabalho.

Referências

- ATALLAH, S.S.; GÓMEZ, M.I.; FUCHS, M.F.; MARTINSON, T.E. Economic impact of grapevine leafroll disease on *Vitis vinifera* cv. Cabernet franc in Finger Lakes vineyards of New York. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.63, p.73-79, 2012. DOI: 10.5344/ajev.2011.11055.
- BASSO, M.F.; FAJARDO, T.V.M.; PIO-RIBEIRO, G.; EIRAS, M.; ZERBINI, F.M. Avanços e perspectivas no estudo das doenças virais e subvirais em videira com ênfase na realidade brasileira. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.22, p.160-207, 2014.
- 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, p.2249-2255, 2010a. DOI: 10.1590/S0103-84782010001100001.
- BASSO, M.F.; FAJARDO, T.V.M.; SANTOS, H.P.; GUERRA, C.C.; AYUB, R.A.; NICKEL, O. Fisiologia foliar e qualidade enológica da uva em videiras infectadas por vírus. **Tropical Plant Pathology**, v.35, p.351-359, 2010b. DOI: 10.1590/s1982-56762010000600003.
- BERTAZZON, N.; ANGELINI, E. Advances in the detection of *Grapevine leafroll-associated virus 2* variants. **Journal of Plant Pathology**, v.86, p.283-290, 2004.
- 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, p.379-385, 2015. DOI: 10.1590/0103-8478cr20140587.
- 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, p.158-165, 2013. DOI: 10.1590/S1982-56762013000200011.
- ESPINOZA, C.; VEGA, A.; MEDINA, C.; SCHLAUCH, K.; CRAMER, G.; ARCE-JOHNSON, P. Gene expression associated with compatible viral diseases in grapevine cultivars. **Functional and Integrative Genomics**, v.7, p.95-110, 2007. DOI: 10.1007/s10142-006-0031-6.
- FAJARDO, T.V.M.; EIRAS, M.; SANTOS, H.P.; NICKEL, O.; KUHN, G.B. Detecção e caracterização biológica e molecular de *Rupestris stem-pitting associated virus* e seu efeito na fotossíntese de videiras. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.209-214, 2004. DOI: 10.1590/S0100-41582004000200016.
- GAMBINO, G.; CUOZZO, D.; FASOLI, M.; PAGLIARANI, C.; VITALI, M.; BOCCACCI, P.; PEZZOTTI, M.; MANNINI, F. Co-evolution between *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* and *Vitis vinifera* L. leads to decreased defence responses and increased transcription of genes related to photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v.63, p.5919-5933, 2012. DOI: 10.1093/jxb/ers244.
- GIRIBALDI, M.; PURROTTI, M.; PACIFICO, D.; SANTINI, D.; MANNINI, F.; CACIAGLI, P.; ROLLE, L.; CAVALLARIN, L.; GIUFFRIDA, M.G.; MARZACHI, C. A multidisciplinary study on the effects of phloem-limited viruses on the agronomical performance and berry quality of *Vitis vinifera* cv. Nebbiolo. **Journal of Proteomics**, v.75, p.306-315, 2011. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.08.006.
- 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.
- MALIOGKA, V.I.; MARTELLI, G.P.; FUCHS, M.; KATIS, N.I. Control of viruses infecting grapevine. In: LOEBENSTEIN, G.; KATIS, N.I. (Ed.). **Control of plant virus diseases vegetatively-propagated crops**. Waltham: Academic Press: Elsevier, 2015. p.175-227. (Advances in Virus Research, 91). DOI: 10.1016/bs.aivir.2014.11.002.
- MANNINI, F.; MOLLO, A.; CREDI, R. Field performance and wine quality modification in a clone of *Vitis vinifera* cv. Dolcetto after GLRaV-3 elimination. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.63, p.144-147, 2012. DOI: 10.5344/ajev.2011.11020.
- MINAFRA, A.; HADIDI, A.; MARTELLI, G.P. Detection of grapevine closterovirus A in infected grapevine tissue by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Vitis**, v.31, p.221-227, 1992.
- NAIDU, R.; ROWHANI, A.; FUCHS, M.; GOLINO, D.; MARTELLI, G.P. Grapevine leafroll: a complex viral disease affecting a high-value fruit crop. **Plant Disease**, v.98, p.1172-1185, 2014. DOI: 10.1094/PDIS-08-13-0880-FE.
- OLIVER, J.E.; FUCHS, M. Tolerance and resistance to viruses and their vectors in *Vitis* sp.: a virologist's perspective of the literature. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.62, p.438-451, 2011. DOI: 10.5344/ajev.2011.11036.
- 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, p.22-29, 2007. DOI: 10.1016/j.jviromet.2006.11.035.
- 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. DOI: 10.1016/j.jviromet.2008.09.005.
- POOJARI, S.; ALABI, O.J.; NAIDU, R.A. Molecular characterization and impacts of a strain of *Grapevine leafroll-associated virus 2* causing asymptomatic infection in a wine grape cultivar. **Virology Journal**, v.10, article 324, 2013. DOI: 10.1186/1743-422X-10-324.
- RADAELLI, P.; FAJARDO, T.V.M.; NICKEL, O.; EIRAS, M.; PIO-RIBEIRO, G. Variabilidade do gene da proteína capsidial de três espécies virais que infectam videiras no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, v.34, p.297-305, 2009. DOI: 10.1590/S1982-56762009000500002.
- ROSA, C.; JIMENEZ, J.F.; MARGARIA, P.; ROWHANI, A. Symptomatology and effects of viruses associated with rugose wood complex on the growth of four different rootstocks. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.62, p.207-213, 2011. DOI: 10.5344/ajev.2011.10104.
- SAMBROOK, J.F.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. New York: CSHL Press, 2001. 999p.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, p.2731-2739, 2011. DOI: 10.1093/molbev/msr121.

Recebido em 7 de novembro de 2014 e aprovado em 27 de maio de 2015