

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO DE VARIANTES DE *GRAPEVINE FANLEAF VIRUS*
(*GFLV*), *ARABIS MOSAIC VIRUS* (*ARMV*) E RESPETIVOS RNAs SATÉLITES
PRESENTES EM CASTAS PORTUGUESAS DE *VITIS VINIFERA***

RITA ALEXANDRA FELICIANO DOS REIS

**Dissertação para obtenção do grau de mestre em:
Biologia Molecular e Microbiana**

**Trabalho efetuado sob a orientação de:
Professora Doutora Filomena Fonseca**

2015

CARACTERIZAÇÃO DE VARIANTES DE *GRAPEVINE FANLEAF VIRUS (GFLV)*,
ARABIS MOSAIC VIRUS (ARMV) E RESPECTIVOS RNAS SATÉLITES PRESENTES EM
CASTAS PORTUGUESAS DE *VITIS VINIFERA*

Declaração de autoria do trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalho consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Rita Alexandra Feliciano dos Reis

Direitos de cópia ou Copyright

© Copyright: Rita Alexandra Feliciano dos Reis

Após publicação do seu conteúdo em revistas da especialidade e de acordo com o ponto 4.2 do Anexo II a que se refere o ponto 2 do artigo 18º do Regulamento nº 287/2021 publicado em Diário da República, a 24 de Julho de 2012: A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço à minha orientadora, a professora doutora Filomena Fonseca, por esta oportunidade e por toda a paciência.

Agradeço também, a todo o pessoal do laboratório 1.73. Em especial aos meus colegas de bancada Vilma e Pedro, por terem lá estado sempre, sem ter sido preciso pedir. Pela amizade, apoio diário e pela partilha que fez daquele, o “nosso cantinho” por uns meses.

À Vilma por me ter ajudado a orientar-me no laboratório e por nunca ter pensado duas vezes antes de me ajudar. Por todas as gargalhadas e conversas sem sentido, e pela compreensão nos dias mais ventosos.

Ao Pedro, por tudo. Por me ter acompanhado durante todos estes anos. Por todos os bons momentos e por todas as vezes que tivemos a oportunidade de aprender juntos.

Um grande obrigada à minha mãe por sempre me ter deixado voar e por me ter permitido viver este sonho. E ao meu irmão, pelo exemplo de inspiração, por me fazer acreditar que nunca devemos deixar de fazer aquilo que realmente gostamos.

E aos meus amigos que mesmo longe estão sempre perto.

Resumo

Grapevine fanleaf virus, vírus do urticado ou nó-curto da videira e *Arabid mosaic virus* são dois *Nepovirus*, da família *Secoviridae* e ambos possuem um genoma bipartido de cadeia simples e sentido positivo. Além destes, foram detetados em alguns isolados de *ArMV* e *GFLV*, RNAs satélite de grande tamanho, satRNA do tipo B. Estes vírus encontram-se entre os principais agentes causadores do complexo de degenerescência da videira, uma das doenças virais mais devastadoras e dispersas pelo mundo, e estão incluídos no esquema de certificação da videira em vigor na União Europeia (Diretiva 68/193/CEE e Diretiva 2002/11/CE).

Neste trabalho, a presença de *Arabid mosaic virus* foi confirmada, através de métodos moleculares, em Portugal. Determinaram-se as relações filogenéticas das variantes de *GFLV* da “*homing protein*”, das proteínas do movimento, da cápside e da RNA polimerase RNA-dependente, de modo a caracterizar a diversidade genética de isolados de *GFLV* em Portugal. Determinou-se, também, a incidência e variabilidade de satRNA em isolados de *GFLV*.

O conhecimento da variabilidade genética permitirá melhorar as ferramentas de diagnóstico molecular e serológico, de modo a implementar um protocolo de deteção robusto adequado ao esquema de certificação em vigor no país.

Palavras-chave: *ArMV*, *GFLV*, videira, RNA satélite, deteção molecular, diversidade genética

Abstract

Grapevine fanleaf virus and *Arabis mosaic virus* are members of the genus *Nepovirus*, family *Secoviridae* and their genome is composed of two single-stranded positive-sense RNAs. Some *GFLV* and *ArMV* isolates contain large satellite RNAs, type B satRNA. Both viruses are responsible for grapevine infectious degeneration, the most damaging viral disease of grapevines, and are included in the grapevine certification scheme in European Union (Directive 68/193/EEC and Directive 2002/11/EC).

In this work, *ArMV* presence in Portugal was molecularly confirmed. Genetic relations of the homing protein, movement protein, coat protein and RNA polymerase RNA-dependent protein *GFLV* variants were determined aiming to characterize *GFLV* isolates genetic diversity in Portugal. satRNA incidence and variability were also determined in *GFLV* isolates.

Genetic variability knowledge will allow the improvement of molecular and serological detection tools in order to implement a stronger detection protocol according to grapevine certification scheme in this country.

Keywords: *ArMV*, *GFLV*, grapevine, satellite RNA, molecular detection, genetic diversity

ÍNDICE GERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
LISTA DE SIGNIFICADOS.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A videira (<i>Vitis vinífera</i> L.).....	1
1.1.1 Aplicações da videira.....	1
1.1.2 A videira em Portugal.....	1
1.2 Complexo da degenerescência da videira (CDV).....	2
1.2.1 Sintomas.....	2
1.2.2 Transmissão dos agentes causadores de CDV.....	3
1.3 Agentes causais do CDV (<i>GFLV</i> e <i>ArMV</i>).....	4
1.3.1 Genoma.....	4
1.3.2 Recombinação e determinantes sintomatológicos.....	5
1.3.3 Detecção de rotina.....	7
1.3.4 Sequências disponíveis em GenBank.....	7
1.4 <i>GFLV</i> e <i>ArMV</i> em castas portuguesas.....	10
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1 Fonte de vírus.....	12
3.2 Amostragem das plantas.....	12
3.3 Extração de RNA total.....	13
3.4 Síntese de cDNA.....	13
3.5 Seleção e design de primers.....	14
3.6 Reações de PCR e verificação de amplificação.....	17
3.7 Clonagem.....	19
3.8 Análise de Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP).....	20
3.9 Extração de pDNA (Miniprep), restrição e sequenciação.....	21
3.10 Análise <i>in silico</i>	21
4. RESULTADOS.....	23
4.1 Desenho de primers.....	23
4.2 Evidência molecular da presença de <i>ArMV</i> em Portugal: isolado CS30404.....	25
4.2.1 Proteína da Cápside.....	25
4.2.2 RNA polimerase RNA-dependente (RdRp).....	28
4.2.3 RNA satélite (satRNA).....	30
4.3 Caracterização de variabilidade genómica de <i>GFLV</i> nos isolados portugueses.....	31
4.3.1 “Homing protein” (HP).....	32
4.3.2 Proteína do movimento (MP).....	37

4.3.3 Proteína da Cápside (CP).....	40
4.3.4 RNA polimerase RNA-dependente (RdRp).....	44
4.3.5 Detecção de recombinação em variantes de <i>GFLV</i>	49
4.3.6 Pressões seletivas nas diferentes regiões codantes.....	52
4.4 Detecção e caracterização da variabilidade do RNA satélite nos isolados portugueses.....	54
4.5 Determinante da sintomatologia: HP?.....	60
5. DISCUSSÃO.....	64
6. CONCLUSÕES.....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.Exemplos de sintomas do complexo de degenerescência da videira. A e B: malformações e mosaico nas folhas. C e D: malformações nas folhas E: comparação entre uma vara saudável (esquerda) com varas com diversas malformações, entre-nós curtos, duplos e com crescimento em ziguezague. F: desenvolvimento desigual dos bagos de uva em crescimento em videiras infetadas. G: comparação entre um cacho de uma videira saudável (esquerda) com um cacho de uma videira infetada com <i>GFLV</i> onde se observam bagos em diferentes estados de maturação (adaptado de: Maliogka et al., 2015 e Mekuria et al., 2009).....	3
Figura 2.Genoma de <i>ArMV</i> e <i>GFLV</i> . RNA1 composto por: cofactor da protease (1A), helicase (1B ^{Hel}), proteína de ligação ao genoma (1C ^{VPg}), protease (1D ^{Pro}) e RNA polimerase dependente de RNA (1E ^{Pol}) e RNA2 composto por: “homing protein” (2A ^{HP}), proteína do movimento (2B ^{MP}) e proteína da cápside (2C ^{CP}). Os dois RNA encontram-se ligados à VPg em 5’ e possuem uma cauda de poli-(A) em 3’ (adaptado de: Mekuria et al., 2009).....	4
Figura 3.Alinhamento de sequências completas de RNA1 e de sequências parciais da RdRp de <i>GFLV</i> . Destacado a azul encontra-se o fragmento correspondente ao primer forward desenhado, <i>GFLV</i> 5072U16: 5’-AAAGGGAAAGGCGAGA-3’. Todas as sequências foram retiradas de GenBank e encontram-se identificadas pelo número de acesso e pelo nome. A numeração dos nucleótidos é dada pela sequência NC003615.....	23
Figura 4.Alinhamento de sequências completas de RNA1 e de sequências parciais da RdRp de <i>GFLV</i> . Destacado a azul encontra-se o local correspondente ao primer reverse desenhado, <i>GFLV</i> 5867L19: 5’-GGCTGGAATAGTGGAAAGA-3’. Todas as sequências foram retiradas de GenBank e encontram-se identificadas pelo número de acesso e pelo nome. A numeração dos nucleótidos é dada pela sequência NC003615.....	24
Figura 5.Alinhamento de sequências completas de RNA1 e sequências parciais da RdRp de <i>ArMV</i> e da sequência referência de RNA1 de <i>GFLV</i> . Destacado a azul encontra-se o fragmento correspondente ao primer forward desenhado para a RdRp de <i>GFLV</i> , <i>GFLV</i> 5072U16 e a verde encontra-se o fragmento correspondente ao primer forward desenhado para <i>ArMV</i> , <i>ArMV</i> 5097U20: 5’- GAATTTGTGCCTGGGTGTGG-3’. Todas as sequências foram retiradas de GenBank e encontram-se identificadas pelo número de acesso e pelo nome. A numeração dos nucleótidos é dada pela sequência NC006057.....	24

Figura 6. Alinhamento de sequências completas de RNA1 e de sequências parciais da RdRp de <i>ArMV</i> e a sequência referência de RNA1 de <i>GFLV</i> . Destacado a azul encontra-se o local correspondente ao primer reverse desenhado para a RdRp de <i>GFLV</i> , GFLV 5867L19 e a verde encontra-se o local correspondente ao primer reverse desenhado, <i>ArMV</i> 5850L17: 5'-GCTGGAATTGTGGCAAG-3'. Todas as sequências foram retiradas de GenBank e encontram-se identificadas pelo número de acesso e pelo nome. A numeração dos nucleótidos é dada pela sequência NC006057.....	25
Figura 7. Alinhamento de sequências parciais da proteína da cápside de <i>ArMV</i> . O isolado português encontra-se identificado pelo nome - CS30404 - e as sequências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso. A numeração dos nucleótidos é dada pela sequência NC006056.....	27
Figura 8. Dendrograma construído com base nas sequências nucleotídicas parciais da RNA polimerase RNA-dependente utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 75% de valor de bootstrap foram colapsados. As sequências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.....	29
Figura 9. Dendrograma construído com base nas sequências parciais de aminoácidos da RNA polimerase RNA-dependente utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 75% de valor de bootstrap foram colapsados. As sequências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.....	30
Figura 10. Dendrograma construído com base nas sequências nucleotídicas do satRNA utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 95% de valor de bootstrap foram colapsados. As sequências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.....	31
Figura 11. Dendrograma construído com base nas sequências de aminoácidos do satRNA utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 95% de valor de bootstrap foram colapsados. As sequências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.....	31
Figura 12. Dendrograma construído com base nas sequências nucleotídicas da “ <i>homing protein</i> ” utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 50% de valor de bootstrap foram colapsados. As sequências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.....	34
Figura 13. Dendrograma construído com base nas sequências de aminoácidos da “ <i>homing protein</i> ” utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 50% de valor de bootstrap foram colapsados. As sequências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.....	35

Figura 14. Dendrograma construído com base nas sequências de nucleótidos da proteína do movimento utilizando o método de Maximum-Likelihood com 1000 replicações de bootstrap. Ramos com menos de 50% de valor de bootstrap foram colapsados. As sequências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso...	38
Figura 15. Dendrograma construído com base nas sequências de aminoácidos da proteína do movimento utilizando o método de Maximum-Likelihood com 1000 replicações de bootstrap. Ramos com menos de 50% de valor de bootstrap foram colapsados. As sequências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso...	39
Figura 16. Dendrograma construído com base nas sequências de nucleótidos da proteína da cápside utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 50% de valor de bootstrap foram colapsados. As sequências obtidas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.....	42
Figura 17. Dendrograma construído com base nas sequências de aminoácidos da proteína da cápside utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 50% de valor de bootstrap foram colapsados. As sequências obtidas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.....	43
Figura 18. A – Exemplo da verificação de amplificação por PCR dum fragmento de 813 bp do gene da RdRp de <i>GFLV</i> (gel de agarose 1,5% em TAE 1x, corado com brometo de etídeo). B – Exemplo da verificação da presença do fragmento de 813nt no plasmídeo, com resultados positivos para todas as colónias (gel de agarose 1,5% em TAE 1x, corado com GreenSafe). 19340203, A3 e Syrah: amostras testadas; C- : controlo negativo do PCR; M: marcador de peso molecular 100bp plus, Números de 1 a 16 – colónias testadas para o isolado A3.....	44
Figura 19. A - Padrões de SSCP obtidos para clones do isolado A3, foram considerados padrões diferentes: 2, 4, 10 e 15. B – Exemplo da verificação do fragmento de 813 bp no plasmídeo através do padrão de restrição com uma endonuclease, previamente à sequenciação (Gel de agarose 1% em TAE 1x, corado em brometo de etídeo).....	45
Figura 20. Dendrograma construído com base nas sequências de nucleótidos da RNA polimerase RNA-dependente utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 50% de valor de bootstrap foram colapsados. As sequências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.....	47
Figura 21. Dendrograma construído com base nas sequências de aminoácidos da RNA polimerase RNA-dependente utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 50% de valor de bootstrap foram colapsados. As sequências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.....	48

Figura 22.A – Exemplo de verificação de detecção por PCR de RNA satélite com dois pares de primers (gel de agarose 1,5% em TAE 1x, corado com brometo de etídeo) B – Exemplo da verificação da presença do fragmento inserido no plasmídeo para colônias amplificadas com NepSatF+NepSatR e colônias amplificadas com GFLV satRNA 174F + GFLV satRNA RACE GSP4 (gel de agarose 1,5% em TAE 1x, corado com Greensafe); C-: controlo negativo; M: marcador de peso molecular 100bp plus.....	54
Figura 23.Padrões de SSCP obtidos para o isolado 6230401, foram considerados padrões diferentes: 5, 6, 7, 12, 13, 14 e 15. B – Exemplo da verificação da presença dos fragmentos correspondentes à amplificação com NEpSatF+NepSatR e GFLVsatRNA 174F+GFLV satRNA RACE GSP4 nos plasmídeos, previamente à sequenciação (gel de agarose 1% em TAE 1x, corado em brometo de etídeo) M: marcador de peso molecular 100bp plus.....	55
Figura 24.Dendrograma construído com base nas sequências de nucleótidos do RNA satélite utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 75% de valor de bootstrap foram colapsados. As sequências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.....	58
Figura 25.Dendrograma construído com base nas sequências de aminoácidos do RNA satélite utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 50% de valor de bootstrap foram colapsados. As sequências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.....	59
Figura 26.Dendrograma construído com base nas sequências de nucleótidos da “ <i>homing protein</i> ” utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 75% de valor de bootstrap foram colapsados. As sequências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso. São mostrados os sintomas de 9 das 11 plantas de onde se obtiveram os isolados deste trabalho.....	62
Figura 27.Dendrograma construído com base em sequências parciais de aminoácidos da “ <i>homing protein</i> ” utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 75% de valor de bootstrap foram colapsados. As sequências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.....	63

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela I. Isolados de <i>Arabidopsis mosaic virus</i> com as sequências completas de RNA1, RNA2 ou satRNA disponíveis em GenBank. As amostras encontram-se caracterizadas pelo nome do isolado e respetivo hospedeiro. O isolado ArMV-ba possui a sequência completa do RNA satélite do Tipo D (satRNA mais pequeno).....	8
Tabela II. Isolados de <i>Grapevine fanleaf virus</i> com as sequências completas do RNA1, RNA2 ou satRNA disponíveis em GenBank. As amostras encontram-se caracterizadas pelo nome do isolado e respetivo hospedeiro.....	9
Tabela III. Constituição do tampão de extração (MacKenzie et al., 1997).....	13
Tabela IV. Pares de primers utilizados na reacção de PCR para a amplificação específica de fragmentos de RNA1, RNA2 e satRNA de <i>ArMV</i> e <i>GFLV</i>	15
Tabela V. Reagentes utilizados na reacção de PCR.....	17
Tabela VI. Protocolos de PCR específicos para cada par de primers.....	18
Tabela VII. Protocolo de PCR de colónias.....	19
Tabela VIII. Constituição do gel de poliacrilamida 8% para SSCP.....	20
Tabela IX. Primers utilizados nas reacções de PCR para a amplificação específica de fragmentos parciais do RNA1, RNA2 e satRNA de <i>ArMV</i> no isolado português CS30404.....	28
Tabela X. Isolados portugueses usados nas análises filogenéticas da HP, MP, CP e RdRp.....	32
Tabela XI. Avaliação da divergência evolutiva média intragrupo (d) entre pares de sequências de diferentes genes codificados no RNA1 ou no RNA2 de <i>Grapevine fanleaf virus</i>	36
Tabela XII. Avaliação da divergência evolutiva média entre os grupos filogenéticos determinados para as variantes nucleotídicas do gene da proteína da cápside (CP) de <i>Grapevine fanleaf virus</i>	44
Tabela XIII. Eventos putativos de recombinação intragénica ^a em variantes de diferentes genes codificados no RNA1 ou no RNA2 de <i>Grapevine fanleaf virus</i>	50
Tabela XIV. Avaliação das pressões de seleção atuantes em diferentes genes codificados no RNA1 ou no RNA2 de <i>Grapevine fanleaf virus</i>	53
Tabela XV. Isolados portugueses usados na análise filogenética do satRNA.....	54
Tabela XVI. Avaliação da divergência evolutiva média intragrupo (d) entre pares de sequências de RNA satélite de <i>Nepovirus</i>	56

Tabela XVII.Avaliação da divergência evolutiva média entre os grupos filogenéticos determinados para as variantes nucleotídicas do RNA satélite de <i>Nepovirus</i>	57
Tabela XVIII.Isolados portugueses e respectivos sintomas.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

+ssRNA1	Ácido ribonucleico1 de cadeia simples e sentido positivo
+ssRNA2	Ácido ribonucleico2 de cadeia simples e sentido positivo
1A	Cofactor da proteinase
1B ^{Hel}	Helicase
1C ^{VPg} e VPg	Proteína de ligação ao genoma
1D ^{Pro}	Proteinase
1E ^{Pol} e RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
2A ^{HP} e HP	“ <i>homing protein</i> ”
2B ^{MP} e MP	Proteína do movimento
2C ^{CP} e CP	Proteína da cápside
3'UTR	<i>3' untranslated region</i>
APS	Persulfato de amónia
<i>ArMV</i>	<i>Arabidopsis mosaic virus</i>
CAN	Coleção Ampelográfica Nacional
cDNA	DNA complementar
CDV	Complexo de degenerescência da videira
DAS-ELISA	<i>Double-Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EAN	Estação Agronómica Nacional
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
UE	União Europeia
GDefV	<i>Grapevine deformation virus</i>
<i>GFLV</i>	<i>Grapevine fanleaf virus</i>
ICVG	<i>International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine</i>
INIAV	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>

LB	<i>Lysogeny broth ou Luria Broth</i>
MF	<i>Infectious malformation</i> ou malformação infecciosa
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NTP	<i>Nucleoside triphosphate</i> , domínio de ligação a nucleótidos
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pDNA	Ácido desoxirribonucleico plasmídico
PVP	<i>Polyvinylpyrrolidone</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNAsat e satRNA	Ácido ribonucleico satélite
RNase	Ribonuclease
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
SOC	<i>Super optimal broth with catabolite repression</i>
SSCP	<i>Single-Strand Conformation Polymorphism</i>
TAE	Tris-acetate-EDTA
TBE	Tris-Borate-EDTA
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
UV	Luz ultravioleta
VSR	<i>Virus-encoded supressor of RNA silencing</i>
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo
YM	<i>Yellow mosaic</i> , mosaico ou clorose infecciosa

LISTA DE SIGNIFICADOS

Primer	Pequena sequência nucleotídica que hibrida com o cDNA e disponibiliza a sua região 3' para ponto de partida da síntese de DNA pela DNA polimerase.
Primer forward	Primer de sentido direto
Primer reverse	Primer de sentido inverso
Taq polimerase	Polimerase termoestável utilizada na amplificação de fragmentos por PCR.
Reverse Transcriptase M-MuLV RT	Enzima recombinante que possui uma atividade polimerase RNA e DNA dependente e uma atividade específica como RNase para o RNA hibridado com DNA.
RiboLock RNase Inhibitor	Inibidor da atividade das RNases A, B e C através de uma ligação de um modo não-competitivo numa razão de 1:1.
EcoRI	Enzima de restrição que reconhece e corta locais G ^A AATTC.
XhoI	Enzima de restrição que reconhece e corta locais C ^A TCGAG.
XbaI	Enzima de restrição que reconhece e corta locais T ^A CTAGA.
<i>Proofreading</i>	Capacidade de autocorreção de erros que algumas polimerases possuem.
Oligo d(T)	Pequena sequência de nucleótidos complementar à cauda de poli-A que fornecem um OH-3' livre para transcrição reversa da molécula de RNA com formação de cDNA.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A videira (*Vitis vinifera* L.)

A espécie *Vitis vinifera* L., pertencente à família *Vitaceae*, divide-se em duas subespécies classificadas de acordo com a sua morfologia: a subespécie cultivada *Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera* (ou *sativa*) L. e a subespécie selvagem *Vitis vinifera* L. ssp. *sylvestris* (C.C.Gmel.) Hegi (Keller, 2015; Maliogka *et al.*, 2015). A característica diferenciadora mais marcante é, provavelmente, o tipo de sistema de reprodução sexuada: a primeira apresenta flores bissexuadas (com gineceu e androceu) e capacidade de autopolinização, enquanto a segunda é uma subespécie dioica. No entanto, esta diferença entre características morfológicas poderá ser devida aos processos de domesticação da subespécie *sylvestris* pelo Homem, uma vez que a seleção para flores bissexuais assegura a produção de fruta por cada indivíduo, e, por isso, a distinção em duas subespécies é bastante contestada (This *et al.*, 2006).

1.1.1 Aplicações da videira

A videira (*Vitis vinifera* L.) é uma das plantas de fruto mais cultivada em todo o mundo (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013). A maioria dos cachos de uva destinam-se à produção de vinho (castas para a produção de vinho), no entanto estes também são consumidos como uvas de mesa (castas para a produção de uva de mesa), frutos secos (passas) e em sumos e doces (geleias) de uva (Reisch *et al.*, 2012). Extratos e alguns dos componentes presentes em folhas, grainhas, polpa e pele de uva são também utilizados na medicina tradicional para o tratamento de feridas (Farzaei *et al.*, 2014), na indústria cosmética em cremes hidratantes e tónicos (Wittenauer *et al.*, 2015; Fiume *et al.*, 2014), em suplementos alimentares (Monagas *et al.*, 2006) e como corantes na indústria alimentar (Bridle e Timberlake, 1997). Além disso, as aplicações deste tipo de substâncias têm vindo a ser testadas na indústria farmacêutica (Sangiovanni *et al.*, 2015; Almajwal e Elsadek, 2015).

1.1.2 A videira em Portugal

A videira é cultivada de norte a sul do país, incluindo nas regiões autónomas da Madeira e dos Açores. No ano de 2014 foram plantados 176884 hectares de vinha para a produção de

vinho e 2102 hectares de vinhas destinadas à produção de uva de mesa. (Instituto Nacional de Estatística, 2015; Serviço Regional de Estatística dos Açores, 2014). Em Portugal, nos últimos dez anos, foram produzidos em média 6,5 milhões de hectolitros de vinho por ano (Instituto da Vinha e do Vinho, I.P., 2015). Na campanha de 2013/2014, Portugal foi o 5º maior produtor europeu de vinho e o 11º a nível mundial, com um valor de produção ligeiramente acima dos 6 milhões de hectolitros de vinho (Instituto da Vinha e do Vinho, I.P., 2015). No ano de 2014, foram exportados cerca de 3 milhões de hectolitros de vinho (Instituto da Vinha e do Vinho, I.P., 2015). Entre 2004 e 2014, o país produziu uma média de aproximadamente 32 mil toneladas de uva de mesa por ano (Instituto Nacional de Estatística, I.P., 2015). E em 2013, cerca de 5,2 mil toneladas de uva de mesa foram exportadas (Instituto Nacional de Estatística, 2015).

1.2 Complexo da degenerescência da videira (CDV)

O *International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine* (ICVG) reconhece a existência de mais de setenta agentes infecciosos capazes de afetar a videira, dos quais sessenta e cinco são vírus (Martelli, 2014). Entre as várias doenças que estes provocam na videira encontra-se o complexo de degenerescência da videira, uma das doenças virais mais devastadoras e dispersas por todo o mundo, responsável por perdas que podem atingir até mais de 80% das culturas (Andret-Link *et al.*, 2004a). *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) e *Arabis mosaic virus* (ArMV) encontram-se entre os principais agentes causadores do complexo de degenerescência da videira (Martelli, 2014).

1.2.1 Sintomas

O complexo de degenerescência da videira é caracterizado por dois tipos de sintomas: *infectious malformation* (MF ou malformação infecciosa) induzida por estirpes causadoras de malformação e *yellow mosaic* (YM, mosaico ou clorose infecciosa) induzido pelas estirpes cromogénicas (Figura 1). A malformação infecciosa caracteriza-se pelo aparecimento de várias malformações na planta, nomeadamente folhas mais pequenas, assimétricas, com o seio peciolar muito aberto e recortes profundos, e sarmentos com entre-nós curtos, nós duplos, crescimento em ziguezague dos entre-nós e presença de fasciação (Maliogka *et al.*, 2015; Martelli, 2014). No caso da clorose infecciosa, os sintomas mais evidentes são o amarelecimento total ou parcial da planta, o aparecimento de mosaico nas folhas com aspetos

e tamanho bastante variáveis no início da primavera, e uma diminuição do tamanho e do número de cachos com bagos de uva em diferentes estados de maturação. A observação de cachos com bagos de uva em diferentes estados de maturação pode ser feita desde o início do seu desenvolvimento até à altura da vindima (Figura 1-F e G) (Maliogka *et al.*, 2015; Martelli, 2014).

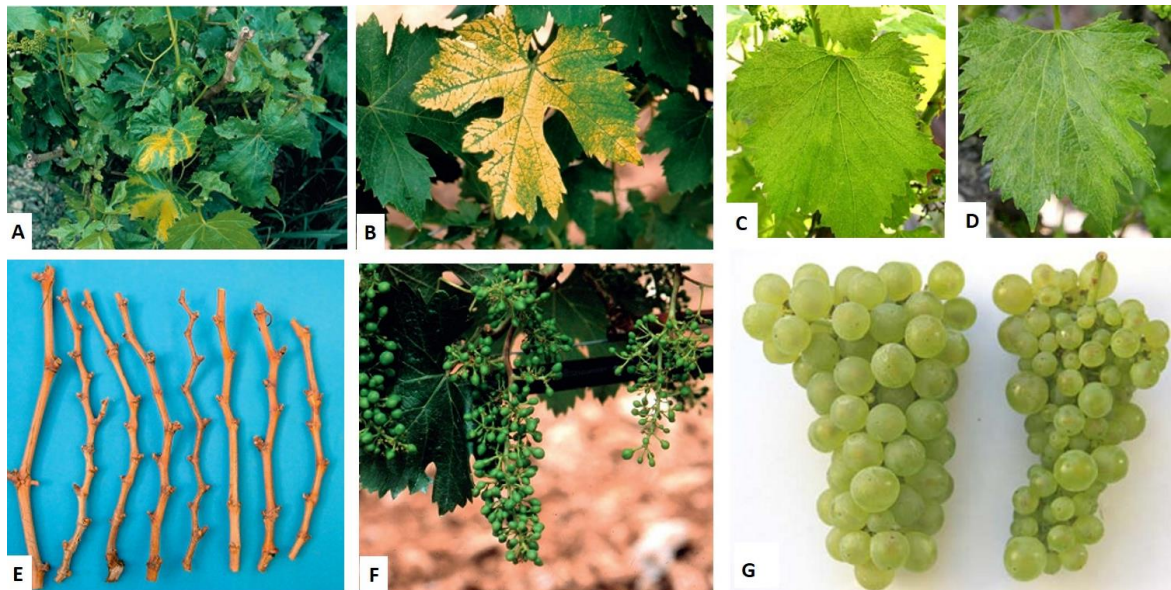


Figura 1. Exemplos de sintomas do complexo de degenerescência da videira. A e B: malformações e mosaico nas folhas. C e D: malformações nas folhas. E: comparação entre uma vara saudável (esquerda) com varas com diversas malformações, entre-nós curtos, duplos e com crescimento em ziguezague. F: desenvolvimento desigual dos bagos de uva em crescimento em videiras infetadas. G: comparação entre um cacho de uma videira saudável (esquerda) com um cacho de uma videira infetada com *GFLV* onde se observam bagos em diferentes estados de maturação (adaptado de: Maliogka *et al.*, 2015 e Mekuria *et al.*, 2009).

1.2.2 Transmissão dos agentes causadores de CDV

A transmissão de *GFLV* e de *ArMV* entre videiras efetua-se através dos nemátodes ectoparasitas *Xiphinema index* Thorne & Allen e *Xiphinema diversicaudatum* (Micoletzky) Thorne, respectivamente (Marmonier *et al.*, 2010; Schellenberger *et al.*, 2010). A transmissão de cada vírus pelo respetivo vetor nemátode é determinada especificamente pela proteína da cápside (CP) em ambos os casos (Marmonier *et al.*, 2010; Schellenberger *et al.*, 2010; Andret-Link *et al.*, 2004b). *GFLV* e *ArMV* também podem ser facilmente disseminados através de propagação vegetativa ou de enxertias (Maliogka *et al.*, 2015). Uma vez estabelecida a infeção inicial é difícil erradicar os vírus e os seus vetores de transmissão,

visto que ambas as espécies de nemátodes podem manter as partículas virais com capacidade infecciosa associadas a locais de retenção no seu interior durante longos períodos de tempo (Maliogka *et al.*, 2015). Estes vírus não estão restritos ao floema podendo também invadir as células do mesofilo das folhas (Kalasjan *et al.*, 1979).

1.3 Agentes causais do CDV (*GFLV* e *ArMV*)

1.3.1 Genoma

Grapevine fanleaf virus, vírus do urticado ou nó-curto da videira e *Arabidopsis mosaic virus* são membros do subgrupo A do género *Nepovirus*, família *Secoviridae* (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2014) e ambos possuem um genoma bipartido de cadeia simples e sentido positivo, +ssRNA1 e +ssRNA2. (revisado por: Sanfaçon, 2008). Os dois RNA são monocistrónicos e encontram-se poliadenilados na extremidade 3' e ligados a uma pequena proteína, VPg, em 5' (Pinck *et al.*, 1991). O RNA1 (aproximadamente 7,4 kb) de *GFLV* e *ArMV* codifica para um polipéptido que é processado proteoliticamente pela protease viral, codificada pelo próprio RNA1, em cinco proteínas (Figura 2): cofactor da protease (1A), helicase (1B^{Hel}), proteína de ligação ao genoma (1C^{VPg}), protease (1D^{Pro}) e RNA polimerase dependente de RNA (1E^{Pol}). O RNA2 (aproximadamente 3,8 kb) codifica para um único polipéptido que também é clivado pela protease codificada no RNA1, em 3 proteínas individuais (Figura 2): “homing protein” (2A^{HP}), proteína do movimento (2B^{MP}) e proteína da cápside (2C^{CP}) (revisado por: Sanfaçon, 2008).

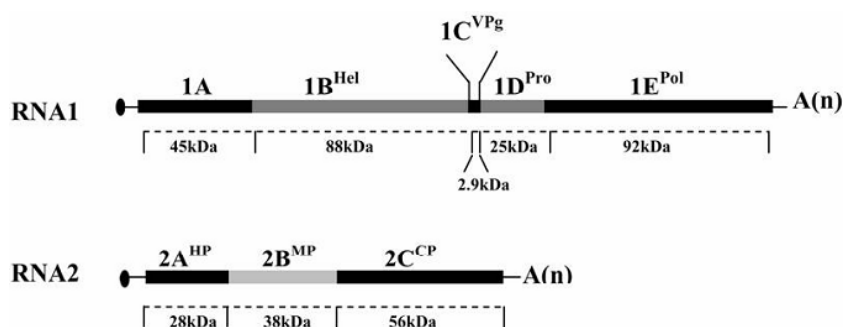


Figura 2. Genoma de *ArMV* e *GFLV*. RNA1 composto por: cofactor da protease (1A), helicase (1B^{Hel}), proteína de ligação ao genoma (1C^{VPg}), protease (1D^{Pro}) e RNA polimerase dependente de RNA (1E^{Pol}) e RNA2 composto por: “homing protein” (2A^{HP}), proteína do movimento (2B^{MP}) e proteína da cápside (2C^{CP}). Os dois RNA encontram-se ligados à VPg em 5' e possuem uma cauda de poli-(A) em 3'. (adaptado de: Mekuria *et al.*, 2009).

Por comparação da região N-terminal de vários nepovírus concluiu-se que a proteína 1A deverá ser um cofator da protease e pelo facto da proteína 1B^{Hel} conter um domínio de ligação NTP, pensa-se que esta desempenhe o papel de helicase (Ritzenthaler *et al.*, 1991). A proteína 1C^{VPg} liga-se à extremidade 5' de ambos os RNA e interage com a maquinaria para iniciar a replicação ou tradução (Pinck *et al.*, 1991; Jiang e Laliberté, 2011). A proteína 1D^{Pro} é a protease responsável pelo processamento dos polipéptidos produzidos a partir do RNA1 e RNA2, como já foi referido, e 1E^{Pol} é a RNA polimerase dependente de RNA responsável pela replicação do genoma (Ritzenthaler *et al.*, 1991). A proteína 2A^{HP} atua como uma “*homing protein*”, uma vez que se pensa que esta seja responsável pelo “transporte” do RNA2 para os locais de replicação do vírus (Gaire *et al.*, 1999). A proteína do movimento (2B^{MP}) é um dos constituintes das estruturas tubulares que permitem a progressão do vírus entre células (Ritzenthaler *et al.*, 1995) e 2C^{CP} é a proteína constituinte da cápside viral (Quacquarelli *et al.*, 1976).

O RNA1 e RNA2 são encapsidados separadamente (as partículas M contém apenas RNA2 e as partículas B contém os dois RNA) e, juntamente com as partículas T (vazias), formam uma estrutura encapsidada icosaédrica de, aproximadamente, 30 nm de diâmetro (Quacquarelli *et al.*, 1976). Ambos os RNA são necessários para a infeção sistémica do hospedeiro (Quacquarelli *et al.*, 1976).

Para além do RNA1 e RNA2, foram detetados em alguns isolados de *GFLV* (Fuchs *et al.*, 1989; Gottula *et al.*, 2013; Lamprecht *et al.*, 2013) e *ArMV* (Liu *et al.*, 1990; Wetzel *et al.*, 2006) moléculas de RNA satélite de grande tamanho, satRNA tipo B. Os satRNA do tipo B (aproximadamente 1,1 kb) dependem do genoma viral para a sua replicação e encapsidação (Pinck *et al.*, 1988). Assim como o RNA1 e RNA2, o satRNA do tipo B também se encontra ligado a uma proteína VPg em 5' e poliadenilado na extremidade 3', no entanto, a função da proteína codificada por estas partículas ainda não foi identificada (Pinck *et al.*, 1988). Associado a isolados de *ArMV* também foram detetados RNA satélite de menor tamanho, satRNA do tipo D (Marmonier *et al.*, 2009).

1.3.2 Recombinação e determinantes sintomatológicos

A recombinação de RNA é um dos mecanismos implicados no processo evolutivo dos vírus de plantas e considerado frequente no caso de *GFLV* e *ArMV*, com evidência de

recombinação intra (Mekuria *et al.*, 2009; Pompe-Novak *et al.*, 2007; Vigne *et al.*, 2004) e interespecífica (Oliver *et al.*, 2010; Jawhar *et al.*, 2009; Mekuria *et al.*, 2009; Vigne *et al.*, 2008). Alguns locais do genoma destes vírus estão mais sujeitos a recombinação, nomeadamente a região terminal 5' do RNA2 (Vigne *et al.*, 2008). A exceção é o caso da origem do *Grapevine deformation virus* (GDefV), cujo genoma evidencia ser um recombinante interespecífico entre *GFLV* e *ArMV* ao nível da região codante da CP (Elbeaino *et al.*, 2012). Este vírus foi descoberto na Turquia, em 2003, de um isolado de *Vitis vinifera* cultivar Dimrit. A sintomatologia associada à videira é a típica de infeção por *GFLV* enquanto em hospedeiro herbáceo, este vírus induz sintomas semelhantes a *ArMV* e *GFLV*, incluindo a existência de lesões cloróticas ou necróticas e malformações nas folhas.

A variabilidade genética associada a este vírus, principalmente ao nível da HP, tem sido referida como um possível responsável pelos sintomas expressos em videiras infetadas (García-Arenal *et al.*, 2001).

Recentemente foi sugerido que, em espécies de *Nicotiana* que servem de hospedeiro herbáceo a *GFLV*, o determinante sintomatológico parece ser o segmento distal de 408 nt da RNA polimerase dependente de RNA (1E^{Pol} ou RdRp), para diferentes estirpes daquele vírus (Vigne *et al.*, 2013). A construção de RNA1 e RNA2 quiméricos a partir dos isolados GHu e F13 permitiu verificar que a região 3' da RdRp do isolado GHu determina a existência de sintomas em *N. benthamiana* e *N. clevelandii*, já que todos os RNA1 quiméricos contendo a totalidade ou uma região 3' parcial da RdRp de GHu induziram sintomas em ambos os hospedeiros herbáceos. No entanto, esta região não parece atuar como um supressor do silenciamento, *virus-encoded supressor of RNA silencing* (VSR), nem que seja necessário haver processamento proteolítico para a indução de sintomas, como se verifica no caso do *Tomato ringspot virus* (Chisholm *et al.*, 2007). Contraditoriamente outros autores sugerem um segmento N-terminal de 469 nt da “homing protein” (2A^{HP}) como discriminante entre estirpes causadoras de malformação e de clorose (Elbeaino *et al.*, 2014). Segundo Elbeaino *et al.*, (2014) o fator diferenciador entre as estirpes cromogénicas e as indutoras de malformação reside na existência de certos motivos de aminoácidos conservados entre as sequências provenientes de isolados cujo hospedeiro revela sintomas de malformação, que não existem nas restantes sequências de estirpes causadores de clorose. Estes autores afirmam também que as sequências de aminoácidos das estirpes causadores de clorose se dividem em três grupos tendo em conta os tipos de resíduos que são conservados em apenas alguns isolados. Assim, o dendrograma produzido a partir do alinhamento de sequências de

aminoácidos divide-se em quatro grupos: três grupos contendo isolados de estirpes indutoras de clorose e um grupo contendo as sequências de estirpes indutoras de malformação.

Além da confirmação da presença de vírus numa cultura através da observação de sintomas *in loco* ou pelo resultado positivo de testes serológicos, é importante determinar molecularmente qual a variante viral presente. Isto de modo a poder prever a evolução da doença e também desenvolver e implementar protocolos de deteção molecular que permitam uma deteção mais rápida (devido à maior sensibilidade deste tipo de análise) e, assim, uma atuação mais expedita no sentido de conter a infeção e de impedir o alastramento para videiras vizinhas através dos vetores conhecidos. O conhecimento das variantes de um determinado vírus também permitirá a aplicação de medidas de prevenção impossibilitando ou, pelo menos, diminuindo a taxa de infeção viral da videira.

1.3.3 Deteção de rotina

GFLV e *ARMV* estão incluídos no esquema de certificação da videira em vigor na União Europeia (Diretiva 68/193/CEE e Diretiva 2002/11/CE) e a deteção de rotina de ambos é realizada por DAS-ELISA com anticorpos comerciais tendo como alvo a proteína da cápside ou por RT-PCR (Maliogka *et al.*, 2015; Martelli, 2014). A proteína CP foi identificada como sendo fundamental para o processo de transmissão de *GFLV* e *ArMV* pelos respetivos vetores nematodes (Marmonier *et al.*, 2010; Schellenberger *et al.*, 2010; Andret-Link *et al.*, 2004b), encapsidação dos RNA genómicos (Quacquarelli *et al.*, 1976) e progressão sistémica dos vírus no hospedeiro através da interação que estabelece com a proteína do movimento permitindo que as partículas virais sejam transportadas entre células (Callaway *et al.*, 2001).

1.3.4 Sequências disponíveis em GenBank

A caracterização da diversidade molecular de *GFLV* e de *ArMV* e respetivas relações filogenéticas têm sido realizadas, sobretudo, com base no RNA2 e a informação sobre outras regiões do genoma é relativamente reduzida (Oliver *et al.*, 2010).

Das 112 sequências de *Arabis mosaic virus* presentes em GenBank (até 10/09/2015), existem apenas 11 sequências completas obtidas de isolados de videira. Desta centena de sequências, a maioria são fragmentos parciais ou a região codante inteira da proteína da cápside. *ArMV-NW* é o único isolado de videira que possui as sequências do RNA1, RNA2 e satRNA

completas (Wetzel *et al.*, 2001, 2004, 2006). O isolado ArMV-S possui duas sequências completas de RNA2 (Loudes *et al.*, 1995) e ArMV-Ta possui uma sequência completa de RNA2 (Vigne *et al.*, 2008). Para o isolado ArMV-DU13 estão disponíveis as sequências completas do RNA1 e RNA2 (López-Fabuel *et al.*, 2013). Os isolados ArMV-P119, ArMV-P116 e ArMV-J86 possuem a sequência completa para o RNA satélite (Wetzel *et al.*, 2006). Além destas, existem sete isolados cujo hospedeiro não é a videira e cujas sequências completas de RNA1, RNA2 ou satRNA se encontram disponíveis na plataforma do GenBank. Os isolados ArMV-lily, ArMV-narcissus e ArMV-butterbur apenas têm disponível a sequência completa do RNA2 (Imura *et al.*, 2008). ArMV-Lv possui as sequências de RNA1 e RNA2 completas (Dupuis *et al.*, 2008) e ArMV-hop e ArMV-lilac têm a sequência de satRNA completa (Wetzel *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 1990). O isolado ArMV-ba é o único que possui a sequência completa para o RNA1, RNA2 e satRNA do tipo D (Marmonier *et al.*, 2009) (Tabela I).

Tabela I. Isolados de *Arabis mosaic virus* com as sequências completas de RNA1, RNA2 ou satRNA disponíveis em GenBank. As amostras encontram-se caracterizadas pelo nome do isolado e respetivo hospedeiro. O isolado ArMV-ba possui a sequência completa do RNA satélite do Tipo D (satRNA mais pequeno).

Hospedeiro	Isolado	RNA1	RNA2	satRNA
<i>Vitis vinifera</i> L.	ArMV-NW	✓	✓	✓
<i>Vitis vinifera</i> L.	ArMV-DU13	✓	✓	
<i>Vitis vinifera</i> L.	ArMV-S		✓	
<i>Vitis vinifera</i> L.	ArMV-Ta		✓	
<i>Vitis vinifera</i> L.	ArMV-P119			✓
<i>Vitis vinifera</i> L.	ArMV-P116			✓
<i>Vitis vinifera</i> L.	ArMV-J86			✓
<i>Hordeum vulgare</i> L.	ArMV-ba	✓	✓	✓(tipo D)
<i>Ligustrum vulgare</i> L.	ArMV-Lv	✓	✓	
<i>Lilium</i> L.	ArMV-lily		✓	
<i>Narcissus</i> L.	ArMV-narcissus		✓	
<i>Petasites</i> Mill.	ArMV-butterbur		✓	
<i>Humulus</i> L.	ArMV-hop			✓
<i>Syringa vulgaris</i> L.	ArMV-lilac			✓

✓: presença de sequência completa em GenBank

GFLV tem sido mais estudado e, como tal, existem 740 sequências nucleotídicas disponíveis na plataforma do GenBank (até 10/09/2015). Destas, todas as sequências completas pertencem a isolados de videira e a maior parte são fragmentos parciais ou a região codante completa da proteína da cápside. Apenas se encontram disponíveis as sequências do RNA1,

RNA2 e RNA satélite completas para os isolados GFLV -F13 e GFLV -SACH44 (Lamprecht *et al.*, 2013; Ritzenthaler *et al.*, 1991; Serghini *et al.*, 1990; Fuchs *et al.*, 1989). GFLV -Ghu, GFLV -SAPCS3, GFLV -WAPN173, GFLV -WAPN6132, GFLV -GFV3138-01 e GFLV -GFV1050-02 possuem as sequências completas do RNA1 e RNA2 (Vigne *et al.*, 2013; Lamprecht *et al.*, 2012, 2013; Rott *et al.*, 2013; Mekuria *et al.*, 2009; Vigne *et al.*, 2008). Os isolados GFLV -R2 e GFLV -R6 possuem a sequência completa do RNA satélite (Gottula *et al.*, 2013). E para os isolados GFLV -NW, GFLV -Shir-Amin, GFLV -Takestan, GFLV -Bonab, GFLV -Urmia, GFLV -WACH911, GFLV -WAPN57, GFLV -WAPN8133, GFLV -WAPN165, GFLV -WAME1492, GFLV -WACF2142 e GFLV -3138-07 só se encontra disponível a sequência completa do RNA2 (Zarghani *et al.*, 2013; Rott *et al.*, 2013; Mekuria *et al.*, 2009; Wetzell *et al.*, 2001) (tabela II).

Tabela II. Isolados de *Grapevine fanleaf virus* com as sequências completas do RNA1, RNA2 ou satRNA disponíveis em GenBank. As amostras encontram-se caracterizadas pelo nome do isolado e respectivo hospedeiro.

Hospedeiro	Isolado	RNA1	RNA2	satRNA
<i>Vitis vinifera</i> L.	GFLV-F13	✓	✓	✓
<i>Vitis vinifera</i> L.	GFLV-SACH44	✓	✓	✓
<i>Vitis vinifera</i> L.	GFLV-SAPCS3	✓	✓	
<i>Vitis vinifera</i> L.	GFLV-WAPN173	✓	✓	
<i>Vitis vinifera</i> L.	GFLV-WAPN6132	✓	✓	
<i>Vitis vinifera</i> L.	GFLV-GHu	✓	✓	
<i>Vitis vinifera</i> L.	GFLV-GFV3138-01	✓	✓	
<i>Vitis vinifera</i> L.	GFLV-GFV1050-02	✓	✓	
<i>Vitis vinifera</i> L.	GFLV-NW		✓	
<i>Vitis vinifera</i> L.	GFLV-Shir-Amin		✓	
<i>Vitis vinifera</i> L.	GFLV-Takestan		✓	
<i>Vitis vinifera</i> L.	GFLV-Bonab		✓	
<i>Vitis vinifera</i> L.	GFLV-Urmia		✓	
<i>Vitis vinifera</i> L.	GFLV-WACH911		✓	
<i>Vitis vinifera</i> L.	GFLV-WAPN57		✓	
<i>Vitis vinifera</i> L.	GFLV-WAPN8133		✓	
<i>Vitis vinifera</i> L.	GFLV-WAPN165		✓	
<i>Vitis vinifera</i> L.	GFLV-WAME1492		✓	
<i>Vitis vinifera</i> L.	GFLV-WACF2142		✓	
<i>Vitis vinifera</i> L.	GFLV-3138-07		✓	
<i>Vitis vinifera</i> L.	GFLV-R2			✓
<i>Vitis vinifera</i> L.	GFLV-R6			✓

✓: presença de sequência completa em GenBank

A fragmentação da informação sobre a variabilidade genética das variantes de ambos os vírus tem tornado difícil a implementação de um protocolo de deteção baseado em técnicas moleculares de retrotranscrição seguida de amplificação por PCR (RT-PCR). Embora existam publicados vários pares de primers para esse fim, não foi até ao momento indicado um par universal capaz de permitir a amplificação de todas as variantes conhecidas de *GFLV* ou de *ArMV*.

A obtenção de sequências genómicas que permitam uma descrição detalhada da variabilidade genética global de ambos os vírus, bem como a compreensão da estrutura genética de isolados e das populações virais é assim fundamental. Este conhecimento permitirá desenvolver ferramentas serológicas mais sensíveis e implementar protocolos com técnicas moleculares capazes de detetar e caracterizar ambos os vírus e respetivas variantes, um aspeto fundamental na implementação de esquemas de certificação e de medidas de contenção do CDV. Permitirá também elucidar mecanismos moleculares subjacentes à transmissão e ao estabelecimento da infeção por estes vírus e identificar marcadores moleculares de sintomatologia.

1.4 *GFLV* e *ArMV* em castas portuguesas

O complexo de degenerescência da videira é uma doença estudada em Portugal desde há muito tempo (Dias, 1963). A deteção dos vírus responsáveis pela doença tem sido realizada através de testes DAS-ELISA com anticorpos comerciais e foram encontrados isolados positivos em Portugal continental e no arquipélago dos Açores (Bettencourt *et al.*, 2009; Figueiredo *et al.*, 2009; Teixeira Santos *et al.*, 2012).

O *GFLV* é encontrado em castas portuguesas por deteções de rotina realizadas pelos serviços do INIAV, utilizando DAS-ELISA com anticorpos comerciais. Em 2012, foi possível obter confirmação molecular da presença de *GFLV* em isolados portugueses (Esteves *et al.*, 2012). Da colaboração com o INIAV através de projetos de investigação foi possível construir uma base de dados de sequências nucleotídicas de RNA2 para um número alargado de isolados do vírus do urticado, obtidos de castas portuguesas que constituem a Coleção Ampelográfica Nacional. Mais recentemente foi obtida pela primeira vez, evidência da existência de *ArMV* em Portugal através de testes serológicos (F. Fonseca com. pessoal). A utilização de técnicas de PCR e sequenciação confirmou a existência deste vírus anteriormente considerado como não existindo em Portugal.

2. OBJETIVOS

A partir de amostras de castas com isolados positivos para *ArMV* por testes DAS-ELISA pretendeu-se fazer uma prospeção intensa com diferentes pares de primers com o objetivo de obter confirmação molecular desses resultados. Pretendeu-se também, caracterizar a estrutura molecular de isolados de *GFLV* em castas portuguesas de *Vitis vinifera* a partir de sequências de RNA2 e, tal como para *ArMV*, confirmar molecularmente os resultados positivos obtidos por DAS-ELISA.

Foi feita uma análise com o objetivo de determinar a existência de RNA satélite nas castas portuguesas e, posteriormente, caracterizar o satRNA associado às variantes de cada vírus nas castas portuguesas.

Pretendeu-se obter sequências de uma região específica da “*homing protein*” e verificar se essa região, como descrito em estudos anteriores, poderá ser o determinante da sintomatologia nos isolados portugueses.

A informação reunida foi processada com o objetivo de descrever a variabilidade dos isolados em Portugal e de melhorar as ferramentas de diagnóstico, quer serológicas quer moleculares, de modo a implementar conjuntamente com o INIAV um protocolo robusto de deteção adequado ao esquema de certificação em vigor no país.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Fonte de vírus

O material vegetal utilizado neste trabalho foi recolhido de videiras da Coleção Ampelográfica Nacional (CAN, PRT051) localizada em Dois Portos (INIAV) e da coleção da Estação Agronómica Nacional (EAN, PRT010) em Oeiras (INIAV). A escolha destes locais para a recolha de amostras deveu-se ao facto de serem conhecidas as condições em que as plantas são mantidas e pela garantia de disponibilidade de material durante todo o trabalho e para estudos futuros. No caso da CAN, a coleção foi estabelecida há 30 anos (Teixeira Santos *et al.*, 2009) no porta-enxertos certificado SO4 (clone 73) e em solo livre de nematodes. As plantas da coleção são regularmente testadas para vários vírus, incluindo os vírus da CDV, por DAS-ELISA ou RT-PCR. Cada acesso da CAN (cada cultivar de videira) está representado por 7 clones, ou seja, 7 plantas propagadas da mesma planta mãe. No caso da EAN, os acessos estão enxertados em diferentes porta-enxertos, igualmente em solo livre de nematodes e são também regularmente testados por DAS-ELISA para vários vírus, incluindo os implicados no CDV.

3.2 Amostragem das plantas

Neste estudo foram amostradas plantas com base na informação prévia sobre a presença dos vírus de interesse obtida por testes de DAS-ELISA realizados pelos serviços do INIAV.

De modo a realizar uma amostragem representativa foram colhidas entre quatro a seis varas de cada planta e as respetivas folhas constituíram uma amostra. Assim, assegurou-se que, mesmo em situações de distribuição heterogénea, foram obtidas amostras (isolados) representativas das diferentes variantes virais presentes nas plantas.

O material vegetal colhido foi mantido a -80°C até à extração de RNA total.

3.3 Extração de RNA total

Para a extração de RNA total das amostras foi utilizado o kit comercial E.Z.N.A.TM Plant Total RNA Kit (Omega Bio-Tek, EUA) em que o tampão de extração foi substituído por um tampão adaptado de MacKenzie *et al.* (1997) (tabela III), otimizado para a extração de RNA de videira.

Tabela III. Constituição do tampão de extração (MacKenzie *et al.*, 1997).

Tampão de extração
Tiocianato de guanidina 4M
Acetato de sódio 0,2M (pH 5,0)
EDTA 25mM
PVP-40 2,5% (p/v)
2-mercaptoetanol 1% (v/v)

De acordo com o protocolo, usaram-se entre 500 a 700 mg de nervuras e mesofilo foliar que foram maceradas em azoto líquido. Cada amostra foi homogeneizada em 2 ml de tampão de extração. Um ml do homogenato resultante foi transferido para um tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml ao qual se adicionaram 100 µl de Sarcozyl 20% (p/v). Esta mistura foi incubada (Dry Block Thermostat, Grant Instruments, Inglaterra) a 70 °C, durante 10 minutos com agitação esporádica. Após incubação, as amostras foram centrifugadas (centrifugadora 5415R, Eppendorf, Alemanha) a 10000g, à temperatura ambiente, durante 10 minutos. A partir deste ponto seguiram-se as instruções do kit de extração. No final, as duas eluições de RNA obtidas (50µl cada) foram armazenadas a -80 °C.

3.4 Síntese de cDNA

Para sintetizar a primeira cadeia de cDNA utilizou-se o kit comercial RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., EUA). Na reação foram usados primers Oligo (dT)₁₈ e 5µl de RNA total. A mistura de primers e RNA foi inicialmente desnaturada a 65°C por 5 minutos e, posteriormente, colocada em gelo. Seguiu-se a adição de mistura de tampão de reação, inibidor de RNase RiboLock, mix de dNTPs e RevertAid M-MuLV RT, de acordo com as instruções do fabricante. Após um passo de incubação a

25°C por 5 minutos, para facilitar a hibridação dos primers, as reações foram incubadas a 42°C durante uma hora.

3.5 Seleção e *design* de primers

De modo a detectar a presença de *GFLV* e *ArMV* foram utilizados vários pares de primers descritos na literatura para a amplificação específica de fragmentos de RNA1, RNA2 e satRNA. Além destes, foram desenhados para este trabalho dois pares de primers cujo alvo respectivo foi a RdRp codificada no RNA1 de *GFLV* e de *ArMV* (tabela IV).

Os primers foram desenhados através do programa Oligo 7 Primer Analysis Software (Rychlik, 2007) a partir das sequências de referência do RNA1 de *GFLV* e *ArMV* com os números de acesso NC003615 e NC006057, respetivamente.

Tabela IV. Pares de primers utilizados na reacção de PCR para a amplificação específica de fragmentos de RNA1, RNA2 e satRNA de *ArMV* e *GFLV*.

Vírus	Designação do primer	Sequência (5'-3')	Tamanho do fragmento (bp)	Localização no genoma	Referência
RNA1					
<i>ArMV</i>	ArMV 5097U20 ArMV 5850L17	GAATTTGTGCCTGGGTGTGG GCTGGAATTGTGGCAAG	769	RdRp	Este trabalho
<i>GFLV</i>	GFLV 5072U16 GFLV 5867L19	AAAGGGAAAGGCGAGA GGCTGGAATAGTGGAAAGA	813	RdRp	Este trabalho
RNA2					
<i>ArMV</i>	ArMV-5A ArMV-3A	TACTATAAGAAACCGCTCCC CATCAAACTCATAACCCAC	302	CP	Faggioli <i>et al.</i> , 2005
<i>ArMV</i>	S418 A871	AAAGAATTGGCAGCGGATTGG GAGTTCGATGATAGGGAGAACG	453	CP	Ipach <i>et al.</i> , 1992
<i>ArMV</i>	AF CNR	GTTACATCGAGGAGGATG GGCAAGTGTGTCCAAAGGAC	849	CP	Marmonier <i>et al.</i> , 2010
<i>ArMV</i>	ArMV-5A A871	TACTATAAGAAACCGCTCCC GAGTTCGATGATAGGGAGAACG	958	CP	Faggioli <i>et al.</i> , 2005 Ipach <i>et al.</i> , 1992
<i>ArMV</i>	ArMV A-3 A871	CCTGGCATGGGAAAATGTTG GAGTTCGATGATAGGGAGAACG	997	CP	Wetzel <i>et al.</i> , 2001 Ipach <i>et al.</i> , 1992
<i>ArMV</i>	ArMV-5A ArMV A-5 Reverse	TACTATAAGAAACCGCTCCC ACTTAATGGCAAGCCATCG	1513	CP	Faggioli <i>et al.</i> , 2005 Wetzel <i>et al.</i> , 2001
<i>ArMV</i>	ArMV A-3 ArMV A-5 Reverse	CCTGGCATGGGAAAATGTTG ACTTAATGGCAAGCCATCG	1552	CP	Wetzel <i>et al.</i> , 2001

Tabela IV. Pares de primers utilizados na reação de PCR para a amplificação específica de fragmentos de RNA1, RNA2 e satRNA de ArMV e GFLV (cont.)

<i>ArMV</i>	AF 3'NC	GTTACATCGAGGAGGATG ACAAACAACACACTGTCGCC	831	CP e 3'UTR	Marmonier <i>et al.</i> , 2010 Wetzel <i>et al.</i> , 2001
<i>ArMV</i>	ArMV-5A 3'NC	TACTATAAGAAACCGCTCCC ACAAACAACACACTGTCGCC	1730	CP e 3'UTR	Faggioli <i>et al.</i> , 2005 Wetzel <i>et al.</i> , 2001 Trabalhos anteriores do laboratório
<i>GFLV</i>	GFLV Ppoly 617F GFLV Ppoly 660R	CTCGTCCACTGCTGGAATTAGA ATCCTGCCTCCAGAGCTTTTT	63	CP	
<i>GFLV</i>	G2 3'NC	AGGATTGCCAGGCAAATAGG ACAAACAACACACTGTCGCC	1622	CP e 3'UTR	Wetzel <i>et al.</i> , 2001
RNA satélite					
<i>ArMV</i> e <i>GFLV</i>	GFLV satRNA 174F GFLV satRNA RACE GSP5	GTAAGCAAACGGACCT AGATAGAAGTGAGGGTGAAA	383	sat RNA	Lamprecht <i>et al.</i> , 2013
<i>ArMV</i> e <i>GFLV</i>	GFLV satRNA 174F GFLV satRNA RACE GSP4	GTAAGCAAACGGACCT CTTTTCAGCAGGAGCCCAGA	658	sat RNA	Lamprecht <i>et al.</i> , 2013
<i>ArMV</i> e <i>GFLV</i>	GFLV satRNA 174F GFLV satRNA dgR	GTAAGCAAACGGACCT ACCTTACGCAACATCCG	747	sat RNA	Lamprecht <i>et al.</i> , 2013
<i>ArMV</i> e <i>GFLV</i>	GFLV satRNA 174F SAT 1085R	GTAAGCAAACGGACCT (Tx6)GAGTTGGCTAATGAGCAACC	930	sat RNA	Adaptado de Lamprecht <i>et al.</i> , 2013
<i>ArMV</i> e <i>GFLV</i>	NepSatF NepSatR	CGTGTAAGCACCGTGCACG GGCTAATGAGCAACCAAATCCC	989	sat RNA	Gottula <i>et al.</i> , 2013

3.6 Reações de PCR e verificação de amplificação

As reações de PCR foram realizadas utilizando DreamTaq™ DNA Polimerase (Thermo Fisher Scientific, Inc., EUA), e primers específicos (Tabela IV) para a amplificação de determinados fragmentos de RNA1, RNA2 e satRNA de *GFLV* e *ArMV*. Seguindo as indicações do fabricante, cada reação consistiu em tampão DreamTaq contendo MgCl₂, dNTPs (Thermo Fisher Scientific, Inc., EUA), primer forward e primer reverse, cDNA, DreamTaq DNA polimerase e H₂O (DNase/RNase-free, 0.1 µm filtered, Sigma-Aldrich, EUA) até perfazer o volume final de 50 µl (tabela V).

Tabela V. Reagentes utilizados na reação de PCR.

Reação de PCR – constituintes e concentrações finais
Tampão DreamTaq 1x com 2 mM de MgCl ₂
dNTPs (ATP, CTP, GTP, TTP) 0,2 mM cada
Primer forward 0,2 mM
Primer reverse 0,2 mM
DreamTaq DNA polimerase 1U
H ₂ O até 50 µl

Cada par de primers da tabela IV foi testado. Uma vez que nem todos os pares de primers testados obtiveram um resultado de amplificação positivo, abaixo são apresentados os protocolos da reação de PCR para os pares que obtiveram resultados positivos (Tabela VI).

As reações de PCR foram realizadas em termocicladores UNO-Thermoblock (Biometra, Alemanha) e T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Lda., EUA). Os produtos de amplificação foram visualizados sob luz UV, após separação por eletroforese em gel de agarose (1,5% em tampão TAE 1x) e corados com brometo de etídeo.

Tabela VI. Protocolos de PCR específicos para cada par de primers.

Pares de primers	Programa de PCR			
	Passo	Duração	Temperatura	Ciclos
ArMV-5A+ArMV-3A S418+A871	1	3 min	95°C	30
	2	30 s	95°C	
	3	30 s	47°C	
	4	45 s	72°C	
	5	10 min	72°C	
	6	Pausa	10°C	
G2+3'NC	1	3 min	95°C	30
	2	30 s	95°C	
	3	30 s	48°C	
	4	2 min	72°C	
	5	15 min	72°C	
	6	Pausa	10°C	
GFLV Ppoly 617F + GFLV Ppoly 660R	1	3 min	95°C	30
	2	30 s	94°C	
	3	30 s	48°C	
	4	30 s	72°C	
	5	5 min	72°C	
	6	Pausa	10°C	
GFLV 5072U16 + GFLV 5867L19	1	3 min	95°C	30
	2	30 s	94°C	
	3	30 s	52°C	
	4	1 min	72°C	
	5	10 min	72°C	
	6	Pausa	10°C	
ArMV 5097U20 + ArMV 5850L17	1	3 min	95°C	30
	2	30 s	94°C	
	3	30 s	55°C	
	4	1 min	72°C	
	5	10 min	72°C	
	6	Pausa	10°C	
GFLV satRNA 174F + GFLV satRNA RACE GSP5 GFLV satRNA 174F + GFLV satRNA RACE GSP4 NepSatF+NepSatR AF+CNR AF+3'NC	1	3 min	95°C	Gradiente 60 - 48°C (7 ciclos)
	2	30 s	94°C	
	3	30 s	60°C	
	4	1 min	72°C	30
	5	30 s	94°C	
	6	30 s	45°C	
	7	1 min	72°C	
	8	15 min	72°C	
	9	Pausa	10°C	

3.7 Clonagem

Os produtos de PCR obtidos com diferentes pares de primers, para cada amostra analisada, foram ligados a vetores de clonagem usando os kits comerciais pGEM®-T Easy System I (Promega, EUA) e CloneJET™ PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA). As reações foram feitas de acordo com as instruções dos fabricantes e utilizando entre 1 e 5 µl de produto de PCR consoante a eletroforese em gel de agarose revelasse uma banda de amplificação forte ou fraca. A ligação foi armazenada a 4°C durante a noite, no caso do vetor pGEM, ou a -20°C, no caso do vetor pJET, e no dia seguinte foi usada para transformar células competentes [*E.coli* XL1Blue (Agilent Technologies Inc., EUA)]. A cada tubo contendo uma alíquota de 100 µl de células competentes mantidas a -80°C, adicionaram-se 5 µl de ligação (pGEM) ou 10 µl de ligação (pJET) e incubou-se a mistura durante 30 minutos no gelo. Findo este tempo, aplicou-se um choque térmico a 42°C durante 90 segundos seguido de uma incubação no gelo por 90 segundos. A cada tudo adicionaram-se 250 µl de meio SOC (LB-Agar líquido com 20mM de glucose) pré-aquecido a 37°C e colocou-se na incubadora (Inkubator1000 e Unimax 1010, Heidolph Instruments, Alemanha) a 37°C com agitação a 200 rpm durante 45 minutos. Entretanto prepararam-se placas de Petri com LB-Agar sólido contendo 50 µg/ml de ampicilina. Uma vez solidificado o agar, espalharam-se à superfície do meio 40 µl de uma solução de X-Gal a 20 mg/ml. Findo tempo de incubação adicionaram-se 5 µl de IPTG 1M a cada transformação tendo-se plaqueado 150µl de transformação por cada placa de Petri preparada. As placas foram incubadas durante a noite, aproximadamente 16 horas, a 37°C.

Para verificar se as colónias recombinantes continham o fragmento de interesse, estas foram sujeito a uma reação de PCR (tabela VII) com os primers específicos do respetivo fragmento clonado, seguida de eletroforese em gel de agarose (1,5% em tampão TAE 1x) e visualização sob UV após coloração com GreenSafe, Este procedimento foi feito para cada fragmento clonado.

Tabela VII. Protocolo de PCR de colónias.

Protocolo de PCR de colónias			
Passo	Duração	Temperatura	Ciclos
1	5 min	95°C	
2	30 s	94°C	30
3	30 s	50°C	
4	1 min	72°C	
5	15 min	72°C	
6	Pausa	10°C	

3.8 Análise de Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

Para cada fragmento clonado foram analisados os produtos de PCR de, pelo menos, 16 clones positivos através de Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) (Orita *et al.*, 1989) em gel de poliacrilamida 8% (tabela VIII) em tampão TBE 1x.

Tabela VIII. Constituição do gel de poliacrilamida 8% para SSCP

Gel de poliacrilamida 8% - constituintes e concentrações finais
TBE 1x
Acrilamida/ Bisacrilamida (29:1) 8% (v/v)
APS 0,1% (v/v)
TEMED 0,1% (v/v)

Conforme a intensidade da banda visualizada após eletroforese, entre 4 e 8 µl de produto de PCR foram adicionados a 16 ou 12 µl de tampão de desnaturação (Formamida 95% com 20mM de EDTA e 1% de Azul de bromofenol) num volume total de 20 µl. As amostras assim preparadas foram desnaturadas a 92°C durante 5 minutos, após o que foram rapidamente arrefecidas em gelo e de seguida carregadas no gel de poliacrilamida. A eletroforese decorreu a 4°C e a 200 V durante aproximadamente 3 horas.

Após o término da eletroforese, os géis foram corados com nitrato de prata, o que permitiu visualizar os padrões de SSCP das amostras. No primeiro passo, os géis foram colocados numa solução de ácido acético glacial 10% (v/v) durante um mínimo de 20 minutos para fixar as bandas ao gel. Após este período, os géis foram lavados três vezes em água destilada

durante 3 minutos cada lavagem, seguindo-se uma incubação numa solução de ácido nítrico 1,5% (v/v) por 3 minutos. Depois, os géis foram novamente lavados em água destilada durante 3 minutos por três vezes e incubados numa solução de nitrato de prata 6mM e formaldeído 0,06% (v/v) durante 30 minutos. Passada meia hora lavaram-se os géis em água destilada uma vez por 3 minutos. Finalmente, os géis foram revelados por incubação em solução aquosa de carbonato de sódio 3% (p/v), formaldeído 0,06% (v/v) e tiosulfato de sódio 0,2% (p/v). Quando as bandas se tornaram visíveis adicionou-se solução de ácido acético glacial 10% (v/v) para parar a coloração.

Uma vez terminada a coloração, os padrões de SSCP foram visualizados. Clones evidenciando padrões diferentes foram escolhidos para extração de DNA plasmídico.

3.9 Extração de pDNA (Miniprep), restrição e sequenciação

As colónias de interesse foram repicadas para tubos tipo Falcon de 50ml contendo 5 ml da LB líquido com ampicilina (50 µg/ml) que foram incubados aproximadamente 16 horas, a 37°C e com agitação a 200rpm. No dia seguinte, extraiu-se o pDNA usando o kit comercial NZYMiniprep (NZYTech,Lda., Portugal) de acordo com as instruções do fabricante. Para confirmar o tamanho esperado do fragmento, o pDNA extraído foi digerido com o enzima FastDigest™ *EcoRI* (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) para ligações ao vetor pGEM e com os enzimas *XhoI* e *XbaI* (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) para ligações ao pJET. Seguiram-se as instruções do fabricante e os fragmentos foram visualizadas sob luz UV após eletroforese em gel de agarose 1% corado em brometo de etídio.

Os clones selecionados foram sequenciados comercialmente (Stab Vida e CCMar-UAIG, Portugal).

3.10 Análise *in silico*

Foi realizada uma análise *in silico* para detetar grupos filogenéticos e as relações filogenéticas das variantes de *GFLV* e *ArMV* presentes nos isolados portugueses. Fez-se uma análise filogenética detalhada com base no RNA1, RNA2 e satRNA, recorrendo aos programas BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) e ClustalW (Larkin *et al.*, 2007) para visualização, tratamento e alinhamento das sequências, e MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013)

para construção de dendrogramas e inferência filogenética. O programa DnaSP (Librado e Rozas, 2009; Rozas, 2009) foi usado para determinação de parâmetros de genética de populações. Eventos de recombinação foram investigados recorrendo ao programa RDP4 (Martin, 2000). O Datamonkey (Kosakovsky e Frost, 2005; Delpont *et al.*, 2010) foi usado para avaliação das pressões de seleção atuantes em diferentes genes. As relações filogenéticas encontradas para as regiões genómicas em estudo foram comparadas com uma matriz de sintomas, de modo a avaliar a existência de correspondência entre filogrupos e sintomas.

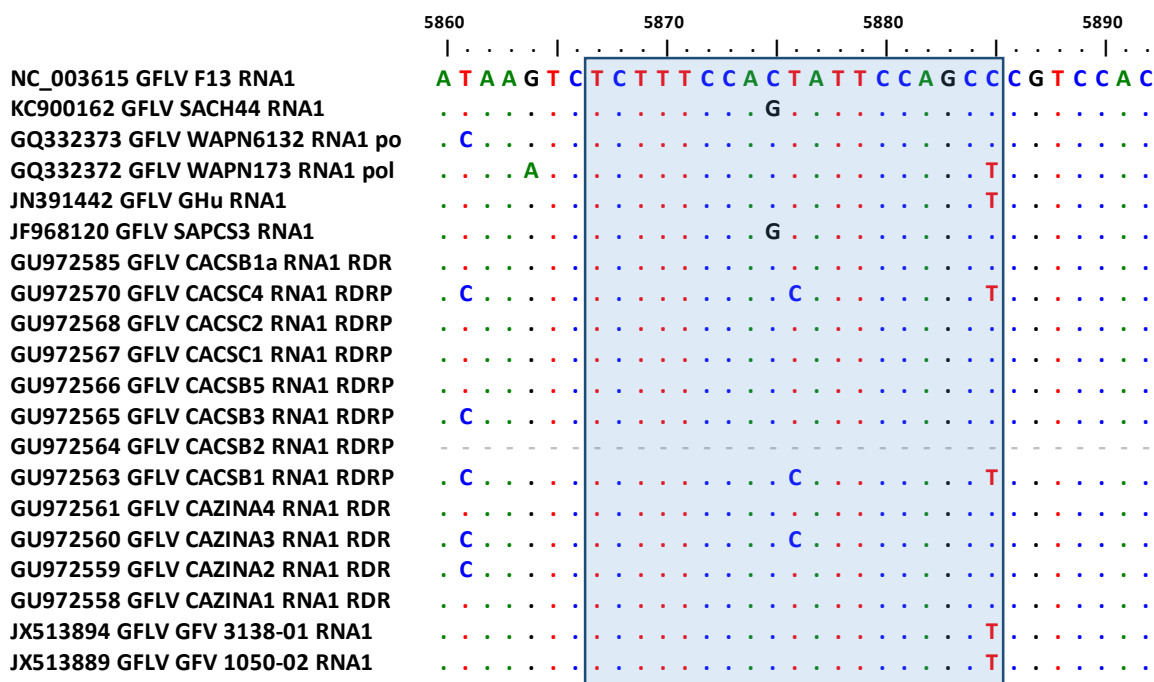


Figura 4. Alinhamento de seqüências completas de RNA1 e de seqüências parciais da RdRp de *GFLV*. Destacado a azul encontra-se o local correspondente ao primer reverse desenhado, GFLV 5867L19: 5'-GGCTGGAATAGTGGAAAGA-3'. Todas as seqüências foram retiradas de GenBank e encontram-se identificadas pelo número de acesso e pelo nome. A numeração dos nucleótidos é dada pela seqüência NC003615.

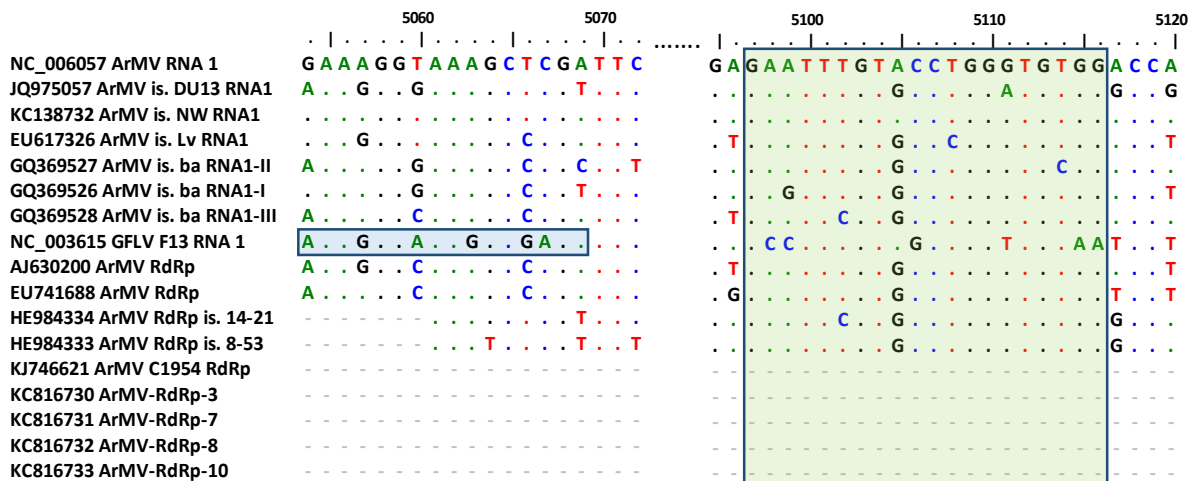


Figura 5. Alinhamento de seqüências completas de RNA1 e seqüências parciais da RdRp de *ArMV* e da seqüência referência de RNA1 de *GFLV*. Destacado a azul encontra-se o fragmento correspondente ao primer forward desenhado para a RdRp de *GFLV*, GFLV 5072U16 e a verde encontra-se o fragmento correspondente ao primer forward desenhado para *ArMV*, ArMV 5097U20: 5'-GAATTTGTGCCTGGGTGTGG-3'. Todas as seqüências foram retiradas de GenBank e encontram-se identificadas pelo número de acesso e pelo nome. A numeração dos nucleótidos é dada pela seqüência NC006057.

obtida foi alinhada com a sequência de referência para o RNA2 de *ArMV* (NC 006056) e as restantes sequências do RNA2 completas desse vírus (EF426853, X81815 e X81814) disponíveis em GenBank. Neste alinhamento também se incluíram a sequência de referência para o RNA2 de GLFV (NC003623) e uma outra do RNA2 completo deste vírus (EF426852). Verificou-se que, ao longo de todo o alinhamento, o nível de semelhança entre a sequência do isolado CS30404 e as sequências homólogas de *ArMV* é maior em comparação ao nível de semelhança entre o isolado português e as sequências homólogas de *GFLV*. Além disso, as sequências do vírus do urticado contêm vários motivos ao longo do alinhamento que nenhuma das restantes sequências de *ArMV* possui.

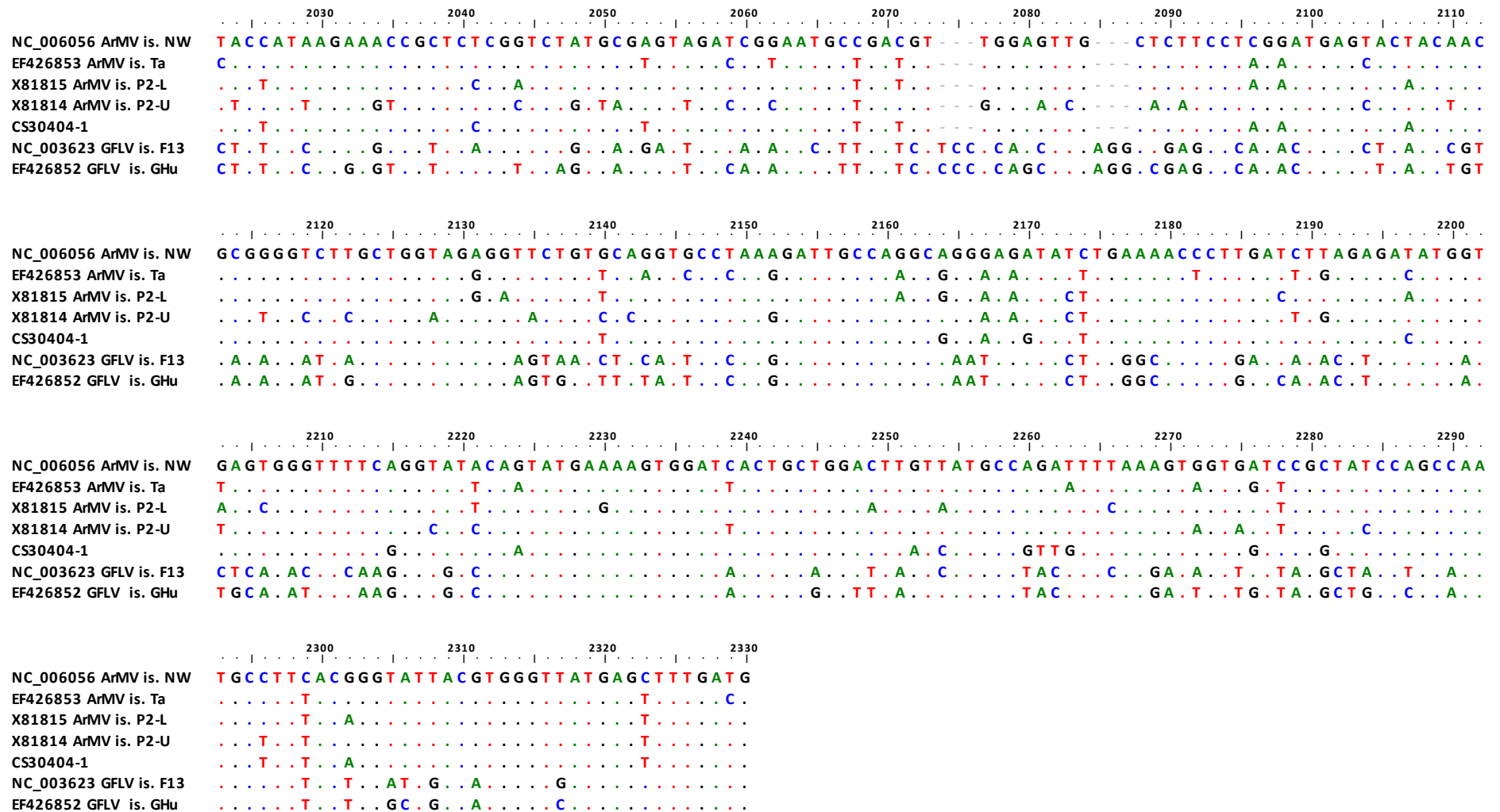


Figura 7. Alinhamento de sequências parciais da proteína da cápside de *ArMV*. O isolado português encontra-se identificado pelo nome - CS30404 - e as sequências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso. A numeração dos nucleótidos é dada pela sequência NC006056.

Neste trabalho, o isolado CS30404 foi também testado por PCR para um conjunto de primers descritos na literatura como específicos para o *ArMV*, com o objetivo de obter mais informação sobre a região codante da proteína da cápside das variantes daquele vírus presentes neste isolado. Foram obtidos resultados positivos de amplificação por PCR para quatro desses pares, *ArMV* 5A + *ArMV* 3A, S418 + A871, AF + CNR e AF + 2'NC. (tabela IX). No entanto, uma vez obtidas as sequências correspondentes e alinhadas com sequências homólogas de *ArMV* e de *GFLV* verificou-se que os fragmentos amplificados com estes pares de primers correspondiam a variantes da região codante da proteína da cápside de *GFLV* e não *ArMV* (dados não mostrados). Este isolado possui, portanto, co-infecção daqueles dois vírus.

Tabela IX. Primers utilizados nas reações de PCR para a amplificação específica de fragmentos parciais do RNA1, RNA2 e satRNA de *ArMV* no isolado português CS30404.

Vírus	Primers	Localização no genoma	Isolado CS30404
RNA 1			
<i>ArMV</i>	<i>ArMV</i> 5097U20 + 5850L17	RdRp	+
RNA 2			
<i>ArMV</i>	<i>ArMV</i> -5A + <i>ArMV</i> -3A	CP	+
<i>ArMV</i>	S418 + A871	CP	+
<i>ArMV</i>	<i>ArMV</i> 5A + <i>ArMV</i> A5-Rev	CP	
<i>ArMV</i>	<i>ArMV</i> 5A + A871	CP	
<i>ArMV</i>	<i>ArMV</i> A3 + A871	CP	
<i>ArMV</i>	AF + CNR	CP	+
<i>ArMV</i>	<i>ArMV</i> 5A + 3'NC	CP e 3'UTR	
<i>ArMV</i>	AF + 3'NC	CP e 3'UTR	+
RNA satélite			
<i>ArMV</i> e <i>GFLV</i>	<i>GFLV</i> satRNA 174F + <i>GFLV</i> satRNA RACE GSP4	satRNA	+
<i>ArMV</i> e <i>GFLV</i>	NepSatF + NepSatR	satRNA	+

+: resultado positivo por PCR

4.2.2 RNA polimerase RNA-dependente (RdRp)

A partir deste isolado foi possível obter fragmentos de amplificação, quer com os primers desenhados para a região codante da RdRp de *ArMV* quer para a de *GFLV*. As sequências parciais da RdRp de *ArMV* e de *GFLV* obtidas foram alinhadas com sequências homólogas

da base de dados GenBank. A partir do alinhamento das sequências em nucleótidos e do alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidas das anteriores foram construídos os respectivos dendrogramas usando o método de Maximum-Likelihood com 1000 replicações para cálculo do valor de bootstrap. Os ramos com menos de 75% de valor de bootstrap foram colapsados. Os dendrogramas construídos a partir das sequências em nucleótidos e aminoácidos mostram o agrupamento das sequências em dois grupos principais, consoante o vírus a que pertencem. As variantes do isolado CS30404 obtidas com cada par de primers inserem-se no respetivo grupo formado pelas demais sequências homólogas de *ArMV* ou de *GFLV*. No dendrograma construído a partir das sequências nucleotídicas (Figura 8) as variantes de *ArMV* do isolado português encontram-se agrupadas com elevado valor de bootstrap (100%) e inseridas num subgrupo de variantes de *ArMV* com o isolado Du13 de origem espanhola e com o isolado americano 8-53. As variantes de *GFLV* encontram-se agrupadas com elevado valor de bootstrap (99%) e inseridas num subgrupo com as restantes variantes de *GFLV*. No dendrograma construído a partir das sequências dos aminoácidos (Figura 9), as variantes de *ArMV* do isolado CS30404 encontram-se agrupadas (bootstrap de 87%) e inseridas num subgrupo com o isolado Du13. As variantes de *GFLV* encontram-se agrupadas (bootstrap de 76%) e inseridas num subgrupo com as restantes variantes de *GFLV*.

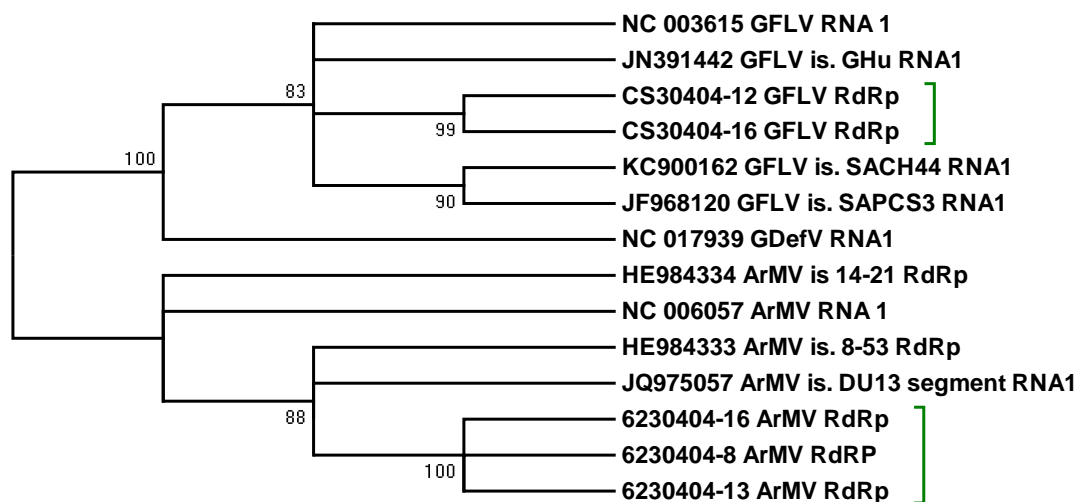


Figura 8. Dendrograma construído com base nas sequências nucleotídicas parciais da RNA polimerase RNA-dependente utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 75% de valor de bootstrap foram colapsados. As sequências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.

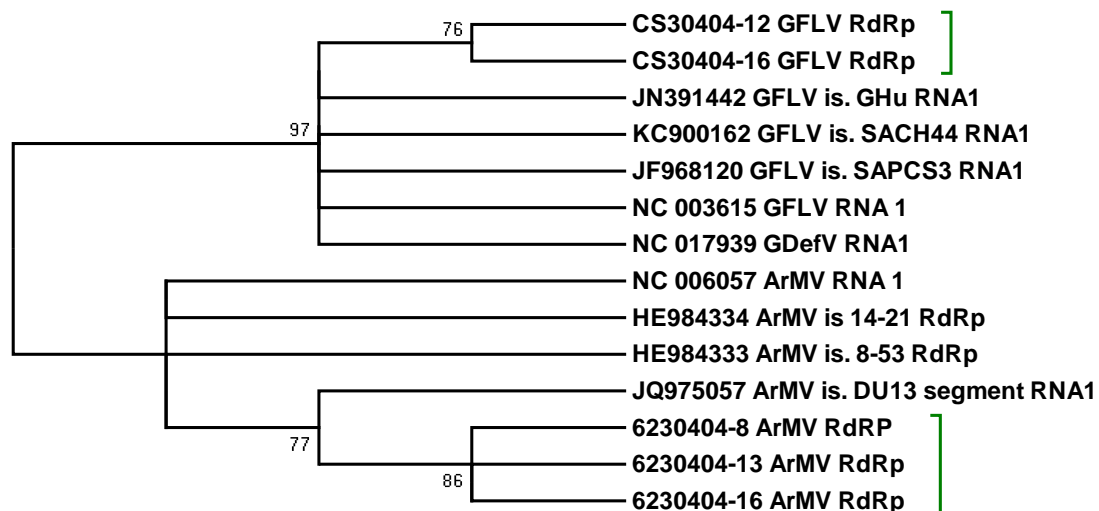


Figura 9. Dendrograma construído com base nas sequências parciais de aminoácidos da RNA polimerase RNA-dependente utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 75% de valor de bootstrap foram colapsados. As sequências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.

4.2.3 RNA satélite (satRNA)

Em alguns casos é possível encontrar moléculas de RNA satélite de grande tamanho (satRNA tipo B) associadas a *ArMV*. De modo a verificar se esse seria o caso para este isolado, foram testados cinco pares de primers em reações de PCR. A partir de dois pares, *GFLV* satRNA 174F + *GFLV* satRNA RACE GSP4 e NepSat F + NepSat R, obtiveram-se fragmentos de amplificação específica (tabela IX). Após a clonagem dos fragmentos de interesse, obtidos da reação de PCR com o par de primers que permitiu a amplificação de um fragmento maior (NepSatF+NepSatR), os clones evidenciando diferentes padrões na análise de SSCP foram escolhidos para sequenciação. As sequências obtidas foram tratadas e posteriormente alinhadas com sequências de RNA satélite tipo B de *ArMV* e *GFLV* que se encontram disponíveis em GenBank. A partir do alinhamento das sequências em nucleótidos (Figura 10) e em aminoácidos (Figura 11) foram produzidos dendrogramas usando o método de Maximum-Likelihood com 1000 replicados para cálculo do valor de bootstrap. Os ramos com menos de 95% de valor de bootstrap foram colapsados. Verifica-se que, tal como para o caso da RdRp, as variantes virais do RNA satélite do isolado CS30404 segregam para o mesmo grupo, com elevado valor de bootstrap (100%).

Em ambos os dendrogramas as variantes do isolado português estão inseridas no grupo formado pelo isolado *GFLV* -SACH44 e pelos isolados *ArMV*-lilac, *ArMV*-P119 e *ArMV*-

P116. Não se verifica correspondência entre o vírus acompanhante (*GFLV* ou *ArMV*) e os grupos observados, quer no caso do isolado português, quer no dos isolados analisados por outros autores.

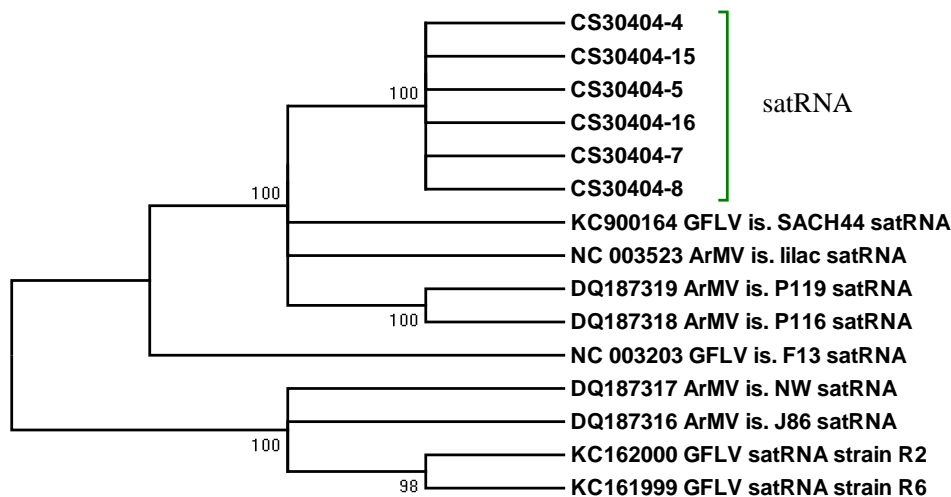


Figura 10. Dendrograma construído com base nas sequências nucleotídicas do satRNA utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 95% de valor de bootstrap foram colapsados. As sequências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.

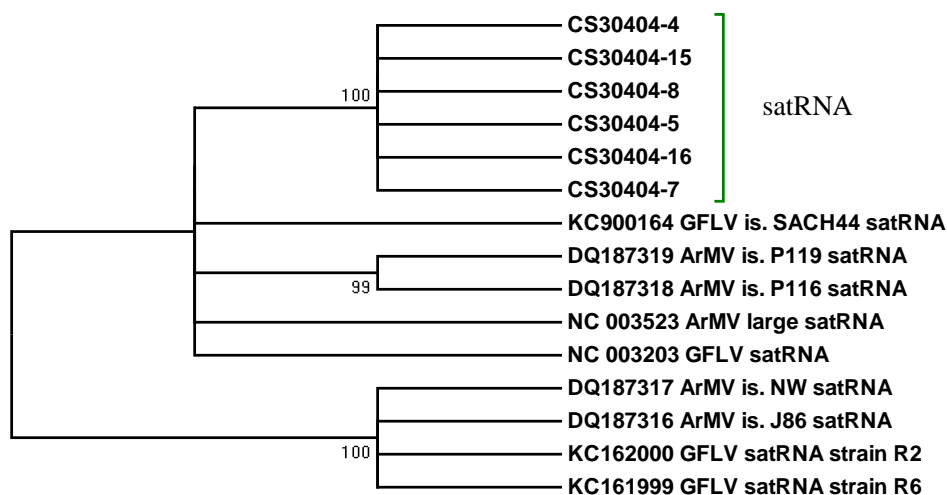


Figura 11. Dendrograma construído com base nas sequências de aminoácidos do satRNA utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 95% de valor de bootstrap foram colapsados. As sequências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.

4.3 Caracterização de variabilidade genómica de *GFLV* nos isolados portugueses

Através de colaborações com o INIAV, foi criada uma base de dados de sequências nucleotídicas de RNA2 para um número alargado de isolados de *Grapevine fanleaf virus*

obtidos de castas da CAN no âmbito do projeto PTDC/AGR-ALI/109859/2009. De modo a caracterizar a variabilidade genética dos isolados portugueses, as sequências presentes na base de dados foram tratadas e, posteriormente, construíram-se alinhamentos a partir da sequência completa da HP, MP e CP. A identificação dos 11 isolados selecionados para análise neste trabalho é dada na tabela X, incluindo um isolado de *V. vinifera* ssp. *sylvestris* (1103032).

Tabela X. Isolados portugueses usados nas análises filogenéticas da HP, MP, CP e RdRp.

Nome	Espécie/Casta
A3	Touriga Nacional
B1	Cabernet Sauvignon
BP5	<i>Vitis vinifera</i> casta desconhecida
Syrah	Syrah
UVAMESA	Uva de mesa
110303(2)	<i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>Sylvestris</i>
19330204	Moscatel de Azeitão
19340203	Moscatel Rosado
950409(01)	Síria
950624(3)	Síria
950629(3)	Síria

Nos alinhamentos incluíram-se, além das sequências dos isolados portugueses, sequências homólogas de isolados de *GFLV* para os quais havia informação disponível em GenBank das sequências codantes completas do RNA1 e RNA2, bem como as sequências de referência para *ArMV* e *GDefV*. As análises filogenéticas foram realizadas usando o método de Maximum-Likelihood com 1000 replicados para cálculo dos valores de bootstrap. Os ramos com menos de 50% de valor de bootstrap foram colapsados.

4.3.1 “Homing protein” (HP)

As sequências completas do gene da HP obtidas para os isolados portugueses e sequências homólogas presentes em GenBank foram alinhadas. Com base no alinhamento resultante, foram construídos dendrogramas a partir das sequências nucleotídicas (Figura 12) e das sequências de aminoácidos deduzidas das anteriores (Figura 13). De uma forma geral, as variantes virais portuguesas tendem a formar subgrupos consoante o isolado de origem, quer quando as relações filogenéticas são analisadas com base nas sequências nucleotídicas quer com base nas sequências de aminoácidos. A existência de conjuntos de variantes de mais

que um isolado a este nível de agrupamento verifica-se somente no caso de B1 e A3 em ambos os dendrogramas (Figuras 12 e 13). No dendrograma construído a partir das sequências de nucleótidos, as variantes de B1, A3 e SYRAH são as únicas que se agrupam com as sequências de GenBank selecionadas para esta análise, embora com um valor de bootstrap relativamente baixo (53%). Esta situação já não é suportada no dendrograma da figura 13. Os subgrupos de variantes nucleotídicas dos isolados 9504091, 9506243 e 9506293 agrupam-se a um nível superior com um valor de bootstrap de 87% e, a este nível de agrupamento, as sequências dos isolados UVAMESA e de 1103032 formam um conjunto com 90% de bootstrap. Comparando com a informação fornecida pelas sequências de aminoácidos, verifica-se que só se mantem o agrupamento entre variantes de 9506243 e 9506293 e que as variantes de 1103032 se encontram mais próximas das do isolado 19340203.

A inserção, na análise filogenética, de sequências homólogas de variantes de *ArMV* e de *GDefV* teve por objetivo a inclusão dum potencial outgroup. No entanto, verifica-se que a sequência NC006056 agrupa com a variante GHu de *GFLV* enquanto a sequência GQ332366 de *GFLV* agrupa com NC017938 de *GDefV*, em ambos os dendrogramas.

No dendrograma com base na sequência de aminoácidos, as variantes de 9506243 e 9506293 continuam agrupadas, no entanto as variantes de 9504091 formam um novo grupo. As variantes virais de 1103032 e UVAMESA, que se encontram no mesmo ramo no dendrograma construído a partir do alinhamento das sequências nucleotídicas, estão separadas no dendrograma produzido a partir da sequência dos nucleótidos.

A divergência evolutiva média entre pares de sequências, considerando o total das 35 sequências foi de 0.131 ± 0.007 (Tabela XI). Este valor foi superior ao encontrado para o grupo de 27 sequências das variantes portuguesas (0.099 ± 0.005). Esta diferença refletiu-se também na contagem de locais polimórficos (S) que foi de 381 no primeiro caso e 272 no segundo. Os polimorfismos detetados nesta região do genoma foram também avaliados através do teste estatístico Tajima D. Este teste é largamente usado para detetar seleção com base nos polimorfismos de sequências nucleotídicas. Um valor de estatística D negativo pode indicar uma seleção purificante com fixação alélica conduzida por seleção natural, enquanto um valor positivo indica uma seleção balanceadora. Valores de estatística D negativos foram encontrados para todos os grupos de variantes da HP considerados (Tabela XI), sem, no entanto, se desviarem significativamente de zero ($P > 0.1$) em nenhum dos casos.

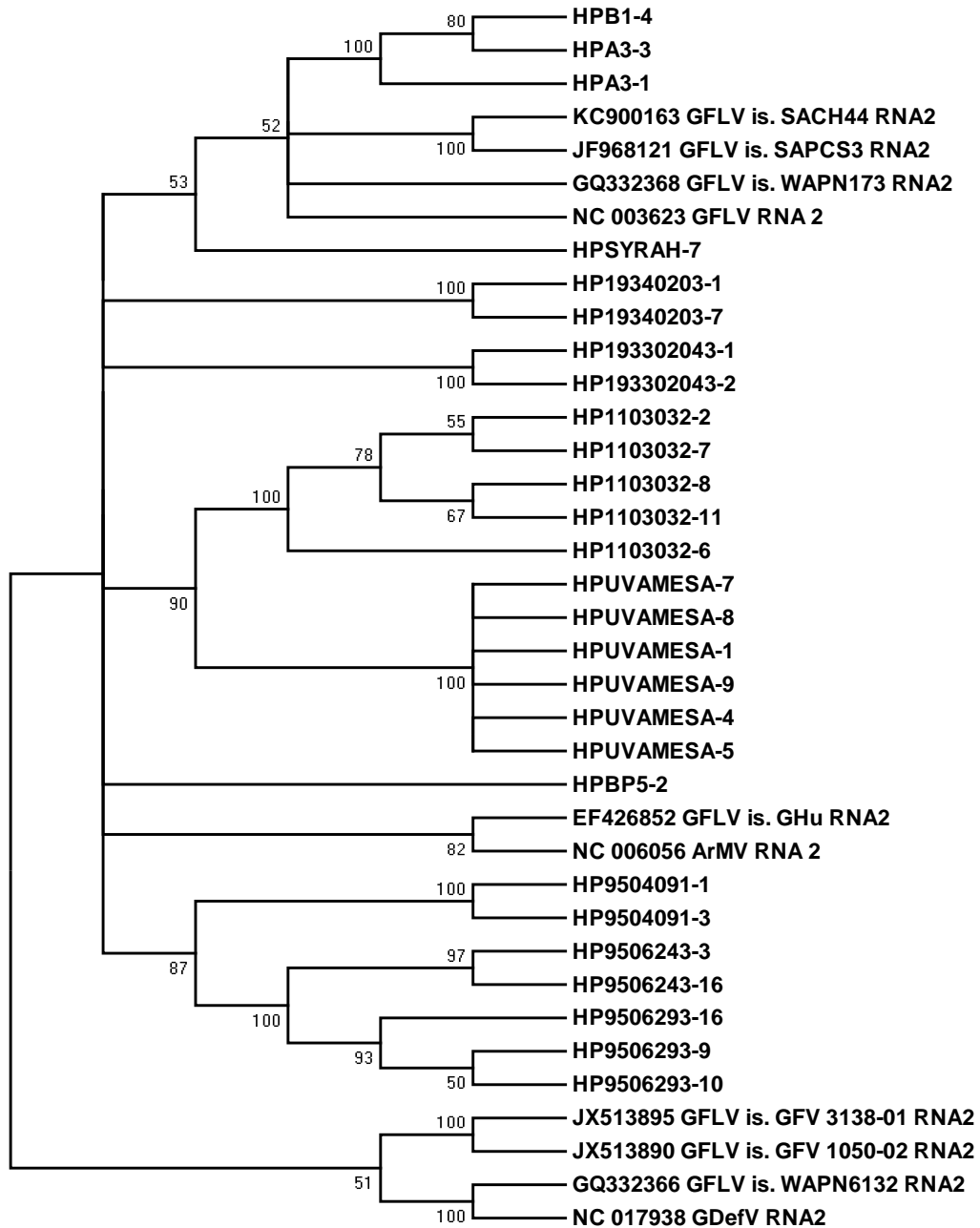


Figura 12. Dendrograma construído com base nas sequências nucleotídicas da “homing protein” utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 50% de valor de bootstrap foram colapsados. As sequências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.

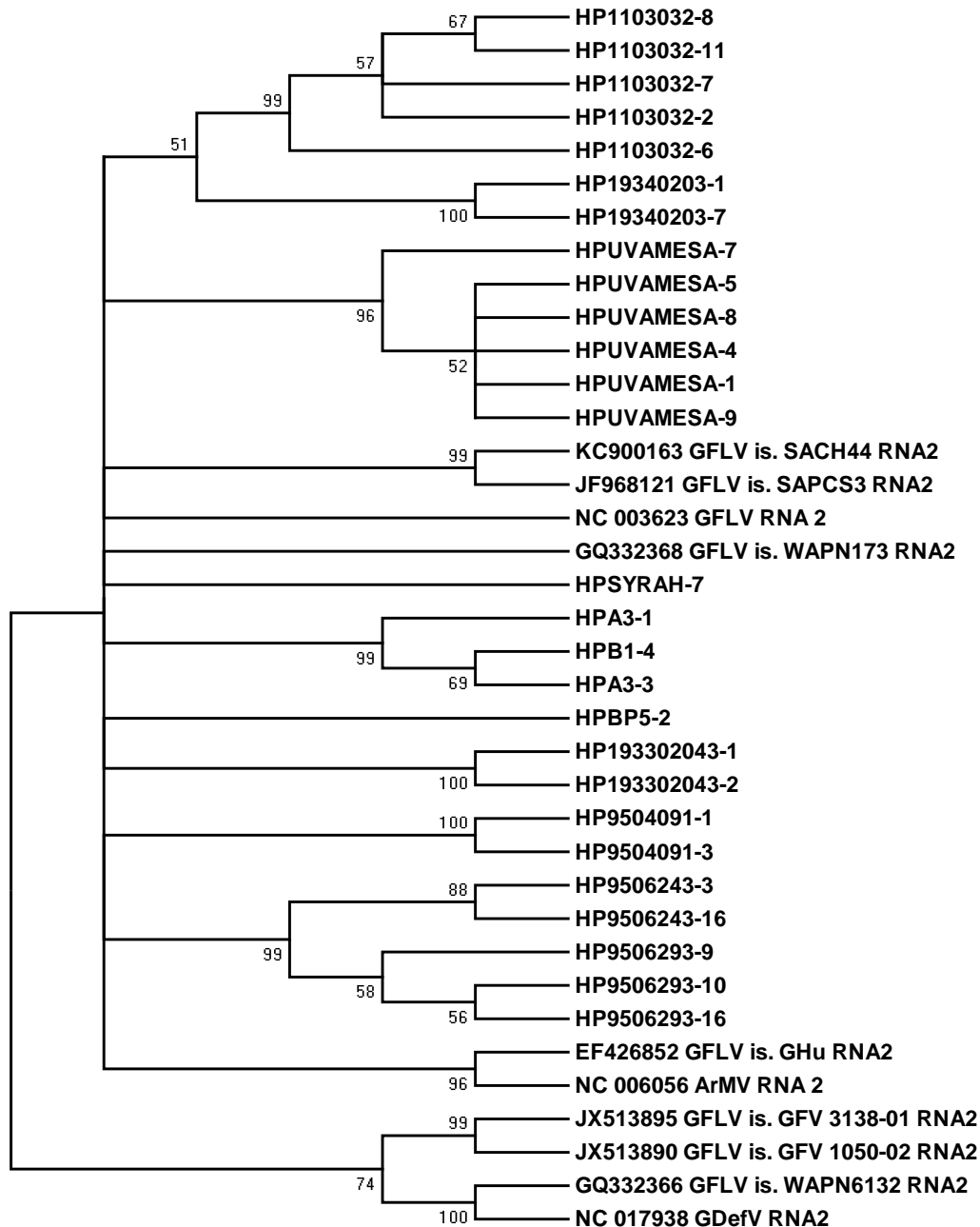


Figura 13. Dendrograma construído com base nas seqüências de aminoácidos da “homing protein” utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 50% de valor de bootstrap foram colapsados. As seqüências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.

Tabela XI. Avaliação da divergência evolutiva média intragrupo (d) entre pares de sequências de diferentes genes codificados no RNA1 ou no RNA2 de *Grapevine fanleaf virus*.

Região genômica e Grupos de variantes	Nº de variantes	d	H	S	Tajima D
HP					
a	35	0.131±0.007	1.000	381	-1.06931; P>0.1
b	8	0.153±0.024	1.000	297	-0.85373; P>0.1
c	27	0.099±0.005	1.000	272	-0.33685; P>0.1
MP					
a	35	0.117±0.007	1.000	531	-1.20208; P>0.1
b	8	0.122±0.024	1.000	320	-0.82276; P>0.1
c	27	0.112±0.005	1.000	447	-0.85429; P>0.1
CP¹					
a	49	0.111±0.003	1.000	683	-0.51280; P>0.1
b	8	0.106±0.010	1.000	396	-0.29945; P>0.1
c	41	0.108±0.003	1.000	613	-0.28756; P>0.1
GR I	31	0.110±0.004	1.000	632	-0.52184; P>0.1
GR II	3	0.064±0.010	1.000	146	nd
GR III	15	0.059±0.008	1.000	277	-0.08780; P>0.1
RdRp					
a	47	0.111±0.003	0.997	321	-0.16768; P>0.1
b	8	0.111±0.010	1.000	223	-0.20367; P>0.1
c	39	0.105±0.004	0.996	278	0.27881; P>0.1

¹ Os filogrupos indicados são os definidos na figura 16

a- Grupo de variantes inclui as sequências deste trabalho e as sequências homólogas obtidas de GenBank

b- Grupo de variantes inclui as sequências homólogas obtidas de GenBank

c- Grupo de variantes inclui as sequências deste trabalho

H- Diversidade haplotípica

S- Número de locais polimórficos (segregantes)

Tajima D – O valor de D do teste Tajima indica uma medida do afastamento da neutralidade para todas as mutações na região genômica considerada. O teste é baseado nas diferenças entre o número de locais polimórficos (segregantes) e o número médio de diferenças nucleotídicas. Os valores deste teste de neutralidade não foram significativos em todos os casos determinados (P>0.1); nd - não determinado por número insuficiente de sequências.

4.3.2 Proteína do movimento (MP)

A análise filogenética das sequências completas do gene da proteína do movimento foi realizada com base no alinhamento construído com as variantes dos isolados portugueses (Tabela X) e sequências homólogas de *GFLV*, *ArMV* e *GDefV* extraídas das mesmas sequências completas de RNA2 anteriormente analisados para a região da HP. Os dendrogramas foram construído com base nos alinhamentos de sequências nucleotídicas (Figura 14) e de sequências de aminoácidos deduzidas das anteriores (Figura 15). A maioria das variantes portuguesas mostra um agrupamento de acordo com o isolado de origem. No dendrograma construído com base nas sequências de nucleótidos as variantes do isolado 193302043 são as únicas dos isolados portugueses que se agrupam com sequências obtidas de GenBank, neste caso com NC003623, que corresponde ao largamente estudado isolado F13. No entanto quando as sequências de aminoácidos são consideradas, é uma das variantes de UVAMESA que está agrupada com a do isolado F13 sendo o único exemplo de agrupamento de variantes portuguesas com variantes obtidas por outros autores. No dendrograma construído com base nas sequências de nucleótidos todas as variantes recuperadas do isolado UVAMESA estão agrupadas com um valor de bootstrap de 100%. Os isolados B1 e A3 e os isolados 9506293, 9506243 e 9504091 integram os únicos dois grupos compostos por variantes de mais de um isolado português. Todavia, no dendrograma construído a partir do alinhamento de sequências de aminoácidos, B1 e A3 encontra-se isolados. No dendrograma baseado nas sequências de aminoácidos verifica-se a existência de dois grupos que integram mais que uma variante viral portuguesa, o grupo dos isolados 19340203 e 950409 e o grupo de 9506293, Syrah e três das variantes de 1103032, embora com valores de bootstrap relativamente baixos de 60% e 50% respetivamente. As duas variantes restantes do isolado 1103033 formam um grupo isolado com 93% de suporte.

À semelhança do que se verificou para a HP, as sequências nucleotídicas e de aminoácidos de *ArMV* e *GDefV*, no caso da MP, não formam o grupo mais distante das variantes de *GFLV*. De facto em ambos os dendrogramas o grupo que integra as sequências NC006056 (*ArMV*) e do isolado GHu (*GFLV*) é o mais divergente, seguido da sequência de *GDefV*

A divergência evolutiva média entre pares de sequências, considerando o total das 35 sequências foi de 0.117 ± 0.007 (Tabela XI). Este valor não foi significativamente superior ao encontrado para o grupo de 27 sequências das variantes portuguesas (0.112 ± 0.005),

embora seja evidente uma diferença na contagem de locais polimórficos (S) que foi de 531 e 447 respectivamente. Os polimorfismos detetados nesta região do genoma foram também avaliados através do teste estatístico Tajima D. Valores de estatística D negativos foram encontrados para os grupos de variantes da MP considerados (Tabela XI), sem, no entanto, se desviarem significativamente de zero ($P > 0.1$) em nenhum dos casos.

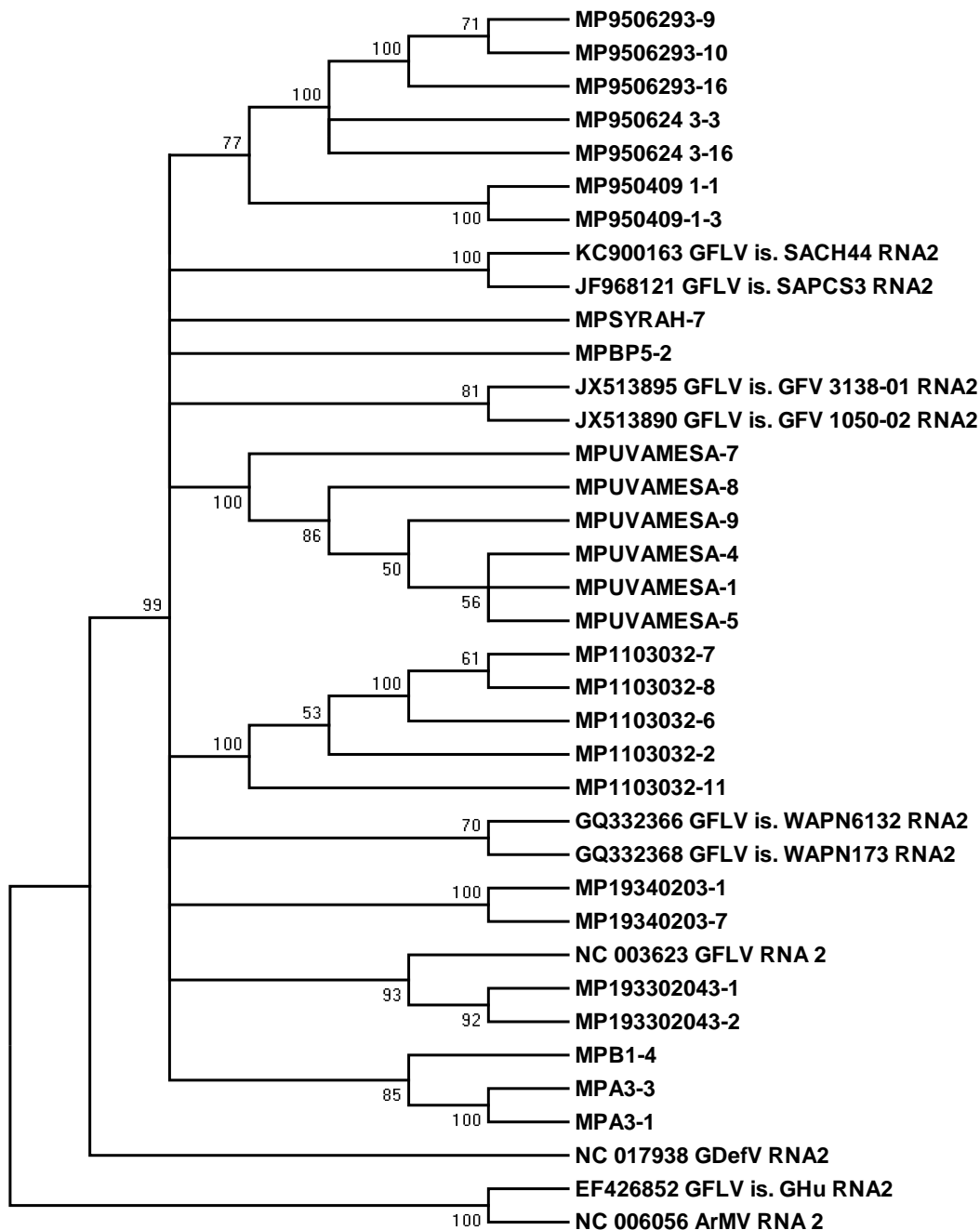


Figura 14. Dendrograma construído com base nas sequências de nucleótidos da proteína do movimento utilizando o método de Maximum-Likelihood com 1000 replicações de bootstrap. Ramos com menos de 50% de valor de bootstrap foram colapsados. As sequências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.

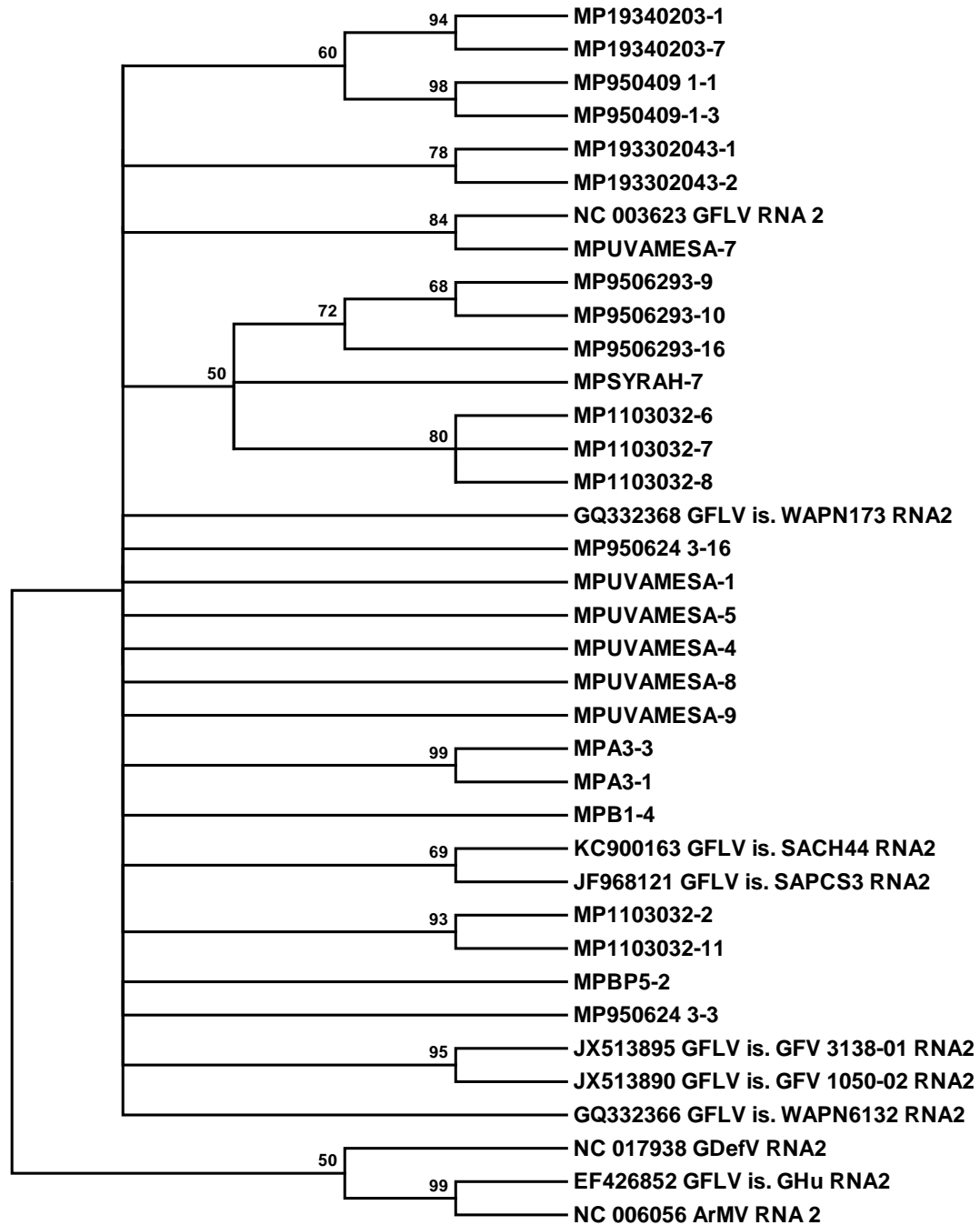


Figura 15. Dendrograma construído com base nas seqüências de aminoácidos da proteína do movimento utilizando o método de Maximum-Likelihood com 1000 replicações de bootstrap. Ramos com menos de 50% de valor de bootstrap foram colapsados. As seqüências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.

4.3.3 Proteína da Cápside (CP)

A análise filogenética das sequências completas do gene da proteína da cápside foi realizada com base no alinhamento construído com as variantes dos isolados portugueses (Tabela X) e sequências homólogas de *GFLV*, *ArMV* e *GDefV* extraídas das mesmas sequências completas de RNA2 anteriormente analisados para as regiões da HP e da MP. Os dendrogramas foram construídos com base nos alinhamentos de sequências nucleotídicas (Figura 16) e de sequências de aminoácidos deduzidas das anteriores (Figura 17).

Na análise das relações filogenéticas baseadas nas sequências nucleotídicas verificou-se uma divisão dos isolados em três grupos principais: GRI, GRII e GRIII, embora com valores de bootstrap não muito robustos de 51%, 79% e 50% respetivamente. O primeiro grupo (GRI) incluiu sequências de variantes de isolados portugueses e isolados obtidos por outros autores, cujas sequências se encontram disponíveis em GenBank. O segundo grupo (GRII) é constituído apenas por variantes dos isolados A3 e SYRAH. O terceiro grupo (GRIII) é composto exclusivamente por variantes de isolados portugueses. Com base na topologia deste dendrograma é sugerida a existência de variantes de diferentes grupos filogenéticos nos isolados A3 e SYRAH.

No dendrograma construído com base nas sequências de aminoácidos uma topologia diferente é observável. As variantes dos isolados portugueses encontram-se, em geral, agrupadas consoante o isolado de origem. As exceções são as variantes dos isolados SYRAH, A3 e BP5 que integram grupos divergentes.

Contrariamente ao que se verificou para a HP e a MP, as sequências nucleotídicas e de aminoácidos de *ArMV* e *GDefV*, no caso da CP, constituem o grupo mais divergente em ambos os dendrogramas.

A divergência evolutiva média entre pares de sequências, considerando o total das 49 sequências foi de 0.111 ± 0.003 (Tabela XI). Este valor não foi significativamente superior ao encontrado para o grupo de 41 sequências das variantes portuguesas (0.108 ± 0.003), e a diferença na contagem de locais polimórficos (S), respetivamente 683 e 613 é também reduzida.

Em relação aos grupos filogenéticos considerados para esta região, o grupo I apresenta a maior divergência evolutiva média entre pares de sequências (0.110 ± 0.004), seguido do grupo II (0.064 ± 0.010) e do grupo III (0.059 ± 0.008). Verifica-se que estes valores de divergência não estão diretamente relacionados nem com o número de sequências em cada grupo nem com os respectivos valores de S (Tabela XI).

Os polimorfismos detetados nesta região do genoma foram igualmente avaliados através do teste estatístico Tajima D. Valores de estatística D negativos foram encontrados para os grupos de variantes considerados (Tabela XI), sem, no entanto, se desviarem significativamente de zero ($P > 0.1$) em nenhum dos casos.

Na tabela XII estão indicados os valores de divergência evolutiva média entre os filogrupos considerados para as variantes do gene da CP. Verifica-se que estes valores, para cada par comparado, são superiores aos de divergência dentro de cada grupo. Embora os valores de bootstrap, como já referido, estejam no limite aceitável para inferência filogenética, os valores da tabela XII fornecem outra linha de evidência de suporte aos grupos considerados.

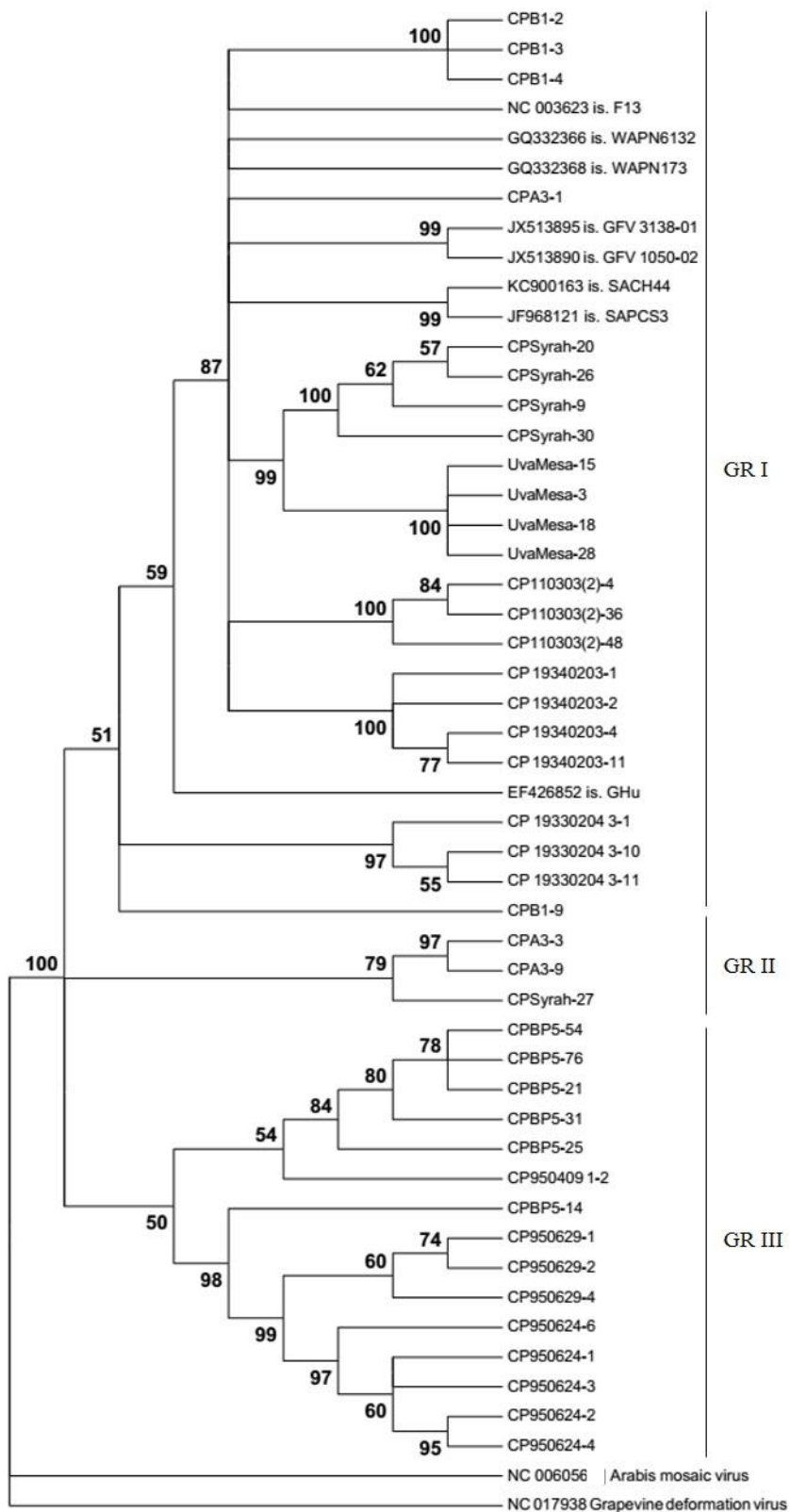


Figura 16. Dendrograma construído com base nas seqüências de nucleótidos da proteína da cápside utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 50% de valor de bootstrap foram colapsados. As seqüências obtidas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.

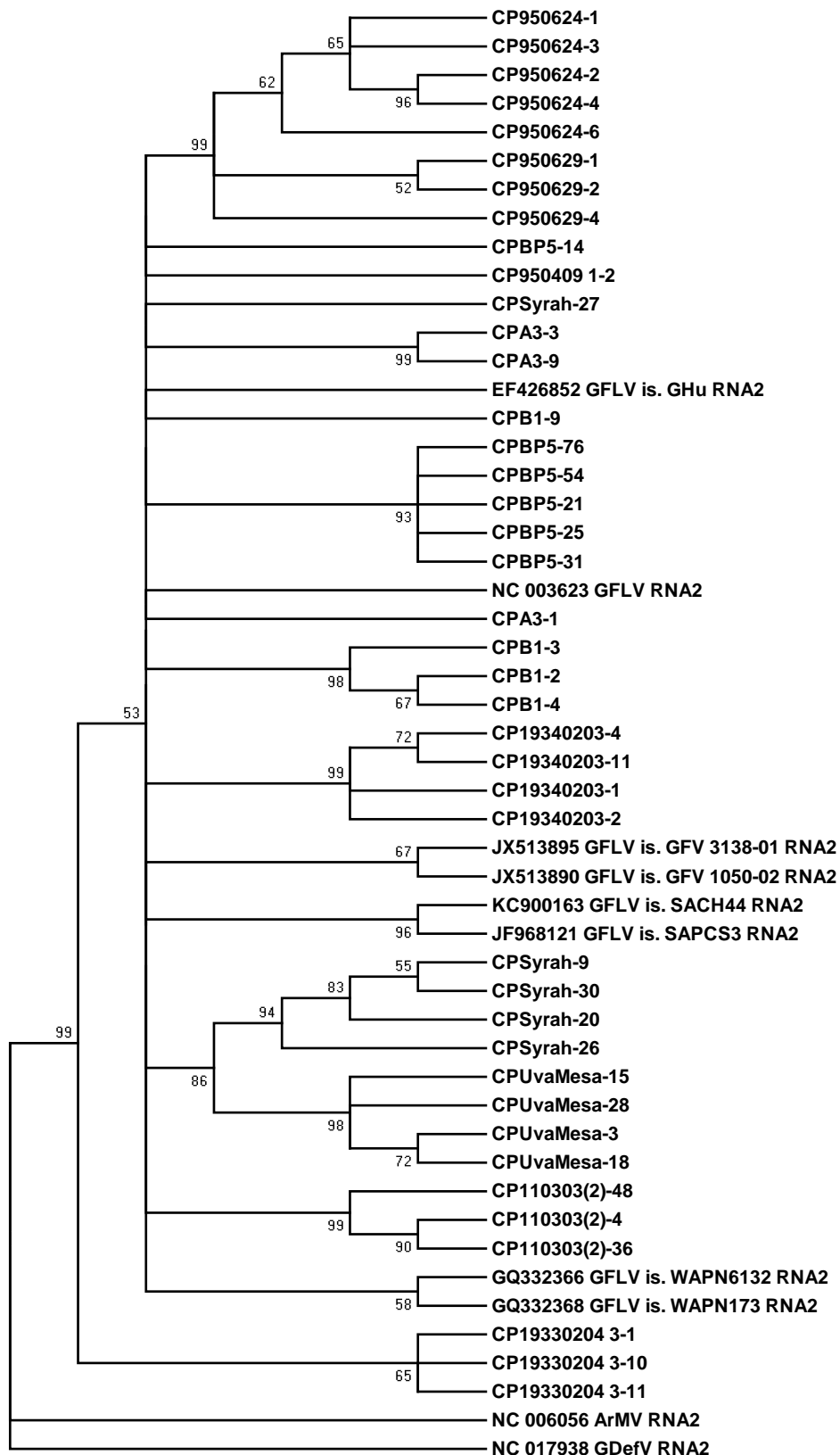


Figura 17. Dendrograma construído com base nas seqüências de aminoácidos da proteína da cápside utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 50% de valor de bootstrap foram colapsados. As seqüências obtidas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.

Tabela XII. Avaliação da divergência evolutiva média entre os grupos filogenéticos determinados para as variantes nucleotídicas do gene da proteína da cápside (CP) de *Grapevine fanleaf virus*.

Filogrupo ^a	I	II	III
Grupo I	-		
Grupo II	0.127 ±0.019	-	
Grupo III	0.124 ±0.009	0.104±0.021	-

^a Os filogrupos indicados são os definidos na figura 16
São indicados os valores médios ± desvio padrão

4.3.4 RNA polimerase RNA-dependente (RdRp)

Os mesmos isolados utilizados para a análise filogenética da HP, MP e CP e com testes positivos por DAS-ELISA com anticorpos comerciais (Tabela X) foram analisados por PCR com o par de primers GFLV 5072U16 e GFLV 5867L19 para a amplificação específica de um fragmento de 813 nt do gene da RdRp (Figura 18-A). Após a ligação do produto de PCR ao plasmídeo e posterior transformação, as colónias recombinantes foram testadas de modo a verificar a inserção do fragmento de 813 bp no plasmídeo (Figura 18-B).

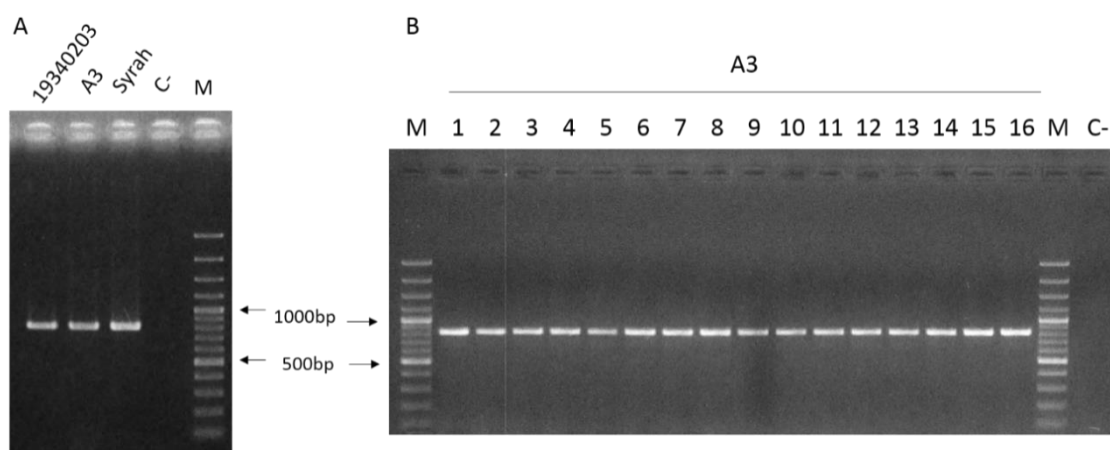


Figura 18. A – Exemplo da verificação de amplificação por PCR dum fragmento de 813 bp do gene da RdRp de *GFLV* (gel de agarose 1,5% em TAE 1x, corado com brometo de etídeo). B – Exemplo da verificação da presença do fragmento de 813nt no plasmídeo, com resultados positivos para todas as colónias (gel de agarose 1,5% em TAE 1x, corado com GreenSafe).19340203, A3 e Syrah: amostras testadas; C-: controlo negativo do PCR; M: marcador de peso molecular 100bp plus, Números de 1 a 16 – colónias testadas para o isolado A3.

Os produtos de PCR de pelo menos 16 clones positivos de cada amostra em estudo foram analisados através de SSCP (Figura 19-A) e os clones evidenciando diferentes padrões foram escolhidos para extração de pDNA. Para confirmar a presença do fragmento de 813bp, o pDNA extraído foi digerido com uma enzima de restrição (Figura 19-B) e posteriormente sequenciado comercialmente.

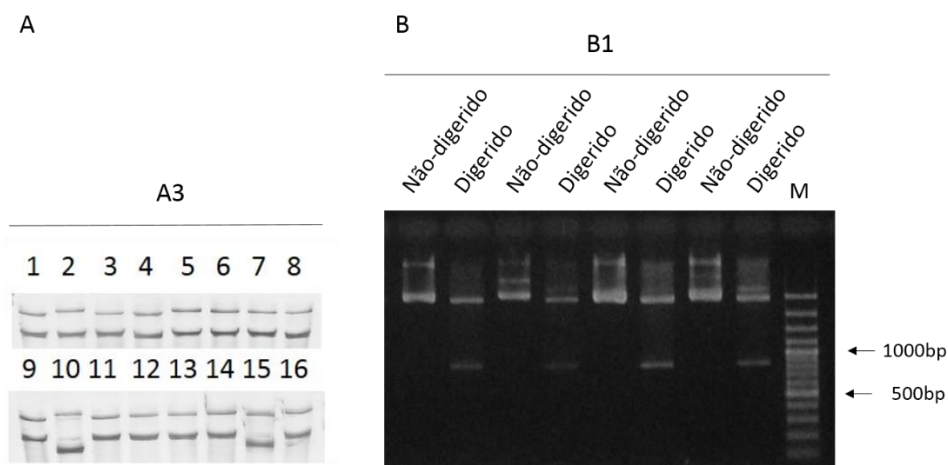


Figura 19. A - Padrões de SSCP obtidos para clones do isolado A3, foram considerados padrões diferentes: 2, 4, 10 e 15. B – Exemplo da verificação do fragmento de 813 bp no plasmídeo através do padrão de restrição com uma endonuclease, previamente à sequenciação (Gel de agarose 1% em TAE 1x, corado em brometo de etídeo).

As sequências obtidas foram tratadas e alinhadas com sequências homólogas disponíveis em GenBank. A partir do alinhamento das sequências nucleotídicas e das sequências de aminoácidos deduzidas a partir das anteriores, construíram-se os respectivos dendrogramas (Figuras 20 e 21).

Verificou-se que as variantes dos isolados portugueses tendem, de um modo geral, a agrupar-se consoante o isolado de origem. As exceção são as variantes do isolado A3 que se agrupam com a variante de Syrah. No dendrograma baseado nas sequências de nucleótidos, as variantes de 9506243 e 950629 encontram-se agrupadas, enquanto no dendrograma construído com base nas sequências de aminoácidos as variantes de 950629 formam um grupo e as variantes de 9596293 se encontram isoladas, facto resultante da existência de substituições não sinónimas. No dendrograma da figura 21, as variantes do isolado 19340203 agrupam-se com a do isolado GHu são as únicas que formam um grupo com um isolado de outro país, GHu.

Embora no dendrograma da figura 20 as sequências de GDefV e ArMV sejam as mais divergentes, o mesmo não acontece no dendrograma da figura 21.

A divergência evolutiva média entre pares de sequências, considerando o total das 47 sequências foi de 0.111 ± 0.003 (Tabela XI). Este valor não foi significativamente superior ao encontrado para o grupo de 39 sequências das variantes portuguesas (0.105 ± 0.004), e a contagem de locais polimórficos (S) foi de 321 e 278 respectivamente. Os polimorfismos detetados nesta região do genoma foram avaliados através do teste estatístico Tajima D. Valores de estatística D negativos foram encontrados considerando o grupo com o total das 47 variantes da RdRp (Tabela XI) e das 8 variantes obtidas de GenBank. O grupo das variantes portuguesas apresentou um valor positivo de estatística D. No entanto nenhum dos valores se desviou significativamente de zero ($P > 0.1$).

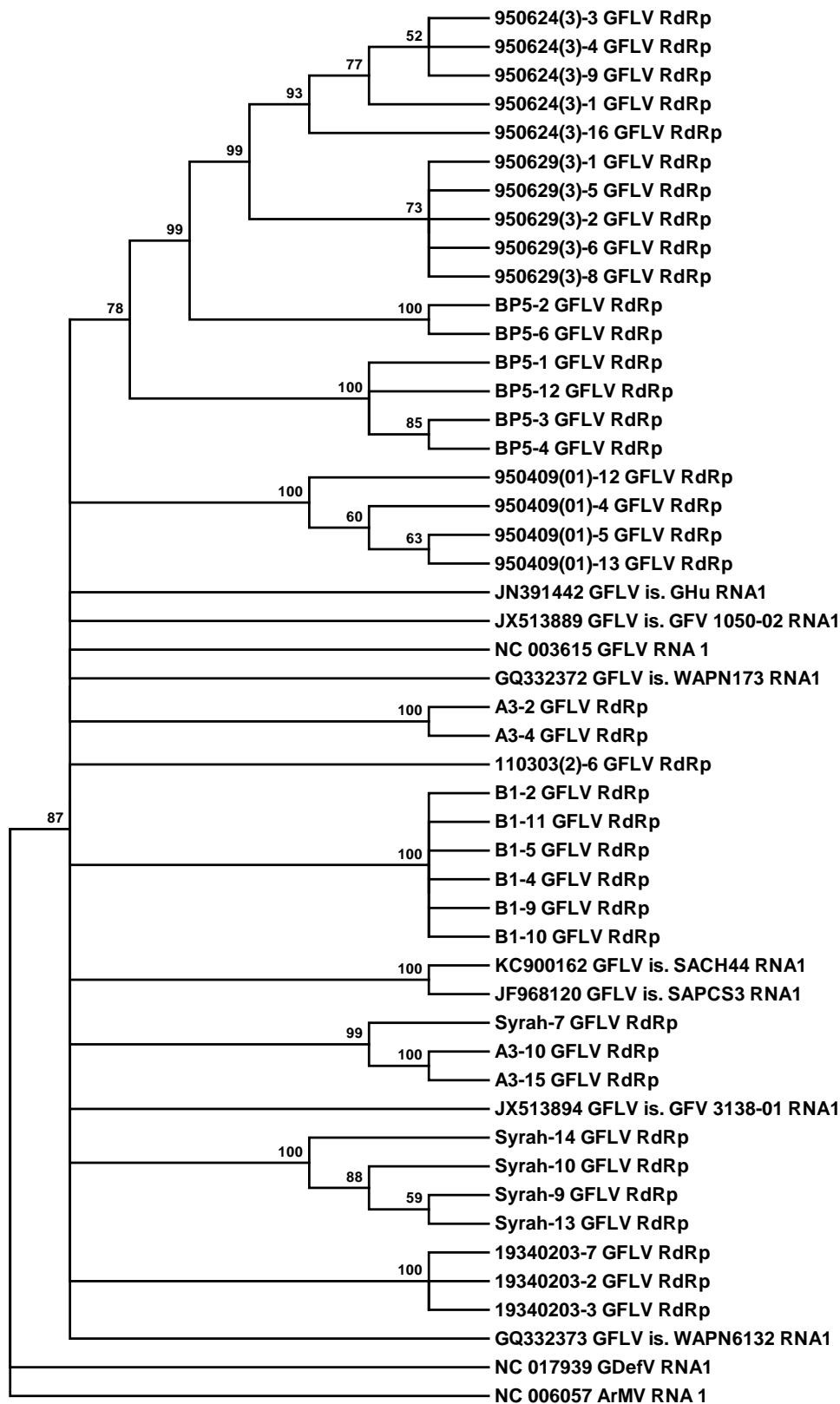


Figura 20. Dendrograma construído com base nas seqüências de nucleótidos da RNA polimerase RNA-dependente utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 50% de valor de bootstrap foram colapsados. As seqüências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.

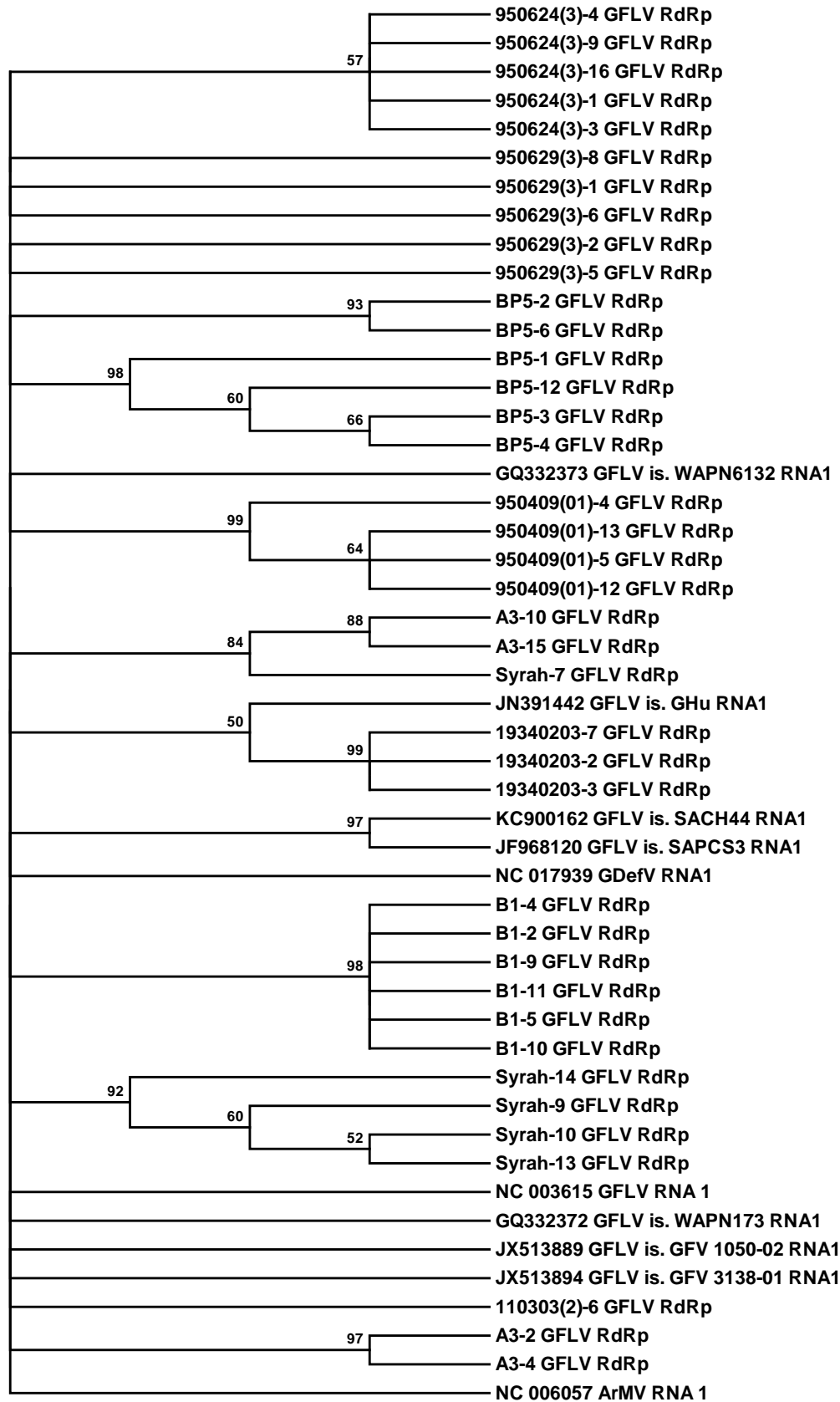


Figura 21. Dendrograma construído com base nas seqüências de aminoácidos da RNA polimerase RNA-dependente utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 50% de valor de bootstrap foram colapsados. As seqüências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.

4.3.5 Detecção de recombinação em variantes de *GFLV*

As sequências de cada região genómica caracterizada anteriormente foram analisadas com os métodos implementados no programa RDP4 para verificação da existência de eventos de recombinação. Na tabela XIII está apresentado um resumo dos eventos encontrados nas regiões codantes respetivamente da HP e da MP para variantes de *GFLV*, por pelo menos quatro dos métodos implementados por RDP4. Nenhum evento de recombinação foi encontrado na região codante da CP ou da RdRp que tivesse o mesmo nível de suporte estatístico.

Na região codante da HP as variantes portuguesas 1103032-8 e 1103032-11 mostraram evidência de recombinação entre as variantes 193302043-1 e GQ332368, e as variantes GQ332366, JX5513890, JX5513895 e JX5513890 sugerem ser resultado da recombinação envolvendo respetivamente as variantes portuguesas 9504091-1, 9506243-3 e 193302043-1 nos dois últimos casos.

Na região codante da MP foi encontrado sinal de recombinação nas variantes portuguesas B1-4, A3-1, A3-3, SYRAH-7 e BP5-2. As variantes recombinadas em cada evento estão referidas na tabela XIII, sendo que o evento mais frequente envolve a variante 193302043-1.

Tabela XIII. Eventos putativos de recombinação intragênica^a em variantes de diferentes genes codificados no RNA1 ou no RNA2 de *Grapevine fanleaf virus*.

HP ^b												
Evento ^a	Breakpoint		Variante Recombinante	Variantes da recombinação		Método (Av. P-val.) ^d						
	Início	Fim		Major	Minor	R	G	B	M	C	S	3Seq
1	18	255	GQ332366	9504091-1 (86.1%)	U(GHu) -	8.923x10 ⁻⁰⁸	1.108x10 ⁻⁰⁶	1.841x10 ⁻⁰⁷	1.197x10 ⁻¹¹	3.437x10 ⁻⁰⁵	3.742x10 ⁻¹⁷	3.898x10 ⁻⁰⁹
2	267	312	JX5513890	JX5513895 (97.3%)	U(9506243-3) -	1.6111x10 ⁻⁰⁷	3.631 x10 ⁻⁰⁷	-	6.264x10 ⁻⁰⁷	1.658x10 ⁻⁰⁷	-	9.139x10 ⁻⁰⁶
3	427	702	JX5513895	U(193302043-1) -	GQ332368 (90.6%)	-	-	3.729x10 ⁻⁰²	1.040x10 ⁻⁰²	1.129x10 ⁻⁰²	1.004x10 ⁻⁰²	2.996x10 ⁻⁰³
	427	702	JX5513890	U(193302043-1) -	GQ332368 (88.6%)	-	-	3.729x10 ⁻⁰²	1.040x10 ⁻⁰²	1.129x10 ⁻⁰²	1.004x10 ⁻⁰²	2.996x10 ⁻⁰³
	427	702	1103032-8	193302043-1 (89.8%)	GQ332368 (93.2%)	-	-	3.729x10 ⁻⁰²	1.040x10 ⁻⁰²	1.129x10 ⁻⁰²	1.004x10 ⁻⁰²	2.996x10 ⁻⁰³
	427	702	1103032-11	193302043-1 (93.2%)	GQ332368 (93.2%)	-	-	3.729x10 ⁻⁰²	1.040x10 ⁻⁰²	1.129x10 ⁻⁰²	1.004x10 ⁻⁰²	2.996x10 ⁻⁰³
MP ^c												
2	258	478	B1-4	U(1103032-11) (68%)	9504091-1 (68%)	2.619x10 ⁻⁰³	2.500x10 ⁻⁰⁵	2.503x10 ⁻⁰⁵	2.148x10 ⁻⁰⁶	1.2 62x10 ⁻⁰⁴	8.703x10 ⁻⁰⁴	1.605x10 ⁻⁰⁶
	365	511	A3-1	U(1103032-11) (89.8%)	9504091-1 (89.8%)	2.619x10 ⁻⁰³	2.500x10 ⁻⁰⁵	2.503x10 ⁻⁰⁵	2.148x10 ⁻⁰⁶	1.2 62x10 ⁻⁰⁴	8.703x10 ⁻⁰⁴	1.605x10 ⁻⁰⁶

5	58	125	A3-3	9506243-16 (90%)	GHu (89.7%)	1.168×10^{-03}	3.736×10^{-02}	9.616×10^{-03}	-	-	-	4.687×10^{-01}
	59	150	A3-1	9506243-16 (90.3%)	GHu (68%)	1.168×10^{-03}	3.736×10^{-02}	9.616×10^{-03}	-	-	-	4.687×10^{-01}
6	245	363	NC003623 (F13)	193302043-2 (98.7%)	BP5-2 (95.8%)	3.202×10^{-04}	4.175×10^{-02}	3.240×10^{-04}	3.357×10^{-06}	2.130×10^{-04}	-	8.691×10^{-06}
9	U	625	JX513895	GQ332366 (89.6%)	U(193302043-1) -	-	5.095×10^{-02}	-	4.773×10^{-01}	6.390×10^{-02}	-	9.9891×10^{-01}
	U	625	Jx513890	GQ332366 (90.3%)	U(193302043-1) -	-	5.095×10^{-02}	-	4.773×10^{-01}	6.390×10^{-02}	-	9.9891×10^{-01}
	U	598	SYRAH-7	U(GQ332366) -	193302043-1 (33.3%)	-	5.095×10^{-02}	-	4.773×10^{-01}	6.390×10^{-02}	-	9.9891×10^{-01}
	U	647	BP5-2	U(GQ332366) -	193302043-1 (90.9%)	-	5.095×10^{-02}	-	4.773×10^{-01}	6.390×10^{-02}	-	9.9891×10^{-01}

^a São indicados somente os eventos suportados pelo menos por quatro dos diferentes métodos implementados no software RD4. O valor de probabilidade de cada método é mostrado. A numeração nucleotídica dos breakpoints corresponde a posições nos respectivos alinhamentos de sequências.

^b HP – sequência codante completa da homing protein

^c MP – sequência codante completa da proteína do movimento

^d R: RDP; G: Geneconv; B: Bootscan; M: MaxChi C: Chimaera; S: SiScan

U-indeterminado

4.3.6 Pressões seletivas nas diferentes regiões codantes

Cada conjunto de variantes de em cada região codante do *GFLV* (genes da HP, MP, CP e RdRp), foi analisado com a ajuda do web interface Datamonkey. Os métodos implementados nesta ferramenta têm em conta os sinais de recombinação detetados nas variantes e os dendrogramas construídos para cada região foram usados para calcular os valores de dN/dS específicos de cada gene, que estão indicados na tabela XIV. Os métodos de cálculo disponíveis não usam apenas os polimorfismos para inferir a pressão seletiva, como o teste estatístico Tajima D, mas sim a razão entre substituições sinónimas e não sinónimas em cada região analisada. Um valor de dN/dS <1 é interpretado como indicando seleção negativa ou purificante, valores de dN/dS =1 sugerem seleção neutra e valores de dN/dS >1 indicam seleção positiva.

Verifica-se que as três regiões codantes que integram o RNA2 estão sob seleção purificante (Tabela XIV), embora seja na região codante da RdRp (RNA1) analisada neste trabalho que a seleção purificante seja mais forte.

Tabela XIV. Avaliação das pressões de seleção atuantes em diferentes genes codificados no RNA1 ou no RNA2 de *Grapevine fanleaf virus*.

Nº de Sequências	Região codante	dN/dS		Pressão de Seleção ^a					
		Log(L)	Média	Positiva		Negativa		Neutra	
				N	%	N	%	N	%
35	HP (264 codões)	-5382.73	0.257	7	2.7	107	40.5	150	56.8
35	MP (349 codões)	-8095.67	0.124	1	0.3	200	57.3	148	42.4
49	CP (505 codões)	-11463.9	0.105	1	0.2	292	57.8	212	42
45	RdRp (272 codões)	-5016.88	0.077	2	0.7	172	63.3	98	36

Os valores médios de dN/dS <1 indicam seleção negativa ou purificante; dN/dS =1 sugerem seleção neutra; dN/dS >1 indicam seleção positiva

HP – homing protein; MP – proteína do movimento ; CP – proteína da cápside; RdRp – RNA polimerase RNA-dependente

^a Locais positivamente ou negativamente selecionados foram identificados pelo menos por um dos três métodos de detecção disponíveis no site Datamonkey: single likelihood ancestor counting (SLAC), fixed effects likelihood (FEL) e internal fixed effects likelihood (IFEL). SLAC é um método de contagem, enquanto que os outros dois métodos são métodos de probabilidade.

4.4 Detecção e caracterização da variabilidade do RNA satélite nos isolados portugueses

Usando primers descritos na literatura, os isolados portugueses (tabela XV) foram testados para a presença de RNA satélite por RT-PCR. Dos 5 pares testados, foram obtidas amplificações com NepSatF+NepSatR e *GFLV* satRNA 174F + *GFLV* satRNA RACE GSP4 (Figura 22-A). Os produtos de PCR foram ligados ao plasmídeo e a ligação foi usada para transformar células competentes. As colónias foram analisadas por PCR para confirmar a presença do fragmento de interesse (Figura 22-B).

Tabela XV. Isolados portugueses usados na análise filogenética do satRNA.

Nome	Espécie/Casta
B1	Cabernet Sauvignon
Syrah	Syrah
UVAMESA	Uva de mesa
19330204	Moscatel de Azeitão
19350106	Uva de mesa
41404(4)	Donago
41701(3)	Tinta de Porto Santo
51103(3)	Ricoca
6230401	Cabernet Sauvignon
6230403	Cabernet Sauvignon
6230304	Cabernet Sauvignon
6230404	Cabernet Sauvignon

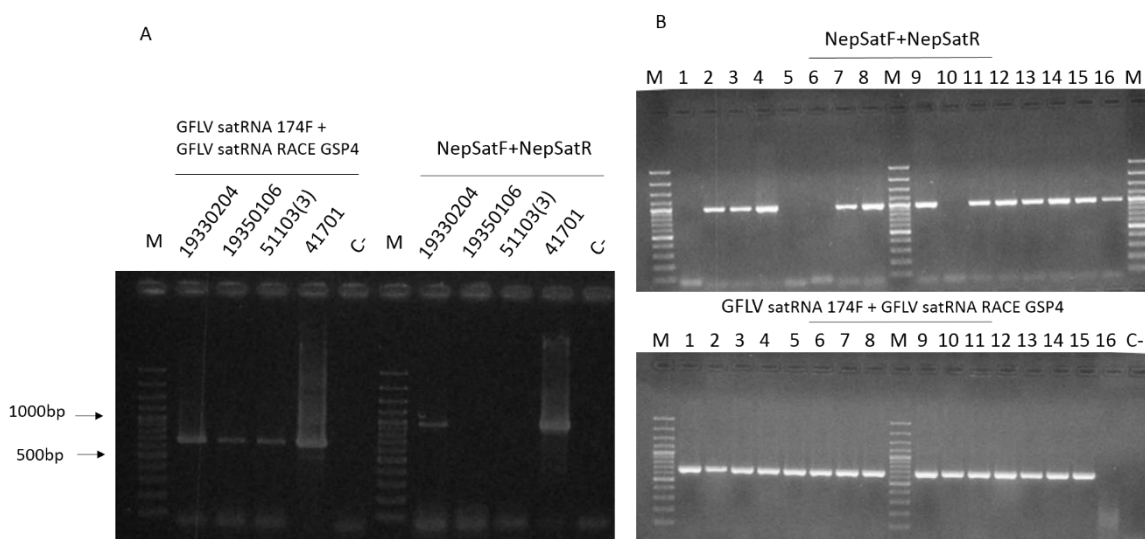


Figura 22. A – Exemplo de verificação de deteção por PCR de RNA satélite com dois pares de primers (gel de agarose 1,5% em TAE 1x, corado com brometo de etídeo) B – Exemplo da verificação da presença do fragmento inserido no plasmídeo para colónias amplificadas com NepSatF+NepSatR e colónias amplificadas com *GFLV* satRNA 174F + *GFLV* satRNA RACE GSP4 (gel de agarose 1,5% em TAE 1x, corado com Greensafe); C-: controlo negativo; M: marcador de peso molecular 100bp plus.

Os produtos de PCR de pelo menos 16 clones positivos por amostra foram analisados através de SSCP (Figura 23-A) e os clones com diferentes padrões foram escolhidos para extração de pDNA. O DNA plasmídico extraído foi digerido com uma enzima de restrição para confirmar se o plasmídeo continha o fragmento de interesse (Figura 23-B) e, posteriormente, foi sequenciado.

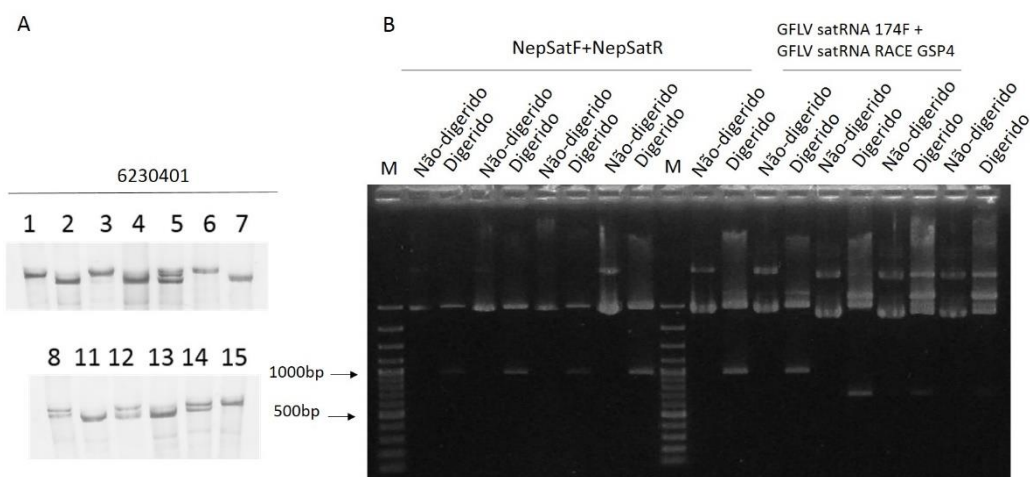


Figura 23. Padrões de SSCP obtidos para o isolado 6230401, foram considerados padrões diferentes: 5, 6, 7, 12, 13, 14 e 15. B – Exemplo da verificação da presença dos fragmentos correspondentes à amplificação com NEpSatF+NepSatR e *GFLV* satRNA 174F+*GFLV* satRNA RACE GSP4 nos plasmídeos, previamente à sequenciação (gel de agarose 1% em TAE 1x, corado em brometo de etídeo) M: marcador de peso molecular 100bp plus.

A partir das sequências obtidas para doze isolados e de sequências depositadas na base de dados GenBank, incluindo variantes de RNA satélite de *GFLV* e *ArMV*, foram construídos alinhamentos. Tendo como base os alinhamentos das sequências nucleotídicas e das sequências de aminoácidos deduzidas das anteriores, foram produzidos os respectivos dendrogramas (Figuras 24 e 25). No primeiro caso as variantes de RNA satélite agrupam-se em três filogrupos (GI, GII e GIII) com elevado valor de bootstraps, respetivamente de 98%, 95% e 99%. Em todos os grupos podem ser encontradas variantes dos isolados portugueses, com especial incidência no grupo II em que a única variante obtida de GenBank corresponde à variante presente no isolado F13. Neste grupo não foram encontradas variantes obtidas de isolados de *ArMV*.

No caso do dendrograma construído com base nas sequências de aminoácidos as relações filogenéticas entre as variantes que constituem o GI não aparecem tão resolvidas. No entanto

a composição dos grupos GII e GIII é mantida com valores de bootstrap de 89% e 99% respectivamente.

Verifica-se que as variantes de RNA satélite não se agrupam filogeneticamente de acordo com o vírus a que estão associados.

A divergência evolutiva média entre pares de sequências, considerando o total das 64 sequências foi de 0.157 ± 0.012 (Tabela XVI). Este valor não foi significativamente superior ao encontrado para o grupo de 55 sequências das variantes portuguesas (0.130 ± 0.013), mas verifica-se uma grande diferença na contagem de locais polimórficos (S), respetivamente 355 e 658.

Em relação aos grupos filogenéticos considerados para as variantes do RNA satélite, o grupo III apresenta a maior divergência evolutiva média entre pares de sequências (0.059 ± 0.012), seguido do grupo I (0.041 ± 0.013) e do grupo II (0.033 ± 0.010). Verifica-se que estes valores de divergência não estão diretamente relacionados nem com o número de sequências em cada grupo nem com os respetivos valores de S (Tabela XVI).

Tabela XVI. Avaliação da divergência evolutiva média intragrupo (d) entre pares de sequências de RNA satélite de *Nepovirus*.

Região genómica e Grupos de variantes ¹	Nº de variantes	d	H	S	Tajima D
RNAsat					
a	64	0.157 ± 0.012	0.992	355	-0.44305; P>0.1
b	10	0.210 ± 0.020	1.000	487	-0.35735; P>0.1
c	55	0.130 ± 0.013	0.989	658	-0.97897; P>0.1
GRI	38	0.041 ± 0.013	0.986	196	-1.95872; P<0.05*
GRII	15	0.033 ± 0.010	1.000	97	-1.35476; P>0.1
GRIII	11	0.059 ± 0.012	1.000	154	0.04173; P>0.1

Os filogrupos indicados são os definidos na figura 24.

a- Grupo de variantes inclui as sequências deste trabalho e as sequências homólogas obtidas de GenBank

b- Grupo de variantes inclui as sequências homólogas obtidas de GenBank

c- Grupo de variantes inclui as sequências deste trabalho

H- Diversidade haplotípica

S- Número de locais polimórficos (segregantes)

Tajima D – O valor de D do teste Tajima indica uma medida do afastamento da neutralidade para todas as mutações na região genómica considerada. O teste é baseado nas diferenças entre o número de locais polimórficos (segregantes) e o número médio de diferenças nucleotídicas.

Os polimorfismos detetados nas variantes nucleotídicas do RNA satélite foram avaliados através do teste estatístico Tajima D. Um valor de estatística D negativo foi encontrado para o grupo I (Tabela XVI), que se desvia significativamente ($P < 0.05^*$) do zero.

Na tabela XVII estão indicados os valores de divergência evolutiva média entre os filogrupos considerados para as variantes do RNA satélite. Verifica-se que estes valores, para cada par comparado, são superiores aos de divergência dentro de cada grupo.

Tabela XVII. Avaliação da divergência evolutiva média entre os grupos filogenéticos determinados para as variantes nucleotídicas do RNA satélite de *Nepovirus*.

Filogrupo ^a	I	II	III
GRI	-		
GRII	0.212 ± 0.019	-	
GRIII	0.258 ± 0.024	0.247 ± 0.038	-

^a Os filogrupos indicados são os definidos na figura 24. São indicados os valores médios ± desvio padrão.

Não foi encontrada nenhuma evidência de recombinação entre variantes de RNA satélite pelos modelos implementados em RDP4. O valor de dN/dS encontrado, considerando as 64 sequências foi de 0.512 ($\text{Log}(L) = -6414.06$).

Estes resultados expandem o conhecimento sobre a variabilidade e incidência de RNA satélite em isolados de *GFLV*. Apesar da pesquisa feita em diferentes bases de dados de motivos proteicos e domínios funcionais não foi possível encontrar informação que permita especular da função ou funções da proteína codificada no RNA satélite.

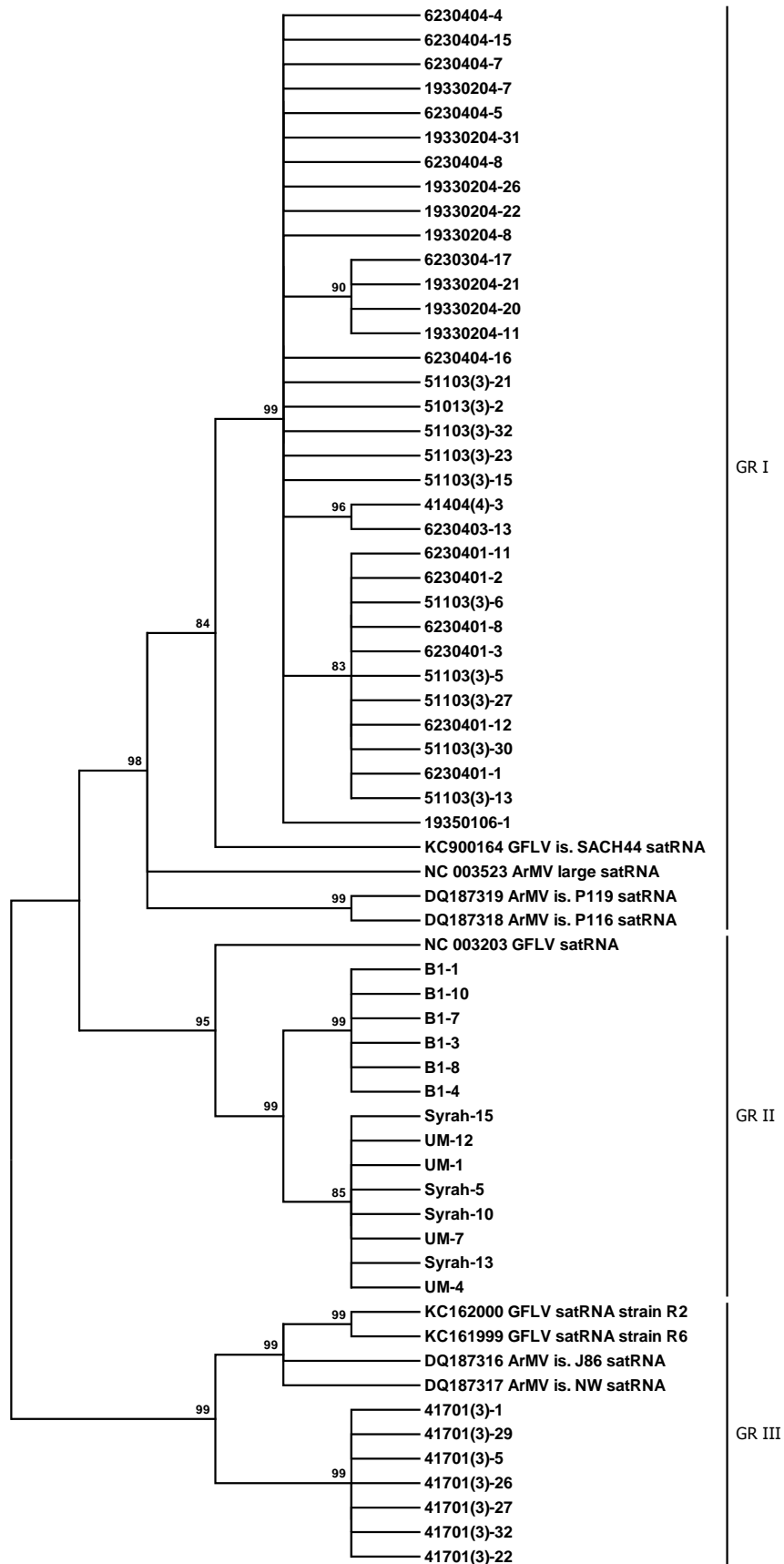


Figura 24. Dendrograma construído com base nas sequências de nucleótidos do RNA satélite utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 75% de valor de bootstrap foram colapsados. As sequências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.

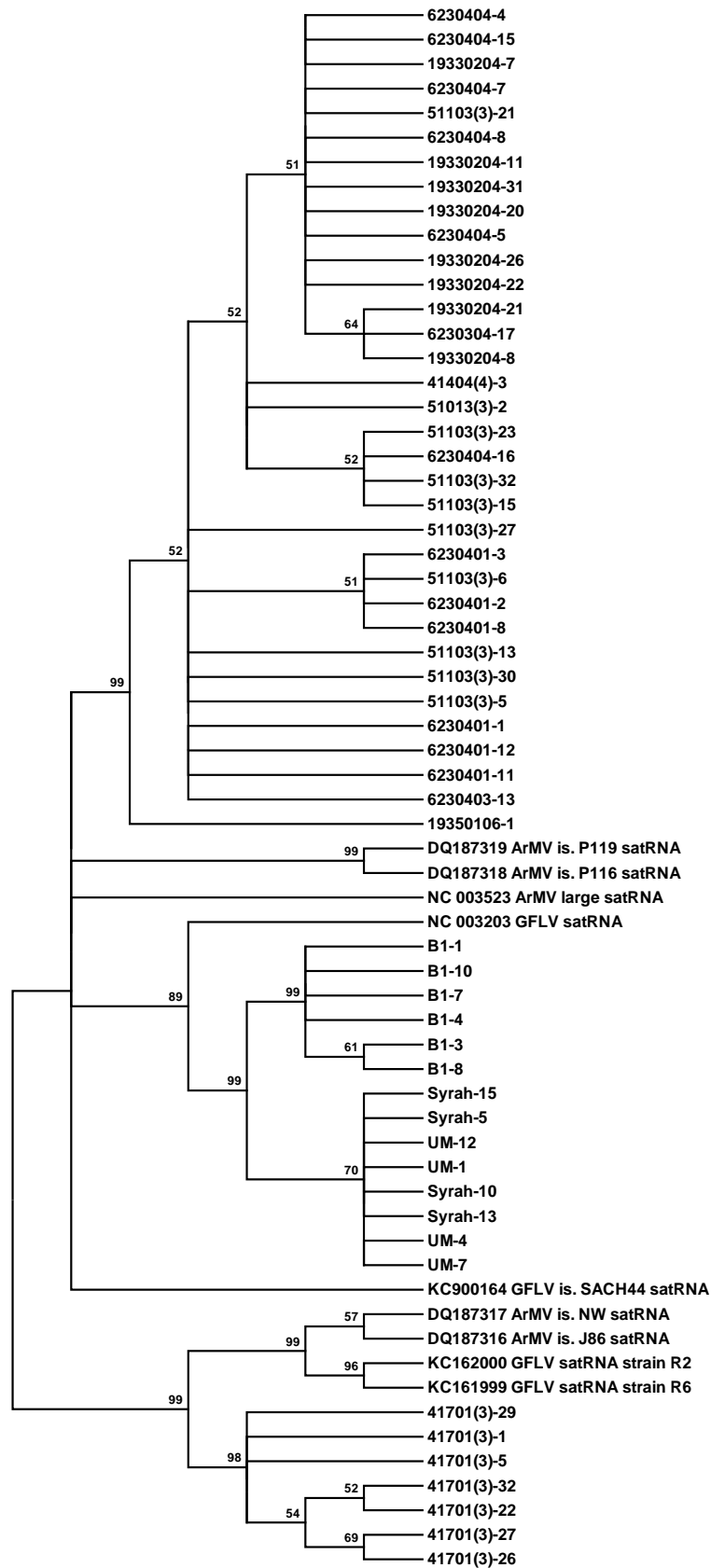


Figura 25. Dendrograma construído com base nas seqüências de aminoácidos do RNA satélite utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 50% de valor de bootstrap foram colapsados. As seqüências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.

4.5 Determinante da sintomatologia: HP?

A “homing protein”, devido à sua maior variabilidade genética em relação a outros locais do genoma, tem vindo a ser apontada como responsável pelos sintomas evidenciados em videiras infetadas (Krake, *et al.*, 1999). Recentemente, Elbeaino *et al.* (2014) sugeriram que uma região específica da HP, nomeadamente a região 5’ que abrange os primeiros 469 nt desta proteína, seria o determinante diferenciador da sintomatologia entre clorose e malformação infeciosa. Com o intuito de verificar se a validade daquela sugestão em isolados portugueses cujos sintomas estão bem documentados (tabela XVIII) foram escolhidas amostras cujos hospedeiros apresentam sintomas mistos de clorose e malformação, e isolados cujo hospedeiro não apresenta sintomas de clorose.

Tabela XVIII. Isolados portugueses e respetivos sintomas.

Nome	Espécie/Casta	Sintomas
A3	Touriga Nacional	Clorose e malformação
B1	Cabernet Sauvignon	Clorose e malformação
BP5	<i>Vitis vinifera</i> casta n.c.	Algum mosaico, sem clorose clara
Syrah	Syrah	Clorose e malformação
UVAMESA	Uva de mesa	Malformação sem clorose
110303(2)	<i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>sylvestris</i>	Ananicada, seio peciolar muito aberto, sem clorose
19330204	Moscatel de Azeitão	Malformação, mosaico, sem clorose
19340203	Moscatel Rosado	Malformação, mosaico, sem clorose
950409(01)	Síria	
950624(3)	Síria	Clorose e malformação, sem assimetria foliar, folha mais curta em forma de leque
950629(3)	Síria	

n.c. – não conhecida

As sequências dos isolados portugueses para a região 5’ da HP foram alinhadas com as sequências de todos os isolados utilizados por Elbeaino *et al.* (2014). A partir do alinhamento das sequências em nucleótidos e das sequências de aminoácidos deduzidas das anteriores, foram construídos os respetivos dendrogramas. Segundo a análise filogenética realizada por aqueles autores, o dendrograma construído com base no alinhamento das sequências em aminoácidos divide-se em quatro grupos. Três desses grupos contêm os isolados cuja planta hospedeira revela sintomas de clorose infeciosa e o grupo restante contém todos os isolados provenientes de plantas com sintomas de malformação. O que se verifica no dendrograma construído a partir do alinhamento das sequências nucleotídicas (Figura 26) e de

aminoácidos (Figura 27) dos isolados portugueses e dos isolados daquele trabalho é, em primeiro lugar, o facto de o dendrograma mostrar três grupos principais, e não quatro como havia sido discutido por Elbeaino *et al.* (2014). Verifica-se também que nenhuma das variantes portuguesas, independentemente dos sintomas, se encontra no grupo dos isolados cujas plantas hospedeiras são indicadas por aqueles autores como possuindo malformações. Mesmo as variantes de isolados cujos sintomas não incluem clorose, como é o caso dos isolados 1103032, 19340203, UvaMesa, 193302043 e BP5, se encontram agrupadas próximo das variantes dos outros isolados portugueses. Não se observa assim agrupamento das variantes em relação com os sintomas dos isolados mas sim, no caso das variantes portuguesas, grupos formados pelas variantes de cada isolado.

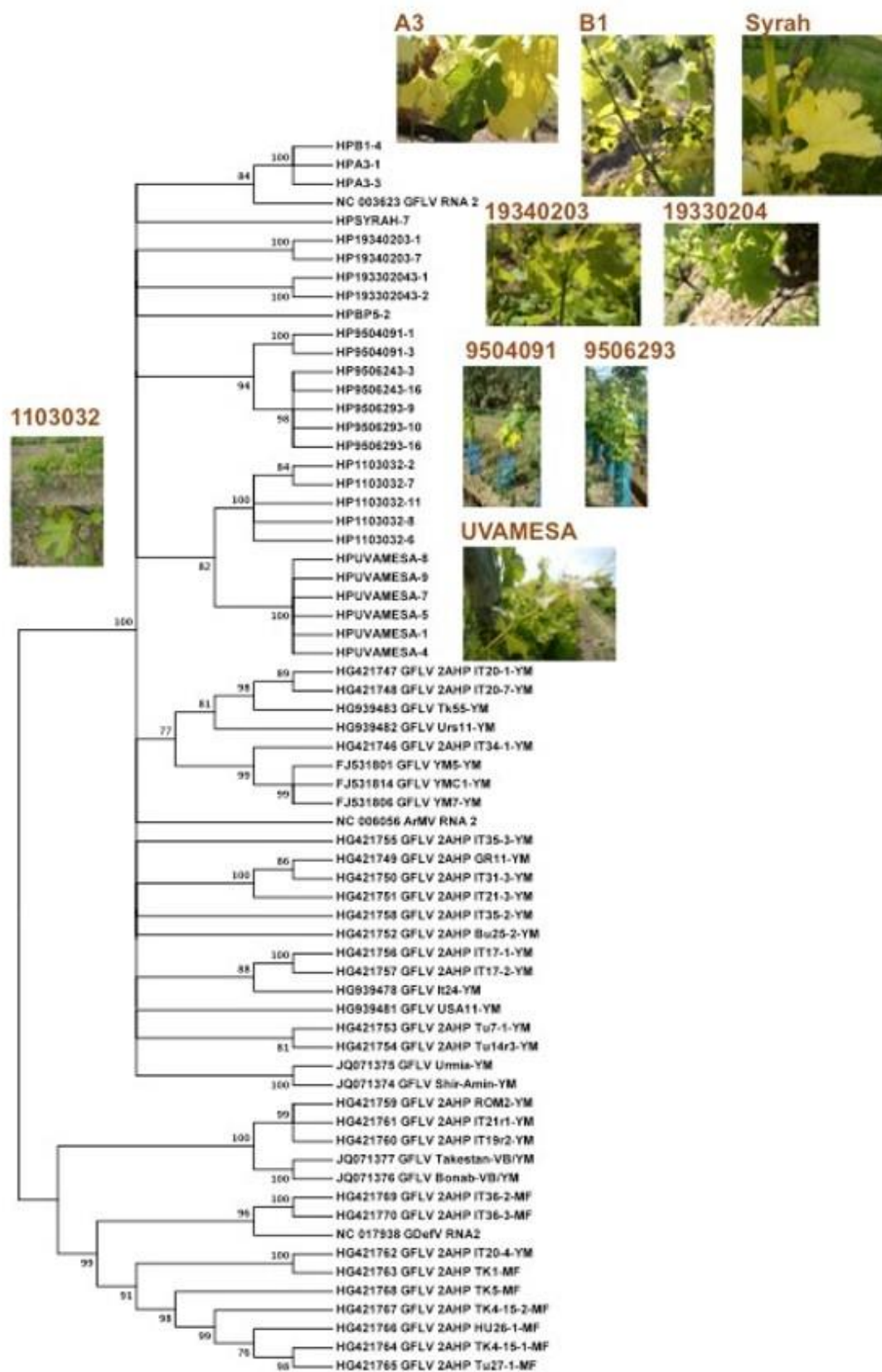


Figura 26. Dendrograma construído com base nas sequências de nucleótidos da “homing protein” utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 75% de valor de bootstrap foram colapsados. As sequências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso. São mostrados os sintomas de 9 das 11 plantas de onde se obtiveram os isolados deste trabalho.

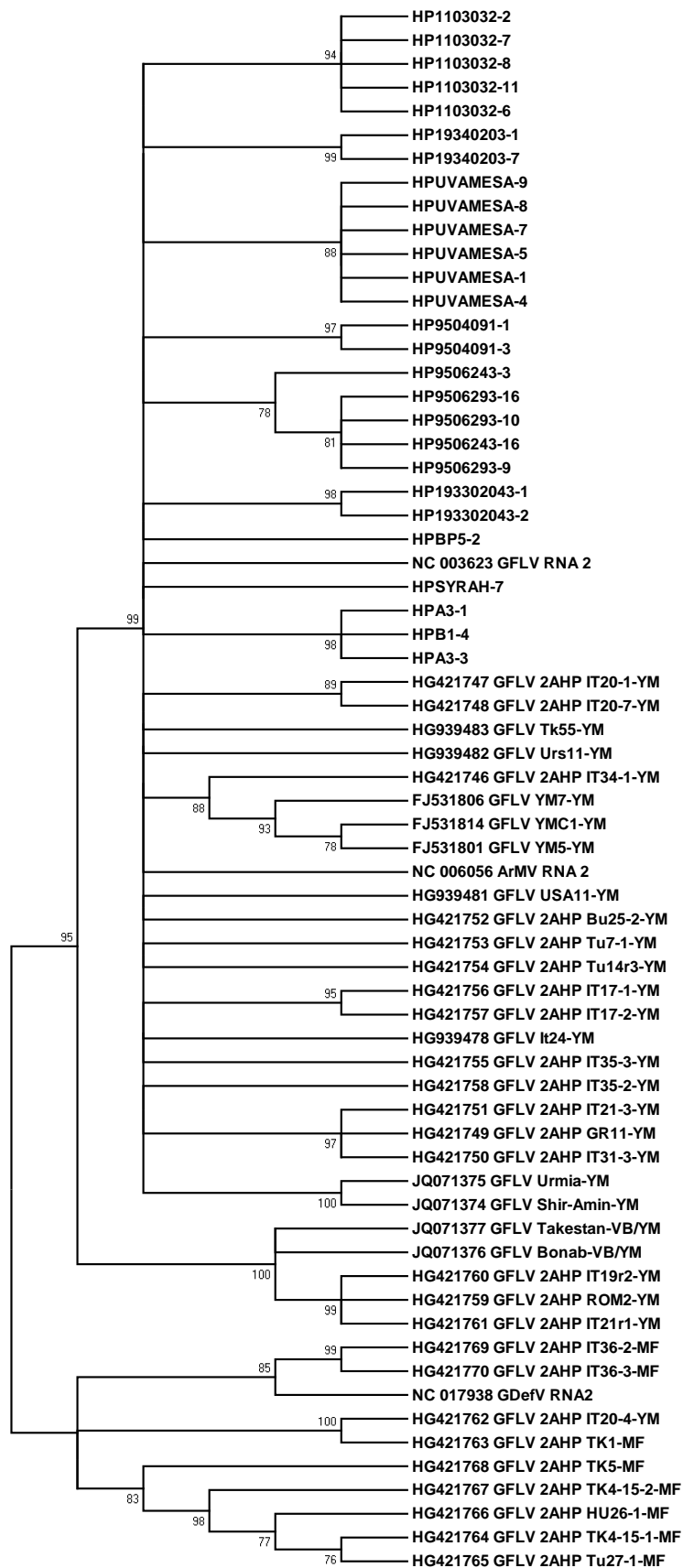


Figura 27. Dendrograma construído com base em seqüências parciais de aminoácidos da “homing protein” utilizando o método de Maximum-Likelihood. Ramos com menos de 75% de valor de bootstrap foram colapsados. As seqüências retiradas de GenBank encontram-se identificadas pelo nome e número de acesso.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, a partir de um isolado positivo para *ArMV* por testes de DAS-ELISA e do qual já havia uma sequência parcial da proteína da cápside, foi possível obter fragmentos parciais da proteína RdRp de *ArMV* e *GFLV*. A obtenção destas evidências moleculares confirmou a presença de um vírus dado como não existindo em Portugal até há pouco tempo, *Arabidopsis mosaic virus*. E confirmou, também, a existência de infecções mistas nos isolados portugueses, com presença de *ArMV* e *GFLV*. Para este isolado, também foi possível obter sequências parciais do RNA satélite. Estas moléculas encontra-se associadas a alguns isolados de *ArMV* (Wetzel *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 1990) e *GFLV* (Gottula *et al.*, 2013; Lamprecht *et al.*, 2013; Fuchs *et al.*, 1989) e a sua distribuição filogenética não está relacionada com o respetivo vírus nem com a localização geográfica do isolado de origem (Lamprecht *et al.* 2013).

Vírus de RNA que infetam culturas perenes, em particular o *GFLV*, possuem um grande potencial para variação genética, uma vez que infetam o seu hospedeiro durante longos períodos de tempo e a RNA polimerase RNA-dependente que codificam não possui atividade de *proofreading* (Vigne *et al.*, 2004) fazendo com que se existam, assim, um conjunto de variantes geneticamente relacionadas a que se chama “*quasispecies*” (Naraghi-Arani *et al.*, 2001). Os processos de recombinação de RNA são, também, um dos mecanismos implicados no processo evolutivo dos vírus de plantas e considerado frequente no caso de *GFLV* e *ArMV*, com evidência de recombinação intra (Mekuria *et al.*, 2009; Pompe-Novak *et al.*, 2007; Vigne *et al.*, 2004) e interespecífica (Oliver *et al.*, 2010; Jawhar *et al.*, 2009; Mekuria *et al.*, 2009; Vigne *et al.*, 2008). Alguns locais do genoma destes vírus estão mais sujeitos a recombinação, é o caso da região terminal 5’ do RNA2 (Vigne *et al.*, 2008).

Na análise filogenética dos isolados portugueses, inferida com base nas sequências nucleotídicas e de aminoácidos, verificou-se que, em geral, as variantes portuguesas são bastante homogêneas formando subgrupos consoante o isolado de origem. A exceção é o caso da proteína da cápside, com base nas sequências nucleotídicas, cujo dendrograma se divide em três filogrupos contendo variantes virais divergentes. Estas inferências filogenéticas são suportadas estatisticamente pelo baixo valor de dN/dS, o que revela uma maior pressão de seleção purificante na proteína da cápside, e pelo facto de não terem sido

detetados eventos de recombinação. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por outros autores (Oliver *et al.*, 2010; Vigne *et al.*, 2004) que afirmam que a proteína da cápside é a região genómica que possui uma maior estabilidade genética devido ao seu papel fundamental na encapsidação dos RNA genómicos (Quacquarelli *et al.*, 1976), progressão sistémica dos vírus no hospedeiro (Callaway *et al.*, 2001) e para o processo de transmissão de *GFLV* pelos respetivos vetores nematodes (Marmonier *et al.*, 2010; Schellenberger *et al.*, 2010; Andret-Link *et al.*, 2004b). No entanto, existem, de facto, evidências que comprovam a existência de variabilidade genómica nesta proteína (Oliver *et al.*, 2010), mas, esta variabilidade só deverá existir dentro de limites que produzem substituições sinónimas, porque os aminoácidos essenciais para as funções da CP não são afetados (Vigne *et al.*, 2004). A segregação dos isolados em, pelo menos, 2 grupos de variantes para o gene da CP de *GFLV* já foi reportada para isolados dos EUA (Oliver *et al.*, 2010), da França (Vigne *et al.*, 2004, 2009), da Tunísia (Fattouch *et al.*, 2005) e da África do Sul (Liebenberg *et al.*, 2009).

No caso da “*homing protein*” e da proteína do movimento, as variantes virais formam subgrupos consoante o isolado de origem nas análises filogenéticas dos isolados portugueses com base nas sequências nucleotídicas e de aminoácidos. Nos três genes que constituem o RNA2, verificou-se que para a MP e HP, apesar de existir uma pressão de seleção purificante em todos, os valores de dN/dS são mais elevados do que para a CP. Tal sugere que estes dois genes estarão sujeitos a uma pressão de seleção purificante menos intensa que a CP, uma vez que as suas funções na progressão do vírus no hospedeiro e no transporte dos vírus para os locais de replicação, não são tão importantes como a replicação do vírus efetuada pela proteína da cápside e parecem ser condicionadas também pelo cultivar hospedeiro. Ao contrário da CP, para estes genes foi possível detetar vários eventos de recombinação. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores nos EUA (Mekuria *et al.*, 2009), na Tunísia (Boulila, 2007), na Eslovénia (Pompe-Novak *et al.*, 2007) e na França (Vigne *et al.*, 2004, 2005, 2008, 2009), nos quais foram detetados eventos de recombinação na HP e MP.

Na análise filogenética da região da RdRp dos isolados portugueses, inferida com base nas sequências nucleotídicas e de aminoácidos, verificou-se que, em geral, as variantes formam subgrupos consoante o isolado de origem. Pelo contrário, Oliver *et al.* (2010) referem uma segregação das variantes em três grupos filogenéticos. De todas as regiões que foram analisadas neste trabalho, a região parcial da RdRp foi a que revelou uma pressão de seleção

purificante mais forte. O facto de esta região revelar uma seleção purificante mais intensa e de não terem sido encontrados locais de recombinação, pode ser justificado por a região analisada neste trabalho incluir seis dos sete motivos típicos da RdRp descritos para vírus de plantas (Chisholm *et al.*, 2007) e devido ao seu papel fundamental na replicação do vírus (Ritzenthaler *et al.*, 1991).

As sequências homólogas de *ArMV* e *GDefV* foram incluídas nas análises filogenéticas com o objectivo de incluir um outgroup. No entanto, verificou-se que, para o caso da HP, NC017938 *GDefV* se encontra agrupada com um isolado de *GFLV* de outros autores e *ArMV* agrupa-se com o isolado GHu de *GFLV*. No caso da MP, *ArMV* continua a agrupar-se com GHu de *GFLV* e *GDefV* ou se encontra isolado ou se agrupa com as anteriores. No dendrograma da RdRp *GDefV* e *ArMV* encontram-se isolados sem formarem um outgroup. Só na CP se verifica a existência dum grupo mais afastado, que poderá funcionar como outgroup, contendo a sequências do *ArMV* e do *GDefV*. Estes resultados sugerem uma grande proximidade entre *ArMV* e *GFLV*, que não é tão óbvia quando é somente tida em conta a região codante da CP, e que a inferência das relações filogenéticas e mecanismos moleculares de divergência entre espécies virais próximas não podem ser avaliados apenas com base numa região genómica.

Associado a alguns isolados de *ArMV* (Wetzel *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 1990) e *GFLV* (Gottula *et al.*, 2013; Lamprecht *et al.*, 2013; Fuchs *et al.*, 1989) foram detetadas moléculas de RNA satélite do tipo B. Na análise filogenética para a região do satRNA dos isolados portugueses, com base nas sequências nucleotídicas, as variantes de satRNA segregam-se em três grupos filogenéticos, adicionando um novo grupo aos dois que já havia sido reportado anteriormente por Lamprecht *et al.* (2013). Também de acordo com estes autores, e segundo o que se verificou nos dendrogramas produzidos a partir das sequências nucleotídicas e de aminoácidos deduzida a partir das anteriores neste trabalho, existe uma separação de isolados de satRNA que não se agrupam consoante o vírus a que estão associados, nem consoante a origem geográfica do isolado. De facto, um dos grupos contém o isolado sul-africano GLFV-SACH44, *ArMV*-P116 e *ArMV*-P119 de origem desconhecida, o isolado *ArMV* large satellite (lilac) do Reino Unido e *GFLV* F13 de origem francesa, enquanto no outro grupo se encontram o isolado alemão *ArMV*-NW, *ArMV*-J86 de origem desconhecida e *GFLV* -R2 e *GFLV* -R6 dos Estados Unidos da América. A análise das pressões de seleção atuantes no gene do RNA satélite revelou o maior valor de dN/dS de todas as regiões analisadas neste trabalho sem, no entanto, ser possível detetar eventos de recombinação. A função da proteína

codificada pelo satRNA não é conhecida e após uma extensa pesquisa em diferentes bases de dados de motivos proteicos e domínios funcionais, não foram encontradas informações que permitam determinar a(s) sua(s) função(ões).

A “homing protein” tem vindo a ser apontada como responsável pelos sintomas evidenciados em videiras infetadas devido à sua maior variabilidade genética em relação a outros locais do genoma (Krake, *et al.*, 1999). Recentemente foi sugerido um segmento da RdRp, localizado a jusante dos domínios típicos desta proteína descritos para vírus de plantas (Chisholm *et al.*, 2007), como possuindo os determinantes de sintomatologia. Naquele trabalho, realizado em *N. benthamiana* e *N. clevelandii*, foi sugerido que a variabilidade naquela região codante, entre os isolados F13 e GHu, seria determinante da capacidade de GHu desenvolver sintomas no hospedeiro herbáceo, o que não acontece com o isolado F13. Pelo contrário, Elbeaino *et al.* (2014) sugeriram que o determinante sintomatológico entre estirpes causadoras de clorose e malformação infeciosa se localizava na região 5’ terminal da HP. No presente estudo, verificou-se, a partir da análise filogenética daquela região da HP, que os isolados portugueses se agrupam consoante o isolado de origem e não consoante os sintomas desenvolvidos pelos diferentes cultivares hospedeiros.

6. CONCLUSÕES

A presença de *Arabid mosaic virus* foi confirmada molecularmente em Portugal a partir da utilização de dois pares de primers cujo alvo era a CP e a RdRp do RNA2 e RNA1, respetivamente. Utilizando estes dois pares de primers, os únicos que se mostraram capazes de amplificar *ArMV* nos isolados portugueses, deverão ser testados mais isolados de forma a obter um maior número de sequências que permita a caracterização deste vírus e das suas variantes em Portugal.

Na análise filogenética dos isolados portugueses, inferida com base nas sequências nucleotídicas e de aminoácidos da “*homing protein*”, da proteína do movimento e da RNA polimerase RNA-dependente, verificou-se que, em geral, as variantes portuguesas são bastante homogêneas formando subgrupos consoante o isolado de origem. A exceção é a proteína da cápside cuja análise filogenética com base nas sequências nucleotídicas revela uma topologia constituída por três filogrupos. A informação obtida neste trabalho acerca da diversidade genética de 11 isolados de *Grapevine fanleaf virus*, ao nível da HP, MP, CP e RdRp, permitiu aumentar o conhecimento sobre as variantes deste vírus em Portugal. O conhecimento da variabilidade genética permitirá desenhar protocolos de deteção e melhorar as ferramentas de diagnóstico molecular e serológico, de modo a implementar um protocolo de deteção robusto adequado ao esquema de certificação em vigor no país.

A análise filogenética dos isolados portugueses de RNA satélite revela uma topologia constituída por três filogrupos. Estes resultados expandem o conhecimento sobre a incidência e variabilidade de satRNA em isolados de *GFLV*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almajwal, A. M. & Elsadek M. F. (2015) Lipid-lowering and hepatoprotective effects of *Vitis vinifera* dried seeds on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. *Nutrition Research and Practice*, 9(1), 37-42.
- Andret-Link, P., Laporte, C., Valat, L., Ritzenthaler, C., Demangeat, G., Vigne, E., Laval, V., Pfeiffer, P., Stussi-Garaud, C. & Fuchs, M. (2004a) *Grapevine fanleaf virus*: Still a Major Threat to the Grapevine Industry. *Journal of Plant Pathology*, 86(3), 183-195.
- Andret-Link, P., Schmitt-Keichinger, C., Demangeat, G., Komar, V., & Fuchs, M. (2004b) The specific transmission of *Grapevine fanleaf virus* by its nematode vector *Xiphinema index* is solely determined by the viral coat protein. *Virology*, 320, 12-22.
- Bettencourt, S., Simões, A.M. & Pereira, A. M. Identificação de vírus em videiras nas ilhas do Pico e Terceira (Açores). *Revista de Ciências Agrárias*, 32(2), 14-22.
- Boulila, M. (2007) Phylogeny and genetic recombination of Grapevine fanleaf virus isolates from naturally infected vineyards in Tunisia. *Phytopathologia Mediterranea*, 46,285–294.
- Bridle, P. & Timberlake, C. F. (1997) Anthocyanins as natural food colours-selected aspects. *Food Chemistry*, 58(1-2), 103-109.
- Callaway, A., Giesman-Cookmeyer, D., Gillock, E. T., Sit, T. L. & Lommel, S. A. (2001) The multifunctional capsid protein of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 39, 419-460.
- Chisholm, J., Zhang, G., Wang, A. & Sanfaçon, H. (2007) Peripheral association of a polyprotein precursor form of the RNA-dependent RNA polymerase of *Tomato ringspot virus* with the membrane-bound viral replication complex. *Virology*, 368, 133–144.
- Delpont, W., Poon, A.F., Frost, S.D. & Kosakovsky Pond, S.L. (2010) Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology *Bioinformatics*. 26(19), 2455-2457.
- Dias, H.F. (1963) Host range and properties of Grapevine fanleaf, and Grapevine yellow mosaic viruses. *Annals of Applied Biology*, 51(5), 97-105.

- Dupuis, L., Cobanov, P., Bassler, A., Krczal, G. & Wetzel, T. (2008) Complete genome sequence of a virulent isolate of *Arabis mosaic virus* from privet (*Ligustrum vulgare*) *Archives of Virology*, 153 (8), 1611-1613.
- Elbeaino, T., Digiario, M., Ghebremeskel, S. & Martelli, G.P. (2012) Grapevine deformation virus: completion of the sequence and evidence on its origin from recombination events between *Grapevine fanleaf virus* and *Arabis mosaic virus*. *Virus Research*, 166, 136–140.
- Elbeaino, T., Kiyi, H., Boutarfa, R., Minafra, A., Martelli, G. P. & Digiario, M. (2014) Phylogenetic and recombination analysis of the homing protein domain of *Grapevine fanleaf virus* (*GFLV*) isolates associated with ‘yellow mosaic’ and ‘infectious malformation’ syndromes in grapevine. *Archives of Virology* 159(10), 2757-2764.
- Esteves, F., Santos, M.T., Brazão, J., Eiras-Dias, J. E., Fonseca, F., Preliminary Assesment of *Grapevine fanleaf virus* (*GFLV*) Isolate Variability in Portugal. Proceedings of the 17th Congress of International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), Davis, USA 42-43.
- Faggioli, F., Ferretti, L., Albanese, G., Sciarroni, R., Pasquini, G., Lumia, V. & Barba, M. (2005) Distribution of olive tree viruses in Italy as revealed by one-step RT-PCR. *Journal of Plant Pathology*, 87(1), 49-55.
- Farzaei, M.H., Abbasabadi, Z., Shams-Ardekani, M.R., Abdollahi, M. & Rahimi, R. (2014) A comprehensive review of plants and their active constituents with wound healing activity in traditional Iranian medicine. *Wounds*, 26(7), 197-206.
- Fattouch, S., Acheche, H., M’hirsi, S., Mellouli, L., Bejar, S., Marrakchi, M. & Marzouki, N. (2005) RT-PCR-RFLP for genetic diversity analysis of Tunisian Grapevine fanleaf virus isolates in their natural host plants. *Journal of Virological Methods*, 127, 126– 132.
- Figueiredo, A., Cortez, I. & Pereira, A.M. (2009) Infecção viral da vinha nos Biscoitos (Ilha Terceira) – Açores. *Revista de Ciências Agrárias*, 32(2), 5-13.
- Fiume, M.M., Bergfeld, W.F., Belsito, D.V., Hill, R.A., Klaassen, C.D., Liebler, D.C., Marks, J.G. Jr, Shank, R.C., Slaga, T.J., Snyder, P.W. & Andersen, F.A. (2014) Safety assessment of *Vitis vinifera* (grape)-derived ingredients as used in cosmetics. *International Journal of Toxicology*, 33 (Supplement 3), 48S-83S.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (2013) FAOSTAT – Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E> (acedido em: 5/09/2015).

Fuchs, M., Pinck, M., Serghini, M. A., Ravelonandro, M., Walter, B. & Pinck, L. (1989) The Nucleotide Sequence of Satellite RNA in *Grapevine fanleaf virus*, Strain F13, *Journal of General Virology*, 70, 955-962.

Gaire F., Schmitt C., Stussi-Garaud C., Pinck L. & Ritzenthaler C. (1999) Protein 2A of grapevine fanleaf nepovirus is implicated in RNA2 replication and colocalizes to the replisome site. *Virology*, 264, 25-36.

García-Arenal F, Fraile A, Malpica JM (2001) Variability and genetic structure of plant virus populations. *Ann Rev Phytopath* 39:157–186.

Gottula, J., Lapato, D., Cantilina, K., Saito, S., Bartlett, B. & Fuchs, M. (2013) Genetic variability, evolution, and biological effects of *Grapevine fanleaf virus* satellite RNAs. *Phytopathology*, 103(11), 1180-1187.

Hall, T.A. (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.

Imura, Y., Oka, H., Kimata, K., Nasu, M., Nakahama, K. & Maeda, T. (2008) Comparisons of complete RNA-2 sequences, pathological and serological features among three Japanese isolates of *Arabis mosaic virus*. *Virus Genes* 37(3), 333-341.

Instituto da Vinha e do Vinho, I.P. (2015) *Vinhos e Aguardentes de Portugal – Anuário 2014*, Lisboa, Ministério da Agricultura e do Mar.

Instituto Nacional de Estatística, I.P., (2015) *Estatísticas Agrícolas 2014*, Lisboa, Instituto Nacional de Estatística, I.P.

International Committee on Taxonomy of Viruses (2014) Virus Taxonomy: 2014 Release. Disponível em: www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp (acedido em: 9/09/2015).

Ipach, U., Altmayer, B. & Eichhorn, K.W. (1992) Detection of *Arabis mosaic virus* using the polymerase chain reaction (PCR). *Vitis*, 31, 213-219.

Jawhar, J., Minafra, A., La Notte, P., Pirolo, C., Saldarelli, P., Boscia, D., Savino, V. & Martelli, G.P. (2009) Recombination events in RNA-2 of *Grapevine fanleaf virus* and *Arabis*

mosaic virus in grapevines affected by yellow mosaic. In: Boudon-Padieu E. (eds) Extended abstracts 16th Meeting of International Council for the study of virus and virus-like diseases of the grapevine, *Le Progrès Agricole et Viticole*, Dijon, France, 73–74.

Jiang, J. & Laliberté, J.F. (2011) The genome-linked protein VPg of plant viruses – a protein with many partners. *Current Opinion in Virology*, 1, 347–354.

Kalasjan, J.A., Litvak, L.A. & Marinescu, V.G. (1979) Tubular structures in grapevine tissue after infection with *Grapevine fanleaf virus*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 15, 373-376.

Keller, M. (2015) Botany and anatomy, *The Science of Grapevines: Anatomy and Physiology*, second edition, Burlington, USA, Academic Press, 1-52.

Kosakovsky Pond, S.L., & Frost, S.D.W. (2005) Datamonkey: Rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics*, 21, 2531-2533.

Krake, L. R., Steele Scott, N., Rezaian, M. A. & Tylor, R. H. (1999) *Graft-Transmitted Diseases of Grapevines*. Collingwood, Victoria: CSIR Publishing.

Lamprecht, R.L., Maree, H.J., Stephan, D. & Burger, J.T. (2012) Complete nucleotide sequence of a South African isolate of *Grapevine fanleaf virus*. *Virus Genes* 45(2), 406-410.

Lamprecht, R.L., Spaltman, M., Stephan, D., Wetzell, T. & Burger, J.T. (2013) Complete nucleotide sequence of a South African isolate of *Grapevine fanleaf virus* and its associated satellite RNA. *Viruses*, 5(7), 1815-1823.

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. (2007) *ClustalW and ClustalX version 2* *Bioinformatics* 23(21), 2947-2948.

Librado, P. & Rozas, J.(2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data, *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.

Liebenberg, A., Freeborough, M.-J., Visser, C.J., Bellstedt, D.U. & Burger, J.T. (2009) Genetic variability within the coat protein gene of Grapevine fanleaf virus isolates from South Africa and the evaluation of RT-PCR, DAS-ELISA and immunostrips as virus diagnostic assays, *Virus Research*, 142, 28–35.

- Liu, Y.Y., Hellen, C.U., Cooper, J.I., Bertioli, D.J., Coates, D. & Bauer, G. (1990) The nucleotide sequence of a satellite RNA associated with arabis mosaic nepovirus. *Journal of General Virology*, 71(6), 1259-1263.
- Lopez-Fabuel, I., Olmos, A., Bassler, A., Dupuis, L., Torres, L.B., Bertolini, E. & Wetzell, T. (2013) Molecular analysis of the genomic RNAs 1 and 2 of the first *Arabis mosaic virus* isolate detected in Spanish grapevines. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 11(1), 199-203.
- Loudes, A.M., Ritzenthaler, C., Pinck, M., Serghini, M.A. & Pinck, L. (1995) The 119 kDa and 124 kDa polyproteins of arabis mosaic nepovirus (isolate S) are encoded by two distinct RNA2 species. *Journal of General Virology*, 76 (4), 899-906.
- MacKenzie, D. J., McLean, M. A., Mukerji, S. & Green, M. (1997) Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Plant Disease*, 81(2), 222-226.
- Maliogka, V.I., Martelli, G.P., Fuchs; M. & Katis, N.I. (2015) Control of Viruses Infecting Grapevine, in Loebenstein, G., Katis, N.I. (eds.) *Advances in Virus Research – Control of Plants Virus Diseases: Vegetatively-Propagated Crops*, vol.91, Burlington, USA, Academic Press,175-227.
- Marmonier, A., Schellenberger, P., Esmenjaud, D., Schmitt-Keichinger, C., Ritzenthaler, C., Andret-Link, P., Lemaire, O., Fuchs, M., Demangeat, G. (2010) The coat protein determines the specificity of virus transmission by *Xiphinema diversicaudatum*. *Journal of Plant Pathology*, 92(1), 275-279.
- Marmonier, A., Vigne, E., Komar, V., Demangeat, G., Besse, S., Gugerli, P. & Lemaire, O. (2009) Comparisons of genomic and pathological features among barley and grapevine infecting-isolates of *Arabis mosaic virus*. 16th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine. *Progrès Agricole e Viticole*, Dijon, France, 92-93.
- Martelli, G.P. (2014) Infectious degeneration (*Grapevine fanleaf virus*), Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents, *Journal of Plant Pathology*, 96 (1S), 11-27.
- Martin, D., Rybicki, E. (2000) RDP: detection of recombinant amongst aligned sequences, *Bioinformatics*, 16(6), 562-563.

- Mekuria, T. A., Gutha, L. R., Martin, R. R., Rayapati & Naidu, A. (2009) Genome Diversity and Intra- and Interspecies Recombination Events in *Grapevine fanleaf virus*. *Phytopathology* 99(12), 1394-1402.
- Monagas, M., Hernandez-Ledesma, B., Gomez-Cordoves, C. & Bartolome, B. (2006) Commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. leaves and grape skins: Antioxidant and chemical characterization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 319–327.
- Naraghi-Arani, P., Daubert, S. & Rowhani, A. (2001) Quasispecies nature of the genome of Grapevine fanleaf virus. *Journal of General Virology*, 82, 1791–1795.
- Oliver, J.E., Vigne, E. & Fuchs, M. (2010) Genetic structure and molecular variability of *Grapevine fanleaf virus* populations. *Virus Research*, 152, 30–40.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawat, H., Hayashi, K. & Sekiya T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms Proceedings of the National Academy of Sciences, 86, 2766-2770.
- Pinck L., Fuchs M., Pinck M., Ravelonandro M. & Walter B. (1988) A satellite RNA in *Grapevine fanleaf virus* strain F13. *Journal of General Virology*, 69, 233-239.
- Pinck, M., Reinbolt, J., Loudes, A.M., Le Ret, M., & Pinck, L. (1991) Primary structure and location of the genome-linked protein (VPg) of grapevine fanleaf nepovirus. *FEBS Letters*, 284(1), 117-119.
- Pompe-Novak, M., Gutiérrez-Aguirre, I., Vojvoda, J., Blas, M., Tomažič, I., Vigne, E., Fuchs, M., Ravnikar, M. & Petrovič, N. (2007) Genetic variability within RNA2 of *Grapevine fanleaf virus*. *European Journal of Plant Pathology*, 117(3), 307–312.
- Quacquarelli A., Gallitelli D., Savino V. & Martelli G.P. (1976) Properties of *Grapevine fanleaf virus*. *Journal of General Virology*, 32, 349-360.
- Reisch, B.I., Owens, C.L. & Cousins, P.S. (2012) Grape, in Badenes, M.L., Byrne, D.H. (eds) *Handbook of plant breeding: fruit breeding*, vol 8, New York, USA, Springer Science+Business Media, LLC, 225–262.
- Ritzenthaler C., Schmit A.C., Michler P., Stussi-Garaud C. & Pinck L. (1995) Grapevine fanleaf nepovirus P38 putative movement protein is located on tubules *in vivo*. *Molecular plant-microbe interactions*, 8, 379-387.

- Ritzenthaler C., Viry M., Pinck M., Margis R., Fuchs M. & Pinck L. (1991) Complete nucleotide sequence and organization of grapevine fanleaf nepovirus RNA1. *Journal of General Virology*, 72, 2357-2365.
- Rott, M., Xiang, Y., Saeed, H., Belton, M., Clarke, E. & Aadum, B. B. (2013) Characterization of tree fruit and grapevine viruses by next generation sequencing. 2013 APS & MSA Joint Meeting, Austin, Texas Abstracts of Presentations, *Phytopathology*, 103(6) (Supplement 2), S2.124.
- Rozas, J. (2009) DNA Sequence Polymorphism Analysis using DnaSP, Bioinformatics for DNA Sequence Analysis, *Methods in Molecular Biology*, 537, 337-350.
- Rychlik, W. (2007) OLIGO 7 primer analysis software. *Methods in Molecular Biology*, 402, 35-60.
- Sanfaçon, H. (2008) Nepovirus, in Mahy, B.W.J., van Regenmortel, M.H.V. (eds.) *Encyclopedia of Virology*, third edition, Oxford, UK, Elsevier, 405-413.
- Sangiovanni, E., Di Lorenzo, C., Colombo, E., Colombo, F., Fumagalli, M., Frigerio, G., Restani, P. & Dell'Agli, M. (2015) The effect of in vitro gastrointestinal digestion on the anti-inflammatory activity of *Vitis vinifera* L. leaves. *Food & Function*, 6(8), 2453-2463.
- Schellenberger, P., Andret-Link, P., Schmitt-Keichinger, C., Bergdoll, M., Marmonier, A., Vigne, E., Lemaire, O., Fuchs, M., Demangeat, G. & Ritzenthaler, C. (2010) A Stretch of 11 Amino Acids in the B-C Loop of the Coat Protein of *Grapevine fanleaf virus* Is Essential for Transmission by the Nematode *Xiphinema index*. *Journal of Virology*, 84(16), 7924–7933.
- Serghini, M. A., Fuchs, M., Pinck, M., Reinbolt, J., Walter & B., Pinck, L. (1990) RNA2 of *Grapevine fanleaf virus*: sequence analysis and coat protein cistron location, *Journal of General Virology*, 71, 1433-1441.
- Serviço Regional de Estatística dos Açores (2014) *Anuário Estatístico da Região Autónoma do Açores 2013*, Açores, Serviço Regional de Estatística dos Açores.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipki, A., Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729.

Teixeira Santos, M., Brazão, J., Cunha J. & Eiras-Dias, J.E. (2012) Renewing and enlarging and the Portuguese Ampelographic Collection: screening for nine viruses by Elisa. Proceedings of the 17th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), USA, 272-273.

Teixeira Santos, M., Rocha, M.L., Guedes da Silva, A., Esteves, F., Fonseca, F. & Eiras-Dias, J.E. (2009) Old grapevine varieties vineyard: a window over a pre sanitary selection era and a source of viroses. In: Extended abstracts of the 16th meeting of the ICVG, France, 62-63.

This, P., Lacombe, T. & Thomas, M. R. (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics*, 22, 511-519.

Vigne, E., Bergdoll, M., Guyader, S. & Fuchs, M. (2004) Population structure and genetic variability within isolates of *Grapevine fanleaf virus* from a naturally infected vineyard in France: evidence for mixed infection and recombination. *Journal of General Virology*, 85, 2435–2445.

Vigne, E., Demangeat, G., Komar, V., Fuchs, M. (2005) Characterization of a naturally occurring recombinant isolate of Grapevine fanleaf virus. *Archives of Virology*, 150, 2241–2255.

Vigne, E., Gottula, J., Schmitt-Keichinger, C., Komar, V., Ackerer, L., Belval, L., L. Rakotomalala, L., Lemaire, O., Ritzenthaler, C. & Fuchs, M. (2013) A strain-specific segment of the RNA-dependent RNA polymerase of *Grapevine fanleaf virus* determines symptoms in *Nicotiana* species. *Journal of General Virology*, 94, 2803–2813.

Vigne, E., Marmonier, A. & Fuchs, M. (2008) Multiple interspecies recombination events within RNA2 of *Grapevine fanleaf virus* and *Arabis mosaic virus*. *Archives of Virology*, 153(9), 1771–1776.

Vigne, E., Marmonier, A., Komar, V., Lemaire, O. & Fuchs, M. (2009) Genetic structure and variability of virus populations in cross-protected grapevines superinfected by Grapevine fanleaf virus. *Virus Research*, 144, 154–162.

Wetzel, T., Bassler, A., Amren, M.A. & Krczal, G. (2006) A RT/PCR-partial restriction enzymatic mapping (PREM) method for the molecular characterization of the large satellite RNAs of *Arabis mosaic virus* isolates. *Journal of Virological Methods*, 132 (1-2), 97-103.

Wetzel, T., Beck, A., Wegener, U. & Krczal, G. (2004) Complete nucleotide sequence of the RNA 1 of a grapevine isolate of *Arabis mosaic virus*. *Archives of Virology*, 149 (5), 989-995.

Wetzel, T., Meunier, L., Jaeger, U., Reustle, G. & Krczal, G. (2001) Complete nucleotide sequences of the RNAs 2 of German isolates of grapevine fanleaf and *Arabis mosaic nepovirus*. *Virus Research*, 75 (2), 139-145.

Wittenauer, J., Mäcke, S., Sußmann, D., Schweiggert-Weisz, U. & Carle, R. (2015) Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity. *Fitoterapia*, 101, 179-87.

Zarghani, S. N., Shams-Bakhsh, M., Bashir, N. S. & Wetzel, T. (2013) Molecular Characterization of Whole Genomic RNA2 From Iranian Isolates of *Grapevine fanleaf virus*. *Journal of Phytopathology*, 161, 419–425.