



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

***Vitivirus* presentes em castas portuguesas de *Vitis vinifera*:
Caraterização molecular e diagnóstico**

Vilma Vanessa Fernandes Duarte

Tese para obtenção do Grau Mestre em Biologia Molecular e Microbiana

Tese executada sob a orientação de:
Prof.^a. Dr.^a. Filomena Fonseca (FCT-DCBB)

2015

***Vitivirus* presentes em castas portuguesas de *Vitis vinifera*: Caraterização molecular e diagnóstico**

Declaração de autoria de trabalho

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

Vilma Vanessa Fernandes Duarte

Copyright© Vilma Vanessa Fernandes Duarte

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 reportórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Dedicatória e Agradecimentos

Dedico esta tese aos meus pais e à minha avó materna. Sem eles a realização desta tese de mestrado não teria sido possível. Agradeço-lhes pelo apoio e amor incondicional, pela força que me transmitiram e paciência nos dias mais complicados. Ensinarão-me a nunca desistir, e que sem esforço e persistência não se chega a lado nenhum. Obrigado Mãe por me limparas as lágrimas, mesmo por telefone, pela postura de força e entusiasmo.

À minha orientadora Professora Doutora Filomena Fonseca, pela oportunidade, por acreditar em mim e pela disponibilidade. Obrigado pelos ensinamentos, pela paciência e pela força nos dias que os resultados não colaboravam. E obrigado pela sua compreensão no meu investimento temporário noutras formações.

Ao André Fernandes, pelos dias que me deixou “fugir” do trabalho para a escrita da tese. E obrigado por, apesar de não achares muita piada ao facto de não ir trabalhar, me apoiares em todas as minhas decisões. E obrigado pelas oportunidades que me tens dado e pelas decisões que me tens feito tomar, que me têm feito crescer enquanto pessoa. És uma das pessoas mais importantes da minha vida. E nunca pensei conduzir um autocarro!

Aos pais do André, pela força e hospitalidade.

Aos meus amigos, colegas universitários e colegas de trabalho, um muito obrigado pela força e paciência, principalmente, nos dias de escrita da tese.

Aos meus colegas de laboratório, Pedro e Rita. Muito obrigado pela companhia, por toda a ajuda e pelos bons momentos que partilhámos. Um obrigado também à Catarina Diniz pelos momentos de diversão.

À Filipa Esteves pela ajuda e pelos ensinamentos no início da tese de mestrado.

Por último, mas não menos importante, à minha Amiga Vanessa Afonso (sim Amiga de A grande!). Foste sem dúvida o meu pilar neste mestrado. Obrigado pela força e calma que sempre me transmitiste. Obrigado pela companhia e pelas noitadas de estudo e de escrita. Se há alguém que levo para o resto da minha vida no coração desta aventura és mesmo tu, não só a nível profissional, mas também a nível pessoal. Foste e és a minha confidente. Mil obrigados não chegam para te agradecer.

Resumo

O impacto do complexo de doenças do lenho rugoso em *Vitis vinifera ssp. L* é reconhecido mundialmente. Os *Vitivirus GVA* e *GVB* estão implicados como agentes causadores desta doença. Embora haja muita informação relativa a *GVA*, a função da ORF 5 não está ainda bem definida, bem como a organização em grupos filogenéticos das variantes daquele vírus. Estudos indicam a presença de três ou quatro grupos filogenéticos, mas neste trabalho, as sequências obtidas alinhadas com as 12 sequências genómicas completas disponíveis em GenBank, conduziram-nos à organização em dois grupos filogenéticos principais (grupos I e II). Estabeleceu-se, ainda neste trabalho, um ensaio de tipificação RT-PCR-RFLP com uma enzima de restrição que permitiu a distinção entre os dois grupos filogenéticos determinados.

A informação relativa a *GVB* é praticamente inexistente. Neste trabalho foram obtidas sequências de seis isolados. Este conhecimento permitiu-nos, pela primeira vez, estabelecer uma relação filogenética e agrupar as variantes caracterizadas em três grupos filogenéticos. Os domínios proteicos da proteína p10 foram investigados e detetaram-se quatro motivos de fosforilação e um de N-miristoilação.

Com a informação obtida de *GVA* e *GVB*, desenhou-se um PCR-duplex, com primers específicos para cada *Vitivirus*. Esta ferramenta permitiu o aperfeiçoamento da deteção molecular destes vírus, de uma forma mais sensível e específica que a atual técnica de DAS-ELISA com anticorpos comerciais.

Uma vez que foi verificada a presença de *GLRaV-3*, nos isolados de *GVA* e ou *GVB*, foi feito um ensaio de RT-PCR-RFLP para tipificação das variantes daquele vírus presentes nas co-infeções. Verificou-se que as variantes do grupo filogenético 1 de *GLRaV-3* tinham uma incidência de 80%.

Este trabalho permitiu a obtenção de informação acerca das variantes destes *Vitivirus*, em castas portuguesas, contribuindo para um melhoramento da caracterização filogenética e funcional de *GVA* e *GVB*, em diferentes regiões genómicas, bem como o desenvolvimento de novas ferramentas destes vírus.

Termos chave: *GVA*, *GVB*, *Vitivirus*, PCR-duplex, RT-PCR-RFLP, proteína p10, *GLRaV-3*

Abstract

The impact of the disease rugose wood complex in *Vitis vinifera ssp. L.* is recognized worldwide. The *Vitivirus GVA* and *GVB* are implicated as causative agents of this disease. While there is much information on *GVA*, neither the function of the ORF 5 nor the phylogenetic relationships of virus variants are clear. Studies indicate the segregation in three or four phylogenetic groups but, the dendrogram obtained based in this source aligned with the 12 complete genome sequences available in GenBank, showed on segregation into two major phylogenetic groups (groups I and II). Was established in this work, a RT-PCR-RFLP typification assay with a restriction enzyme that allowed the distinction between variants for each phylogenetic group determined.

Information on *GVB* is practically nonexistent. Sequences from 6 isolates were obtained in this study. The information allowed, for the first time to establish between the virus variants and the segregation in three main phylogenetic groups. The protein domains and motifs of the p10 protein have been investigated and yielded four phosphorylation motifs and one N-myristoylation motif.

With the information obtained from *GVA* and *GVB*, a PCR-duplex assay was developed, with specific primers for each *Vitivirus*. This tool has allowed the improvement of molecular detection of these viruses providing, a more sensitive and specific assay than DAS-ELISA with commercial antibodies.

Once it was verified the presence of GLRaV -3, isolates on *GVA* and/or *GVB*, was made an RT -PCR -RFLP assay for typification of the variants of that virus present in the co-infections. It was found that variants of the phylogenetic group 1 on GLRaV -3 had an incidence of 80 %.

This study has disclosure information about the variants of *Vitivirus* in Portuguese varieties, contributing to an improvement of the phylogenetic and functional characterization of *GVA* and *GVB*, in different genomic regions, as well as provide new detection tools for these viruses.

Keywords: *GVA*, *GVB*, *Vitivirus*, PCR-duplex, RT-PCR-RFLP, p10 protein, *GLRaV-3*

Índice

Resumo	ii
Abstrat	iii
Índice	iv
Índice de figuras	vii
Índice de tabelas	x
Lista de abreviaturas e significados	xii
1. Introdução	1
1.1. Videira	1
1.2 Complexos de doenças da videira de origem viral	2
1.2.1 Complexo do lenho rugoso (RW) da videira e agentes causais	2
1.2.2 Genoma de <i>Vitivirus</i>	4
1.3 Variabilidade genética, patogenicidade e detecção de <i>Vitivirus</i> associados a RW	5
1.4 Co-infecção entre <i>Vitivirus</i> e <i>Ampelovirus</i>	8
1.5 Incidência de <i>Vitivirus</i> e <i>GLRaV-3</i> em castas portuguesas	9
2. Objectivos	11
3. Materiais e Métodos	12
3.1 Análises <i>in silico</i> para design de primers	12
3.2 Obtenção de material infetado	12
3.2.1 Indução de rebentamento das varas em fitoclima	14
3.3 Extração de RNA total	14
3.4 Síntese de cDNA com oligo d(T)	15
3.5 Amplificação do cDNA por PCR	15
3.6 <i>Vitivirus</i> : Clonagem e sequenciação	16
3.7 Análise filogenética	17
3.8. Duplex PCR	18
3.9. Ensaio de tipificação por RT-PCR-RFLP	18
3.9.1 Tipificação de variantes de <i>GVA</i>	18
3.9.2 Tipificação de variantes de <i>GLRaV-3</i>	19
4.1. Resultados	20
4.1.1 Variabilidade Genética de <i>GVA</i>	20
4.1.2 <i>ORF 4 – Proteína da Cápside</i>	28

4.1.2.1 <i>Diversidade genética</i>	28
4.1.3 <i>ORF 5</i>	29
4.1.3.1 <i>Diversidade genética</i>	29
4.1.3.2 <i>Motivos proteicos</i>	35
4.1.4 <i>Pressão evolutiva</i>	37
4.1.5 <i>Aperfeiçoamento da detecção de GVA</i>	37
4.2. Discussão	40
4.2.1 <i>Variabilidade genética de GVA</i>	40
4.2.2. <i>Proteína da cápside</i>	41
4.2.3. <i>ORF 5 – p10</i>	41
4.2.4. <i>Aperfeiçoamento da detecção de GVA</i>	42
4.3. Referências Bibliográficas	43
5.1 Resultados	44
5.1.1 <i>Caracterização de variabilidade genética</i>	44
5.1.2 <i>ORF 4 – Proteína Cápside (CP)</i>	52
5.1.2.1 <i>Diversidade genética</i>	52
5.1.3 <i>ORF 5</i>	55
5.1.3.1 <i>Diversidade genética</i>	55
5.1.3.2 <i>Motivos Proteicos</i>	58
5.1.4 <i>Pressão evolutiva</i>	61
5.1.5 <i>Aperfeiçoamento da detecção molecular de Grapevine virus B</i>	61
5.2. Discussão	63
5.2.1 <i>Variabilidade genética de GVB</i>	63
5.2.2 <i>Proteína da cápside</i>	65
5.2.3 <i>ORF 5</i>	65
5.2.4. <i>Aperfeiçoamento da detecção de GVB</i>	66
5.3. Referências Bibliográficas	67
6.1. Resultados	68
6.1.1. <i>Deteção de GVA e GVB por duplex-pCR</i>	68
6.1.2. <i>PCR-RFLP para GVA</i>	68
6.1.3. <i>Tipificação de variantes de GLRAV-3 em isolados de GVA e GVB</i>	74
6.2. Discussão	76
6.2.1 <i>Duplex PCR para co-deteção de GVA e GVB</i>	76
6.2.2 <i>Tipificação de variantes de GVA</i>	76

6.2.3. Tipificação de variantes de <i>GLRaV-3</i>	77
6.3 Referências Bibliográficas	78
7. Discussão geral e Conclusões	79
8. Referências Bibliográficas	81
9. Anexos	87
9.1. Géis de DNA.....	87
9.1.1 Gel para PCR.....	87
9.2.1 Gel para Produto de Amplificação de colónias	87
9.3.1 Gel de acrilamida.....	87
9.2. Tampões e meios	87
9.2.1. Tampão TBE.....	87
9.2.2 Tampão TAE.....	87
9.2.3. Meio LB líquido.....	87
9.2.5. Meio LB agar	88
9.2.6. Meio SOC	88
9.2.7. Loading buffer 6%.....	88

Índice de figuras

Nº da figura	Designação	Página
1.1	Sintomas da doença do complexo rugoso da videira num cultivar com <i>GVB</i> .	3
1.2	<i>Grapevine virus A</i> . Partícula viral montada em acetato de uranil.	4
1.3	Organização do genoma de <i>GVA</i> .	5
1.4	Organização do genoma de <i>GLRaV-3</i> .	10
4.1	Amostras testadas com <i>primers</i> de <i>GVA</i>	20
4.2	Exemplo de uma análise Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) para variantes de <i>GVB</i> presentes no isolado TdC(3).	24
4.3	Análise filogenética das sequências nucleotídicas compreendendo parte da ORF 3, ORF4 e o gene da p10, e 3'UTR de <i>GVA</i> .	26
4.4	Análise filogenética das sequências nucleotídicas do gene da proteína da cápside (CP) de <i>GVA</i> .	30
4.5	Análise filogenética das sequências de aminoácidos deduzida das sequências nucleotídicas do gene da proteína da cápside (CP) de <i>GVA</i> .	31
4.6	Dendrograma filogenético das sequências de nucleótidos da ORF5 de <i>GVA</i> .	33
4.7	Dendrograma filogenético das sequências de aminoácidos do gene da proteína p10 de <i>GVA</i> , deduzidas das sequências nucleotídicas	34
4.8	Representação dos cinco motivos proteicos obtidos no programa ScanProsite, para a sequência de aminoácidos deduzida da sequência nucleotídica da ORF 5 de NC003604 para <i>Grapevine virus A</i> .	35

Nº da figura	Designação	Página
4.9	Representação gráfica do alinhamento da ORF 5 de <i>GVA</i> . Estão representadas 11 sequências de aminoácidos, das quais cinco se encontram na base de dados GenBank [NC003604 (Grupo I), DQ855086 (anterior grupo II, Sub Grupo 1A), JX559641 (Grupo III), AY244516 e AF007415 (anterior grupo IV, Sub Grupo 1B)].	36
4.10	Resultado do teste <i>primers</i> de detecção de <i>GVB</i> de detecção.	37
4.11	Ilustração da posição dos <i>primers</i> de detecção de <i>GVA</i> .	39
5.1	Amostras testadas com <i>primers</i> de <i>GVB</i> .	44
5.2	Exemplo de uma análise Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) para variantes de <i>GVB</i> presentes no isolado TdC(3).	45
5.3	Relação de identidade parcial entre a sequência recombinante (KM232952) e os major parent [Bs(3)-48] e minor parent [TdC(3)-2].	50
5.4	Análise filogenética das sequências nucleotídicas compreendendo as ORFs 4 e 5, e a região 3'-UTR de <i>GVB</i> .	51
5.5	Análise filogenética das sequências nucleotídicas do gene da proteína da cápside (CP) de <i>GVB</i> .	53
5.6	Análise filogenética das sequências de aminoácidos do gene da proteína da cápside (CP) de <i>GVB</i> .	55
5.7	Análise filogenética das sequências nucleotídicas do gene da p10 de <i>GVB</i> .	56
5.8	Análise filogenética das sequências de aminoácidos do gene da proteína p10 de <i>GVB</i> .	57
5.9	Representação dos motivos proteicos obtidos no programa ScanProsite, para a sequência de aminoácidos deduzida da sequência nucleotídica da ORF 5 de NC003602 para <i>Grapevine virus B</i> .	59
5.10	Representação gráfica do alinhamento da ORF 5 de <i>GVB</i> .	60
5.11	Amostras testadas com <i>primers</i> de <i>GVB</i> de detecção.	63

Nº da figura	Designação	Página
5.12	Representação gráfica do alinhamento de sequências nucleotídicas para evidenciar a posição física dos <i>primers</i> utilizados para deteção e amplificação do <i>Vitivirus Grapevine virus B</i> .	64
6.1	Deteção dos fragmentos obtidos através de duplex-PCR e que indicam a presença de <i>GVA</i> (654 bp) e de <i>GVB</i> (588 bp).	72
6.2	Perfis de restrição obtidos com a enzima de restrição <i>Hpy8I</i> no ensaio PCR-RFLP para tipificação de variantes de <i>GVA</i>	72
6.3	Deteção dos fragmentos obtidos através de PCR com os <i>primers</i> específicos de <i>GLRaV-3</i> .	74
6.4	Exemplos dos perfis de restrição obtidos no ensaio de tipificação de variantes de <i>GLRaV-3</i> .	75

Índice de tabelas

Nº da tabela	Descrição	Página
3.1	Pares de <i>primers</i> utilizados para cada <i>Vitivirus</i> e para o Ampelovírus, <i>GLRaV-3</i> , analisados neste trabalho, com o tamanho esperado do fragmento de amplificação por PCR e respectiva correspondência no genoma.	13
3.2	Tipificação de <i>GVA</i> com a enzima <i>Hpy8I</i> com os fragmentos esperados para cada grupo filogenético.	18
3.3	Tipificação de <i>GLRaV-3</i> com as enzimas e fragmentos esperados para cada grupo filogenético.	19
4.1	Resultados do DAS-ELISA para os diferentes isolados de <i>GVA</i> (informação cedida pelos técnicos do INIAV) e resultados de amplificação obtidos com os <i>primers</i> <i>GVA</i> , <i>GVA</i> CP e <i>GVA</i> detecção.	21
4.2	Eventos putativos de recombinação intragénica envolvendo sequências de <i>GVA</i> analisadas neste trabalho.	25
4.3	Estimativas de divergência evolutiva média (d) em sequências genéticas de <i>Grapevine virus A</i> . Distância genética e teste de neutralidade dentro de grupos está apresentada.	27
4.4	Estimativas de divergência evolutiva média (d) em sequências genéticas da proteína da cápside de <i>Grapevine virus A</i> . Distância genética e teste de neutralidade dentro de grupos está apresentada.	28
4.5	Estimativas de divergência evolutiva média (d) em sequências genéticas da ORF 5 – p10 de <i>Grapevine virus A</i> . Distância genética e teste de neutralidade dentro de grupos está apresentada.	32
4.6	Valores de Pressão Seletiva estimados nos genes da CP (ORF 4) e da ORF 5 em isolados de <i>Grapevine virus A</i> (<i>GVA</i>).	38
5.2	Eventos putativos de recombinação intragénica envolvendo sequências de <i>GVB</i> analisadas neste trabalho.	49

Nº da tabela	Descrição	Página
5.3	Estimativas de divergência evolutiva média (d) entre sequências nucleotídicas de <i>Grapevine virus B</i> , compreendendo o gene da CP, da p10 e o 3'-UTR. A distância genética e teste de neutralidade dentro de grupos está apresentada.	52
5.4	Estimativas de divergência evolutiva média (d) em sequências nucleotídicas do gene da proteína da cápside de <i>Grapevine virus B</i> . A distância genética e teste de neutralidade dentro de grupos está apresentada.	54
5.5	Estimativas de divergência evolutiva média (d) entre sequências nucleotídicas da p10 de <i>Grapevine virus B</i> . A distância genética e teste de neutralidade dentro de grupos está apresentada.	58
5.6	Valores de Pressão Seletiva estimados nos genes da CP (ORF 4) e da ORF 5 em isolados de <i>Grapevine virus B</i> (GVB).	62
6.1	Lista de isolados testados com a ferramenta de detecção dupla e respectivos resultados da técnica DAS-ELISA, para GVA e GVB,	69
6.2	Resumo do número isolados testados com a enzima de restrição <i>Hpy8I</i> , e percentagens de ocorrência dos grupos filogenéticos apresentados na figura 4.2.	73
6.3	Resumo do número isolados tipificados e percentagens de ocorrência dos cinco grupos filogenéticos.	75

Lista de abreviaturas e significados

Abreviaturas	Estrangeirismo	Significados
A.C.		Antes de Cristo
ARM	Arginine Rich Motif	Motivo rico em arginina
ArMV	<i>Arabid Mosaic Virus</i>	Vírus do Mosaico de <i>Arabid</i>
CB	Corky Bark	Casca encortiçada
CP	Capsid Protein	Proteína da cápside
CAN		Coleção Ampelográfica Nacional
cDNA	Complementary DNA	DNA complementar
DAS-ELISA	Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay	Teste imunoenzimático de detecção de anticorpos específicos duplo
DNA	Deoxyribonucleic acid	Ácido desoxirribonucleico
DNAses	Deoxyribonuclease	Desoxirribonuclease
DNAsp	DNA sequence polymorphism	Polimorfismo da sequência de DNA
dsRNA	Double-stranded RNA	RNA de cadeia dupla
GCBaV	Grapevine Corky Bark-associated Virus <i>Closterovirus</i>	Vírus <i>Closterovirus</i> associados a Casca encortiçada de videira
GFLV	<i>Grapevine fanleaf virus</i>	Doença da degenerescência da videira
GLRaV	<i>Grapevine leafroll-associated virus</i>	Vírus associado ao enrolamento da videira
GVA	<i>Grapevine virus A</i>	
GVB	<i>Grapevine virus B</i>	
GVC	<i>Grapevine virus C</i>	
GVD	<i>Grapevine virus D</i>	
GVE	<i>Grapevine virus E</i>	

Abreviaturas	Estrangeirismo	Significados
GVF	<i>Grapevine virus F</i>	
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses	Comité Internacional em Taxonomia de Vírus
INIAV		Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
ISEM	Immunosorbent electron microscopy	Microscopia eletrónica de imunoabsorvância
LR	Leafroll Diseases	Doença do enrolamento
MEGA 6	Molecular evolutionary genetic analysis, version 6 (2013)	Análise genética de evolução molecular, versão 6 (2013)
MP	Movement Protein	Proteína do movimento
nt	Nucleotides	Nucleótidos
ORF	Open Reading Frame	Quadro de leitura aberto
pDNA		DNA plasmídico
PCR	Polymerase Chain Reaction	Reação em Cadeia da Polimerase
PTGS	Tanscriptional Gene Silencing	Sistema pós-transcricional de silenciamento de genes
RDP4	Recombination detection program, version 4.1	Programa de deteção de recombinação, versão 4.1
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase	RNA polimerase dependente de RNA
RFLP	Restriction Fragment Lenght Polymorphism	Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição
RISC	RNA-Induced Silencing Complex	Complexo de silenciamento induzido pelo RNA
RNA	Ribonucleic acid	Ácido Ribonucleico
RNAses	Ribonuclease	Ribonuclease

Abreviaturas	Estrangeirismo	Significados
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction	Transcriptase Reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase
RT-PCR-RFLP	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism	Transcriptase Reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase e seguida de Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição
RW	Rugose Wood	Lenho rugoso
SD	Shiraz disease	Doença de Shiraz
siRNAs	Small interfering RNA	Pequenos RNA de interferência
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism	Polimorfismos de Conformação de Cadeia Simples
SSR	Simple Sequence Repeat	Microsatélites
+ssRNA	Positive-sense single-stranded RNA	Cadeia simples de polaridade positiva
UTR	Untranslated region	Regiões não traduzidas
UV	Ultraviolet	Ultravioleta

Lista de Significados

Estrangeirismo	Significados
<i>template</i>	Cadeia molde
<i>eppendorf</i>	Tubos de centrifugação de 0.5mL a 2.0mL
<i>vortéx</i>	Vórtice
<i>pellet</i>	Partículas pequenas tipicamente criadas através da compressão de um material original
<i>falcons</i>	Tubos de centrifugação de 50 mL
<i>g</i>	Medida da força centrífuga
<i>zinc-finger</i>	Pequena proteína estrutural
<i>pitting</i>	Perfurações
<i>grooving</i>	Caneladuras
<i>bootstrap</i>	Os valores de bootstrap são tomados como uma medida do suporte de uma determinada duma relação filogenética mostrada num dendograma
<i>in silico</i>	Análise em programas bioinformáticos
<i>design de primers</i>	Desenho de Pequena sequência de nucleótidos com informação conservada que serve de ponto de partida à síntese de DNA
<i>Major parent</i>	Sequência mais próxima
<i>Minor parent</i>	Sequência, a seguir ao Major parente, mais próxima
<i>vara</i>	sarmento de videira
<i>primer</i>	Pequena sequência de nucleótidos com informação conservada que serve de ponto de partida à síntese de DNA
<i>Primer forward</i>	<i>Primer</i> de sentido directo
<i>Primer reverse</i>	<i>Primer</i> de sentido inverso
<i>oligo</i>	Oligonucleótidos
<i>annealing</i>	Hibridação dos primers

1. Introdução

1.1. Videira

O cultivo e domesticação da videira (*Vitis vinifera* L.) deu-se entre o sétimo e o quarto milénios A.C., numa área geográfica entre o Mar Negro e o Irão (Châtaignier, 1995; McGovern *et al.*, 1996; McGovern e Rudolph, 1996; Zohary, 1995; Zohary e Hopf, 2000), designada como centro primário de domesticação. A partir deste centro primário de domesticação, a videira foi dispersa para o Mediterrâneo, Palestina, Líbano e Jordânia (Zohary e Spiegel-Roy, 1975). Na primeira metade do terceiro milénio A.C., na Ásia menor, na Grécia, Creta e no Chipre, apareceram as primeiras videiras domesticadas. No sul das Balcãs (Logothetis, 1970; Kroll, 1991) foram encontradas videiras no início do segundo milénio A.C., e já na segunda metade desse milénio, as videiras chegaram no sul de Itália. O norte da Itália, sul de França, Espanha e Portugal receberam as primeiras videiras na segunda parte do primeiro milénio A.C. Grassi, *et al.* (2003), investigaram a existência de centros secundários de domesticação, áreas onde variedades selvagens tivessem sido domesticadas em períodos subsequentes (Olmo, 1995), através do conhecimento histórico baseado em evidências arqueo-botânicas, culturais e históricas e através de marcadores moleculares, como análise SSR (Simple Sequence Repeat – Microsatélites) utilizado para avaliar relações genéticas entre cultivares (Sefc *et al.*, 2000; Labra *et al.*, 2001). Nuoro (Sardenha) mostrou ser um centro secundário de domesticação, por dados moleculares, morfológicos, culturais e históricos (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994).

A domesticação da videira criou cultivares com uma ampla diversidade de acordo com o clima e condições do solo, compreendendo agora cerca de seis dezenas de espécies distribuídas pela Ásia, América do Norte e Europa Mediterrânica, com condições climáticas temperadas (Almadanim *et al.*, 2007; Terral, *et al.*, 2010).

A indústria vinícola em Portugal tem uma forte influência na estabilidade económica e desenvolvimento do país. A nível mundial, Portugal encontra-se em décimo primeiro no ranking de produção de vinho. O clima e a rápida adaptação das videiras, permitiram o estabelecimento de vinhas desde o Algarve até ao Minho (Fraga *et al.*, 2015). A biodiversidade de videiras no país é bastante elevada e são conhecidos cerca de 1400 nomes diferentes de cultivares. Contudo, atualmente, apenas 16 cultivares são plantadas para a produção de vinho, em Portugal (Almadanim *et al.*, 2007).

Apesar da boa qualidade vinícola, as alterações climáticas, novas doenças e pragas têm condicionado a biodiversidade e têm provocado um decréscimo da mesma. A Coleção

Ampelográfica Nacional, estabelecida em 1988, em Dois Portos, preserva importantes cultivares de videira, pela conservação de germoplasma. Todas as cultivares presentes na coleção são importantes como um repositório de variabilidade genética, pois permitem estudos de melhoramento de detecção em vinhas estabelecidas de produção vinícola (Almadanim *et al.*, 2007).

1.2 Complexos de doenças da videira de origem viral

O complexo de doenças do lenho rugoso (RW) é um dos maiores complexos de doenças que afetam espécies de videira (*Vitis* sp.), conhecido desde 1959 (Graniti e Ciccarone, 1961). Do complexos de doenças da videira induzidos por viroses fazem parte ainda a doença da degenerescência da videira, devido ao vírus do urticado (GFLV) e ao *Arabis mosaic virus* (ArMV) (não abordado nesta tese), e a doença do enrolamento da videira, causada pelos *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV) (Hewitt *et al.*, 1962).

1.2.1 Complexo do lenho rugoso (RW) da videira e agentes causais

O complexo RW afeta videiro ao nível do crescimento secundário do caule, causando casca encortiçada (corky bark) e também perfurações (pitting), caneladuras (grooving) e severas mal formações da zona de crescimento interior à casca. Atualmente a incidência deste complexo de doenças em vinhas no mundo inteiro é reconhecida como tendo um forte impacto na economia da indústria relacionada com o cultivo de videira (Goszczyński, 2010).

Dois dos principais agentes causais deste complexo estão classificados no género *Vitivirus* da família *Betaflexiviridae*: *Grapevine virus A* (GVA), associado inicialmente com o síndrome “Kober stem grooving” (Garauet *et al.*, 1994) e *Grapevine virus B* (GVB), associado com o síndrome “Corky bark” (CB) (Bonavia *et al.*, 1996).

Para além dos agentes causais GVA e GVB, de ocorrência comum em vinhas, foram já isolados molecularmente três outros *Vitivirus* – *Grapevine virus D* (GVD) (Abou-Ghanem *et al.*, 1997), *Grapevine virus E* (GVE) (Nakaune *et al.*, 2008) e *Grapevine virus F* (GVF) (Al Rwahnih *et al.*, 2012) em videiras, evidenciando sintomas do complexo de doenças do lenho rugoso.

Grapevine virus C (GVC) foi identificado no início da década de 90 em cultivares Mission, Chardonnay e Brant, e suspeitava-se que esteve-se envolvido no síndrome CB. Foi isolado em plantas *N. benthamiana* por inoculação, e estas viriam a apresentar necrose

local, necrose nos vasos sistémicos, emurchecimento das folhas apicais, antes de morrerem (Monette e James, 1990; Monette e James, 1991). Preparações purificadas de GVC foram utilizadas para produzir anticorpos policlonais em coelhos. A proteína da cápside foi detetada em *Western blot* e o peso molecular de 25kDa estimado em eletroforese em gel de poliacrilamina. GVC é serologicamente distinto de GVA ou GVB (Monette e Green, 1992). Em 2006, Masri *et al.*, mostraram que os anticorpos policlonais produzidos contra GVC reagiram positivamente com o então já identificado *Grapevine lefroll associated virus 2 (GLRaV-2)* e ambos os vírus foram considerados proximamente idênticos ou relacionados. Através de microscopia eletrónica de imunoabsorvância (ISEM) mostraram que os anticorpos produzidos de GVC decoram as partículas virais de *GLRaV-2*, e que não haviam diferenças ao utilizar anticorpos de *GLRaV-2* em partículas virais de GVC. Concluíram, assim que GVC e *GLRaV-2* seriam o mesmo vírus (Masri *et al.*, 2006).



Figura 1.1: Sintomas da doença do complexo rugoso da videira num cultivar com GVB. A – Casca encortçada; B e C – Inchaço e perfurações na zona do caule.

<http://research.agwa.net.au/wp-content/uploads/2012/09/2011-07-FS-Rugose-Wood-Disease.pdf>

Embora se saiba que os *Vitivirus* estão implicados no complexo RW, a sua etiologia não é bem conhecida. Cada uma das espécies virais associadas com o complexo parece ter influência na severidade da doença e a expressão dos sintomas parece depender também do porta-enxerto, do garfo e da combinação de ambos. Mais recentemente foi sugerido que determinadas variantes de GVA estão implicadas também na doença de Shiraz (SD), uma doença fortemente destrutiva nas castas Shiraz e Merlot, que impede a maturidade

das varas e causa malformação do sistema condutor da planta (Goussard e Bakker, 2006; Goszczyński 2007; Goszczyński e Habili, 2012).

Os viriões destes *Vitivirus* são morfologicamente filamentosos e flexíveis, com um comprimento entre 725nm a 785nm (du Preez *et al.*, 2011) e o processo de transmissão natural em situação de campo é mediado por ação de insetos-vetores (Martelli *et al.*, 2011), incluindo *Heliococcus bohemicus* (Zorloni *et al.*, 2006), *Parthenolecanium corni*, para GVA, e vários géneros de *Pseudococcus*, *Planococcus*, *Neopulvinaria*, *Cavariella* e *Ovatus*. A transmissão destes vírus entre videiras é também possível através de enxertia de material infetado ou inoculação mecânica com extratos de plantas infetadas (Fajardo *et al.*, 2003). De facto, embora o hospedeiro natural destes *Vitivirus* seja a videira (*Vitis vinifera L.*), para ensaios de diagnóstico e propagação por vezes são utilizados hospedeiros herbáceos, como *Nicotiana benthamiana*, *N. occidentalis* e algumas espécies de *Chenopodium*, infetadas através de inoculação mecânica (du Preez *et al.*, 2011).



Figura 1.2: *Grapevine virus A*. Partícula viral montada em acetato de urânio. Comprimento da barra: 100nm; adaptada de Martelli *et al.* (2011).

1.2.2 Genoma de *Vitivirus*

O genoma dos *Vitivirus* é constituído por uma molécula de RNA de cadeia simples de polaridade positiva (+ssRNA) variando entre 7351 e 7471 nucleótidos (nt), excluindo a cauda de poli(A) na extremidade 3'. Está organizado em cinco “open reading frames” (ORF 1-5), flanqueado por duas regiões não traduzidas (UTR), respetivamente de 86 nt na extremidade 5' e 68 nt na extremidade 3'. Para os *Grapevine virus A*, -*B*, -*E* e -*F*, para os quais foi já obtida a sequência genómica completa, está descrito que a ORF1 codifica a replicase RdRp (RNA polimerase dependente de RNA) com um tamanho de cerca de 194-kDa, a ORF3 codifica a proteína do movimento (MP) com 31-kDa, a ORF4 a proteína da cápside (CP), 21.5 k-Da, e a ORF5 codifica uma “RNA-binding protein”,

também designada por p10 (10-kDa) (Alabi *et al.*, 2014). A ORF2 codifica uma proteína de 19.8-kDa que não tem homologia significativa com nenhuma das proteínas disponíveis na base de dados de GenBank (Goszczyński, 2014), pelo que a sua função permanece desconhecida.



Figura 1.3: Organização do genoma de *GVA*. Adaptado de Goszczyński (2014).

1.3 Variabilidade genética, patogenicidade e detecção de *Vitivirus* associados a RW

GVA é a espécie tipo do género *Vitivirus* (ICTV, consultado a 30.09.2015) e a mais estudada. É considerado um vírus geneticamente heterogéneo, com variantes genéticas classificadas em pelo menos quatro grupos filogenéticos (Goszczyński, 2014). A existência de correspondência entre grupo filogenético e grau de patogenicidade das variantes não está completamente esclarecida.

A proteína do movimento (MP) de *GVA* tem a função de permitir a passagem célula-a-célula do hospedeiro dos transcritos genómicos virais segundo Galiakparov *et al.*, 2003a). Estes autores verificaram que ao inocular plantas de *N. benthamiana* com um clone mutante (pGVAΔMPGUS) para a ORF 3, os transcritos genómicos não passavam de célula para célula. Concluíram que a presença deste clone, a expressão da MP foi reduzida quando comparada com uma sequência não mutada (Galiakparov *et al.*, 2003a). A ORF 4 foi identificada como proteína da cápside por Minafra *et al.* (1994). Galiakparov *et al.* (2003a) estudou a proteína da cápside na replicação e movimentos virais através de um clone infeccioso (pGVA-fsCP). Este clone era portador de uma alteração que, como verificado em Western blot, impediu a acumulação da CP mas não da MP. Plantas de *N. benthamiana* inoculadas com este transcrito mutado, apresentaram a presença da CP restrita a algumas células, o que levou os autores a concluir que a CP, para além da MP, poderá ser requerida para o movimento do vírus célula a célula. Sugeriram ainda que esta proteína não é requerida para a replicação de *GVA* (Galiakparov, 2003a).

Tem sido discutido que um dos aspetos particulares do processo infeccioso do *GVA* poderá estar relacionado com o produto da ORF5. A proteína p10 é homóloga de proteínas de ligação a ácidos nucleicos de vários vírus de plantas, e carrega dois domínios diferentes, um rico em arginina (ARM) e um domínio *zinc-finger*. Este último domínio parece ser

conservado em todas os produtos proteicos codificados na zona proximal da extremidade 3' do genoma de *Vitivirus* (Galiakparov *et al.*, 2003b). Embora o motivo *zinc-finger* seja normalmente considerado como estando envolvido na ligação de proteínas a ácidos nucleicos, uma análise de mutação na p10 do isolado PA3-*GVA* (AF007415) mostrou que o motivo ARM é fundamental para que a p10 de *GVA* se ligue aos ácidos nucleicos (Galiakparov *et al.*, 2003b).

A produção desta proteína p10 por parte do *GVA* permite a supressão do sistema pós-transcricional de silenciamento de genes (PTGS), um sistema de degradação de RNA, usado pelas plantas como mecanismo de defesa contra infecções virais. Esta via é desencadeada por moléculas de RNA de cadeia dupla (dsRNA), que podem ser originados por transgenes endógenos ou exógenos, transposões ou RNA viral infeccioso (Fire *et al.*, 1998; Hannon, 2002). O papel fundamental no processo de silenciamento é desempenhado por pequenas moléculas de RNA, designados RNA de interferência (siRNAs), ou seja, moléculas de dsRNA entre 21 e 25 nt, que são geradas por clivagem, levada a cabo pelas enzimas do tipo RNase III, de moléculas de dsRNA maiores (Hamilton e Baulcombe, 2002; Schauer *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2004). Estes siRNAs são incorporados num complexo de silenciamento induzido pelo RNA (RISC) que por sua vez catalisa a degradação de sequências específicas de RNAs alvo. Os vírus são ao mesmo tempo indutores e alvo do PTGS (Frederick, 2000; Elbashir *et al.*, 2001). No caso do *GVA* e de alguns outros vírus de plantas, proteínas do tipo da p10 devido a sua capacidade de ligar ao RNA, são capazes de suprimir a ação do PTGS ao sequestrar os siRNAs.

Estudos sobre o funcionamento da p10 do *GVA* mostraram que a zona N-terminal do péptido afeta o aparecimento de sintomas em plantas de *Nicotiana benthamiana* e que p10 obtida de isolados severos e de isolados moderados parece afetar o silenciamento do RNA de forma semelhante em células do mesófilo de *N. benthamiana* (Haviv *et al.*, 2012). O produto da ORF5 de *GVB* mostra homologia apreciável com proteínas de ligação a ácidos nucleicos encontradas noutros vírus (Minafra *et al.*, 1994), no entanto tem fraca homologia com os produtos da ORF5 de outros *Vitivirus*, nomeadamente *GVA* (Galiakparov *et al.*, 2003b), e não tem sido explorada experimentalmente. Em 2009, Brumin *et al.* observaram que a infecção por *GVB* resulta num aumento da acumulação de transgenes específicos de PTGS, provavelmente a partir de um supressor de silenciamento proveniente do *GVB*. Assim, quando se pretende induzir resistência ao vírus com base em transgenes específicos de PTGS, deve ter se em conta a infecção por parte de outros vírus, pois pode ocorrer supressão dos transgenes específicos de PTGS induzida.

A função da ORF 2 é ainda desconhecida, e embora tenha homologia com algumas proteínas disponíveis em GenBank, a única instigação relaciona-a com transmissão às cochilhas (Galiakparov, 2003a).

Para todos os *Vitivirus* a função do produto codificado na ORF2 continua desconhecida. Na base de dados de GenBank encontram-se disponíveis sequências nucleotídicas destes cinco *Vitivirus*. Para *GVA*, encontram-se disponíveis 342 sequências nucleotídicas, sendo 12, sequências do seu genoma completo, com cerca de 7351 nt. A maioria de sequências de nucleótidos disponíveis em GenBank são da CP (236 sequências). Mais uma vez se verifica a variabilidade mundial deste *Vitivirus*, pois são encontradas sequências nucleotídicas espalhadas por todos os cantos do mundo, incluindo Washington, África e Europa. De *GVB* foram submetidas 126 sequências, das quais somente 4 são de genoma completo (cerca de 7599 nt). Relativamente ao *Grapevine virus D* (*GVD*) não existe disponível nenhuma sequência genômica completa, mas estão disponíveis 5 sequências nucleotídicas parciais. *GVE* e *GVF* apresentam 32 e 36 sequências nucleotídicas, respetivamente. *GVE* apresenta 5 sequências genômicas completas (cerca de 7568 nt), e *GVF*, 3 sequências genômicas completas (cerca de 7551 nt).

Atualmente, a deteção de *GVA* e *GVB* é feita por *Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay* (DAS-ELISA) com anticorpos comerciais (Saldarelli *et al.*, 2005), tendo como alvo a proteína da cápside. Os anticorpos comerciais são normalmente produzidos usando como imunizante um extrato proteico, parcialmente purificado, duma planta infetada. Dada a grande variabilidade genética descrita para isolados de *GVA* e *GVB* na região da CP (Shi *et al.*, 2004, Goszczynski, 2014)), é de esperar que os anticorpos atualmente disponíveis não detetem todas as variantes virais. A deteção é feita em folhas ainda jovens, o que também pode comprometer a fiabilidade do teste, visto estes *Vitivirus* estarem associados ao tecido floémico. Por outro lado, essa mesma variabilidade tem dificultado o estabelecimento de protocolos de deteção molecular baseados em transcrição reversa, seguida de reação em cadeia polimérica (RT-PCR), uma vez que, embora existam publicados pares de *primers* para amplificação de fragmentos do genoma daqueles vírus e até alguns trabalhos de comparação da capacidade de amplificação de diferentes variantes entre pares de *primers* (Goszczynski e Jooste, 2002; Galiakparov *et al.*, 2003c; Fajardo *et al.*, 2012; Osman *et al.*, 2013) não houve até à data validação dum par de *primers* para deteção molecular de rotina.

Neste cenário a etiologia destes vírus permanece pouco conhecida e torna-se claramente importante a obtenção de informação sobre a estrutura genética de isolados e populações

virais em condições de campo. Por sua vez esta informação poderá ser usada para melhorar as ferramentas de detecção, quer ao nível de técnicas serológicas quer de protocolos de detecção molecular.

1.4 Co-infecção entre *Vitivirus* e *Ampelovirus*

A primeira indicação que *Closterovirus* pudessem infetar videiras foi dada por Mengden (1971), que observou a acumulação de partículas virais em cortes finos dos tubos de seiva em videiras alemãs. Pensava-se que todos os *Closterovirus* “longos” (*GLRaV*), exceto um, *Grapevine Corky Bark-associated Virus Closterovirus* (*GCBaV*), estavam envolvidos no enrolamento. Eram ainda observadas partículas designadas *Closterovirus* “curtos”, como *GVA* e *GVB*, que se sabe hoje que pertencem ao género *Vitivirus*, e *GVC* que é na realidade um *Closterovirus* (*GLRaV-2*) (Gugerli *et al.*, 1984; Rosciglione e Gugerli, 1986; Rosciglione e Gugerli, 1989; Tanne *et al.*, 1989; Gugerli, 1991; Masri *et al.*, 2006).

Aquando tratamento térmico, verificava-se a ausência de *GLRaV-1*, *GLRaV-2* e *GLRaV-3*, e de sintomas de enrolamento foliar (Gugerli *et al.*, 1984; Zimmermann *et al.*, 1990; Gugerli *et al.*, 1991). O papel do *GLRaV-3* na doença de enrolamento foi adicionalmente suportada pela transmissão experimental do vírus, juntamente com sintomas típicos de enrolamento de videira para videira por *Planococcus ficus* (Rosciglione e Gugerli, 1986; Engelbrecht e Kasdorf, 1990) e *Pseudococcus longispinus* (Tanne *et al.*, 1989). Contrariamente aos restantes *Closterovirus*, *GCBaV* parecia estar envolvido em casca de cortiça (Namba *et al.*, 1991). Poucos anos depois da primeira referência de plantas infectadas por RW (Graniti e Ciccarone, 1961) foi descoberto o *GVA*, distribuído por todo o mundo. O seu papel exato na etiologia das doenças da vinha permaneceu controversa uma vez que também foi detetada a doença do enrolamento em videiras doentes (Rosciglione *et al.*, 1983; Conti e Milne, 1985; Engelbrecht e Kasdorf, 1985; Engelbrecht e Human, 1989; Agran *et al.*, 1990; Monette *et al.*, 1990).

A evidência substancial do papel etiológico do *GVA* no RW foi dada pelo tratamento térmico para a doença do enrolamento (LR) e da doença RW, onde *GLRaV-1*, *GLRaV-3* e *GVA* tinham sido detetados. Após o tratamento, os sintomas de LR por *GLRaV-1* e *GLRaV-3* foram eliminados, mas não *GVA* e nem os sintomas de RW (Gugerli *et al.*, 1991).

O complexo do RW associado à doença do enrolamento (*Grapevine leafroll*) estão indicadas como ameaças ao crescimento e estabelecimento de vinhas por todo o mundo

(Credi e Giunchedi, 1996). A doença do enrolamento é induzida por complexos de agentes virais, como referido anteriormente, partículas flexíveis e filamentosas, com comprimento entre 800nm e 2200nm, encontrados em vinhas sintomáticas, denominadas GLRaV (Martelli, 1993). *Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3)* pertence ao género *Ampelovirus*, na família *Closteroviridae*, e encontra-se restrito ao floema da videira, embora seja um agente muito difundido na doença do enrolamento (Martelli, *et al* 2002). O genoma deste *Closterovirus* está organizado em 13 ORF's (figura 1.4), numa mono partícula linear de RNA (+ssRNA) (Martelli, 1993). *GLRaV-3* infeta dicotiledóneas, transmitindo por cochonilhas e insetos vetores, tal como os *Vitivirus*, e afeta o desenvolvimento e qualidade dos bagos de uva, através de atrasos no amadurecimento e diminuição do teor de açúcares dos bagos. Isto implica a redução da qualidade do vinho (Mannini *et al*, 2000). A diversidade genómica de *GLRaV-3* tem vindo a ser analisada por vários autores ao nível das sequências parciais e completas do gene da proteína da cápside. Estes estudos têm indicado a existência de diversos grupos filogenéticos, desde três a cinco (Turturo *et al*, 2005; Fajardo *et al*, 2007; Engel *et al*, 2008; Chooi *et al*, 2009; Fuchs *et al*, 2009; Gouveia *et al.*, 2009; Jooste *et al*, 2010). Gouveia *et al.* (2011), verificaram em castas portuguesas que o gene da proteína da cápside de *GLRaV-3* se encontra distribuído em cinco grupos filogenéticos, suportados por elevados valores de *bootstrap* e um elevado coeficiente de diferenciação, sendo que os três primeiros grupos correspondem aos já descritos por Jooste, *et al.* (Jooste *et al*, 2010; Gouveia *et al.*, 2009; Gouveia *et al*, 2011). Esta informação é de elevada relevância para o estabelecimento de um ensaio de tipificação por RT-PCR-RFLP.

1.5 Incidência de *Vitivirus* e *GLRaV-3* em castas portuguesas

Embora *GVA* e *GVB* não sejam especificamente mencionados no esquema de certificação da videira em vigor em Portugal (DR-1.a SERIE, No 194, de 27.09.2006, Pág. 7058) o material mãe de propagação tem de estar isento de sintomas englobados no complexo de doenças do lenho rugoso segundo a legislação nacional transposta da legislação europeia. *Grapevine leafroll-associated virus 3* está mencionado no esquema de certificação da videira (DR-1.a SERIE, No 194, de 27.09.2006, Pág. 7058) no qual a cepa selecionada e os materiais vitícolas a partir dos quais são obtidos os materiais da categoria inicial devem estar isentos das viroses e doenças similares provenientes deste *Ampelovirus*.

2. Objectivos

Em seguimento do acima exposto, o objetivo global desta tese de mestrado foi descrever a diversidade de *Vitivirus* presentes em castas portuguesas e estabelecer um protocolo de deteção e tipificação. Devido à evidência de co-infecção de *GLRaV-3* com alguns *Vitivirus*, estabeleceu-se um protocolo de deteção-tipificação deste vírus com informação obtida disponível no laboratório.

Para este fim os trabalhos de tese foram desenvolvidos ao longo de três tarefas:

Tarefa 1 - Caracterização molecular de variantes dos diferentes *Vitivirus* presentes em castas portuguesas e respetiva incidência;

Tarefa 2 - Desenvolvimento dum ensaio de deteção-tipificação RT-PCR-RFLP para filogrupos de variantes de cada vírus estudado;

Tarefa 3 – Aplicação de um ensaio de deteção-tipificação RT-PCR-RFLP para o *Ampelovirus*, *GLRaV-3*.

3. Materiais e Métodos

3.1 Análises *in silico* para design de primers

Foram usados os programas *BioEdit* (Hall, 1999) para visualização e alinhamento de sequências homólogas obtidas em GenBank e *Oligo* (*OligoPrimerAnalysis* vr.7) para desenho de *primers* e verificação de condições de PCR. A ferramenta BLAST, disponível através de GenBank, foi usada para verificar a especificidade dos *primers* desenhados.

Foram assim desenhados *primers*, que permitissem a amplificação específica de regiões genómicas de cada *Vitivirus* em estudo, inicialmente foram desenhados pares para regiões genómicas que permitissem analisar a diversidade genética de cada vírus.

Após a obtenção de sequências de isolados portugueses, alinharam-se estas sequências com as disponíveis em GenBank e procuram-se regiões genómicas adequadas à deteção, no caso de *GVA* e *GVB*, e à tipificação, no caso de *GVA*.

Para *GLRaV-3*, usaram-se os *primers* publicados por Ling *et al.*, 1997.

Os *primers* utilizados neste trabalho estão mostrados na tabela 3.1.

3.2 Obtenção de material infetado

As amostras a analisar foram recolhidas de castas portuguesas, que se encontram disponíveis na Coleção Ampelográfica Nacional (CAN, PRT051-INIAV, Dois Portos), tendo como base os sintomas evidenciados e resultados de rastreios anteriores com DAS-ELISA com anticorpos comerciais. A CAN, como referido anteriormente, preserva importantes cultivares de videira, pela conservação de germoplasma (Almadadimet *al.*, 2007), e pela manutenção da variabilidade genética. A utilização da CAN como fonte de vírus garantiu a disponibilidade de material para este estudo e permitiu acesso à informação sobre o estado fitossanitário das plantas, rastreado ao longo de vários anos.

Cada amostra de material vegetal foi constituída pelas folhas de 4 a 6 varas colhidas na mesma planta. Pela quantidade de material que foi recolhido em diferentes pontos da planta, esta estratégia de amostragem garantiu uma amostra representativa, mesmo que a distribuição do vírus, e respetivas variantes na planta, fosse heterogénea. Foram também recolhidas varas de diferentes culturas. As amostras foram recolhidas em diferentes épocas do ano, como se explica seguidamente.

Tabela 3.1: Pares de *primers* utilizados para cada *Vitivirus* e para o Ampelovírus, *GLRaV-3*, analisados neste trabalho, com o tamanho esperado do fragmento de amplificação por PCR e respectiva correspondência no genoma.

Par	Virus	Primers	Sequência	Tamanho produto (bp)	Posição no genoma	Referência bibliográfica
1	GVA	MP	TGCCAGAGGTGTTTGAGACAAT	988	ORF3, ORF4, ORF5 e 3'UTR	De Meyer <i>et al.</i> , 2000
		CPdt	TTTTTGTCTTCGTGTGACAACCT			
2	GVA	GVACP1	CGATCACTGAGACCTCCAA	788	ORF4	Trabalhos anteriores
		GVACP2	GTGGACCTACCCGTGAGAA			
3	GVA detecção	GVA6534-Fw GVA7170-Rev	ACTCTCTTCGGGTACATCGC GGCTACTCTCCCTCTTT	654	ORF4 e ORF5	Este trabalho
4	GVB	GVB6445U21	ATGGAAAATATATCCC GGATG	1149	ORF4, ORF5 e 3'UTR	Adaptado de Goszczynski, 2010
		GVB7573L21	TTATTCACGCTTCTTTACCA			Este trabalho
5	GVB detecção	GVB6986U19d	AGAACGTATTACAGCACA	608	ORF4, ORF5 e 3'UTR	Este trabalho
		GVB7573L21	TTATTCACGCTTCTTTACCA			
6	GVD	GVD131U21	GACGCTCTTCGGGTACATAGC	600	ORF 1 e ORF2	Este trabalho
		GVD710L21	ATGGCTTTCTTCCTACAGTCA			
7	GVE	GVE6382U21	CATCTGTGCCACTGAAGTTCT	1137	ORF4, ORF5 e 3'UTR	Este trabalho
		GVE7540L21	ATGCTACCTTTGCTTATTTG			
8	GVF	GVF6031U19	CGCAGGATGCTTGGTGGTGG	1460	ORF3, ORF4, ORF5 e 3'UTR	Este trabalho
		GVF7510L21	CATGTGGACAACCGTGCTCGC			
9	GVF detecção	GVFd4861U18	CGGACAGATTATGAGCAC	255	ORF1	Este trabalho
		GVFd5134L20	TCCTTCCACCAACACGATTTG			
10	GLRaV-3	KSL95-5	ATGGCATTGAACTGAA	1011	ORF 7 (Proteína da Cápside)	Ling, <i>S. et al.</i> , 1997
		KSL95-6	TATAAGCTCCGATGAAT			

3.2.1 Indução de rebentamento das varas em fitoclima

As varas recolhidas em Dezembro de 2014, foram colocadas em *falcons* de 50 ml com água destilada e acondicionadas em fitoclima, com temperatura constante (24°C/25°C), intensidade luminosa de 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (lâmpadas GroLux fluorescentes) e fotoperíodo de 12 horas, de forma a induzir o rebentamento. Dos genes em desenvolvimento foram recolhidas folhas em expansão e inflorescências. As amostras foram armazenadas a -80°C.

3.3 Extração de RNA total

As amostras de tecido fresco foram moídas num almofariz com a ajuda de azoto líquido e o pó obtido transferido para um tubo tipo *ependorf* de 1,5 ml devidamente etiquetado. Para a extração de RNA total foi usado o kit *RNA Plant Kit* (EZNA, Omega Biotek; Califórnia) e o tampão de extração descrito por Mackenzie *et al.* (1997).

Este método de extração envolve uma precipitação simples e rápida que remove compostos fenólicos e polissacarídeos, que geralmente são um problema ao isolamento de RNA em amostras de plantas.

Utilizou-se 0,1g de folhas jovens e adicionou-se 1mL do tampão de extração [4M de Tiocianato de guanidina, 0.2M de Acetato de sódio (pH 5.0), 25mM de EDTA, 2.5% de PVP-40 e 1% de β -mercaptoetanol]. Homogeneizou-se no Ultra-turrax (Modelo T8, IKA Labortechnik) e adicionou-se 100 μl de Sarkozyl 20%. Incubou-se a 70°C durante 10 minutos, com agitação regular. Centrifugou-se durante 10 minutos a 10.000 g, à temperatura ambiente. Recolheu-se cuidadosamente 700 μl de lisado limpo para um novo tubo, assegurando que o *pellet* permanecia intacto e que não eram transferidos detritos. Adicionou-se 700 μl de isopropanol e levou-se ao *vortex* para precipitar o RNA. Centrifugou-se durante 2 minutos a 10.000 g, à temperatura ambiente para precipitar o RNA. Decantou-se o sobrenadante, certificando que o *pellet* não era perturbado, e inverteu-se o tubo em papel absorvente durante 1 minuto, de forma a permitir que o líquido residual drenasse. Adicionou-se 100 μl de tampão RB (fornecido no *kit*) pré aquecido a 65°C e levou-se ao *vortex* para ressuspender o *pellet*. Incubou-se durante cerca de 2 minutos a 65°C para dissolver o *pellet*. Adicionou-se 250 μl de tampão RB com 2% de β -mercaptoetanol, seguidos de 350 μl de etanol absoluto. Levou-se ao *vortex* para misturar. Aplicou-se a totalidade da amostra na coluna HiBind RNA Mini column colocada num tubo coletor de 2mL. Centrifugou-se durante 30 segundos a 10.000 g, à

temperatura ambiente. Desprezou-se o eluído e colocou-se a coluna no tubo coletor. Adicionou-se 500 µl de RNA *Wash Buffer I* e centrifugou-se durante 30 segundos a 10.000 g. Descartou-se o eluído e o tubo coletor. Colocou-se a coluna HiBind RNA *Mini column* num novo tubo coletor de 2 mL e adicionou-se 700 µl de RNA *Wash Buffer II* (fornecido no *kit*) previamente diluído com etanol absoluto. Centrifugou-se durante 30 segundos a 10.000 g, à temperatura ambiente e desprezou-se o eluído. Repetiu-se o processo e desprezou-se o eluído. Centrifugou-se durante 1 minuto a 14.000 g, à temperatura ambiente, de forma a eliminar resíduos de etanol. Transferiu-se a coluna para um tubo de 1,5 mL limpo e adicionou-se 50 µl de água estéril e livre de enzimas capazes de degradar RNA e DNA (*RNases* ou *DNases*) pré aquecida a 65°C. Centrifugou-se durante 1 minuto a 14.000 g, à temperatura ambiente. Guardou-se o tubo devidamente etiquetado (1º Eluição) a -80°C e a coluna foi colocada num novo tubo de 1,5 mL, à qual se voltou a adicionar 50 µl de água pré aquecida a 65°C. Guardou-se o tubo devidamente etiquetado (2º Eluição) a -80°C.

3.4 Síntese de cDNA com oligo d(T)

Utilizou-se o *kit* de síntese de cDNA *iScript™ Select* (BIORAD; Amadora - PORTUGAL) para obtenção de síntese da primeira cadeia de cDNA de cada amostra, de acordo com as instruções do fabricante, com um volume final de 20 µl, utilizando 5 µl do RNA total anteriormente extraído.

3.5 Amplificação do cDNA por PCR

O cDNA obtido anteriormente, foi utilizado como molde para amplificação com diferentes *primers* de *GVA*, *GVB*, *GVD*, *GVE* e *GVF*, e *GLRaV-3* (tabela 3.1). Cada reação de amplificação foi constituída por Tampão da Taq (5 µl), dNTP's (0.2mM), Primer Forward (1 µM), Primer Reverse (1 µM), 1 unidade de Taq (5 u/µl; DreamTaq Polimerase, Thermo Scientific, USA), 3 µl de RNA e H₂O (Sigma) estéril para um volume final de 50 µl. O programa de amplificação utilizado iniciou-se com 5 minutos a 94°C (desnaturação dos heteroduplex RNA/cDNA), seguido de 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 45°C – 50°C durante 30 segundos (hibridação dos *primers*) e 72°C durante 1 minuto e 15 segundos (extensão). O último passo foi de extensão final de 15 minutos a 72°C. A reação terminou a 10°C.

Terminadas as reações de amplificação com cada um dos *primers* desenhados para este trabalho, os produtos foram visualizados sob luz UV, após eletroforese em gel de agarose corado Brometo de Etídeo.

3.6 *Vitivirus*: Clonagem e sequenciação

Os produtos de PCR de interesse, isto é, fragmentos com tamanho esperado para cada par de *primers* usado e *Vitivirus* em estudo, obtidos de cada amostra foram ligados a um vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega), segundo a descrição do fabricante deste vetor de clonagem. Manteve-se a ligação durante 90 minutos à temperatura ambiente e armazenou-se a 4°C durante a noite.

A transformação foi feita usando células competentes de *Escherichia coli* estirpe XL1 Blue já disponíveis. A 100 µl de células competentes conservadas em tubos *eppendorf* adicionou-se 5 µl de ligação. Colocou-se o tubo durante 30 minutos no gelo, seguidos de 45 segundos a 42°C e por fim no gelo durante 2 minutos. Adicionou-se 250 µl de meio SOC (Meio Luria-Bertani para *E. coli* com Glucose 1 M) (anexo 9.2.6) e colocou-se na incubadora a 37°C, com agitação durante uma hora. Foram entretanto preparadas placas de Petri com 12.5 mL de meio Luria-Bertani, Agar e ampicilina (0,05mg/ml). Uma vez solidificado o meio, adicionou-se 40µl de XGal (20 mg/ml) a cada placa com a ajuda de um espalhador. Antes de plaquear as células, adicionou-se 5µl de IPTG 1M a cada transformação, e misturou-se cuidadosamente. Plaqueou-se 150 µl de volume de cada transformação por placa de Petri. As placas foram colocadas em incubadora a 37°C, durante a noite.

No dia seguinte, as colónias brancas, indicador dos recombinantes de interesse, foram repicadas para nova placa de Petri. Cada ponta estéril utilizada, foi seguidamente imersa num tubo de 0.2 ml contendo a mistura para PCR. Deste modo cada colónia foi amplificada através de PCR usando o respetivo par de *primers* para cada *Vitivirus*, de modo a ser verificada a presença de cada fragmento que se pretendia clonar. A visualização dos resultados de PCR foi feita sob luz UV após eletroforese em gel de agarose corado com *GreenSafe* (NZYTech). Os fragmentos obtidos foram sujeitos a análise de polimorfismo de conformação da cadeia simples (SSCP) (Oritaet *al.*, 1989). Em tubos *eppendorf* de 0.5 ml, adicionou-se 2 µl do produto de PCR e 18 µl de Tampão de Desnaturação [95% de Formamida, 4% de EDTA (5mM a pH 8.00) e 1% de uma solução saturada de Bromofenol em H₂O sigma]. As amostras foram carregadas num gel de acrilamida 8% (anexo 9.3.1) depois de desnaturarem a 92°C durante 5 minutos.

Após a eletroforese, procedeu-se à coloração de géis de acrilamida com nitrato de prata. Fixou-se os géis em solução aquosa de ácido acético glacial a 10%, durante pelo menos 20 minutos. Lavou-se os géis 3 vezes durante 3 minutos cada com água destilada. Incubou-se os géis em solução aquosa de ácido nítrico a 1.5% durante 3 minutos. De seguida lavou-se os géis 3 vezes durante 3 minutos cada com água destilada. Incubou-se os géis em solução aquosa de nitrato de prata (1 g/L) com formaldeído (1.5 mL/L de uma solução comercial a 37%) durante 30 minutos. Lavou-se os géis uma vez durante 3 minutos com água destilada. Os géis foram revelados através da incubação em solução aquosa de carbonato de sódio (30 g/L), com formaldeído (1.5 mL/L de uma solução comercial a 37%) e tiosulfato de sódio ($\text{NaS}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, e mg/L). As bandas tornaram-se visíveis e parou-se a coloração adicionando a solução aquosa de ácido acético glacial 10%.

Clones com diferentes padrões de Polimorfismos de Conformação de Cadeia Simples (SSCP) foram selecionados para extração de DNA plasmídico (pDNA). Cada colónia de interesse foi inoculada em 5 mL de meio Luria-Bertani com ampicilina (0,05 mg/mL) para crescimento da cultura em incubadora a 37°C, com agitação durante a noite. No dia seguinte procedeu-se à extração do pDNA (Miniprep) de cada inóculo, usando o *kit* NZY Miniprep (NZYTech; PORTUGAL), de acordo com as instruções do fabricante. Este *kit* usa o método de lise alcalina para se obter o DNA plasmídico em solução sem o contaminar com o DNA da bactéria, e um passo inicial de ressuspensão das células com tratamento com RNase para evitar contaminação com RNA bacteriano.

3.7 Análise filogenética

Procedeu-se a uma análise *in silico* para deteção de grupos filogenéticos e as relações filogenéticas das variantes de cada *Vitivirus* presente nos isolados portugueses, após alinhamento com as sequências homólogas disponíveis em GenBank, utilizando o programa BioEdit [Hall, 1999; ClustalW (Larkin *et al.*, 2007) incluído] para visualização e alinhamento das sequências e o programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) para construção de dendrogramas e inferência filogenética com diferentes algoritmos. Foram utilizadas apenas sequências genómicas completas das disponíveis em GenBank, para cada vírus.

Analizou-se a informação filogenética detalhadamente com base nas sequências nucleotídicas da ORF5, seguida de uma análise funcional com base nas respetivas sequências de aminoácidos deduzidas, comparando *GVA* e *GVB*. O programa DnaSP

(Librado e Rozas 2009; Rozas 2009) foi usado para determinação de parâmetros de genética de populações. Eventos de recombinação foram investigados com a ajuda do programa RDP4, vr 4.39 (Martin, 2009). Sinais de recombinação e pressões seletivas atuantes nas regiões codantes foram detetadas através do *software* implementado na interface DataMonkey (<http://www.datamonkey.org/>; Kosakovsky Pond e Frost, 2005). Os motivos protéicos da ORF 5 de *GVA* e *GVB* foram detetados através da interface ScanProsite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>; De Castro *et al.* 2006).

3.8. Duplex PCR

O DNA complementar (cDNA) obtido anteriormente, foi utilizado como *template* para amplificação com os *primers* de detecção de *GVA* e de detecção de *GVB*, em simultâneo, de modo a obter uma detecção mais direcionada à presença de um ou dos dois *Vitivirus* em cada isolado. O preparação da amplificação foi feita de acordo com as instruções do fabricante Thermo Scientific DreamTaq DNA Polymerase, num volume final de 50 µl com 3 µl de cDNA de cada isolado.

3.9. Ensaio de tipificação por RT-PCR-RFLP

Com base nas relações filogenéticas detetadas foi desenvolvido um protocolo de tipificação RT-PCR-RFLP. Esta técnica baseia-se numa análise de genotipagem.

Amplificou-se os fragmentos detetados como variáveis, que posteriormente foram sujeitos à ação de enzimas de restrição. Para o desenvolvimento deste protocolo procedeu-se à identificação da(s) enzima(s) de restrição apropriadas no programa BioEdit (Hall, 1999; ClustalW incluído), e a amplificação do fragmento com informação específica.

3.9.1 Tipificação de variantes de *GVA*

A enzima identificada com um padrão de reconhecimento de grupos filogenéticos diferente foi a *Hpy8I*. A *Hpy8I* é uma enzima degenerada que reconhece o padrão 5'-GTN↓NAC-3'. O perfil esperado é o encontrado na tabela 3.2.

Tabela 3.2: Tipificação de *GVA* com a enzima *Hpy8I* com os fragmentos esperados para cada grupo filogenético.

Grupo filogenético	<i>Hpy8I</i>
Grupo I	510; 145
Grupo III	269; 240; 145

Num tubo tipo *eppendorf* de 0.5 mL para cada reação de tipificação e amostra, adicionou-se 2 µl de 10X FastDigest Green Buffer (Termo Scientific; USA), 10 µl de produto de amplificação, 1 µl de enzima FastDigest (Termo Scientific; USA) e para perfazer um volume total de 30 µl, adicionou-se água DNase/RNase-free, 0.1um filtered (Sigma). Todas as amostras foram incubadas no bloco térmico Dry Block Termostat, a 37°C, durante 15 minutos, e carregadas logo de seguida num gel de 3% de agarose em TAE (1X). A eletroforese correu a 75V até as amostras entrarem nos poços, sendo o resto da corrida a 90V.

3.9.2 Tipificação de variantes de *GLRaV-3*

As enzimas identificadas para identificação dos diferentes grupos filogenéticos estão representadas na tabela 3.3. O padrões conhecidos de corte são: *SpeI*, 5'-A↓CTAGT-3'; *PvuII*, 5'CAG↓CTG; *BstZI7I*, 5'-GTA↓TA C-3'; *PdmI*, 5'-GAANN↓NNTTC-3'; *KpnI*, 5'-GGTAC↓C-3'.

Tabela 3.3: Tipificação de *GLRaV-3* com as enzimas e fragmentos esperados para cada grupo filogenético.

Grupo Filogenético	<i>SpeI</i> + <i>PvuII</i>	<i>BstZI7I</i>	<i>PdmI</i>	<i>KpnI</i>
I	733; 284	1017	1017	1017
II	1017	625; 392	1017	1017
III	1017	1017	509; 508	1017
IV	1017	1017	1017	742; 275
V	546; 284; 187	1017	1017	1017

Num tubo tipo *eppendorf* de 0.5 mL, para cada reação de tipificação e amostra, adicionou-se 2 µl de 10X FastDigest Green Buffer (Termo Scientific; USA), 10 µl de produto de amplificação, 1 µl de enzima FastDigest (Termo Scientific; USA) e para perfazer um volume total de 30 µl, adicionou-se água DNase/RNase-free, 0.1um filtered (Sigma). Todas as amostras foram incubadas no bloco térmico Dry Block Termostat, a 37°C, durante 15 minutos, e carregadas logo de seguida num gel de 3% de agarose em TAE (1X). A eletroforese correu a 75V até as amostras entrarem nos poços, sendo o resto da corrida a 90V.

4.1. Resultados

4.1.1 Variabilidade Genética de GVA

Num trabalho anterior acerca de *Grapevine virus A*, algumas sequências nucleotídicas compreendendo as sequências codantes da proteína do movimento (MP), da proteína da cápside (CP), da p10 e ainda a sequência 3'-UTR, com um tamanho de 988 nucleótidos, já tinham sido obtidas com o par de *primers* 1 (tabela 3.1). Haviam sido testados 18 isolados e obtidas sequências com 988 nucleótidos de quatro isolados de GVA, contendo informação da ORF 3, 4 e 5, e de 3'UTR, e sequências de dois isolados com informação da proteína da cápside. Neste trabalho testaram-se 12 isolados, para além dos já experimentados. Estes isolados continham informação positiva por parte do DAS-ELISA. Obtiveram-se sequências de 2 isolados. Na figura 4.1 está exemplificado um resultado de electroforese em gel de agarose, em que nas posições 1, 2, 10, 11 e 12 surge sinal de amplificação para o par de *primers* 1 de GVA (tabela 3.1). Como as bandas de amplificação de Dn(3), Cv(3) e PF(3) tinham uma fraca intensidade de fluorescência, procedeu-se ao processo de clonagem e sequenciação de AC(3) e C(3).

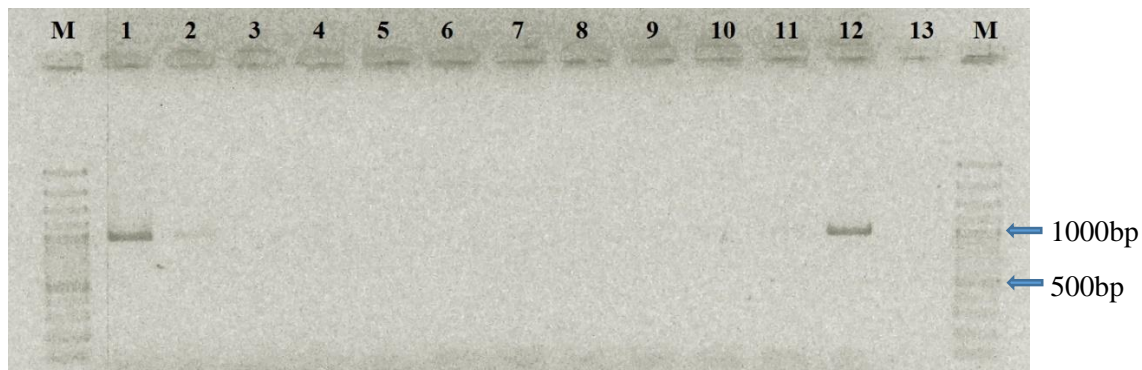


Figura 4.1: Amostras testadas com *primers* de GVA (gel de agarose 1,5% em TAE (1X) com EtBr). Legenda: M – Marcador Gene Ruler (100 bp Plus, Life Technologies), 1 – AC(3), 2 – Dn(3), 3 – Zf(3), 4 – TPS(3), 5 – Rb(3), 6 – TdG(3), 7 – MT(3), 8 – TNM(3), 9 – TT(3), 10 – Cv(3), 11 – PF(3), 12 – C(3), 13 – controlo negativo de PCR.

Verificou-se, também com este par de *primers* 1 (tabela 3.1), a possível existência de falsos negativos no teste serológico DAS-ELISA, nomeadamente em isolados positivos para GVB (13 isolados) indicados na tabela 4.1. Estes isolados não tinham informação do teste em DAS-ELISA com anticorpos para GVA ou havia a informação de serem negativos para este *Vitivirus*. Desta amplificação obtiveram-se fragmentos de tamanho esperado em 5 isolados.

Tabela 4.1: Resultados do DAS-ELISA para os diferentes isolados de *GVA* (informação cedida pelos técnicos do INIAV) e resultados de amplificação obtidos com os *primers GVA*¹, *GVA CP*² e *GVA detecção*³.

Variedade / Isolado	Identificação do isolado	DAS-ELISA		<i>GVA</i> ¹	<i>GVA CP</i> ²	<i>GVA detecção</i> ³
		<i>GVA</i>	<i>GVB</i>			
Alvarelhão Ceitão	AC(3)	+	-	+	+	+
Donago	Dn(4)	+	-	+		+
Zinfandel	Zf(3)	+	-			+
Tinta de Porto Santo	TPS(2)	+	-			+
Cristalino	Cr(3)	+	+			+
Aramis	Ar(3)	+	-			+
Airén	Ai(3)	-	+			+
Bandeirante	Bd(3)	+	-			+
Tinta Ferreira	TF(3)	+	-	+		+
Ribatejana	Rb(7)	+	-			+
Tinta da Graciosa	TdG(3)	+	-			+
Tinto Velasco	TV(3)	+	-			+
Boal das Abelhas	BdA(3)	+	+			+
Tinta Martins	TM(3)	+	+	+		+
Português-Azul	PA(3)	+	-		+	+

Tabela 4.1 continuação

Variedade / Isolado	Identificação do isolado	DAS-ELISA		GVA ¹	GVA CP ²	GVA detecção ³
		GVA	GVB			
Malandra	MI(3)	+	-	+		+
Malvasia Fina	MF(3)	+	+			+
Tinta Lameira	TL(3)	+	-		+	+
Roseira	Rs(3)	+	-	+		+
Lourela	LI(3)	+	-			+
Gonçalo-Pires	GP(3)	-	+	+		+
Sousão	S (3)	-	+	+		+
Varejoa	Vr(3)	+	-			+
Malvasia Trigueira	MT(3)	+	-	+		+
Tinta Engomada	TE(3)	+	-			+
Caramela	Ca(3)	+	+	+		+
Ricoca	Rc(3)	+	-	+		+
Bovale de Spagna	BS(3)	+	-			+
Garnacha Roja	GR(3)	+	-			+
Bastardo-Tinto	BT(3)	+	-			+

Tabela 4.1 conclusão

Variedade / Isolado	Identificação do isolado	DAS-ELISA		GVA ¹	GVA CP ²	GVA detecção ³
		GVA	GVB			
Alvarelhão Branco	AB(3)		+	+		+
Tinta Negra Mole	TNM(2)	+	-			+
Tinta-Tabuaço	TT(3)	+	-			+
Tinta de Cidadelhe	TdC(3)	-	+			+
Sevilhão	Se(3)	-	+			+
Corropio	Cp(3)	-	+	+		+
Carrega-Tinto	CT(3)		+	+		+
Corvo	Cv(3)	+	-	+		+
Monvedro	Mo(3)		+			+
Pau Ferro	PF(3)	+		+		+
Ramisco	Ra(3)		+	+		+
Brancelho	Br(3)		+	+		+
Bastardo	Bs(3)		+			+
Cot	C(3)	+	-	+		+

¹Primer GVA: Par 1 da tabela 1.1 do capítulo 3 (Materiais e Métodos)²Primer GVA CP: Par 2 da tabela 1.1 do capítulo 3 (Materiais e Métodos)³Primer GVA detecção: Par 3 da tabela 1.1 do capítulo 3 (Materiais e Métodos)

A figura 4.2 ilustra o resultado parcial da análise SSCP da amostra Br(3), onde se verificam sete padrões diferentes. Para cada isolado, clones de diferentes padrões foram selecionados para sequenciação comercial (STABVIDA, Caparica, Portugal).



Figura 4.2: Exemplo de uma análise Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) para variantes de *GVB* presentes no isolado TdC(3).

* assinala clones de padrão diferente.

As sequências de *GVA*, obtidas e homólogas disponíveis em GenBank, foram visualizadas e alinhadas. Sequências repetidas dentro do mesmo isolado foram retiradas do alinhamento. Verificou-se a presença de eventos de recombinação através do software RDP4 (Martin, 2009). Verificou-se que cinco sinais de recombinação, em quatro isolados diferentes, os clones TM(3)-4, Rs(3)-16, AC(3)-23, MI(3)-9 e MI(3)-12, representados na tabela 4.2. Para considerar uma sequência como recombinante, quatro dos métodos do programa RDP4 têm de dar um valor P significativo. Assim, na construção dos dendrogramas considerou-se TM(3)-4, Rs(3)-16 e AC(3)-23, considerámo-los como sequências recombinantes.

A figura 4.3 ilustra as relações filogenéticas detetadas. Pode verificar-se que as 84 sequências compreendendo parte do gene da MP, da CP, da p10 e a região 3'-UTR se agrupam em dois grupos filogenéticos distintos, o grupo I e o grupo III. As variantes dos isolados AC(3), MI(3), TF(3), Rs(3) e Rc(3) encontram-se distribuídas pelos dois grupos filogenéticos. No grupo I verificou-se a presença de três grupos resolvidos e ao mesmo nível filogenético, dois deles anteriormente designados grupo II e grupo IV, os grupos 1A, 1B, respetivamente, e o grupo 1C. As sequências completas disponíveis em GenBank incluídas no alinhamento foram NC003604, AY244516, AF007415, DQ855086, AF441235, DQ855083, DQ855082, DQ855081, DQ855087, DQ855085, KC962564, DQ855084, AF441234, JX559641, DQ787959 e DQ855088.

Tabela 4.2: Eventos putativos de recombinação intragênica envolvendo sequências de *GVA* analisadas neste trabalho.

Evento ^a	Breakpoint		Sequência Recombinante	Sequências na recombinação		Método (Av. P-val.) ^d					
	#	Ínicio		Fim	Major	Minor	R	G	M	C	S
1	740	976	TM(3)-4	MI(3)-13 (99.2%) GIII	MI(3)-5 (96.1%) GI	5.070x10 ⁻¹⁴	4.356x10 ⁻⁰⁹	1.805x10 ⁻⁰⁹	3.201x10 ⁻⁰⁸	3.369x10 ⁻⁰⁸	2.179x10 ⁻²²
2	951	U	Rs(3)-16	Rc(3)-7 96.2% GI	U[C(3)-15] - GI	4.765x10 ⁻⁰³	1.071x10 ⁻⁰²	1.003x10 ⁻⁰²	1.100x10 ⁻⁰²	2.045x10 ⁻⁰³	3.054x10 ⁻⁰³
2	55	204	Rs(3)-16	Rc(3)-16 98.8% GI	U[Rs(3)-3] - GI	2.711x10 ⁻⁰⁴	7.741x10 ⁻⁰³	2.986x10 ⁻⁰⁴	2.806x10 ⁻⁰⁴	1.320x10 ⁻⁰⁵	2.504x10 ⁻⁰⁵
3	972	U	AC(3)-23	AC(3)-13 99.5% GI	AC(3)-3 98% GIII	1.971x10 ⁻²⁰	9.039x10 ⁻¹⁹	3.537x10 ⁻¹²	9.775x10 ⁻¹²	3.776x10 ⁻⁰⁶	7.890x10 ⁻³¹
CP ^c											
1	586	U	Rs(3)-16	Rc(3)-7 95.1% GI	U[KF013767] - GI	8.126x10 ⁻⁰⁴	1.190x10 ⁻⁰²	2.217x10 ⁻⁰³	7.048x10 ⁻⁰³	-	2.115x10 ⁻⁰⁴
2	590	U	AC(3)-23	AC(3)-6 98.3% GI	AC(3)-3 97.4% GIII	6.713x10 ⁻¹²	1.685x10 ⁻⁰⁹	5.929x10 ⁻¹⁰	1.021x10 ⁻⁰⁹	1.875x10 ⁻⁰⁵	2.924x10 ⁻²²

^aEventos de recombinação são suportados por pelo menos 4 do diferentes métodos implementados no software RDP4 vr 4.39 . A probabilidade suportada por casa método é mostrada. A numeração dos nucleótidos de breakpoints corresponde a posições nos respectivos alinhamentos de sequências.

^bMP-3'UTR: Parcial ORF 3, ORFs 4 e 5 completas e região 3'UTR.

^cCP: ORF 4 completa.

^dR: RDP; G: Geneconv; M: MaxChi; C: Chimaera; S: SiScan.

U – Desconhecido

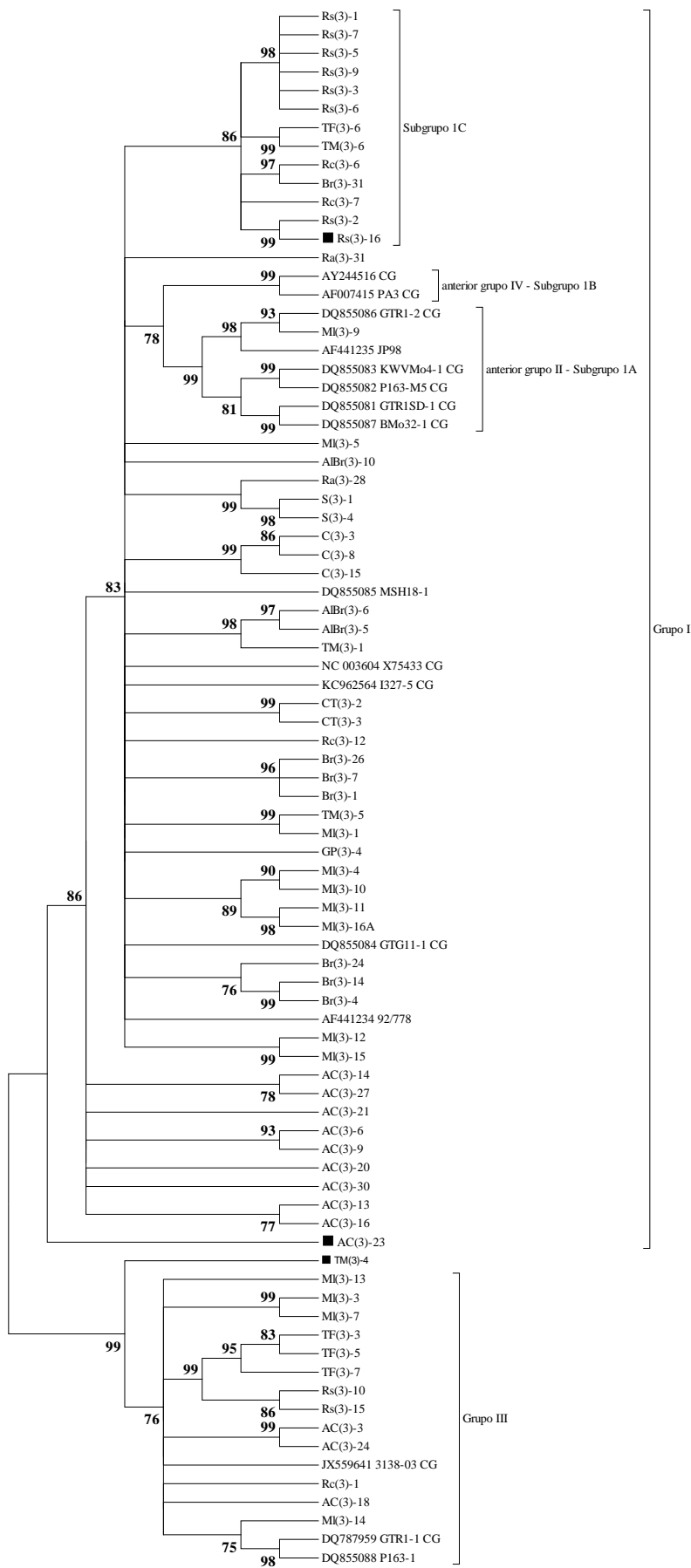


Figura 4.3: Análise filogenética das sequências nucleotídicas compreendendo parte da ORF 3, ORF4 e o gene da p10, e 3'UTR de GVA. O alinhamento das sequências obtidas e disponíveis em GenBank, foi analisado no programa BioEdit e a árvore filogenética no programa MEGA 6, utilizando o método Maximum Likelihood (ML), com 1000 replicados para determinação do valor bootstrap. As sequências recombinantes estão marcadas por (■).

A tabela 4.3 mostra as estimativas de divergência evolutiva média (d) nas entre pares dentro dos grupos filogenéticos considerados na figura 4.3. O sub grupo 1 B apresenta o valor mais baixo, enquanto os grupo I e 1A apresentam o valor mais alto. O segundo valor mais alto pertence ao grupo III. Os polimorfismos nucleotídicos nos filogrupos determinados para cada região foram avaliados pelo teste estatístico Tajima D (Tajima, 1989). Este teste é um dos mais utilizados para detecção de seleção usando polimorfismos de sequências nucleotídicas. Uma estatística D negativa indica uma seleção purificante e fixação alélica conduzida por seleção natural, enquanto uma estatística D positiva indica uma seleção balanceadora. Embora o grupo 1C apresente um valor negativo e os estantes grupos apresentem valores positivos os valores não são significativos ($P > 0.1$). O grupo 1B não contém sequências suficientes para este teste, que requer pelo menos 3 sequências. A divergência evolutiva média foi considerada apenas entre o grupo I e III e é de 0.202 ± 0.01 .

Tabela 4.3: Estimativas de divergência evolutiva média (d) em sequências genéticas de *Grapevine virus A*. Distância genética e teste de neutralidade dentro de grupos está apresentada.

Filogrupo	Nº Variantes	d	S	Hd	Tajima's D
Todos	84	0.119 ± 0.006	428	1.000	0.99202ns
Grupo I	64	0.081 ± 0.004	344	1.000	0.09700ns
Sub Grupo 1A	7	0.081 ± 0.009	170	1.000	0.58308ns
Sub Grupo 1B	2	0.003 ± 0.002	3	1.000	ND
Sub Grupo 1C	12	0.038 ± 0.005	127	1.000	-0.60763ns
Grupo III	16	0.062 ± 0.005	190	1.000	0.18554ns

A estatística Tajima D foi utilizada como medida de neutralidade para todas as mutações na região genômica, utilizando o programa DnaSP 5.10.11 (Librado e Rozas 2009). O teste D é baseada nas diferenças entre o número de loci polimórficos e o número médio de diferenças de nucleótidos. O programa DnaSP fornece uma medida da significância o valor de D. Os valores para os testes de neutralidade não foram significativas (ns) em todos os casos determinados ($P > 0,10$). ND = não determinado devido a falta de sequências suficientes

S corresponde ao número de locais segregantes (polimórficos).

Hd - diversidade haplotípica.

^aFilogrupos estão definidos na figura 4.3.

4.1.2 ORF 4 – Proteína da Cápside

4.1.2.1 Diversidade genética

As sequências longas obtidas foram cortadas pelos respectivos codões de iniciação e finalização da proteína da cápside, tendo por base a sequência de genoma completa NC003604. Para além das sequências completas disponíveis em GenBank, incluiu-se na análise da CP, sequências obtidas de isolados portugueses e sequências disponíveis em GenBank completas para a CP [KF013755; KF013758; KF013764; KF013767; KF013777; KF013787; KF013790; KF013793; KF013798; KF013799; KF013807; KF013826; KF013828; KF013849 (Alabi *et al.*, 2014)]. A figura 4.4 mostra o dendrograma filogenético obtido para as sequências nucleotídicas da ORF 4 de *Grapevine virus A*. Os dois grupos filogenéticos observados, suportados a mesma organização mostrada na figura 4.3.

O alinhamento foi analisado através do software RDP4 para verificar a existência de sinais de recombinação. Foram encontrados dois eventos de recombinação (tabela 4.2) comuns aos já encontrados para as sequências longas, Rs(3)-16 e AC(3)-23.

Na tabela 4.4 temos estimativas de divergência evolutiva média (d) entre pares de sequências dentro dos grupos filogenéticos considerados na figura 4.4. Os valores mais elevados correspondem novamente aos grupos I e ao sub grupo 1A, e o mais baixo ao sub grupo 1C. Os polimorfismos nucleotídicos nos filogrupos determinados para cada região foram avaliados pelo teste estatístico Tajima's D. O subgrupo 1C apresenta um valor estatístico D negativo e todos os outros filogrupos apresentam valores estatísticos D positivos, mas não significativos ($P > 0.1$). A divergência evolutiva média entre os grupos I e III é de 0.192 ± 0.06 .

Na figura 4.5. está representado o dendrograma filogenético das sequências de aminoácidos deduzida das sequências de nucleótidos da proteína da cápside (CP) do *Grapevine virus A*. Cada sequência tem 90 aminoácidos e estão agrupadas em dois grupos filogenéticos, grupo I e III. Dentro do grupo I, temos um subgrupo, 1A (anteriormente designado grupo II), ao invés dos três subgrupos resolvidos no dendrograma de sequências nucleotídicas da CP. O bootstrap é mínimo, 50%, mesmo assim verifica-se que várias sequências do grupo I não se encontram resolvidas.

Os valores de pressão de seletiva foram determinados através de DataMonkey para a ORF 4 e ORF 5. Na ORF 4 foram encontrados 145 locais negativamente selecionados. Na ORF 5, encontramos 39 locais negativamente selecionados, e um positivamente selecionado, como é possível verificar na tabela 4.5.

Tabela 4.4: Estimativas de divergência evolutiva média (d) em sequências genéticas da proteína da cápside de *Grapevine virus A*. Distância genética e teste de neutralidade dentro de grupos está apresentada.

Grupo Filogenético	Nº Variantes	d	S	Hd	Tajima's D
Todos	108	0.136±0.007	298	1.000	1.32090ns
Grupo I	89	0.100±0.005	285	1.000	0.11289ns
Grupo 1A	9	0.097±0.008	140	1.000	0.063320ns
Grupo 1B	5	0.068±0.012	74	1.000	1.04151
Grupo 1C	12	0.040±0.006	80	1.000	-0.53752ns
Grupo III	19	0.076±0.004	142	1.000	0.44470ns

A estatística Tajima D foi utilizada como medida de neutralidade para todas as mutações na região genômica, utilizando o programa DnaSP 5.10.11 (Librado e Rozas 2009). O teste D é baseada nas diferenças entre o número de loci polimórficos e o número médio de diferenças de nucleótidos. O programa DnaSP fornece uma medida da significância o valor de D. Os valores para os testes de neutralidade não foram significativas (ns) em todos os casos determinados ($P > 0,10$).

S corresponde ao número de locais segregantes (polimórficos).

Hd – diversidade haplotípica

^aFilogrupos estão definidos na figura 4.3.

4.1.3 ORF 5

4.1.3.1 Diversidade genética

O alinhamento das sequências da ORF 5 obtidas neste trabalho com as sequências homólogas retiradas das sequências de genoma pmpeto disponíveis em GenBank. Verificou-se através do software RDP4, que nesta região nenhuma sequência apresentava sinal de recombinação. Foi construído o dendrograma apresentado na figura 4.6 que demonstra as relações filogenéticas entre sequências e entre grupos, e incluídos os recombinantes mostrados na tabela 4.2. Na proteína p10, as sequências agrupam-se em dois grupos filogenéticos distintos, grupo I e III, sem sub grupos relevantes.

A tabela 4.5 apresenta as estimativas de divergência (d) na ORF 5 de *GVA*. O valor mais alto encontra-se no grupo I, sendo o grupo III o que apresenta valor mais baixo. O teste estatístico Tajima D exibe um valor estatístico D negativo para o grupo I. Todos os restantes filogrupos apresentam valores estatísticos D positivos, embora os valores não sejam significativos ($P > 0,1$). O valor de divergência média entre grupos é de 0.134 ± 0.06 entre os grupos I e III.

Na figura 4.7 temos o dendrograma que elucida as relações filogenéticas entre as sequências de aminoácidos da ORF 5, deduzidas das sequências nucleotídicas. As

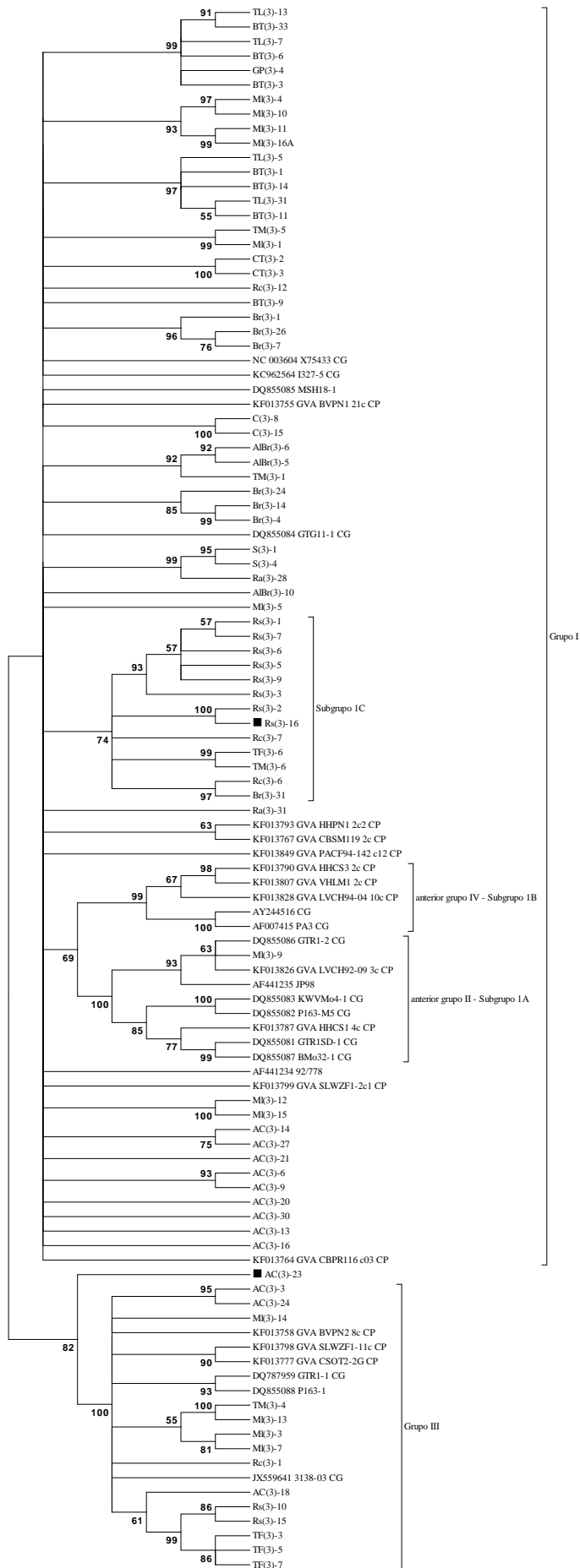


Figura 4.4: Análise filogenética das seqüências nucleotídicas do gene da proteína da cápside (CP) de *GVA*. O alinhamento das seqüências obtidas e disponíveis em GenBank, foi analisado no programa BioEdit e a árvore filogenética no programa MEGA 6, utilizando o método Maximum Likelihood (ML), com 1000 replicados para determinar o valor de bootstrap. As seqüências recombinantes estão marcadas por (■).

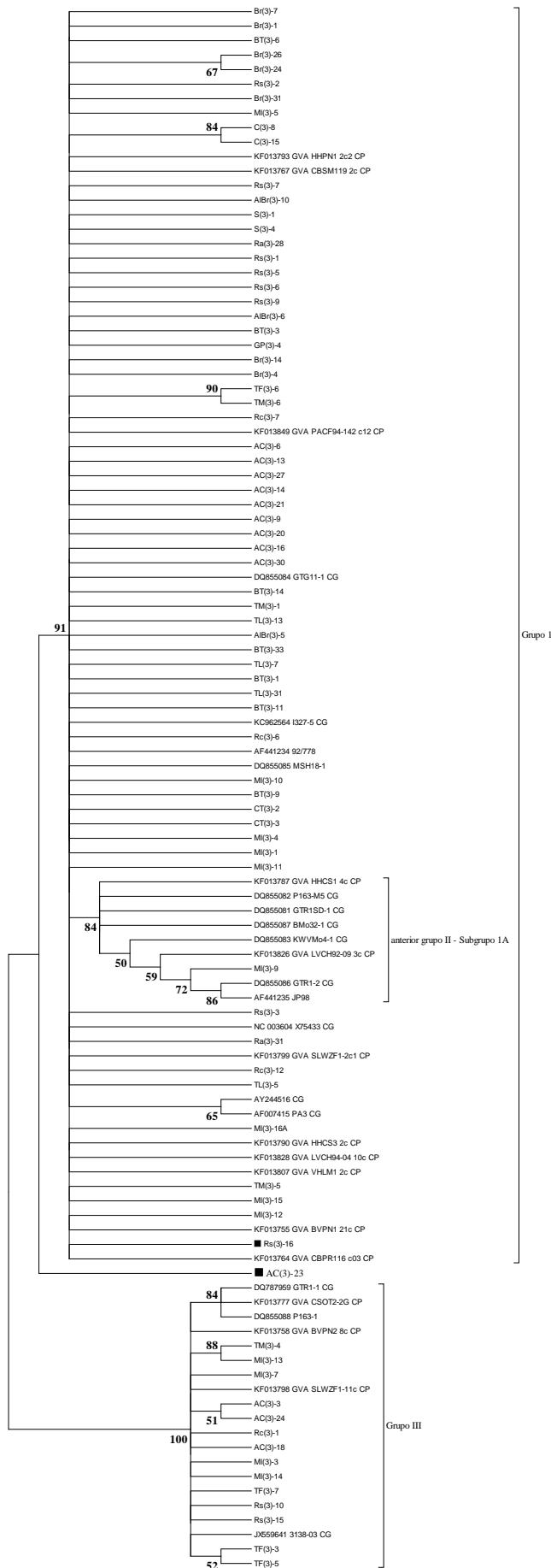


Figura 4.5: Análise filogenética das seqüências de aminoácidos deduzida das seqüências nucleotídicas do gene da proteína da cápside (CP) de GVA. O alinhamento das seqüências obtidas e disponíveis em GenBank, foi analisado no programa BioEdit e a árvore filogenética no programa MEGA 6, utilizando o método Maximum Likelihood (ML), com 1000 replicados para determinar o valor de bootstrap. As seqüências recombinantes estão marcadas por (■).

sequências agrupam-se em dois filogrupos, embora com valores de bootstrap muito inferiores ao observado no dendrograma anterior.

Tabela 4.5: Estimativas de divergência evolutiva média (d) em sequências genéticas da ORF 5 – p10 de *Grapevine virus A*. Distância genética e teste de neutralidade dentro de grupos está apresentada.

Grupo Filogenético	Nº Variantes	D	S	Hd	Tajima's D
Todos	71	0.086±0.005	105	0.999	0.24014ns
Grupo I	54	0.060±0.003	82	0.999	-0.36294ns
Grupo III	14	0.053±0.005	42	1.000	0.37771ns

A estatística Tajima D foi utilizada como medida de neutralidade para todas as mutações na região genômica, utilizando o programa DnaSP 5.10.11 (Librado e Rozas 2009). O teste D é baseada nas diferenças entre o número de loci polimórficos e o número médio de diferenças de nucleótidos. O programa DnaSP fornece uma medida da significância o valor de D. Os valores para os testes de neutralidade não foram significativas (ns) em todos os casos determinados ($P > 0,10$).

S corresponde ao número de locais segregantes (polimórficos).

Hd – diversidade haplotípica

^aFilogrupos estão definidos na figura 4.3.

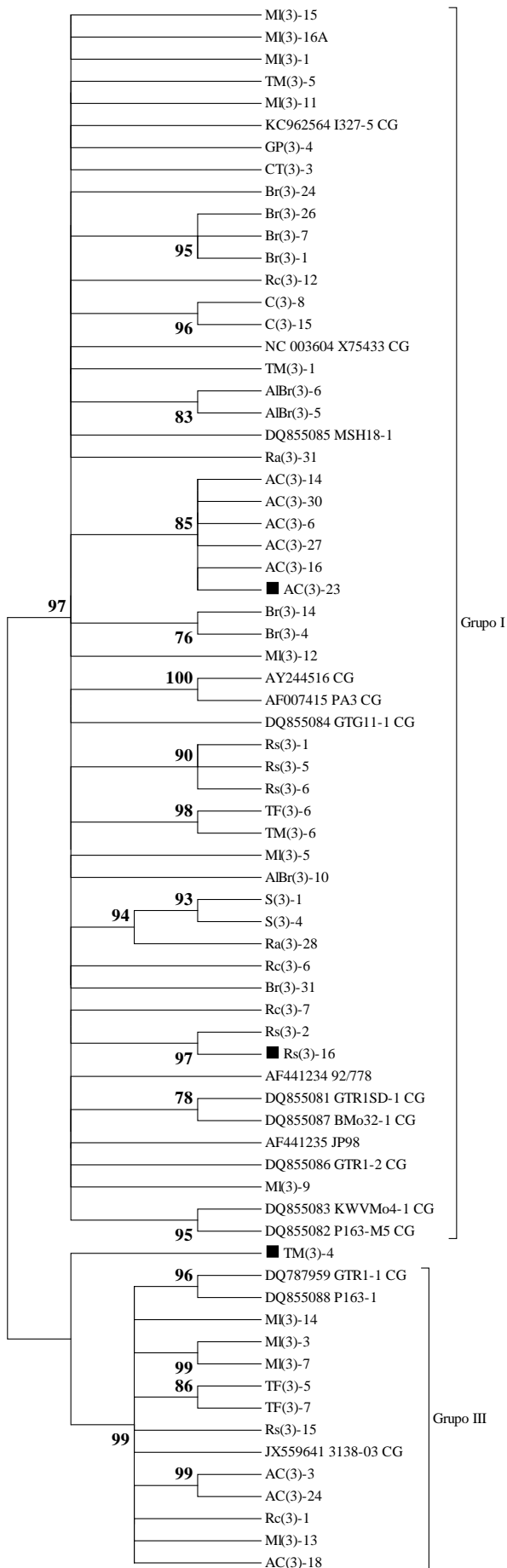


Figura 4.6: Dendrograma filogenético das sequências de nucleótidos da ORF5 de GVA. O alinhamento foi feito no programa BioEdit e a árvore filogenética no programa MEGA 6, utilizando o método Maximum Likelihood (ML), com 1000 replicados para determinar o valor de bootstrap. As sequências recombinantes estão marcadas por (■).

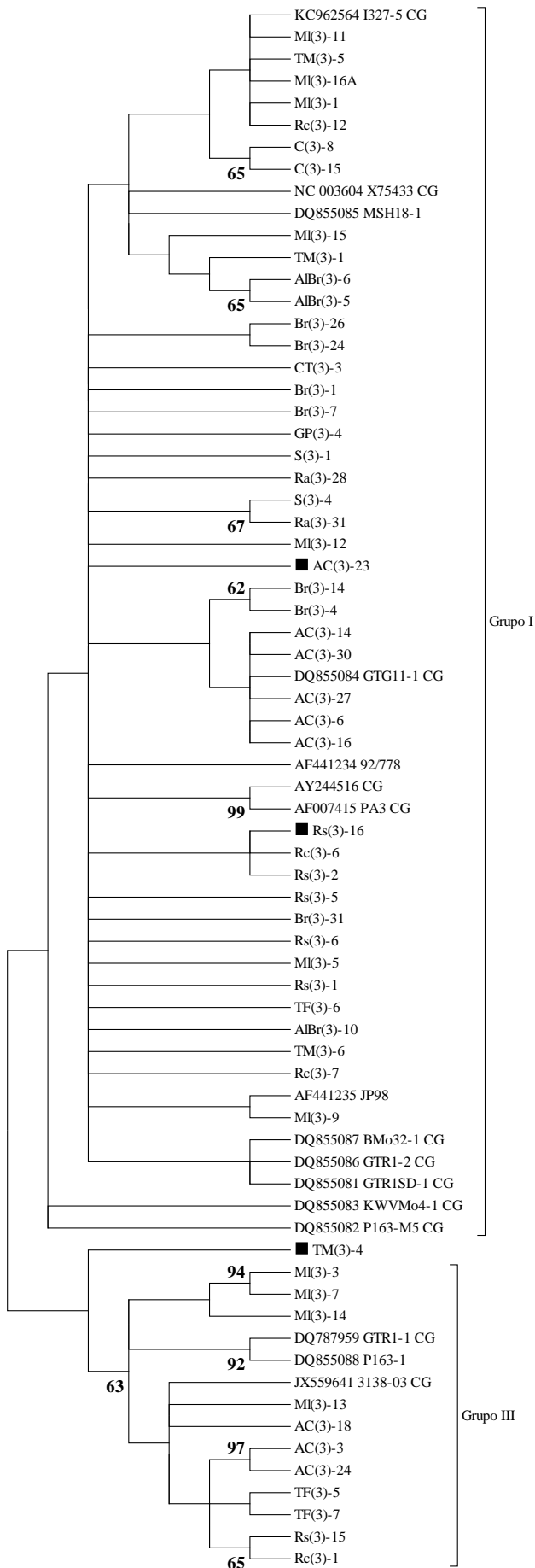


Figura 4.7: Dendrograma filogenético das sequências de aminoácidos do gene da proteína p10 de *GVA*, deduzidas das sequências nucleotídicas. O alinhamento foi feito no programa BioEdit e a árvore filogenética no programa MEGA 6, utilizando o método Maximum Likelihood (ML), com 1000 replicados para determinar o valor de bootstrap. As sequências recombinantes estão marcadas por (■).

4.1.3.2 Motivos proteicos

Na figura 4.8 temos representados os motivos proteicos encontrados na sequência NC003604 presente em GenBank, a partir do programa ScanProsite. Verificou-se que esta sequência detém cinco locais de fosforilação. Encontrou-se dois locais de fosforilação da proteína quinase C, um da tirosina quinase e dois de fosforilação da caseína quinase II. Como referido no capítulo 1, a proteína p10 de *GVA* é considerada homóloga de proteínas de ligação a ácidos nucleicos e carrega dois domínios funcionais, um rico em arginina (ARM) e um domínio “zinc-finger”, representados pela caixa a preto e roxa, respetivamente, da figura 4.9. Estes motivos e domínios foram procurados no alinhamento com todas as sequências analisadas neste trabalho. Foi verificado que os domínios ARM e *zinc-finger* são comuns a todas as variantes sob análise. Em relação aos 5 locais de fosforilação, observa-se que os da proteína quinase C não são conservados.

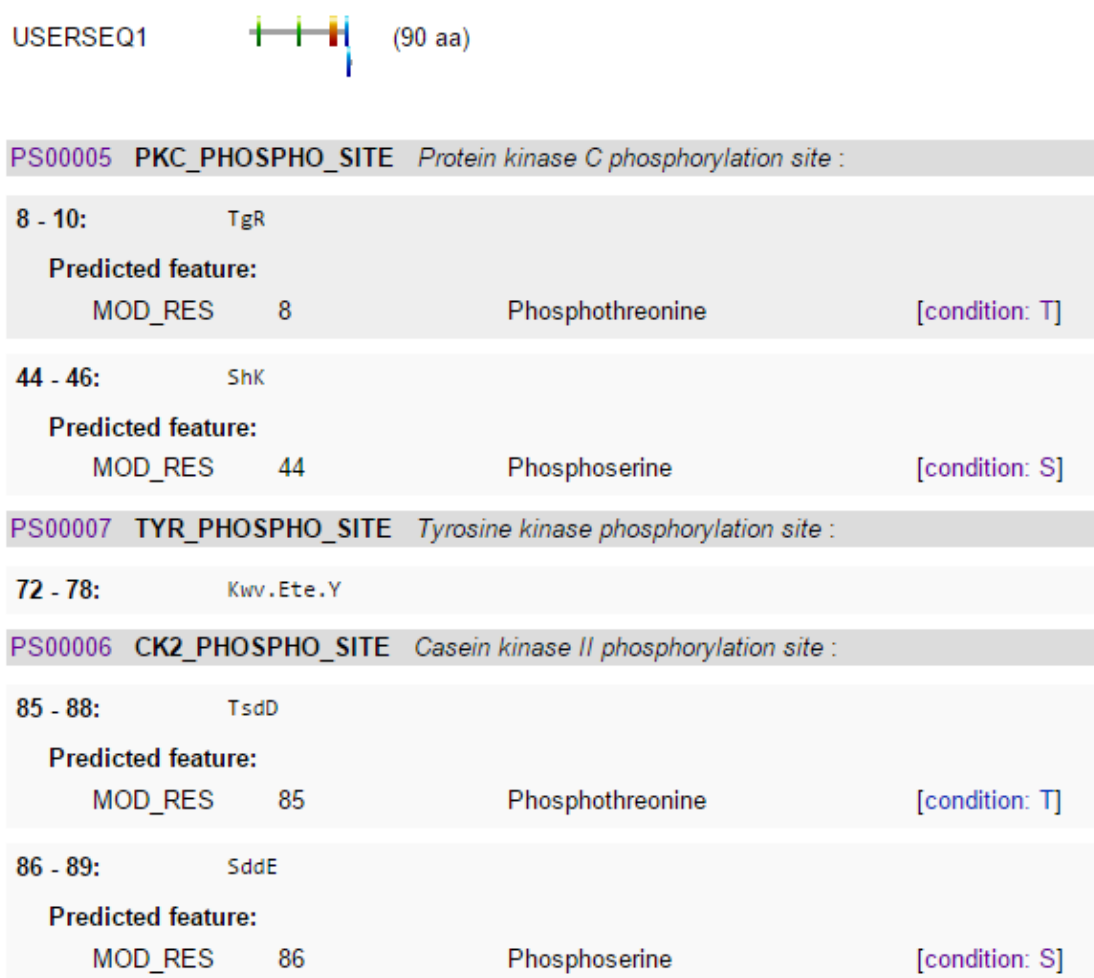


Figura 4.8: Representação dos cinco motivos proteicos obtidos no programa ScanProsite, para a sequência de aminoácidos deduzida da sequência nucleotídica da ORF 5 de NC003604 para *Grapevine virus A*.

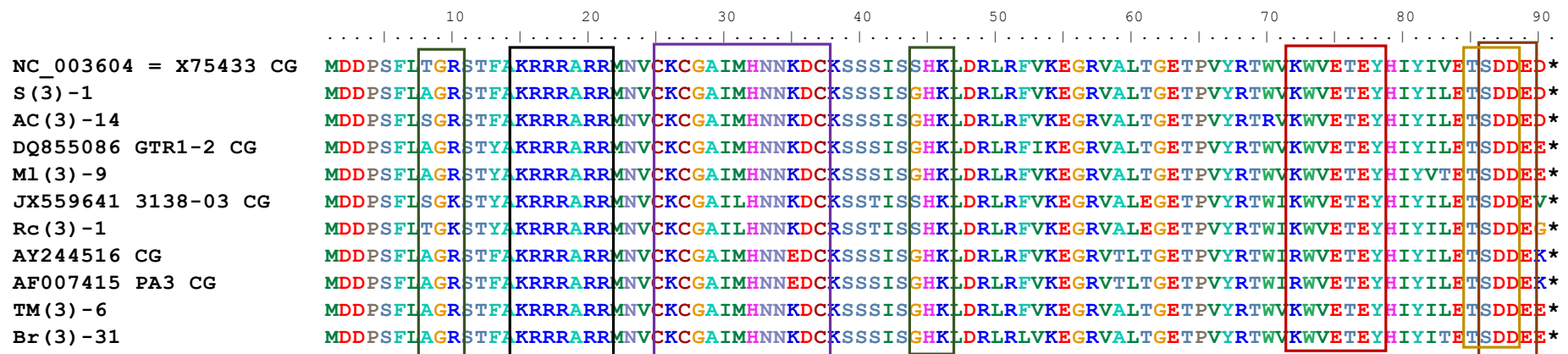


Figura 4.9: Representação gráfica do alinhamento da ORF 5 de *GVA*. Estão representadas 11 seqüências de aminoácidos, das quais cinco se encontram na base de dados GenBank [NC003604 (Grupo I^a), DQ855086 (anterior grupo II, Sub Grupo 1A^a), JX559641 (Grupo III^a), AY244516 e AF007415 (anterior grupo IV, Sub Grupo 1B^a)]. As restantes 6 seqüências foram deduzidas a partir de seqüências nucleotídicas obtidas no laboratório [S(3)-1 e AC(3)-14 (Grupo I^a), Ml(3)-9 (anterior grupo II, Sub Grupo 1A^a), Rc(3)-1 (Grupo III^a), TM(3)-6 e Br(3)-31 (Sub Grupo 1C^a)]. A verde escuro encontra-se os locais de fosforilação da proteína quinase C, com um padrão consenso [ST]-x-[RK], entre os aminoácidos 8 e 10, e entre os aminoácidos 44 e 46; a preto encontra-se o motivo rico em argininas (ARM), entre os aminoácidos 10 e 15; a roxo, o motivo zinc-finger, de padrão consenso C-x-C-x(4)-H-x(4)-C, encontrado entre os aminoácidos 25 e 37; A vermelho escuro temos o motivo de fosforilação da tirosina quinase, com um padrão consenso [RK]-x(2)-[DE]-x(3)-Yor[RK]-x(3)-[DE]-x(2)-Y (Y é o local de fosforilação), entre o aminoácido 72 e o aminoácido 78. A castanho e a dourado temos os dois motivos de fosforilação da caseína quinase II, [ST]-x(2)-[DE], entre os aminoácidos 85 e 88, e entre os aminoácidos 86 e 89. x representa qualquer aminoácido.

^aGrupos filogenéticos definidos com base na figura 4.2.

4.1.4 Pressão evolutiva

Os valores de pressão seletiva evidenciados pelas ORF 4 e ORF 5, foram obtidos no através de DataMonkey. Na ORF 4 foram encontrados 145 locais negativamente selecionados, enquanto na ORF 5 foram encontrados 39 locais negativamente selecionados e um positivamente selecionado. (tabela 4.6).

Os valores dN/dS determinados para cada região genómica indicam que ambas as ORF 4 e 5 estão sujeitas a seleção purificante, embora esse efeito seja mais forte na região codante da proteína da cápside.

4.1.5 Aperfeiçoamento da detecção de GVA

Na figura 4.10 estão representados os *primers* de detecção de GVA. A partir do alinhamento das sequências completas de GVA disponíveis na base de dados GenBank e das sequências nucleotídicas obtidas, procuraram-se zonas conservadas no alinhamento e procedeu-se ao desenho de um novo par de *primers* para GVA. Procurou-se que o tamanho do fragmento de detecção tivesse um tamanho mais pequeno do que os fragmentos já obtidos, de forma a facilitar a amplificação e detecção deste Vitivírus. Este par de *primers*, par 3 da tabela 1.1, amplifica sequências com 654 pares de bases. Os resultados de amplificação com o *primer* de detecção de GVA encontram-se na tabela 4.1.

Na figura 4.10, temos o resultado de uma eletroforese, que mostra a amplificação de nove isolados positivos para GVA, com o *primer* da detecção. Todos os isolados obtiveram banda de amplificação forte, exceto no caso da posição 5, em que o isolado TNM(3) apresentou um sinal de amplificação muito baixo.

Na figura 4.11 está ilustrado um alinhamento de GVA contendo parte da MP à região 3'-UTR, para mostrar a posição relativa dos *primers* de detecção de GVA.

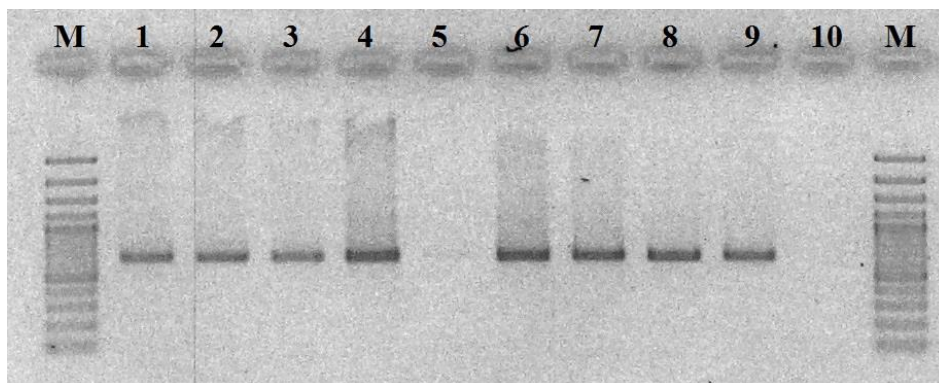


Figura 4.10: Resultado do teste *primers* de detecção de GVA de detecção (gel de agarose 1,5% em TAE (1X) com EtBr). Legenda: 1 – TPS(3), 2 – Rb(3), 3 – TdG(3), 4 – MT(3), 5 – TNM(3), 6 – TT(3), 7 – Cv(3), 8 – PF(3), 9 – C(3), 10 – controlo negativo do PCR.

Tabela 4.6: Valores de Pressão Seletiva estimados nos genes da CP (ORF 4) e da ORF 5 em isolados de *Grapevine virus A (GVA)*.

Região codante ^a	Pressão Seletiva ^b							
	dN/dS ^c		Positiva		Negativa		Neutra	
	Log (L)	Médio	N	%	N	%	N	%
ORF 4 - CP	-9699.21	0.064	0	0	145	73.2	53	26.8
ORF 5 – p10	-2278.80	0.142	1	1.1	39	43.3	50	55.6

^a Os dados foram representados por 198 e 90 códons para as regiões codantes da CP e ORF 5, respectivamente.

^b Locais positiva e negativamente selecionados foram identificados por três métodos de pressão seletiva: single-likelihood ancestor counting (SLAC), fixed-effects likelihood (FEL), e internal fixed-effects likelihood (IFEL). O SLAC é um método de contagem, enquanto o FEL e IFEL são métodos de probabilidade.

^c Valores normalizados do rácio de substituições não sinónimas por local não sinónimo (dN) e substituições sinónimas por local sinónimo (dS), divididos pelo tamanho apropriado da árvore, dão uma medida de pressão seletiva. Valores dN/dS normalizados < 1 indicam seleção negativa ou purificação, valores dN/dS normalizados = 1 sugerem seleção neutra e valores dN/dS normalizados > 1 indicam seleção positiva para cada conjunto de dados de genes específicos.

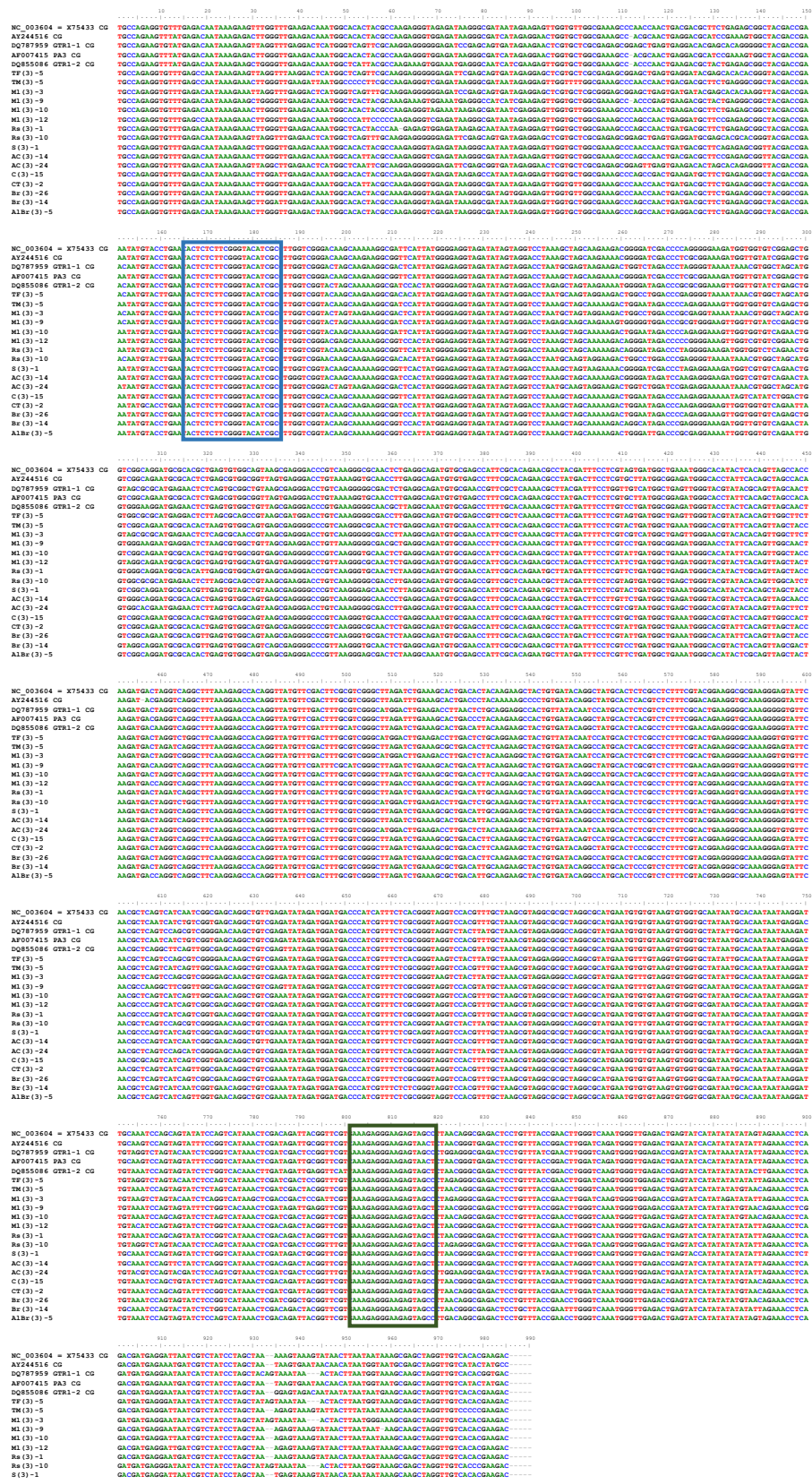


Figura 4.11: Ilustração da posição dos primers de detecção de GVA. Alinhamento feito no programa BioEdit (CrystalW). A caixa azul indica o primer forward e a caixa verde mostra o primer reverse.

4.2. Discussão

4.2.1 Variabilidade genética de GVA

A existência de falsos negativos, como é o caso das sequências obtidas para GP(3) e S(3) é dada pela grande variabilidade descrita para GVA, principalmente na região da proteína da cápside (CP), alvo dos anticorpos comerciais do teste DAS-ELISA (Saldarelli *et al.*, 2005; Goszczyński, 2014).

As variantes nucleotídicas obtidas neste trabalho, foram alinhadas com sequências homólogas completas presentes na base de dados GenBank (AY244516, AF007415, DQ855086, AF441235, DQ855083, DQ855082, DQ855081, DQ855087, DQ855085, NC003604, KC962564, DQ855084, AF441234, JX559641, DQ787959, DQ855088). O dendrograma da figura 4.3 mostra a existência de dois grupos filogenéticos principais - grupos I e III. Dentro do grupo I estão incluídos os anteriormente designados grupos II e IV (Alabi, *et al.*, 2014), que foram designados subgrupo 1A e 1B, respectivamente, neste trabalho. O grupo formado por isolados portugueses Rs, Rc, Br, TF e TM foi considerado um subgrupo ao mesmo nível que os subgrupos anteriores, e foi assim nomeado subgrupo 1C. Murolo *et al.* (2008) já tinham sugerido a existência de três grupos filogenéticos, e dentro do designado grupo I classificaram dois sub grupos. Goszczyński (2014) considerou a existência de três grupos filogenéticos. De acordo com os resultados da análise filogenética feita no presente estado, observa-se que, ao mesmo tempo nível de agrupamento do grupo III, se encontra o aqui designado grupo I com um valor de bootstrap de 86%. Este grupo inclui os anteriores grupos II e IV e grande parte das sequências dos isolados portugueses. Não obstante, verifica-se a existência de subgrupos de variantes que correspondem aos anteriores grupos II e IV, e ao novo subgrupo 1C composto completamente por variantes dos isolados portugueses.

As sequências com sinal de recombinação foram caracterizadas na tabela 4.2. Três das variantes obtidas neste trabalho apresentaram sinal de recombinação, sendo os seus major e minor parents também sequências obtidas neste trabalho, seja do mesmo isolado ou de isolados diferentes. Estudos anteriores tinham já identificado eventos de recombinação na base da grande diversidade encontrada neste vírus, nomeadamente que as sequências virais incluídas no filogruppo III teriam uma elevada propensão à recombinação quando comparadas com outros grupos (Alabi *et al.*, 2014).

Com a informação obtida das variantes portuguesas, verifica-se uma grande incidência de variantes no grupo I nas cistas portuguesas. Observa-se no entanto que é frequente a mistura de variantes, dos dois grupos filogenéticos considerados, no mesmo isolado,

como é o caso dos isolados Rs(3), Rc(3), MI(3), AC(3) e TF(3). Esta situação não deverá ser frequente ou não ter sido ainda detetada por outros autores, uma vez que não se encontrou na literatura qualquer referência sobre este tipo de observação.

4.2.2. Proteína da cápside

A proteína da cápside (CP) tem sido agrupada em três grupos filogenéticos distintos (Wang *et al.*, 2011; Goszczynski e Habili, 2012). Há ainda informação publicada recentemente sobre a existência de quatro grupos filogenéticos para a CP (Alabi *et al.*, 2014), mas os nossos resultados indicam uma organização filogenética em dois grupos distintos – grupos I e III. Dentro do grupo I encontramos ainda três subgrupos (1A, 1B e 1C). Da dedução das sequências de aminoácidos a partir das sequências nucleótídicas, continuamos a ter os grupos I e III, mas as relações evolutivas das sequências que faziam parte dos subgrupos 1B e 1C, deixam de ser claras, pelo que considerou-se apenas o subgrupo 1A. A evidência obtida para a região codante da CP dá suporte à referência filogenética anteriormente considerada de agrupamento em duas grandes linhagens das variantes deste vírus.

4.2.3. ORF 5 – p10

As sequências nucleótídicas da ORF 5 encontram-se agrupadas em dois grupos filogenéticos distintos, designados grupos I e III e cujas variantes são as mesmas que integram os grupos I e III já discutidos.

Em 2003, Galiakparov e os seus colegas mostraram que as sequências de aminoácidos carregavam dois domínios proteicos – um motivo rico em argininas (ARM; KRRRARR) e um motivo zinc-finger [C-X-C-X(4)-H-X(4)-C]. Estes motivos são encontrados e são conservados em todas as sequências (figura 4.8 a preto e roxo, respetivamente), incluindo as obtidas neste trabalho. Estes motivos foram implicados na função da proteína enquanto RNA-binding protein, e na sua acção durante o processo infeccioso, com efeito de supressor do sistema de silenciamento da planta (Zhou *et al.*, 2006).

Na análise feita no presente estudo, foram observados também cinco locais de fosforilação tendo como por base a sequência NC003604. Os motivos de fosforilação incluem, dois locais de fosforilação da proteína quinase C (uma fosfotreonina e uma fosfoserina), um da tirosina quinase e dois da caseína quinase II (uma fosfotreonina e uma

fosfoserina). No entanto os dois primeiros não são conservados no conjunto de variantes em análise.

O motivo da proteína quinase C têm preferência pela fosforilação do resíduo serina ou do resíduo treonina localizados perto de um resíduo básico da zona C-terminal (Kishimoto *et al.*, 1985; Woodget *et al.*, 1986). Este motivo só está presente na sequência analisada e numa variante portuguesa [Rc(3)-1] pertencente ao grupo III (figura 4.2), entre a posição 8 e 10. Na posição 44 voltamos a ter este motivo, e as sequências que o apresentam são a NC003604, JX559641 e Rc(3)-1, estas últimas pertencentes ao grupo III (figura 4.2).

Os substratos de proteínas tirosina quinases são geralmente caracterizados por uma lisina ou por sete resíduos de arginina para o local N-terminas da tirosina fosforilada. Um resíduo ácido (ácido aspártico ou glutâmico) é frequentemente encontrado em ambos três ou quatro resíduos do local N-terminal da tirosina (Hunter, 1982; Patschinsky *et al.*, 1982; Cooper *et al.*, 1984). Há uma série de exceções a esta regra, tal como os locais de fosforilação de tirosina de enolase e lipocortina II. Este local de fosforilação está presente em todas as sequências do alinhamento representado na figura 4.8, entre a posição 72 e 78, podendo dizer-se que é um motivo conservado.

A caseína kinase II (CK-2) é uma proteína quinase serina/treonina cuja atividade é independente de nucleótidos cíclicos e cálcio. CK-2 fosforila diferentes proteínas (Towler *et al.*, 1988; Grand *et al.*, 1989). Este motivo, tal como o anterior, encontra-se conservado em ambas as posições e em todas as sequências representadas na figura 4.8.

4.2.4. Aperfeiçoamento da deteção de GVA

Neste estudo obteve-se um elevado número de sequências das variantes portuguesas, mostrando a diversidade das castas portuguesas. O DAS-ELISA era uma técnica de deteção melhor que o RT-PCR, porque os primers encontrados na literatura não amplificavam grande parte dos isolados portugueses. As sequências obtidas permitiram o desenho de um par de primers que possibilitou a deteção de um maior número de isolados, melhorando a deteção deste vírus com o RT-PCR, quando comparado com o DAS-ELISA.

4.3. Referências Bibliográficas

- Alabi, O.J.,** Rwahnih, M.A., Mekuria, T.A. e Naidu, R.A. (2014) Genetic diversity of *Grapevine virus A* in Washington and California vineyards. *Virology*. 548 – 560.
- Cooper, J.A.,** Esch, F.S., Taylor, S.S. e Hunter T. (1984). Phosphorylation sites in enolase and lactate dehydrogenase utilized by tyrosine protein kinases in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* **259**:7835-7841.
- Grand, R.J.A.** (1989). Acylation of viral and eukaryotic proteins. *Biochem. J.*, **258**: 625-638.
- Goszczynski, D.E.** e Habili, N. (2012). *Grapevine virus A* variants of group II associated with Shiraz disease in South Africa are present in plants affected by Australian Shiraz disease, and have also been detected in the USA. *Plant Pathology*. **61**:1, 205-214.
- Goszczynski, D.E.** (2014). Complete genome sequence of a natural mutante of *Grapevine virus A* (GVA). *Arch Virol*. **159**: 2523-2528.
- Hunter, T.** (1982). Synthetic peptide substrates for a tyrosine protein kinase. *J. Biol. Chem.* **257**:4843-4848.
- Kishimoto, A.,** Nishiyama K., Nakanishi H., Uratsuji Y., Nomura H., Takeyama Y., Nishizuka Y. (1985). Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **260**:12492-12499.
- Murolo, S., Romanazzi, G., Rowhani, A., Minafra, A., La Notte, P., Branzanti, M., Savino, V., 2007. Genetic variability and population structure of *Grapevine virus A* coat protein gene from naturally infected Italian vines. *Euro. J. Plant Pathol.* 120, 137-145.
- Patschinsky, T.,** Hunter, T., Esch, F.S., Cooper, J.A. e Sefton, B.M. (1982). Analysis of the sequence of amino acids surrounding sites of tyrosine phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**: 973-977.
- Saldarelli, P.,** Keller, H., Dell'Orco, M., Schots, A., Elicio, V. e Minafra, A. (2005). Isolation of recombinante antibodies (scFvs) to *Grapevine virus B*. *Elsevier. Journal of Virological Methods*. **124**: 191-195.
- Towler, D.A.,** Gordon J.I., Adams S.P., Glaser L. (1988). The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Annu. Rev. Biochem.* **57**:69-99.
- Wang, Z,** Hong N, Liu Y, Xu W, Wang G. (2011) Genetic variability and population structure of *Grapevine virus A* in China based on the analysis of its coat protein gene. *Can J Plant Pathol.* **33**:227 – 233.
- Woodget, J.R.,** Gould K.L., Hunter T. (1986). *Eur. J. Biochem.* **161**:177-184.
- Zhou, Z.S.,** Dell'Orco, M., Saldarelli, P., Turturo, C., Minafra, A. e Martelli, G.P. (2006) Identification of RNA-silencing supressor in the genome of *Grapevine virus A*. *Journal of General Virology*. **87**: 2387 – 2395.

5.1 Resultados

5.1.1 Caracterização de variabilidade genética

Com base na informação presente na base de dados GenBank e em artigos científicos sobre *Grapevine virus B*, desenhou-se um par de *primers* que permitiu amplificar sequências nucleotídicas, compreendendo as sequências codantes da proteína da cápside, da p10 e ainda a sequência 3'-UTR, com um tamanho de 1147 pares de bases. De acordo com lista de amostras cedida pelos técnicos do INIAV, foram escolhidos dezassete isolados positivos para *GVB* por ELISA (Tabela 5.1.) para testar os *primers* desenhados. Dos isolados constantes desta lista, obtiveram-se sequências de 4 isolados, que apresentaram sinal de amplificação com o par de *primers GVB*, três dos quais estão representados na figura 5.1. Em cima, a amostra 8 [isolado TdC(3)] mostrou um fragmento de amplificação de tamanho esperado e em baixo, as amostras 2 [isolado Cp(3)] e 8 [isolado Bs(2)].

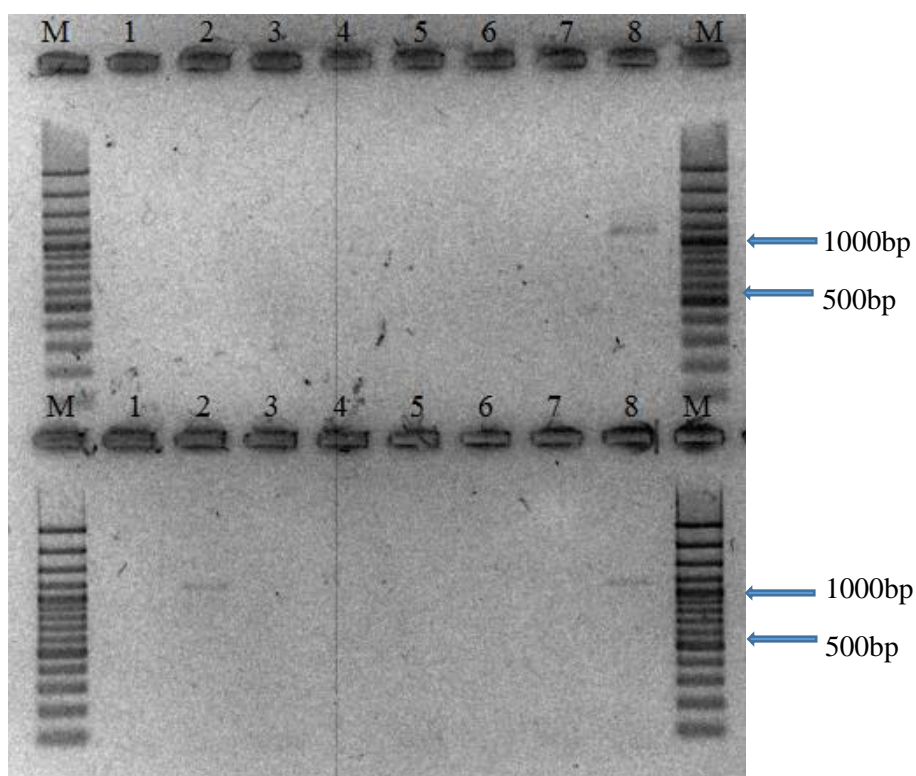


Figura 5.1: Amostras testadas com *primers* de *GVB* (gel de agarose 1,5% em TAE (1X) com EtBr). Legenda em cima: M – Marcador Gene Ruler (100 bp Plus, Life Technologies), 1 – Cr(3), 2 – Ai(3), 3 – BdA(3), 4 – TM(3), 5 – MF(3), 6 – GP(3), 7 – S(3), 8 – TdC(3); em baixo: M - Marcador Gene Ruler (100 bp Plus, Life Technologies), 1 – Se(3), 2 – Cp(3), 3 – Ca(3), 4 – CT(3), 5 – Mo(3), 6 – Ra(3), 7 – Br(3), 8 – Bs(3).

De forma a averiguar a possível existência de falsos negativos no teste DAS-ELISA, procedeu-se à verificação deste par de *primers* noutros isolados, nomeadamente em isolados positivos para *GVA* em DAS-ELISA (27 isolados), indicados na tabela 5.1. Para

estes isolados não havia informação de testes em DAS-ELISA com anticorpos para *GVB* ou havia informação de serem negativos para este *Vitivirus*. Desta amplificação obtiveram-se fragmentos com o tamanho esperado em dois dos isolados.

Após obtenção de sinal de amplificação, e como descrito no Capítulo 3, o produto de PCR de cada isolado foi clonado e os clones sequenciados após seleção através da análise de single-strand conformation polymorphism (SSCP). A figura 5.2. representa o resultado parcial da análise SSCP da amostra TdC(3), onde se indicam seis padrões. Para cada isolado, clones evidenciando diferentes padrões de SSCP foram selecionados para sequenciação comercial (STABVIDA, Caparica, Portugal).

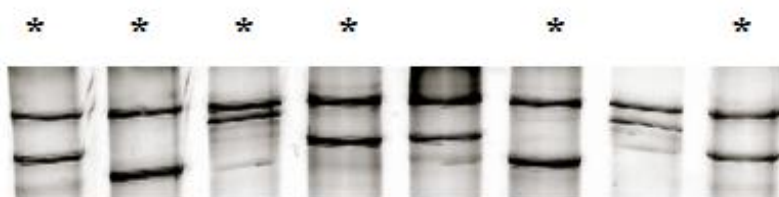


Figura 5.2: Exemplo de uma análise Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) para variantes de *GVB* presentes no isolado TdC(3).

* assinala clones de padrão diferente.

As sequências obtidas foram visualizados (BioEdit) e alinhadas (ClustalW) com sequências homólogas disponíveis em GenBank. Da base de dados GenBank foram usadas somente sequências genómicas completas das diferentes variantes conhecidas de *GVB*. Sequências repetidas dentro de um mesmo isolado, foram retiradas dos alinhamentos. Para verificar a ocorrência de eventos de recombinação utilizou-se o software RDP4. Verificou-se que uma das sequências genómicas completas de *GVB*, KM232952 disponível em GenBank, apresentou sinal de recombinação em sete métodos utilizados pelo RDP4, como é possível verificar na tabela 5.2.

Na figura 5.3 está ilustrado o gráfico das relações da sequência recombinante com as sequências que lhe deram origem (minor e major parents).

Tendo em conta a sequência recombinante, procedeu-se à geração de dendrogramas filogenéticos, com base nas sequências obtidas neste trabalho e nas sequências presentes na base de dados GenBank. A figura 5.4. ilustra as relações filogenéticas detetadas. Pode observar-se que as 24 sequências, compreendendo o gene da CP, da p10 e a região 3'-UTR, das quais 18 obtidas neste trabalho, se agrupam em três grupos filogenéticos

Tabela 5.1: Resultados de DAS-ELISA para os diferentes isolados (informação cedida pelos técnicos do INIAV) e resultados de amplificação obtidos com os *primers GVB*¹ e *GVB* detecção².

Variedade	Identificação do isolado	DAS-ELISA		<i>GVB</i> ¹	<i>GVB</i> detecção ²
		<i>GVA</i>	<i>GVB</i>		
Alvarelhão Ceitão	AC(3)	+	-	-	-
Donago	Dn(4)	+	-	-	-
Zinfandel	Zf(3)	+	-	-	-
Tinta de Porto Santo	TPS(2)	+	-	-	-
Cristalino	Cr(3)	+	+	-	+
Aramis	Ar(3)	+	-	-	-
Airén	Ai(3)	-	+	-	+
Bandeirante	Bd(3)	+	-	-	-
Tinta Ferreira	TF(3)	+	-	-	-
Ribatejana	Rb(7)	+	-	-	-
Tinta da Graciosa	TdG(3)	+	-	-	-
Tinto Velasco	TV(3)	+	-	-	-
Boal das Abelhas	BdA(3)	+	+	-	+
Tinta Martins	TM(3)	+	+	-	+
Português-Azul	PA(3)	+	-	-	-

Tabela 5.1 Continuação

Variedade / Isolado	Identificação do isolado	DAS-ELISA		<i>GVB</i> ¹	<i>GVB</i> deteção ²
		<i>GVA</i>	<i>GVB</i>		
Malandra	MI(3)	+	-	-	+
Malvasia Fina	MF(3)	+	+	-	+
Tinta Lameira	TL(3)	+	-	-	-
Roseira	Rs(3)	+	-	-	-
Lourela	LI(3)	+	-	-	-
Gonçalo-Pires	GP(3)	-	+	-	+
Sousão	S (3)	-	+	-	+
Varejoa	Vr(3)	+	-	-	-
Malvasia Trigueira	MT(3)	+	-	+	+
Tinta Engomada	TE(3)	+	-	-	-
Caramela	Ca(3)	+	+	-	+
Ricoca	Rc(3)	+	-	+	+
Bovale de Spagna	BS(3)	+	-	-	-
Garnacha Roja	GR(3)	+	-	-	-
Bastardo-Tinto	BT(3)	+	-	-	-

Tabela 5.1 Conclusão

Variedade / Isolado	Identificação do isolado	DAS-ELISA		<i>GVB</i> ¹	<i>GVB</i> detecção ²
		<i>GVA</i>	<i>GVB</i>		
Alvarelhão Branco	AB(3)		+	+	+
Tinta Negra Mole	TNM(2)	+	-	-	-
Tinta-Tabuaço	TT(3)	+	-	-	-
Tinta de Cidadelhe	TdC(3)	-	+	+	+
Corropio	Cp(3)	-	+	+	+
Carrega-Tinto	CT(3)		+	-	+
Corvo	Cv(3)	+	-	-	-
Monvedro	Mo(3)		+	-	+
Pau Ferro	PF(3)	+		-	-
Ramisco	Ra(3)		+	-	+
Brancelho	Br(3)		+	-	+
Bastardo	Bs(3)		+	+	+
Cot	C(3)	+	-	-	-

¹ *Primer GVB*: Par 4 da tabela 1.1 do capítulo 3 (Materiais e Métodos)

² *Primer GVB* detecção: Par 5 da tabela 1.1 do capítulo 3 (Materiais e Métodos)

Tabela 5.2: Eventos putativos de recombinação intragénica envolvendo sequências de *GVB* analisadas neste trabalho.

CP-3'UTR ^b												
Evento ^a	Breakpoint		Sequência Recombinante	Sequências na Recombinação		Método (Av. P-val.) ^c						
	Índice	Fim		Major	Minor	R	G	B	M	C	S	3Seq
1	910	1089	KM232952	U(Bs(3)-48) - GII	TdC(3)-2 (96.6%) GII	6.029x10 ⁻⁰⁶	5.116x10 ⁻⁰⁴	9.426x10 ⁻⁰⁴	1.981x10 ⁻⁰⁴	6.989x10 ⁻⁰⁴	8.137x10 ⁻⁰⁶	8.176x10 ⁻⁰³

^a Eventos de recombinação são suportados por pelo menos 4 dos diferentes métodos implementados no software RDP4 vr 4.39 (Martin, 2009). A probabilidade suportada por cada método é mostrada. A numeração dos nucleótidos de breakpoints corresponde a posições nos respetivos alinhamentos de sequências.

^b CP-3'UTR: complete ORF4 and ORF5 and 3'UTR

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

U - Desconhecido

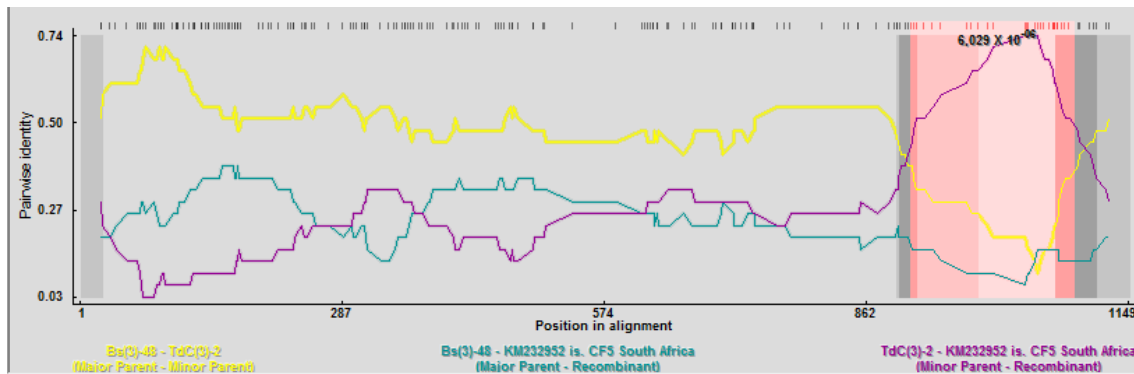


Figura 5.3: Relação de identidade parcial entre a sequência recombinante (KM232952) e os major parent [Bs(3)-48] e minor parent [TdC(3)-2].

distintos. Todas as variantes obtidas dos isolados AB(3), TdC(3) e Rs(3) se inserem no grupo designado neste trabalho como Grupo I, juntamente com as sequências EF583906 e GU733707 de GenBank, com um valor de bootstrap de 74%. A sequência JX513897 agrupa com todas as sequências obtidas dos isolados Bs(3), Cp(3) e TdC(3), no grupo aqui designado por Grupo II. As sequências NC003602 e KJ524452 formam o grupo III. A posição da sequência KM232952 não ficou resolvida em nenhum dos grupos considerados. De facto esta sequência situa-se perto, embora fora do grupo II, de acordo com o sinal de recombinação detetado.

Nenhum dos isolados das castas portuguesas mostrou ser composto por variantes de diferentes grupos filogenéticos. De um modo geral, verificou-se a existência de subgrupos dentro de cada um dos grupos principais já inferidos, formados por sequências dum mesmo isolado.

A tabela 5.3 mostra as estimativas de divergência evolutiva média (d) entre pares de sequências dentro dos grupos filogenéticos considerados na figura 5.4. O grupo I apresenta o valor mais baixo, enquanto o grupo III, com o menor número de sequências, apresenta o valor mais elevado. Os valores de segregação têm uma contagem alta em todos os filogrupos. Os polimorfismos nucleotídicos nos filogrupos determinados para cada região foram avaliados pelo teste estatístico Tajima D (Tajima, 1989). Este teste é um dos mais utilizados para deteção de seleção usando polimorfismos de sequências nucleotídicas. Uma estatística D negativa é aceite como indicando uma seleção purificante e fixação alélica conduzida por seleção natural, enquanto uma estatística D positiva indica uma seleção balanceadora. Embora os grupos I e II apresentem valores estatísticos D negativos e o grupo das sequências totais apresenta um valor estatístico D

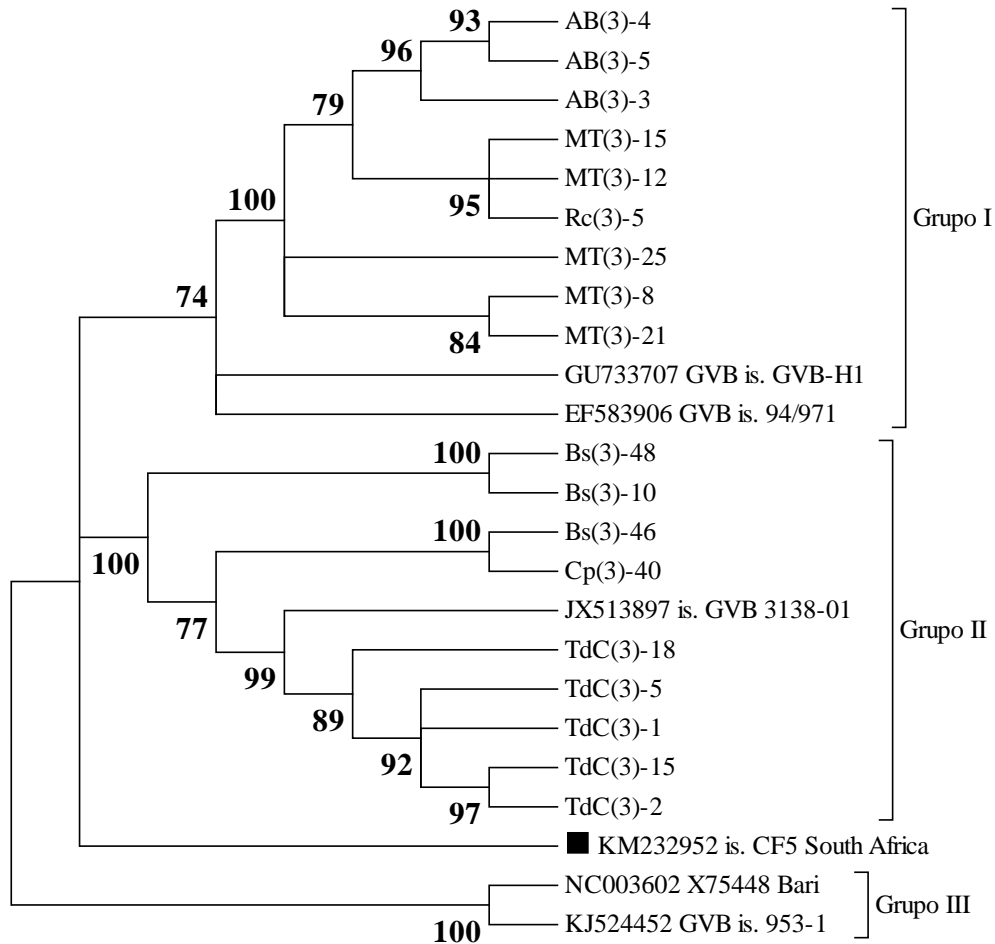


Figura 5.4: Análise filogenética das sequências nucleotídicas compreendendo as ORFs 4 e 5, e a região 3'-UTR de *GVB*. As sequências GU733707, EF583906, JX513897, KM232952, NC003602 e KJ524452, estão disponíveis em GenBank. As restantes sequências foram obtidas neste trabalho. (■) assinala a sequência recombinante. As sequências foram analisadas no programa BioEdit e o dendrograma contruído no programa MEGA 6 (Maximum Likelihood method), com 1000 replicados para determinação do valor de bootstrap.

positivo, os valores não são significativos ($P > 0.1$). O grupo II não contém sequências suficientes para este teste, que requer pelo menos 3 sequências.

A divergência evolutiva média entre os grupos filogenéticos considerados é de 0.177 ± 0.05 entre o grupo I e o grupo III e entre os grupos II e III, e de 0.116 ± 0.02 entre o grupo I e o grupo II. Estes valores são sempre superiores aos valores individuais de cada grupo, o que é mais uma evidência que suporta os grupos considerados neste trabalho.

Tabela 5.3: Estimativas de divergência evolutiva média (d) entre sequências nucleotídicas de *Grapevine virus B*, compreendendo o gene da CP, da p10 e o 3'-UTR. A distância genética e teste de neutralidade dentro de grupos está apresentada.

Filogrupo	Nº de Variantes	d	S	Hd	Tajima's D
Todas	24	0.102±0.010	421	1.000	0.11398ns
Grupo I	11	0.043±0.014	200	1.000	-1.37891ns
Grupo II	10	0.060±0.009	199	1.000	-0.15834ns
Grupo III	2	0.088±0.044	101	1.000	ND

A estatística Tajima D foi utilizada como medida de neutralidade para todas as mutações nas regiões genômicas consideradas, utilizando o programa DnaSP 5.10.11 (Librado e Rozas 2009). O teste D é baseada nas diferenças entre o número de locais segregados e o número médio de diferenças de nucleótidos. O programa DnaSP fornece uma medida da significância do valor de D. Os valores não foram significativos (ns) em todos os casos determinados ($P > 0.1$). ND = não determinado por número insuficiente de sequências.

S corresponde ao número de locais segregantes (polimórficos).

Hd corresponde ao número de haplótipos.

^aFilogrupos estão definidos na figura 5.4.

5.1.2 ORF 4 – Proteína Cápside (CP)

5.1.2.1 Diversidade genética

O alinhamento foi analisado através do software RDP4 para verificar a existência de sinais de recombinação. Apesar da sequência KM232952 ter evidência de recombinação quando as regiões codantes da CP, p10 e a 3'-UTR foram analisadas, nenhum evento de recombinação foi detetado na região codante da CP por pelo menos 4 dos métodos que integram RDP4. A figura 5.5 mostra o dendrograma filogenético obtido para as sequências nucleotídicas da ORF 4 de *Grapevine virus B*. As sequências longas obtidas foram cortadas pelos codões de iniciação e finalização da proteína da cápside (com base na sequência do genoma completo NC003602), e alinhadas. Os três grupos filogenéticos observados, suportados por valores de bootstrap iguais ou superiores a 85% seguem a mesma organização mostrada na figura 5.4. Novamente a posição da sequência KM232952 não fica resolvida neste dendrograma.

Na tabela 5.4 estão representadas as estimativas de divergência evolutiva média (d) entre pares de sequências dentro dos grupos filogenéticos considerados na figura 5.5.

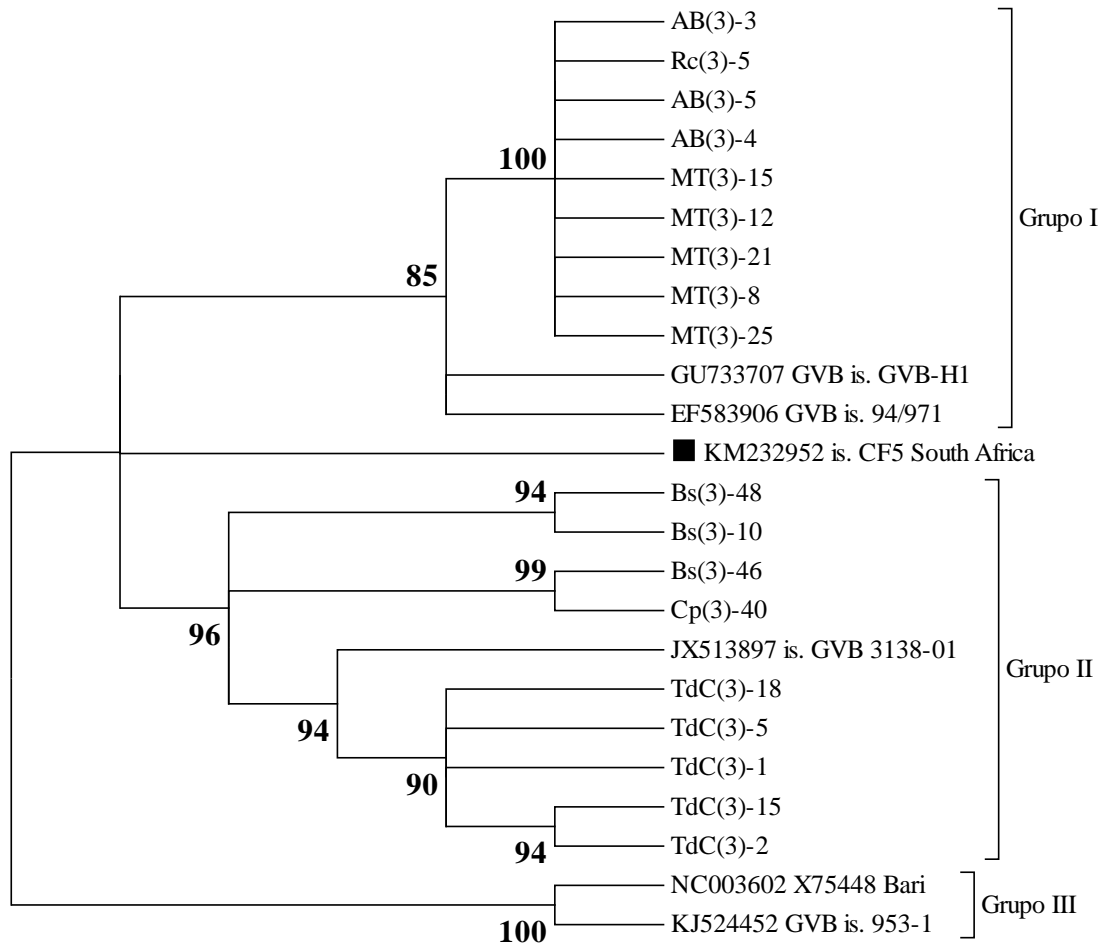


Figura 5.5: Análise filogenética das sequências nucleotídicas do gene da proteína da cápside (CP) de *GVB*. As sequências GU733707, EF583906, JX513897, KM232952, NC003602 e KJ524452, estão disponíveis em GenBank. As restantes sequências foram obtidas neste trabalho. (■) assinala a sequência recombinante da figura 5.4. As sequências foram analisadas no programa BioEdit e o dendrograma construído no programa MEGA 6 (Maximum Likelihood method) com 1000 replicados para determinação do valor de bootstrap.

Novamente, os grupos I e III apresentam, respetivamente, o valor mais baixo e o valor mais elevado. No teste estatístico Tajima D, o grupo I da proteína da cápside apresenta um valor estatístico D negativo, com $0.1 > P > 0.05$, o que sugere um efeito significativo de seleção purificante a conduzir a divergência evolutiva deste grupo de sequências. Os restantes valores estatísticos D são positivos, mas não significativos ($P > 0.1$). O grupo II não apresenta sequências suficientes para este teste.

Tabela 5.4: Estimativas de divergência evolutiva média (d) em sequências nucleotídicas do gene da proteína da cápside de *Grapevine virus B*. A distância genética e teste de neutralidade dentro de grupos está apresentada.

Filogrupo	Nº Variantes	d	S	Hd	Tajima's D
Todos	24	0.116±0.010	213	1.000	0.77273ns
Grupo I	9	0.009±0.001	22	1.000	-1.61860
Grupo II	10	0.064±0.007	98	1.000	0.41347ns
Grupo III	2	0.096±0.048	57	1.000	ND

A estatística Tajima D foi utilizada como medida de neutralidade para todas as mutações nas regiões genômicas consideradas, utilizando o programa DnaSP 5.10.11 (Librado e Rozas 2009). O teste D é baseada nas diferenças entre o número de locais segregados e o número médio de diferenças de nucleótidos. O programa DnaSP fornece uma medida da significância do valor de D. Os valores não foram significativos (ns) em todos os casos determinados ($P > 0.1$). ND = não determinado por número insuficiente de sequências.

S corresponde ao número de locais segregantes (polimórficos).

Hd corresponde à diversidade de haplótipos.

^aFilogrupos estão definidos na figura 5.5.

A divergência evolutiva média entre os grupos filogenéticos considerados é 0.192 ± 0.06 entre o grupo I e o grupo III e entre os grupos II e III, e de 0.140 ± 0.02 entre o grupo I e II. Estes valores são sempre superiores aos valores individuais de cada grupo, o que é mais uma evidência que suporta os grupos considerados neste trabalho.

A figura 5.6 mostra o dendrograma obtido com base nas sequências de aminoácidos deduzidos a partir das sequências nucleotídicas do gene da CP. Verifica-se que os grupos filogenéticos anteriormente estabelecidos com base nas sequências nucleotídicas se mantêm, embora com valores de bootstrap mais baixos.

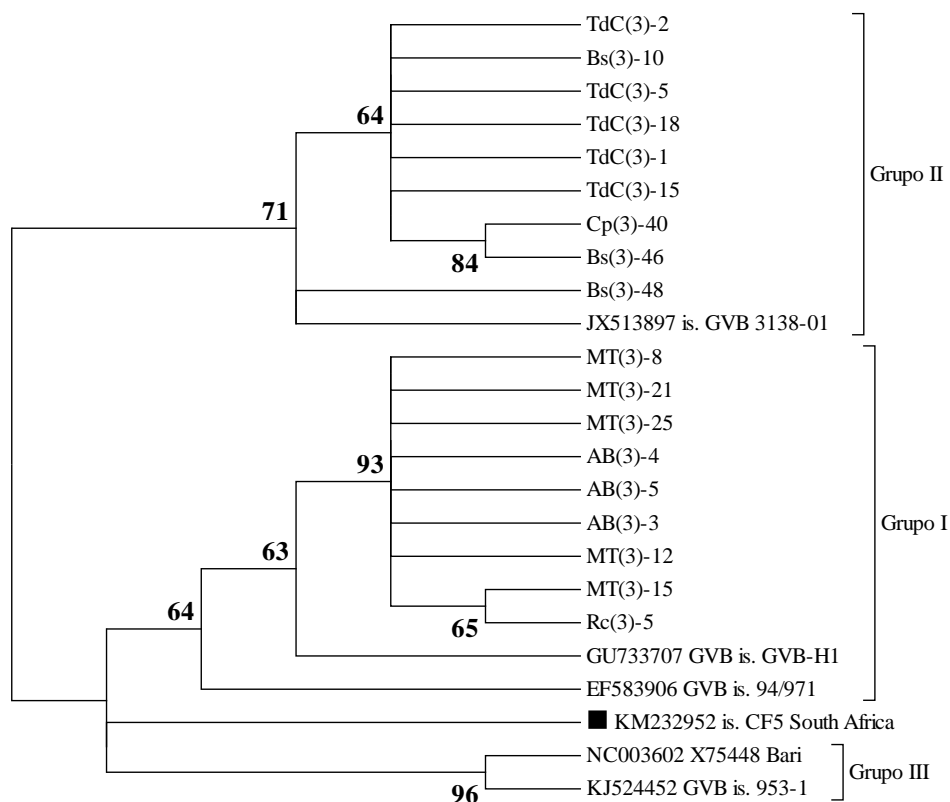


Figura 5.6: Análise filogenética das seqüências de aminoácidos do gene da proteína da cápside (CP) de *GVB*. As seqüências GU733707, EF583906, JX513897, KM232952, NC003602 e KJ524452, estão disponíveis em GenBank. As restantes seqüências foram obtidas neste trabalho. (■) assinala a seqüência recombinante da figura 5.4. As seqüências foram analisadas no programa BioEdit e o dendrograma contruído no programa MEGA 6 (Maximum Likelihood method) com 1000 replicados para determinação do valor de bootstrap.

5.1.3 ORF 5

5.1.3.1 Diversidade genética

Foi feito o alinhamento das seqüências da ORF 5 obtidas neste trabalho com as seqüências homólogas de genoma completo disponíveis em GenBank. Foi verificado através do uso do software RDP4 que nenhuma seqüência nesta região evidencia sinal de recombinação. Seguidamente foi construído o dendrograma apresentado na figura 5.7, que mostra as relações filogenéticas entre seqüências e entre grupos. Verifica-se a existência de 3 grupos filogenéticos, com composição de isolados concordante com os da CP. No caso da ORF 5, a posição das seqüências GU733707 e EF583906 não se encontra resolvida (figura 5.7).

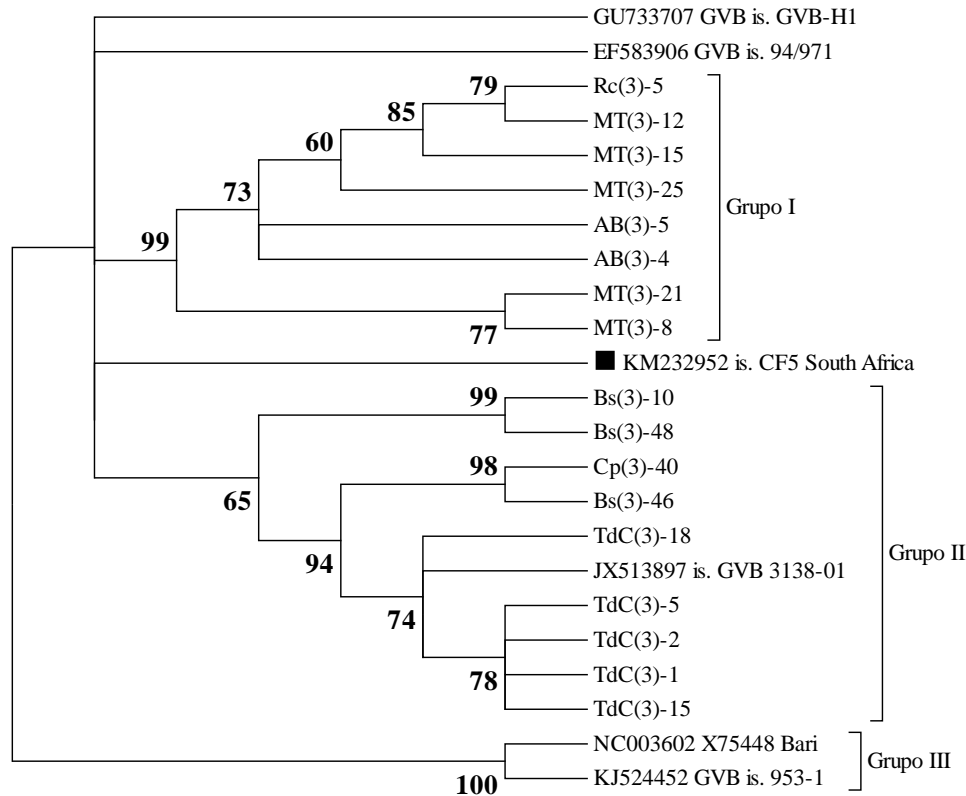


Figura 5.7: Análise filogenética das sequências nucleotídicas do gene da p10 de *GVB*. As sequências GU733707, EF583906, JX513897, KM232952, NC003602 e KJ524452, estão disponíveis em GenBank. As restantes sequências foram obtidas neste trabalho. (■) assinala a sequência recombinante da figura 5.4. As sequências foram analisadas no programa BioEdit e o dendrograma construído no programa MEGA 6 (Maximum Likelihood method) com 1000 replicados para determinação do valor bootstrap.

As sequências de aminoácidos obtidas para a ORF 5 foram deduzidas das sequências nucleotídicas, e o dendrograma construído é mostrado na figura 5.8. A posição das sequências GU733707 e EF583606 continua a não estar resolvida. Embora a sequência KM232952 não tenha sido detetado sinal de recombinação por mais de 4 dos métodos de RDP4 para esta região, a sua posição não fica resolvida em nenhum dos dendrogramas obtidos e é sempre intermédia entre os grupos I e II.

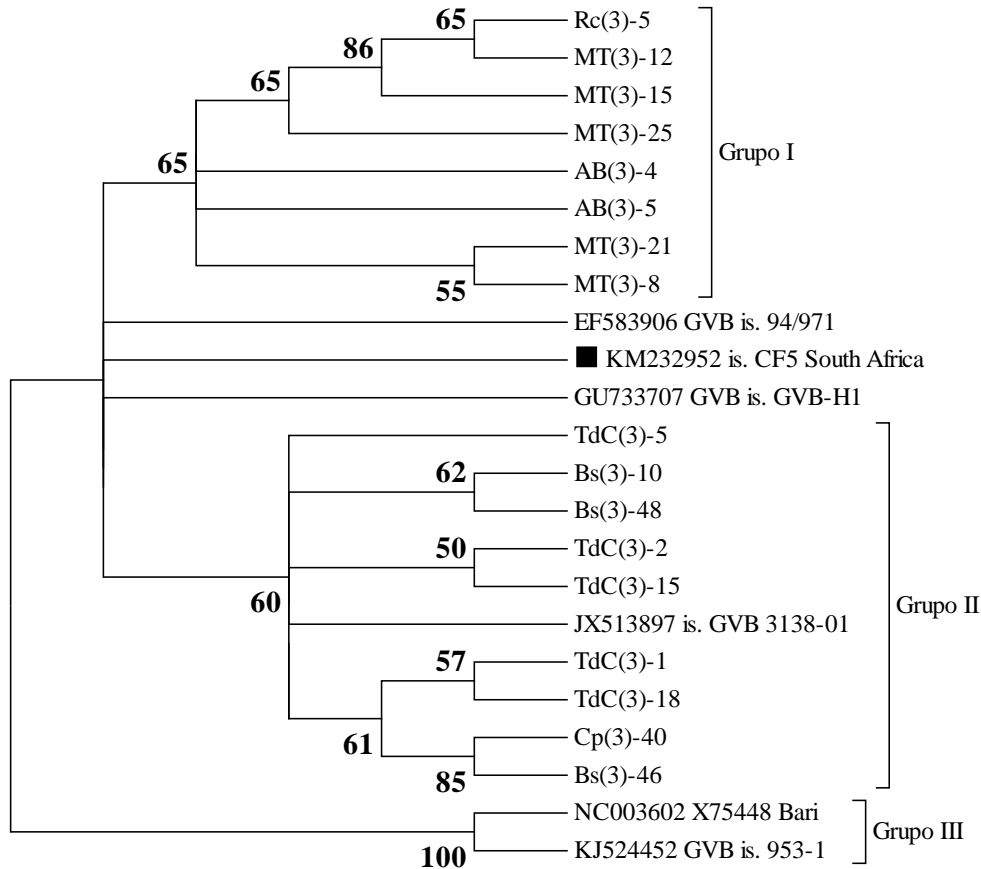


Figura 5.8: Análise filogenética das sequências de aminoácidos do gene da proteína p10 de *GVB*. As sequências GU733707, EF583906, JX513897, KM232952, NC003602 e KJ524452, estão disponíveis em GenBank. As restantes sequências foram obtidas neste trabalho. (■) assinala a sequência recombinante. As sequências foram analisadas no programa BioEdit e o dendrograma contruído no programa MEGA 6 (Maximum Likelihood method) com 1000 replicados para determinação do valor de bootstrap.

Na tabela 5.5 estão representadas as estimativas de divergência evolutiva média (d) nas sequências codantes da p10. O valor mais baixo é encontrado no grupo I e o mais elevado no grupo II. No teste estatístico Tajima D, todos os grupos apresentam um valor estatístico D negativo, embora com $P > 0.1$. O grupo III não apresenta sequências suficientes para este teste.

O valor da divergência evolutiva média entre grupos foi mais baixo entre os grupos I e II (0.085 ± 0.014) e mais alto entre os grupos II e III (0.176 ± 0.055), dando de 0.0168 ± 0.056 entre os grupos I e III.

Tabela 5.5: Estimativas de divergência evolutiva média (d) entre sequências nucleotídicas da p10 de *Grapevine virus B*. A distância genética e teste de neutralidade dentro de grupos está apresentada.

Filogrupo	Nº Variantes	D	S	Hd	Tajima's D
Todos	23	0.086±0.0002	136	1.000	-0.51506ns
Grupo I	8	0.015±0.003	18	1.000	-1.02197ns
Grupo II	10	0.050±0.01	61	1.000	-0.66973ns
Grupo III	2	0.089±0.044	33	1.000	ND

A estatística Tajima D foi utilizada como medida de neutralidade para todas as mutações nas regiões genômicas consideradas, utilizando o programa DnaSP 5.10.11 (Librado e Rozas 2009). O teste D é baseada nas diferenças entre o número de locais segregados e o número médio de diferenças de nucleótidos. O programa DnaSP fornece uma medida da significância do valor de D. Os valores não foram significativos (ns) em todos os casos determinados ($P > 0.1$). ND = não determinado por número insuficiente de sequências.

S corresponde ao número de locais segregantes (polimórficos).

Hd corresponde ao número de haplótipos.

^aFilogrupos estão definidos na figura 5.7.

5.1.3.2 Motivos Protéicos

A função da ORF 5 de *GVB* é ainda desconhecida não se encontrado nenhum domínio conservado através de análise BLASTp, em GenBank. Assim, procurou-se que motivos proteicos se encontram na sequência de aminoácidos, no programa ScanProsite (De Castro, *et al.* 2006), que possam elucidar a função da p10. A figura 5.9 mostra os cinco motivos encontrados para a sequência NC003602. Quatro dos motivos são locais de fosforilação de quinases (um motivo de quinases dependentes de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) e monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), um de proteína quinase C e dois motivos de Caseína quinase II) e o quinto motivo, um local de N-miristoilação.

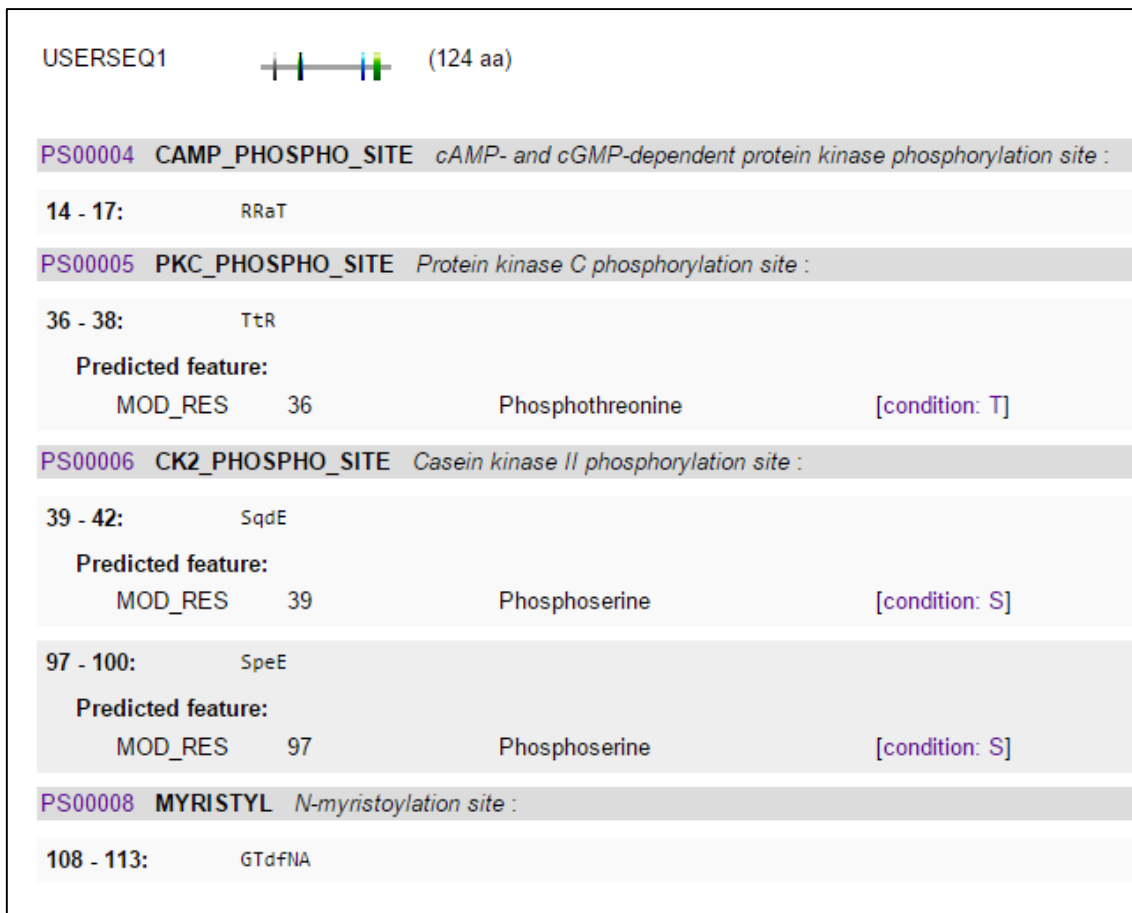


Figura 5.9: Representação dos motivos proteicos obtidos no programa ScanProsite, para a sequência de aminoácidos deduzida da sequência nucleotídica da ORF 5 de NC003602 para *Grapevine virus B*.

A figura 5.10 representa uma ilustração gráfica do alinhamento das sequências de aminoácidos da ORF 5, onde foram elucidadas as posições dos motivos encontrados. O motivo de fosforilação de quinases dependentes de cAMP e CGMP, com o padrão RRaT é igual em todas as 23 sequências. O motivo de fosforilação da proteína quinase C, de padrão TtR só é verificado na sequência NC003602 e na sequência KJ513897. Nas restantes sequências o último aminoácido não corresponde ao padrão consenso estabelecido para este motivo proteico. Os dois motivos de fosforilação da caseína quinase II, correspondem ao padrão consenso S-x(2)-E e são conservados em todas as sequências. O último motivo, N-miristoilação, com um padrão G-T-x(2)-N-A, só é verificado na sequência NC003602 e na sequência KJ513897, tal como o primeiro motivo.

5.1.4 Pressão evolutiva

Os valores de pressão de seletiva foram determinados no programa DataMonkey. Para a ORF 4 foram encontrados 108 locais negativamente selecionados e um local positivamente selecionado. Na ORF 5 apenas foram encontrados locais negativamente selecionados (tabela 5.6). De acordo com os valores de dN/dS encontrados para cada região genómica, verifica-se que ambas estarão sujeitas a seleção purificante, embora o efeito seja mais forte na região codante da proteína da cápside.

5.1.5 Aperfeiçoamento da deteção molecular de *Grapevine virus B*

Verificou-se neste trabalho que a deteção molecular de *GVB* era claramente menos eficiente do que os ensaios serológicos. Assim, o alinhamento das sequências nucleotídicas, compreendendo as regiões codantes da CP e p10 e a região 3'-UTR, obtidas neste trabalho e disponíveis em GenBank, foi analisado com o objetivo de encontrar zonas conservadas adequadas ao desenho de um par de *primers* que permitisse amplificar qualquer das variantes virais conhecidas. Verificou-se que o *primer* reverse anteriormente usado ancorava já numa região conservada, pelo que se desenhou um *primer* forward que fosse par daquele, isto é, respeitasse os parâmetros necessários para permitir a amplificação numa reação de PCR.

A figura 5.11 mostra o resultado de eletroforese em gel de agarose da amplificação com este par de *primers*. Neste exemplo, embora os fragmentos na posição 2, 5 e 7 tenham uma fraca intensidade de fluorescência, os 11 isolados testados apresentam amplificação. Os resultados de todos os isolados testados encontra-se na tabela 5.1.

Na figura 5.12 estão indicados os locais de hibridação e a sequência dos *primers* utilizados para amplificação de sequências nucleotídicas de *GVB*. A vermelho está representado o *primer* forward no início da ORF 4, e a amarelo, o *primer* reverse, desenhado no fim da região 3'-UTR, dando origem a um fragmento de 1147 nucleótidos. Este último *primer* foi mantido no ensaio de deteção de *Grapevine virus B*, com o novo *primer* forward apresentado a preto, originando um fragmento de 608 nucleótidos. A seleção do tamanho esperado do fragmento teve também em conta a possibilidade do estabelecimento dum ensaio de deteção de *GVA* e *GVB* em PCR-duplex, isto é, um tamanho suficientemente diferente do fragmento de deteção de *GVA* para se visualizar ambos em gel de agarose

Tabela 5.6: Valores de Pressão Seletiva estimados nos genes da CP (ORF 4) e da ORF 5 em isolados de *Grapevine virus B* (GVB).

Região codante ^a	Pressão Seletiva ^b							
	dN/dS ^c		Positiva		Negativa		Neutra	
	Log (L)	Médio	N	%	N	%	N	%
ORF 4 – CP	-2904.42	0.075	1	0.51	108	54.82	88	44.67
ORF 5	-1698.94	0.193	0	0	43	34.7	81	65.3

^a Os dados foram representados por 197 e 124 códons para as regiões codantes da CP e ORF 5, respectivamente.

^b Locais positiva e negativamente selecionados foram identificados por três métodos de pressão seletiva: single-likelihood ancestor counting (SLAC), fixed-effects likelihood (FEL), e internal fixed-effects likelihood (IFEL). O SLAC é um método de contagem, enquanto o FEL e IFEL são métodos de probabilidade.

^c Valores normalizados do rácio de substituições não sinónimas por local não sinónimo (dN) e substituições sinónimas por local sinónimo (dS), divididos pelo tamanho apropriado da árvore, dão uma medida de pressão seletiva. Valores dN/dS normalizados <1 indicam seleção negativa ou purificante, valores dN/dS normalizados = 1 sugerem seleção neutra e valores dN/dS normalizados >1 indicam seleção positiva para cada conjunto de dados de genes específicos.

após eletroforese. Este par de *primers* permitiu a amplificação do fragmento esperado em todos os isolados detetados como positivos por DAS-ELISA (tabela 5.1), bem como do isolado MT(3), considerado negativo através de testes serológicos.

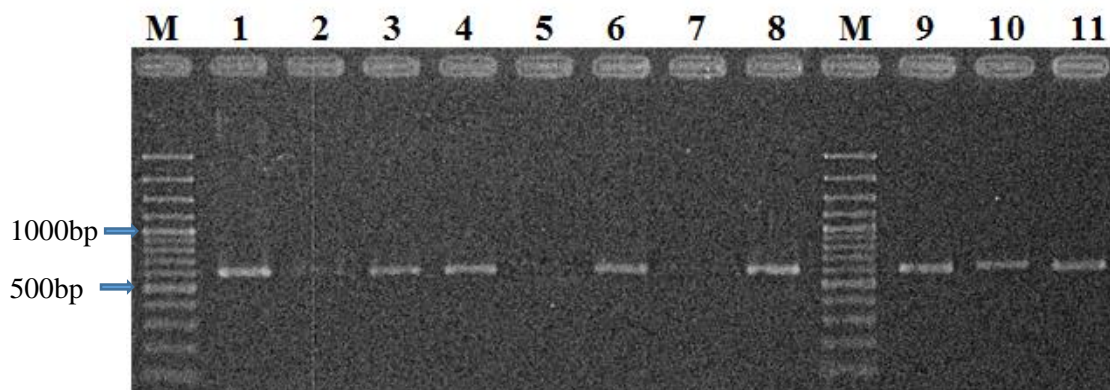


Figura 5.11: Amostras testadas com *primers* de *GVB* de detecção (gel de agarose 1,5% em TAE (1X) com EtBr). Todas as amostras mostraram banda de amplificação, embora não seja visível banda de amplificação em 5 e 7 devido à qualidade da imagem. Legenda: 1 – Cr(3), 2 – Ai(3), 3 – BdA(3), 4 – TM(3), 5 – MF(3), 6 – GP(3), 7 – Ca(3), 8 – Se(3), 9 – CT(3), 10 – Mo(3), 11 – Br(3), 12 – controlo negativo do PCR.

5.2. Discussão

5.2.1 Variabilidade genética de *GVB*

Neste trabalho obtiveram-se sequências de 6 isolados de *GVB*. Destes, quatro tinham anteriormente testado positivos em DAS-ELISA com anticorpos comerciais para a CP, um tinha testado negativo e o último não tinha sido testado. As sequências obtidas nas castas portuguesas agruparam-se em dois grupos filogenéticos distintos, juntamente com, no caso do grupo I, duas sequências disponíveis em GenBank, EF583906 e GU733707, e no caso do grupo II, a sequência JX513897. Verifica-se a existência de um terceiro grupo composto pelas sequências NC003602 e KJ524452. Foram assim identificados três grupos filogenéticos para as sequências que incluem proteína da cápside, ORF 5 e 3'UTR. Apesar deste vírus ser menos estudado que o *GVA*, existem sequências disponíveis em GenBank para além das do genoma completo incluídas no presente estudo. No entanto não há na literatura estudos que tenham anteriormente identificado grupos filogenéticos em *GVB*.

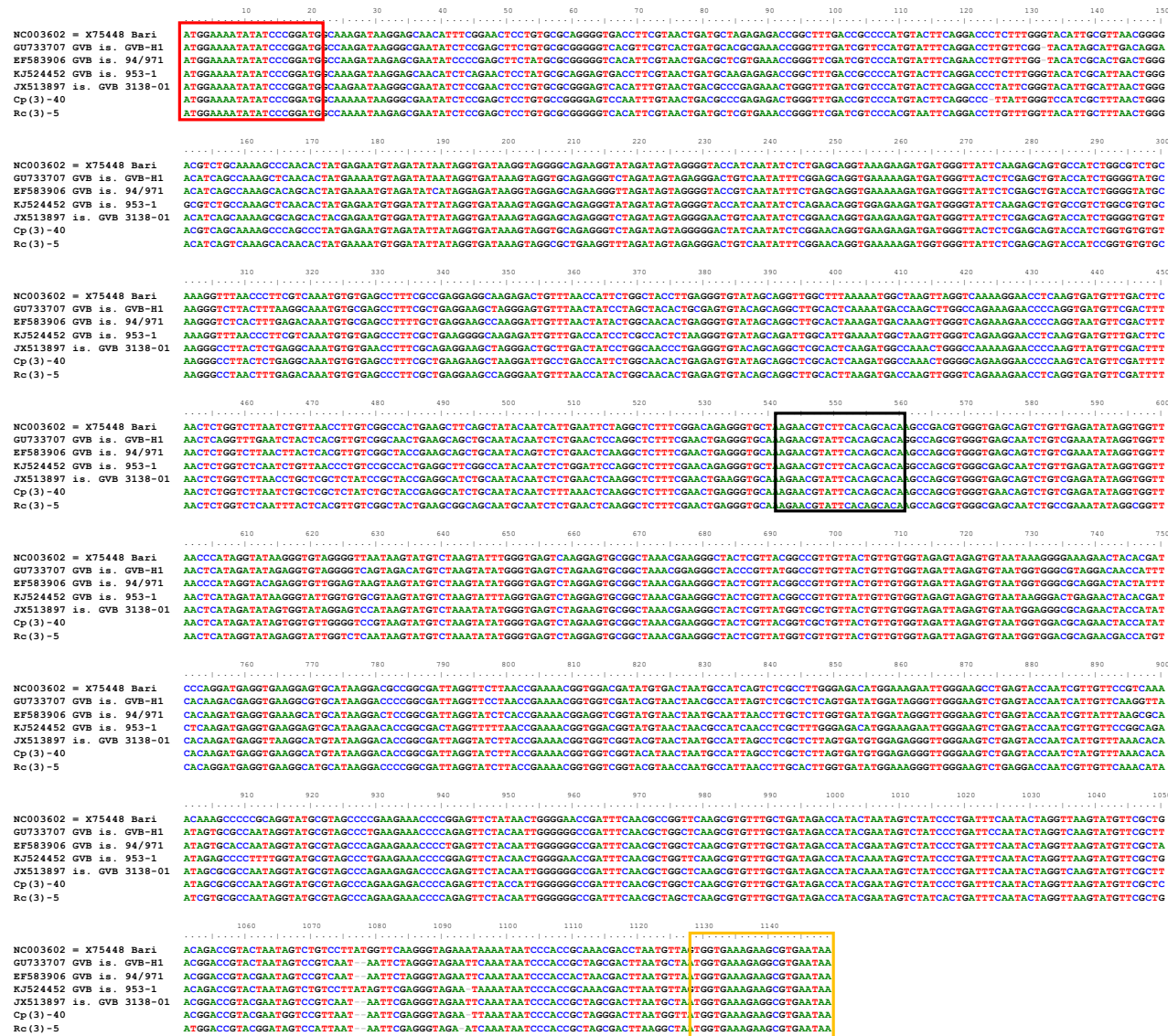


Figura 5.12: Representação gráfica do alinhamento de sequências nucleotídicas para evidenciar a posição física dos primers utilizados para detecção e amplificação do *Vitivirus Grapevine virus B*. A vermelho encontra-se o primer forward, *GVB6445U21*, a preto o primer forward da detecção de *GVB6986U19d* e a amarelo está realçado o primer reverse utilizado para amplificar ambos os fragmentos, *GVB7573L21* (tabela 3.1).

5.2.2 Proteína da cápside

Os grupos filogenéticos detetados para as sequências de 1147nt mantiveram-se nos dendrogramas da proteína da cápside, tanto para sequências nucleotídicas como para sequências de aminoácidos. Sciancalepore e os seus colegas, em 2006, identificaram quatro filogrupos para a CP de *GVB*, num trabalho apresentado no 16º Congresso do ICVG. No entanto, no Extend Abstract disponível não está apresentado o respectivo dendrograma.

Comparando a CP de *GVA*, com elevado número de sequências completas descritas (Alabi *et al.*, 2014), *GVB* dispõe de pouca informação para esta região genómica (Nickel *et al.*, 2002).

5.2.3 ORF 5

A ORF 5 apresenta, também, três grupos filogenéticos, mas as sequências EF583906 e GU733707, que na proteína da cápside e nas sequências longas obtidas se encontravam no grupo I, não se encontram resolvidas nesta ORF.

Foram encontrados 5 motivos na ORF 5. O motivo de fosforilação de proteínas quinases dependentes de cAMP e cGMP, onde estas quinases aparecem para mostrar a preferência para fosforilar resíduos de serina e treonina encontrados perto de, pelo menos, dois resíduos básicos consecutivos da zona N-terminal (Fremisco *et al.*, 1980; Glass e Smith, 1983; Glass *et al.*, 1986). O motivo da proteína quinase C têm preferência pela fosforilação do resíduo serina ou do resíduo treonina localizados perto de um resíduo básico da zona C-terminal (Kishimoto *et al.*, 1985; Woodget *et al.*, 1986). A caseína kinase II (CK-2) é uma proteína quinase serina/treonina cuja atividade é independente de nucleótidos cíclicos e cálcio. CK-2 fosforila diferentes proteínas. O substrato específico desta enzima pode: 1 – em condições comparáveis, a serina pode ser favorecida em relação à treonina; 2 – ter um resíduo ácido (ou ácido aspártico ou glutâmico) deve ter presentes três resíduos da zona C-terminal de um local aceitador de fosfato; ter resíduos ácidos adicionais nas posições +1, +2, +4 e +5 aumentando a taxa de fosforilação. A maioria dos substratos fisiológicos tem no fim um resíduo ácido nestas posições; 4 – o ácido aspártico é preferido em relação ao glutâmico como um fornecedor de determinantes ácidos; 5 – um resíduo básico na zona N-terminal do local aceitador decresce a taxa de fosforilação, enquanto um ácido irá aumentá-la (Pinna, 1990). O motivo N-miristolado está envolvido na acetilação de proteínas de eucariotas pela adição covalente de miristato (ácido gordo saturado – C₁₄) no seu resíduo N-terminal por acção

de uma ligação amida. A sequência específica da enzima responsável por esta modificação, miristoil CoA: proteína N-miristoil transferase (NMT), tendo derivado da sequência conhecida de proteínas N-miristoiladas e de estudos utilizando péptidos sintéticos. Este motivo parece funcionar da seguinte forma: 1 – o resíduo N-terminal deve ser glicina; 2 – na posição 2, resíduos sem carga são permitidos. Resíduos carregados, prolina e resíduos hidrofóbicos grandes são permitidos; 3 – nas posições 3 e 4, a maioria ou mesmo todos os resíduos são permitidos; 4 – na posição 5, pequenos resíduos não carregados são permitidos (Alanina, serina, treonina, cisteína, asparagina e glicina). A serina é o aminoácido favorecido; 5 – Na posição 6, a prolina não é permitida (Towler *et al.*, 1988; Grand *et al.*, 1989).

A ORF 5 (p10) de *GVA* carrega dois domínios perto da zona N-terminal, o motivo ARM e o motivo zinc finger (figura 4.8) (Galiakparov *et al.*, 2003b). Não está esclarecida a presença do motivo ARM em *GVB*, visto o motivo encontrado para este *Vitivirus* (KRRATR) ser diferente do motivo típico de ARM em *GVA* (KRRRARR) (Galiakparov *et al.*, 2003b). Não foi encontrado um motivo zinc finger ou similar nas sequências de *GVB*, neste trabalho.

O tamanho da proteína carregada nesta ORF difere nos dois *Vitivirus*, tendo a p10 de *GVA* 10-kDa e 90 aminoácidos (Haviv *et al.*, 2012), enquanto a sequência de aminoácidos para *GVB* inclui 120 aminoácidos.

5.2.4. Aperfeiçoamento da deteção de *GVB*

Neste estudo adquiriu-se informação genética acerca de *GVB* que permitiu o desenho de um par de primers que amplifica-se todos os isolados com informação positiva por parte do DAS-ELISA. Apesar de somente 17 isolados mostrarem informação positiva para este *Vitivirus* por DAS-ELISA, esta técnica de deteção mostrava ser melhor que o RT-PCR, pois os primers encontrados na literatura não amplificavam grande parte dos isolados portugueses. As sequências obtidas dos 6 isolados portugueses, permitiram o desenho de um par de primers que proporcionou a deteção de um maior número de isolados, melhorando a deteção deste vírus com o RT-PCR, quando comparado com o DAS-ELISA.

5.3. Referências Bibliográficas

- Alabi, O.J.,** Rwahnih, M.A., Mekuria, T.A. e Naidu, R.A. (2014) Genetic diversity of *Grapevine virus A* in Washington and California vineyards. *Virology*. 548 – 560.
- Fremisco, J.R.,** Glass D.B., Krebs E.G. (1980). *J. Biol. Chem.* **255**:4240-4245.
- Galiakparov, N.,** Tanne, E., Sela, I. e Gafny, R. (2003a). Functional analysis of the *Grapevine virus A* genome. *Virology*. **306**: 42-50
- Glass, D.B.,** Smith S.B. (1983). Phosphorylation by cyclic GMP-dependent protein kinase of a synthetic peptide corresponding to the autophosphorylation site in the enzyme. *J. Biol. Chem.* **258**:14797-14803.
- Glass, D.B.,** el-Maghrabi M.R., Pilakis S.J. (1986). Synthetic peptides corresponding to the site phosphorylated in 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase as substrates of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* **261**:2987-2993.
- Grand, R.J.A.** (1989). Acylation of viral and eukaryotic proteins. *Biochem. J.*, **258**:625-638.
- Haviv, S.,** Iddan, Y., Goszczynski, D.E. e Mawassi, M. (2012). The ORF5 of *Grapevine virus A* is involved in symptoms expression in *Nicotiana benthamiana* plants. *Annals of Applied Biology*. **160**: 2, 181–190.
- Kishimoto, A.,** Nishiyama K., Nakanishi H., Uratsuji Y., Nomura H., Takeyama Y., Nishizuka Y. (1985). Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **260**:12492-12499.
- Nickel, O.,** Fajardo, T.V.M., Aragão, F.J.L., Chagas, C.M., Kuhn, G.B. (2002) Detection and coat protein gene characterization of an isolate of *Grapevine virus B* from corky bark-affected grapevines in Southern Brazil. *Fitopatologia Brasileira*. **27**: 279-284.
- Pinna, L.A.** (1990). Casein kinase 2: an 'eminence grise' in cellular regulation? *J. Biol. Chem.* **260**:12492-12499.
- Sciancalepore, A.,** Ribeiro, G. P., Turturo, C., Dell'Orco, M., Minafra, A., Saldarelli, P., et al. (2006). Molecular variability of *GVA* and *GVB* coat protein genes in natural infected grapevine accessions (pp 81–82). Extended Abstracts 15th ICVG Meeting, Stellenbosch (South Africa), April3–7.
- Towler, D.A.,** Gordon J.I., Adams S.P., Glaser L. (1988). The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Annu. Rev. Biochem.* **57**:69-99.
- Woodget, J.R.,** Gould K.L., Hunter T. (1986). *Eur. J. Biochem.* **161**:177-184

6.1. Resultados

6.1.1. Detecção de *GVA* e *GVB* por duplex-pCR

Nos capítulos anteriores mostrou-se o desenho de um par de *primers* de deteção para cada *Vitivirus* estudado (*GVA* e *GVB*). Isoladamente, cada ensaio mostrou constituir uma ferramenta robusta para a deteção da presença de *GVA* ou de *GVB* nos diferentes isolados de castas portuguesas. Assim, decidiu-se implementar um ensaio de deteção conjunta através de duplex-PCR, com ambos os pares de *primers* numa mesma reação de amplificação, de forma a estabelecer uma ferramenta de deteção de rotina com elevada sensibilidade ou seja, capaz de detetar todas as variantes conhecidas quer de *GVA* quer de *GVB*. Foram testados 44 isolados com os resultados indicados na tabela 6.1: em 24 isolados foi detetado *GVA* sem *GVB* e em 20 isolados foi detetada a presença de co-infeção pelos dois vírus, não tendo sido encontrado nenhum isolado só com *GVB*.

Os resultados do ensaio de co-deteção foram concordantes com os dados dos ensaios de deteção de cada vírus em separado, já relatados nos capítulos 4 e 5, confirmando a existência entre os 44 isolados de 6 falsos negativos para *GVA* e 1 falso negativo para *GVB* na deteção por DAS-ELISA. A figura 6.1. ilustra a aplicação deste teste de deteção: os isolados AC(3) e C(3) têm somente *GVA* e os isolados Cr(3) e TM(3) têm *GVA* e *GVB*, o que corresponde aos resultados de DAS-ELISA apresentados na tabela XX. Todavia, os isolados S(3), GP(3) e TdC(3) identificados como positivos somente para *GVB*, e o isolado MT(3) identificado como tendo só *GVA* nos testes serológicos, mostram possuir variantes dos dois *Vitivirus* neste ensaio de co-deteção molecular.

6.1.2. PCR-RFLP para *GVA*

O *primer* de deteção de *GVA* permitiu o estabelecimento de ensaio de tipificação por PCR-RFLP para este *Vitivirus*. Cada sequência foi analisada no programa BioEdit e o mapa de restrição visualizado. Foi verificado que a endonuclease Hpy8I (GTN[^]NAC) corta as variantes dos grupos I e III gerando padrões de restrição identificadores de cada grupo. Sequências que pertencem ao grupo I geram sempre fragmentos de restrição com 510bp e 145bp. A restrição das sequências do grupo III gera sempre fragmentos com 145bp, 240bp e 269bp. Na figura 6.2 é mostrado o perfil de restrição obtido para vários isolados após a digestão com a enzima Hpy8I. Para estes e todos os isolados testados, verificou-se que as restrições foram sempre completas.

Tabela 6.1: Lista de isolados testados com a ferramenta de detecção duplex-PCR, com os respectivos resultados da técnica DAS-ELISA, para *GVA* e *GVB*, e duplex-PCR.

Variedade	Identificação do isolado	DAS-ELISA		PCR Duplex
		<i>GVA</i>	<i>GVB</i>	
Alvarelhão Ceitão	AC(3)	+	-	<i>GVA</i>
Donago	Dn(4)	+	-	<i>GVA</i>
Zinfandel	Zf(3)	+	-	<i>GVA</i>
Tinta de Porto Santo	TPS(2)	+	-	<i>GVA</i>
Cristalino	Cr(3)	+	+	<i>GVA</i> + <i>GVB</i>
Aramis	Ar(3)	+	-	<i>GVA</i>
Airén	Ai(3)	-	+	<i>GVA</i> + <i>GVB</i>
Bandeirante	Bd(3)	+	-	<i>GVA</i>
Tinta Ferreira	TF(3)	+	-	<i>GVA</i>
Ribatejana	Rb(7)	+	-	<i>GVA</i>
Tinta da Graciosa	TdG(3)	+	-	<i>GVA</i>
Tinto Velasco	TV(3)	+	-	<i>GVA</i>
Boal das Abelhas	BdA(3)	+	+	<i>GVA</i> + <i>GVB</i>
Tinta Martins	TM(3)	+	+	<i>GVA</i> + <i>GVB</i>
Português-Azul	PA(3)	+	-	<i>GVA</i>
Malandra	MI(3)	+	-	<i>GVA</i> + <i>GVB</i>
Malvasia Fina	MF(3)	+	+	<i>GVA</i> + <i>GVB</i>

Tabela 6.1 Continuação

Variedade	Identificação do isolado	DAS-ELISA		PCR Duplex
		<i>GVA</i>	<i>GVB</i>	
Tinta Lameira	TL(3)	+	-	<i>GVA</i>
Roseira	Rs(3)	+	-	<i>GVA</i>
Lourela	Ll(3)	+	-	<i>GVA</i>
Gonçalo-Pires	GP(3)	-	+	<i>GVA + GVB</i>
Sousão	S (3)	-	+	<i>GVA + GVB</i>
Varejoa	Vr(3)	+	-	<i>GVA</i>
Malvasia Trigueira	MT(3)	+	-	<i>GVA + GVB</i>
Tinta Engomada	TE(3)	+	-	<i>GVA</i>
Caramela	Ca(3)	+	+	<i>GVA + GVB</i>
Ricoca	Rc(3)	+	-	<i>GVA + GVB</i>
Bovale de Spagna	BS(3)	+	-	<i>GVA</i>
Garnacha Roja	GR(3)	+	-	<i>GVA</i>
Bastardo-Tinto	BT(3)	+	-	<i>GVA</i>
Alvarelhão Branco	AlBr		+	<i>GVA + GVB</i>
Tinta Negra Mole	TNM(2)	+	-	<i>GVA</i>
Tinta-Tabuaço	TT(3)	+	-	<i>GVA</i>
Tinta de Cidadelhe	TdC(3)	-	+	<i>GVA + GVB</i>

Tabela 6.1 Conclusão

Variedade	Identificação do isolado	DAS-ELISA		PCR Duplex
		<i>GVA</i>	<i>GVB</i>	
Sevilhão	Se(3)	-	+	<i>GVA + GVB</i>
Corropio	Cp(3)	-	+	<i>GVA + GVB</i>
Carrega-Tinto	CT(3)		+	<i>GVA + GVB</i>
Corvo	Cv(3)	+	-	<i>GVA</i>
Monvedro	Mo(3)		+	<i>GVA + GVB</i>
Pau Ferro	PF(3)	+		<i>GVA</i>
Ramisco	Ra(3)		+	<i>GVA + GVB</i>
Brancelho	Br(3)		+	<i>GVA + GVB</i>
Bastardo	Bs(3)		+	<i>GVA + GVB</i>
Cot	C(3)	+	-	<i>GVA</i>

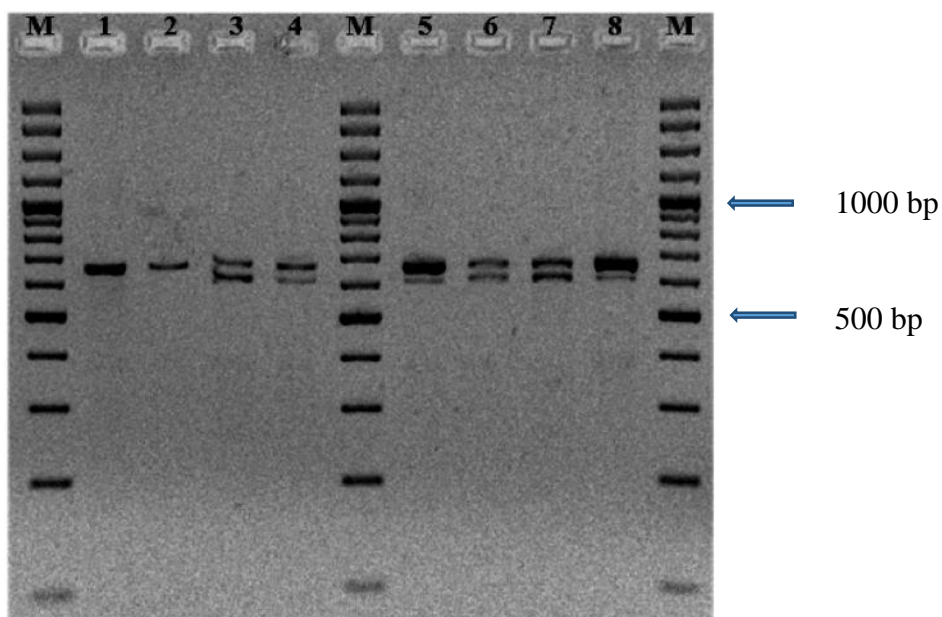


Figura 6.1: Detecção (gel de agarose 2,5% em TAE (1X) com EtBr) dos fragmentos obtidos através de duplex-PCR e que indicam a presença de *GVA* (654 bp) e de *GVB* (588 bp). Legenda: M – Marcador Gene Ruler (100bp Plus, Life Technologies); 1 - AC(3); 2 - C(3); 3 - Cr(3); 4 - TM(3); 5 - S(3); 6 - GP(3); 7 - TdC(3); 8 - MT(3).

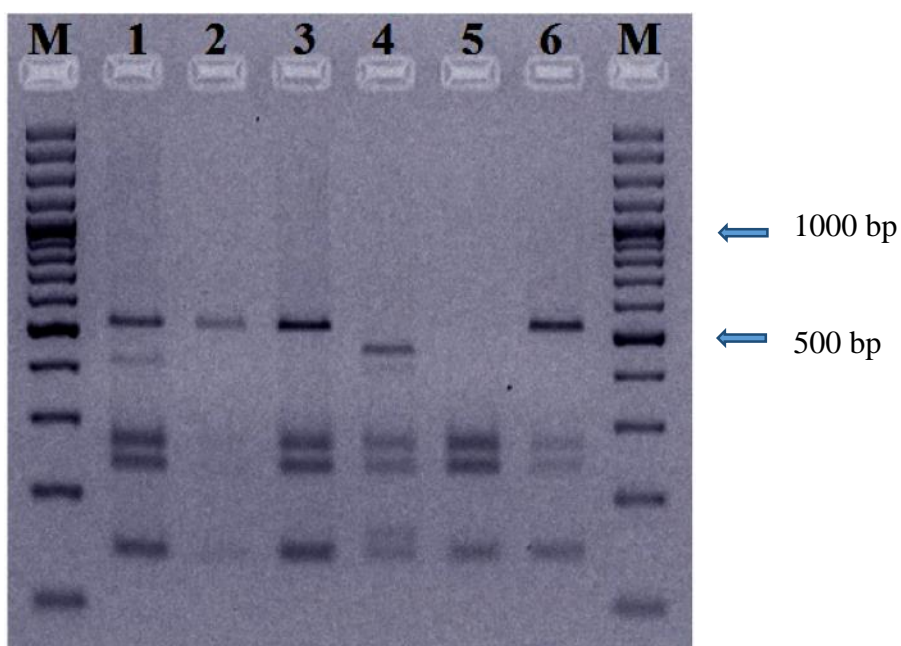


Figura 6.2: Perfis de restrição obtidos com a enzima de restrição *Hpy8I* no ensaio PCR-RFLP para tipificação de variantes de *GVA* (eletroforese em gel de agarose 3% em TAE (1X), com EtBr). Legenda: M – marcador Marcador Gene Ruler (100bp Plus, Life Technologies); 1 – MT(3); 2 – TNM(3); 3 – TT(3); 4 – Cv(3); 5 – PF(3); 6 – C(3).

Os isolados apresentados correspondem a isolados detetados como positivos para *GVA* também por DAS-ELISA . Através deste ensaio foi detetada a presença de variantes dos grupos I e III nos 3 primeiros e do grupo III nos dois últimos casos. As variantes nucleotídicas anteriormente recuperadas do isolado C(3) encontravam-se todas no grupo I, como é possível verificar na figura 4.2. No entanto no ensaio de tipificação, C(3) apresenta fragmentos específicos dos grupos I e III. Este resultado parece sugerir, que variantes que possivelmente estarão em menor número de cópias no isolado poderão, apesar do processo de clonagem e análise de SSCP, não ser recuperadas, enquanto que a tipificação do fragmento diretamente obtido de PCR parece permitir a sua deteção. De facto, o volume de amplificação usado para fazer a clonagem é de 2 µl, enquanto que o volume em cada reação de restrição é 5 vezes superior.

No caso dos isolados MT(3), TNM(3), TT(3), Cv(3) e PF(3) não havia informação prévia sobre as variantes presentes. Verificou-se que, para além do perfil de bandas que permitem identificar os grupos I ou III, é visível uma banda ligeiramente acima de 400pb no perfil de restrição dos isolados MT(3) e Cv(3) e duas outras bandas no perfil de restrição do isolado Cv(3), respetivamente acima da de 145 bp e entre os 450 e 500 bp . Da análise do alinhamento das variantes conhecidas não há locais de corte previsíveis para a *Hpy8I* que gerem fragmentos daquele tamanho, pelo que os resultados sugerem que nestes isolados, para além de variantes do grupo III poderão existir variantes de grupos ainda não identificados ou variantes dos grupos I e/ou III com mutações que geraram locais de corte adicionais.

Na tabela 6.2 é mostrada a ocorrência de cada grupo filogenético em termos de percentagem doo total de isolados tipificados com *Hpy8I*.

Tabela 6.2: Resumo do número isolados testados com a enzima de restrição *Hpy8I*, e percentagens de ocorrência dos grupos filogenéticos apresentados na figura 4.2.

	N de isolados testados	%
Grupo Filogenético I	0	0
Grupo Filogenético III	3	17.65
Grupos Filogenéticos I e III	14	82.35
Total de isolados testados	17	

Pode observar-se que a maioria dos isolados testados apresenta mistura de variantes dos dois grupos filogenéticos e que a ocorrência de variantes exclusivamente do grupo III está reduzida a cerca de 18%. A ocorrência de variantes do grupo I isoladamente não foi verificada.

6.1.3. Tipificação de variantes de *GLRAV-3* em isolados de *GVA* e *GVB*

Tal como já referido no capítulo 1, existem estudos que evidenciam a existência de co-infecção entre vírus do enrolamento e *Vitivirus*, principalmente entre *GLRAV-3* e *GVA*. De modo a caracterizar esse aspeto nos isolados em análise, foi verificada a presença de *GLRAV-3* através de PCR com *primers* específicos para este vírus (par de *primers* 10 da tabela 3.1) já disponíveis no laboratório. Todos os 44 isolados indicados na tabela 6.1, foram testados e apresentaram sinal de amplificação sob a forma de fragmento com o tamanho esperado de 1017 bp (dados não apresentados). Na figura 6.3 é mostrado um exemplo de sinal de amplificação visualizado em gel de agarose.

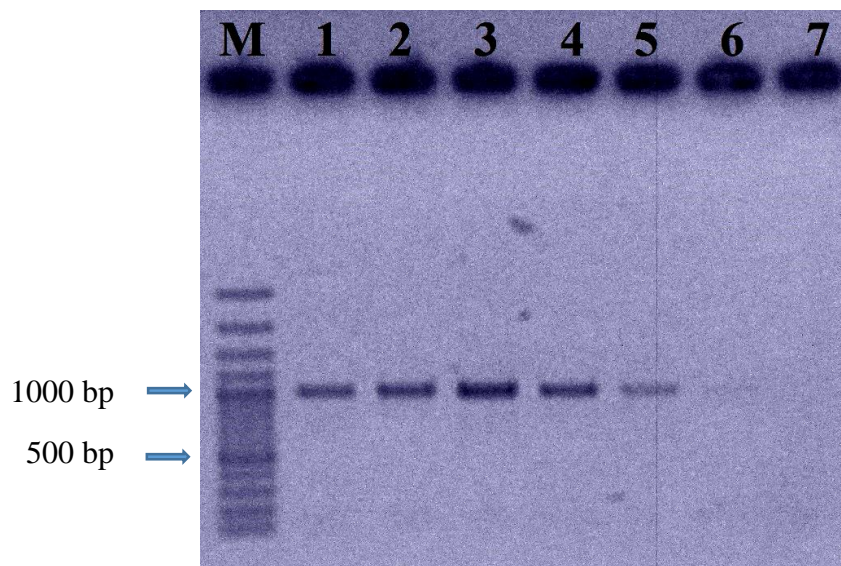


Figura 6.3: Detecção (gel de agarose 2,5% em TAE (1X) com EtBr) dos fragmentos obtidos através de PCR com os *primers* específicos de *GLRAV-3*. Legenda: M – Marcador Gene Ruler (100 bp Plus, Life Technologies), 1 – MF(3), 2 – Rs(3), 3 – Cv(3), 4 – PF(3), 5 – C(3), 6 – GP(3) 7 – Controlo negativo do PCR.

O ensaio PCR-RFLP para este *Ampelovirus* estava já estabelecido no laboratório como ensaio de tipificação de rotina. As reações de restrição com endonucleases utilizadas para detetar variantes deste vírus pertencentes a cada um dos cinco grupos filogenéticos já encontrados em cultivares portugueses e respetivos padrões de restrição esperados estão indicados na tabela 6.2.

A tabela 6.3 apresenta todas as combinações de grupos filogenéticos encontradas nos 43 isolados testados. A amostra GP(3) apresentou uma banda de amplificação demasiado fraca (figura 6.3) que não permitiu a tipificação.

Tabela 6.3: Resumo do número isolados tipificados e percentagens de ocorrência dos cinco grupos filogenéticos.

	N de isolados testados	%
Grupo Filogenético I	25	58.14
Grupo Filogenético II	9	20.93
Grupos Filogenéticos III	1	2.33
Grupo Filogenético V	2	4.64
Grupos Filogenéticos I e II	1	2.33
Grupos Filogenéticos II e V	1	2.33
Grupos Filogenéticos III e IV	1	2.33
Grupos Filogenéticos I, III e IV	2	4.64
Grupos Filogenéticos II, III e IV	1	2.33
Total de isolados testados	43	100

O grupo filogenético I é o mais abundante, apresentando-se em mais de metade dos isolados testados. O grupo II fez-se representar em 9 isolados, o grupo III num isolado e o grupo V, em dois isolados. As misturas de grupos filogenéticos são pouco comuns, como é possível verificar.

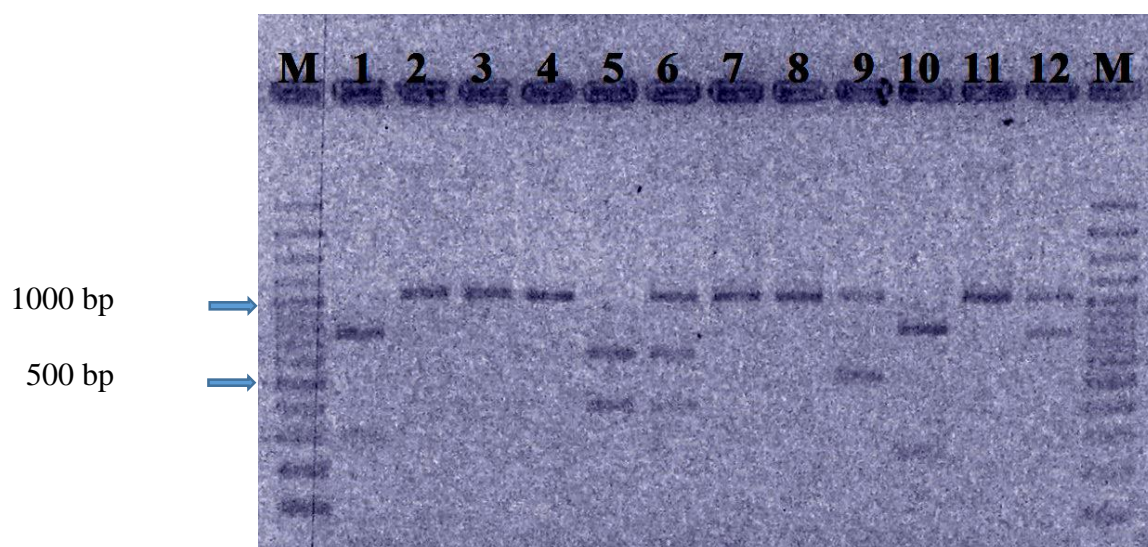


Figura 6.4: Exemplos dos perfis de restrição obtidos no ensaio de tipificação de variantes de *GLRaV-3* (eletroforese em gel de agarose 1,5% em TAE (1X), com EtBr). Legenda: M – Marcador Gene Ruler (100 bp Plus, Life Technologies), 1, 4, 7 e 10 – isolado BdA(3); 2, 5, 8 e 11 – isolado Cp(3); 3, 6, 9 e 12 – isolado Bs(3); 1, 2 e 3 – Perfis de restrição daqueles isolados na reação com *SpeI* e *PvuII* (Grupos I e V); 4, 5 e 6 – Perfis de restrição daqueles isolados na reação *BstZI7I* (Grupo II); 7, 8 e 9 - Perfis de restrição daqueles isolados na reação com *Pdml* (Grupo III); 10, 11 e 12 - Perfis de restrição daqueles isolados na reação com *KpnI* (Grupo IV).

6.2.Discussão

6.2.1 Duplex PCR para co-deteção de GVA e GVB

A implementação de sistemas de deteção num só ensaio está em constante evolução (Osman *et al.*, 2013). Os testes serológicos foram largamente utilizados para deteção de vírus de videira (Pacífico *et al.*, 2009). Rotineiramente, o teste DAS-ELISA é a técnica utilizada para a deteção de vírus de videira. Os anticorpos comerciais nesta técnica, são produzidos contra uma variante, e sendo os *Vitivirus* tão variáveis, podem ocorrer falsos negativos. Logo, é necessário o desenvolvimento de métodos de alta sensibilidade e especificidade para implementação dos programas fitossanitários de certificação para controlo de doenças virais (López-Fabuel *et al.*, 2013).

Desenvolveu-se, assim, com os primers estabelecidos para deteção molecular de cada *Vitivirus*, uma ferramenta robusta que detete os dois vírus. Como referido anteriormente, todos os isolados mostraram ser positivos para *GVA*, e alguns também possuem *GVB*. Isolados que só apresentem *GVB* não foram encontrados.

6.2.2 Tipificação de variantes de GVA

Os resultados obtidos neste trabalho (tabela 6.2) confirmam a ocorrência de infeções mistas de variantes altamente divergentes de *GVA* em cada isolado (Galiakparov, *et al.*, 2003a; Galiakparov, *et al.*, 2003c; Goszczynski, *et al.*, 2008; Murolo, *et al.*, 2007). As infeções mistas podem ser consequência de enxertia, onde o contato do garfo e do porta-enxerto abrigam variantes distintas a reunir-se. A inoculação por cochonilhas e insetos também contribuem para co-infeções de variantes *GVA*, quando estes vetores são capazes de introduzir sequências de variantes diferentes de uma planta para outra durante a transmissão dentro e entre as vinhas (Alabi *et al.*, 2014). A maioria dos isolados portugueses testados mostraram ter co-infeção de variantes do vírus de *GVA* (82,35% dos isolados testados). O grupo I é um grupo bastante abrangente, e contém a maioria dos clones obtidos neste trabalho, embora, nesta tipificação, nenhum isolado o apresentou unicamente. Alguns isolados apresentaram-se como só detendo o grupo III. Na figura 6.2, verificou-se a presença de fragmentos de tamanho diferente ao esperado. Nestes casos tem de se proceder à clonagem e sequenciação de um elevado número de clones de forma a verificar se corresponde a um novo grupo filogenético ou se existem mutações.

6.2.3. Tipificação de variantes de *GLRaV-3*

Esteves *et al.*, (2009) e Gouveia *et al.*, (2011), verificaram que as variantes do gene da proteína da cápside de GLRaV de isolados portugueses, se encontrava distribuído em cinco grupos filogenéticos. Com base nesta evidência, foi estabelecido um RT-PCR-RFLP, com cinco enzimas de restrição. Cada enzima de restrição corta um grupo filogenético, com padrões diferentes que permitem a sua identificação. A maioria dos isolados detém o grupo I, com uma percentagem 58%. Tal como para *GVA*, há evidência de transmissão deste *Ampelovirus*, por cochonilhas e insetos vetores, entre isolados (Zorloni *et al.*, 2006). Isto poderá explicar a presença de duas ou três variantes do vírus em vários isolados.

6.3 Referências Bibliográficas

- Alabi, O.J.,** Rwahni, M.A., Mekuria, T.A. e Naidu, R.A. (2014) Genetic diversity of *Grapevine virus A* in Washington and California vineyards. *Virology*. 548 – 560.
- Galiakparov, N.,** Tanne, E., Sela, I. e Gafny, R. (2003a). Functional analysis of the *Grapevine virus A* genome. *Virology*. 306: 42-50
- Galiakparov, N.,** Tanne, E., Mawassi, M., Gafny, R. e Sela, I. (2003b). ORF 5 of *Grapevine virus A* a nucleic acid-binding protein and affects pathogenesis. *Virus Genes*. **27**:3, 257-262.
- Gouveia, P.,** Santos, M.T., Eiras-Dias, J.E., Nolasco, G. (2011). Five phylogenetic groups identified in the coat protein gene of grapevine leafroll-associated virus 3 obtained from Portuguese grapevine varieties. *Arch. Virol.* Doi: 10.1007/s00705-010-0878-7.
- Goszczynski, D.,** du Preez, J. e Burger, J. (2008) Molecular divergence of *Grapevine virus A* (*GVA*) variants associated with Shiraz disease in South Africa. *Virus Res*. **138**: 105–110.
- Lopez-Fabuel, I.,** Wetzell, T., Bertolini, E., Bassler, A., Vidal, E., Torres, L.B., Yuste, A. e Olmos A. (2013) Real-time multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of the five main grapevine viruses. *Journal of Virological Method*. **188**: 21–24.
- Murolo, S.,** Romanazzi, G., Rowhani, A., Minafra, A., La Notte, P., Branzanti, M., Savino, V. (2007). Genetic variability and population structure of *Grapevine virus A* coat protein gene from naturally infected Italian vines. *Euro. J. Plant Pathol*. **120**: 137-145.
- Pacifico, D.,** Caciagli, P., Palmano, S., Mannini, F., Marzachi, C. (2009). Quantitation of Grapevine leafroll associated virus-1 and -3, *Grapevine virus A*, Grapevine fanleaf virus and Grapevine fleck virus in field-collected *Vitis vinifera* L. Nebbiolo by real-time reverse transcription-PCR. *J. Virol. Methods*. 172, 1–7.
- Osman, F.,** Hodzic, E., Omanska-Klusek, A., Olineka, T. e Rowhani, A. (2013). Development and validation of a multiplex quantitative PCR assay for the rapid detection of *Grapevine virus A, B* and *D*. *Journal of Virology Methods*. **194**:138-145
- Zorloni, A.,** Prati, S., Bianco, P.A. e Belli, G. (2006). Transmission of *Grapevine virus A* and *Grapevine Leafroll-associated virus 3* by *Heliococcus bohemicus*. *Journal of Plant Pathology*. **88**:3, 325-328.

7. Discussão geral e Conclusões

Neste trabalho foi verificado para os isolados portugueses que, em concordância com estudos de outros autores (Alabi, *et al.* 2014; Goszczynski, 2014), a variabilidade genética de *GVA* é elevada, o que dificulta a detecção molecular com os pares de primers disponíveis na literatura. No presente estudo foi obtido um elevado número de sequências de variantes de castas portuguesas que compreendem o gene da MP, da CP, da p10 e a região 3'-UTR. Estas sequências mostraram agrupar-se em dois grupos filogenéticos principais. O mesmo se observou no dendrograma das sequências nucleotídicas da CP, e das sequências de aminoácidos deduzidas das anteriores, embora nestes casos sempre com valores bootstrap mais baixos. A informação obtida sobre as variantes nucleotídicas nas castas portuguesas permitiu o desenho de um novo par de primers com o objectivo de detetar molecularmente infecções com *GVA*. Verificou-se que todos os isolados testados positivos em DAS-ELISA com anticorpos comerciais foram amplificados, bem como detetaram alguns falsos negativos em testes serológicos.

Tendo-se verificado em alguns dos isolados portugueses a existência de mistura de variantes dos dois grupos filogenéticos considerados, implementou-se um ensaio de tipificação por RT-PCR-RFLP com a enzima de restrição *Hpy8I*. Através do perfil de restrição de cada isolado é possível determinar a que grupo filogenético pertencem as variantes que cortem, recorrendo-se à clonagem e sequenciação somente nos casos em que os isolados mostrem um perfil inconclusivo.

O *Grapevine virus B* não é tão estudado quanto o *GVA*, mas existem estudos que vão elucidando as relações filogenéticas entre sequências (Shi *et al.*, 2004; Goszczynski, 2010). A detecção deste *Vitivirus* é feita por DAS-ELISA e por RT-PCR (Hu *et al.*, 2014). Goszczynski (2010) desenhou vários pares de primers, um dos quais adaptado e utilizado neste trabalho, e obteve várias sequências muito distintas. Neste trabalho obteve-se sequências de 6 isolados, e sugeriu-se uma organização filogenética em três grupos (grupos I, II e III). As sequências de variantes do mesmo isolado agruparam-se no mesmo grupo filogenético. Não foram obtidas variantes no grupo III. Os três grupos filogenéticos mantiveram-se em todas as regiões genómicas analisadas, tanto para a CP como para a p10.

Os primers de detecção para *GVA* e *GVB*, testados neste trabalho, permitiram o desenvolvimento de um ensaio molecular de co-deteção dos dois *Vitivirus* em estudo. Todas os isolados testados que apresentaram *GVB* também mostraram ter *GVA*, embora existam casos, em que o isolado só apresenta *GVA*.

Todos os isolados testados para *GVA* e *GVB* mostraram co-infecção com *GLRaV-3*. A existência de co-infecção entre *GLRaV-3* e *Vitivirus*, principalmente *GVA* tem sido documentada e poderá dever-se à presença dos mesmos insectos vectores transmissores de vírus entre videiras (Zorloni *et al.*, 2006). Verificou-se para *GLRaV-3* que o filogrupa I tinha a incidência mais elevada.

Deste estudo advém outros que podem ser feitos ou melhorados. O ensaio de deteção PCR-duplex de *GVA* e *GVB* pode evoluir para um ensaio de deteção e quantificação por real-time, podendo determinar a sazonalidade dos respetivos títulos virais. Ao ensaio de deteção molecular por PCR-duplex pode juntar-se o primer de *GLRaV-3*, permitindo a deteção em simultâneo dos três vírus.

Um ensaio de RT-PCR-RFLP para *GVB* seria um ensaio que permitiria tipificar variantes dos três grupos filogenéticos encontrados neste trabalho. Para isso seria necessário obter mais sequências nucleotídicas, com o par de primers já estabelecido ou através do desenho de um novo. A incidência de *GVB* nas castas portuguesas parece ser inferior à de *GVA*, com base nos dados de DAS-ELISA.

Na posse do conhecimento sobre a variabilidade da CP de cada vírus é possível obter novos anticorpos, capazes de detetar qualquer das variantes conhecidas. Deste modo a ferramenta serológica de rotina poderá ser melhorada, o que permitirá reduzir o impacto destes vírus, e re-avaliar as incidências respectivas em castas portuguesas.

8. Referências Bibliográficas

- Alabi, O.J.,** Rwahni, M.A., Mekuria, T.A. e Naidu, R.A. (2014) Genetic diversity of *Grapevine virus A* in Washington and California vineyards. *Virology*. 548 – 560.
- Abou-Ghanem, N.,** Saldarelli, P., Minafra, A., Buzkan, N., Castellano, M.A. e Martelli, G.P. (1997). Properties of *Grapevine virus D*, a novel putative trichovirus. *J Plant Pathol.* **78**:15-25.
- Agran, M.K.,** Di Terlizzi, B., Boscia, D., Minafra, A., Savino, V., Martelli, G.P., Askri, F. (1990). Occurrence of *Grapevine virus A* (GVA) and other closteroviruses in Tunisian grapevines affected by leafroll disease. *Vitis* **29**, 43-48.
- Almadanim, M.C.,** Baleira-Couto, M.M., Pereira, H.S., Carneiro, L.C., Fevereiro, P., Eiras-Dias, J.E., Morais-Cecilio, L., Viegas, W. e Veloso, M.M. (2007). Genetic diversity of the grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars most utilized for wine production in Portugal. *Vitis*, **46** (3): 116-119.
- Al Rwahni, M.,** Sudarshana, M.R., Uyemoto, J.K. e Rowhani, A. (2012). Complete genome sequence of a novel *Vitivirus* isolated from Grapevine. *Journal of Virology*. **86**:17, 9545.
- Arroyo-Garcia, R.,** Ruiz-Garcia, L., Bolling, L., *et al.* (2006). Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. Subsp. *silvestres*) based on chloroplast DNA polymorphisms. *Molecular Ecology*. **15**: 3707-3714.
- Bonavia, M.,** Digiarioi, M., Boscia, D., Boari, A., Bottalico, G. Savino, V. e Martelli, G.P. (1996). Studies on “corky rugose wood” of grapevine and on the diagnosis of *Grapevine virus B*. *Vitis*, **35**: 53–58.
- Brumin, M.,** Stukalov, S., Haviv, S. *et al.* (2009). Post-transcriptional gene silencing and viru resistance in *Nicotiana benthamiana* expressing a *Grapevine virus A* minireplicon. *Transgenic Res.* **18**: 331 - 345.
- Cavalli-Sforza, L.L.,** Menozzi, P. e Piazza, A. (1994) The history and geography of human genes. Princeton University Press, USA
- Châtaignier, C.** (1995) La Transcaucasie au Néolithique et au Chalcolithique. *British Archaeological Series*. **624**: 1–240.
- Chooi, K.M.,** Pearson, M.N., Cohen, D. e Pong, J.C.H. (2009). Sequence variation in Grapevine leafroll-associated virus 3 (*GLRaV-3*) New Zealand isolates. In: Extended abstracts 16th meeting ICVG, Dijon, France, 31 August–4 September 2009, pp 290–291
- Conti, M. e** Milne, R. (1985). Closterovirus associated with leafroll and stem pitting in grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* **24**, 110-113.
- Credi, R. e Giunchedi, L.** (1996). Grapevine leafroll-associated viroses and *Grapevine virus A* in selected *Vitis vinifera* cultivars in northern Italy, *Plant Pathology*. **45**: 1110-1116.
- De Castro, E.,** Sigrist C. J. A, Gattiker A., Bulliard V., Langendijk-Genevaux P. S., Gasteiger E., Bairoch, A., Hulo, N. (2006). ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res.* **34**.
- De Meyer, J.,** Gaudin, M., Bourquin, L., Jakab, G., Malnoe, P. e Gugerli, P. (2000) New primers for the molecular identification and detection of *Grapevine virus A* (GVA), 138-140. Extended Abstracts, 13th Meeting of ICVG, Adelaide, 12-17 March 2000.
- du Preez, J.,** Stephan, D., Mawassi, M. e Burger, J.T. (2011). The grapevine-infecting *Vitiviruses*, with particular reference to *Grapevine virus A*. *Arch Virol.* **156**: 1495-1503.
- Elbashir, S. M.,** Lendeckel, W. & Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* **15**: 188–200.
- Engel, E.A.,** Girardi, C., Escobar, P.F., Arredondo, V., Dominguez, C., Perez-Acle, T., Valenzuela, P.D. (2008). Genome analysis and detection of a Chilean isolate of Grapevine leafroll associated virus-3. *Virus Genes.* **37**:110–118.

- Engelbrecht**, D.J., Kasdorf, G.G.F. (1985). Association of a closterovirus with grapevines indexing positive for grapevine leafroll disease and evidence for its natural spread in grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* **24**, 101-105.
- Engelbrecht**, D.J., Human, R. (1989). Absence of *Grapevine virus A* correlated with elimination of leafroll disease. *Proceedings 9th Meeting of ICVG, Kiryat Anavim, Israel*. 159-163.
- Engelbrecht**, D.J., Kasdorf, G.G.F. (1990). Transmission of grapevine leafroll disease and associated closteroviruses by the vine mealybug *Planococcus ficus*. *Phytophylactica* **22**, 341-346.
- Fajardo**, T.V.M., Nickel, O., Eiras, M. e Kuhn, G.B. (2003) Detecção de um isolado de *Grapevine virus A* e caracterização do gene da proteína capsidial. *Fitopatol. Bras.* **28**.
- Fajardo**, T.V.M., Dianese, E.C., Eiras, M., Cerqueira, D.M., Lopes, D.B., Ferreira, M.A.S.V., Martins, C.R.F. (2007). Variability of the coat protein gene of Grapevine leafroll-associated virus 3 in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*. **32**:335–340.
- Fajardo**, T.V.M., Eiras, M., Nickel, O., Dubiela, C.R. e Souto, E.R. (2012). Detection and partial molecular characterization of *Grapevine fleck virus*, *Grapevine virus D*, *Grapevine leafroll-associated virus -5* and *-6* infecting grapevines in Brazil. *Ciência Rural, Santa Maria*. **42**: 12, 2127-2130.
- Fire**, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. e Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-strand RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. **391**: 806-811.
- Fraga**, H., Santos, J.A., Malheiro, A.C., Oliveira, A.A., Moutinho-Pereira, J. e Jones, G.V. (2015). Climatic suitability of Portuguese grapevine varieties and climate change adaptation. *Int. J. Climatol*. Doi:10.1002/joc.4325.
- Frederick**, M., Jr (2000). RNA degradation and models for posttranscriptional gene silencing. *Plant Mol Biol*. **43**: 261–273.
- Fuchs**, M., Martinson, T.E., Loeb, G.M., Hoch, H.C. (2009). Survey for the three major leafroll disease-associated viruses in Finger Lakes vineyards in New York. *Plant Dis*. **93**:395–401
- Galiakparov**, N., Tanne, E., Sela, I. e Gafny, R. (2003a). Functional analysis of the *Grapevine virus A* genome. *Virology*. 306: 42-50.
- Galiakparov**, N., Tanne, E., Mawassi, M., Gafny, R. e Sela, I. (2003b). ORF 5 of *Grapevine virus A* a nucleic acid-binding protein and affects pathogenesis. *Virus Genes*. **27**:3, 257-262.
- Galiakparov**, N., Goszczynski, D.E., Che, X., Batuman, O., Bar-Joseph, M. e Mawassi, Munir. (2003c). Two classes of subgenomic RNA of *Grapevine virus A* produced by internal controller elements. *Elsevier. Virology*. **312**: 434-448.
- Garau**, R., Protai, V.A., Pireddar, R., Boscia, D. e Prota, U. (1994). On the relationship between Kober stem grooving and *Grapevine virus A*. *Vitis* **33**:161-163.
- Graniti** A., Ciccarone, A. (1961). Osservazioni su alterazioni virosiche e virus-simili della vite in Puglia. *Notiziario sulle Malattie delle Piante*. **55** (n.s.34): 92-102.
- Grassi**, F., Labra, M., Imazio, S., Spada, A., Sgorbati, S., Sala, F. (2003). Evidence of a secondary grapevine domestication centre detected by SSR analysis. *Theoretical and Applied Genetics*. **107**: 1315-1320.
- Goszczynski**, D.E. e **Jooste**, A.E.C. (2002). The application of single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for the analysis of molecular heterogeneity of *Grapevine virus A*. *Vitis*. **41**:2, 77-82.
- Goszczynski**, D.E. (2007). Single-strand conformation polymorphism (SSCP), cloning and sequencing of *Grapevine virus A* (*GVA*) reveal a close association between related molecular variants of the virus and Shiraz disease in South Africa. *Plant Pathol*. **56**:755-762.
- Goszczynski**, D.E. (2010). Rugose wood-associated viroses do not appear to be involved in Shiraz (Syrah) decline South Africa. *Arch. Virol*. **155**:1463-1469.

- Goszczynski**, D.E. e **Habili**, N. (2012). *Grapevine virus A* variants of group II associated with Shiraz disease in South Africa are present in plants affected by Australian Shiraz disease, and have also been detected in the USA. *Plant Pathology*. **61**:1, 205-214.
- Goszczynski**, D.E. (2014). Complete genome sequence of a natural mutante of *Grapevine virus A* (GVA). *Arch Virol*. **159**: 2523-2528.
- Goussard**, H e **Bakker**, H. (2006). Characterisation of grapevines visually infected with Shiraz disease associated viruses. Wynboer. <http://www.wynboer.co.za/recentarticles/200612shiraz.php3>
- Gouveia**, P., Esteves, F., Santos, M.T., Fonseca, F., Eiras-Dias, J.E., Nolasco, G. (2009). Assessment of *GLRaV-3* variants occurring in Portuguese grapevine varieties according to the coat protein gene. In: Extended abstracts 16th meeting ICVG, Dijon, France, 31 August–4 September 2009. pp 316–317
- Gouveia**, P., Santos, M.T., Eiras-Dias, J.E., Nolasco, G. (2011). Five phylogenetic groups identified in the coat protein gene of grapevine leafroll-associated virus 3 obtained from Portuguese grapevine varieties. *Arch. Virol*. Doi: 10.1007/s00705-010-0878-7.
- Gugerli**, P., Brugger, J.J., Bovey, R. (1984). L'enroulement de la vigne: mise en évidence de particules virales et développement d'une méthode immuno-enzymatique pour le diagnostic rapide. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture* 16, 299-304.
- Gugerli** P., Rosciglione, B., Brugger, J.J., Bonnard, S., Ramel, M.E., Tremea, F. (1991). Further characterization of grapevine leafroll disease. *Extended Abstracts 11th Meeting of ICVG, Montreux, Switzerland*. 59-60.
- Hall**, T. A., (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analyses program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*. **41**: 95-98.
- Hamilton**, A., Voinnet, O., Chappell, L. & **Baulcombe**, D. (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J*. **21**: 4671–4679.
- Hannon**, G.J. (2002). RNA interference. *Nature*. **418**:244-251.
- Hewitt**, W.B., Goheen, A.C., Raski, D.J. e Gooding, G.V. (1962). Studies on Virus Diseases of Grapevine in California. *Vitis*. **3**: 57-83.
- Haviv**, S., Iddan, Y., Goszczynski, D.E. e Mawassi, M. (2012). The ORF5 of *Grapevine virus A* is involved in symptoms expression in *Nicotiana benthamiana* plants. *Annals of Applied Biology*. **160**: 2, 181–190.
- Hu**, G.J., Dong, Y.F., Zhang, Z.P., Fan, X.D., Fang, R. e Zhu, H.J. (2014) Detection and sequence analysis of *Grapevine virus B* isolates from China. *Acta Virol*. **58**(2):180-4.
- Jooste**, A.E., Maree, H.J., Bellstedt, D.U., Goszczynski, D.E., Pietersen, G., Burger, J.T. (2010). Three genetic grapevine leafroll-associated virus 3 variants identified from South African vineyards show high variability in their 5'UTR. *Arch Virol*. doi:10.1007/s00705-00010-00793-y (in press).
- Kosakovsky Pond**, S.L. and Frost, S.D.W. (2005) "Datamonkey: Rapid Detection of Selective Pressure on Individual Sites of Codon Alignments." *Bioinformatics*. **21**(10): 2531-2533.
- Kroll** H (1991) Sudosteuropa. In: Van Zeist W, Wasylikowa K, Behre KE (eds) Progress in old world palaeoethnobotany. Rotterdam-Brookfield, Balkema. 161–177
- Labra**, M., Winfield, M., Ghiani, A., Grassi, F., Sala, F., Scienza, A. e Failla, O. (2001) Genetic studies on Trebbiano and morphologically related varieties by SSR and AFLP markers. *Vitis*. **40**:187–190
- 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. e Higgins, D.G. (2007) "ClustalW and ClustalW version 2". *Bioinformatics*. **23** (21): 2947–2948.
- Librado**, P. e **Rozas**, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451-1452.

- Ling, K.S., Zhu, H.Y., Alvizo, H., Hu, J.S., Drong, R.F., Slightom, J.L. e Gonsalves, D. (1997)** The coat protein gene of grapevine leafroll associated closterovirus-3: cloning, nucleotide sequencing and expression in transgenic plants. *Arch Virol.* **142**:1101–1116
- Logothetis, B.C. (1970)** The development of the vines and of viticulture in Greece, Tessalonica, Aristotelion Panepistemion Tessalonikis (in Greek with summary in French)
- Mackenzie, D.J., McLean, M.A., Mukerji, S. e Green, M. (1997).** Improved RNA extraction from Woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription – polymerase chain reaction. *Plant Dis.* **81**:222-226.
- Mannini, F., Credi, R., Symons, R.H. (2000)** Appraisal of agronomic and enological modifications in the performances of grapevine clones after virus eradication. In: Extended abstracts 13th meeting ICVG, Adelaide, Australia, 12–17 March 2000. pp 151–152.
- Maree, H.J., Almeida, R.P.P., Bester, R., Chooi, K.M., Cohen, D., Dolja, V.V., Fuchs, M.F., Golino, D.A., Jooste, A.E.C., Martelli, G.P., Naidu, R.A., Rowhani, A., Saldarelli, P. e Burger, J.T. (2013)** Grapevine leafroll-associated virus 3. *Frontiers in Microbiology.* **4**, 82.
- Martelli, G.P. (1993).** Graft-Transmissible Diseases of Grapevines. *Handbook for Detection and Diagnosis.* Rome, Italy: FAO Publications Division.
- Martelli, G.P., Agranovsky, A.A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R.H., Dolja, V.V., Falk, B.W., Gonsalves, D., Jelkmann, W., Karasev, A.V., Minafra, A., Namba, S., Vetten, H.J., Wisler, G.C., Yoshikawa, N. (2002).** The family Closteroviridae revised. *Arch Virol.* **147**:2039–2044
- Martelli, G.P., Minafra, A., Saldarelli, P. (2011).** *Vitivirus.* Springer. 551-558.
- Martin, D. P. (2009).** Recombination detection and analysis using RDP3. *Methods Mol Biol.* **537**,185–205.
- McGovern, P.E. e Rudolph, H.M. (1996).** The analytical and archaeological challenge of detecting ancient wine: two case studies from the ancient Near East. In: McGovern PE, Fleming SJ, Katz SH, eds. The origins and ancient history of wine. *New York: Gordon and Breach.* 57–67.
- McGovern, P.E., Glusker, D.L., Exner, L.J. e Voigt, M.M. (1996)** Neolithic resinated wine. *Nature* **381**: 480–481.
- Masri, S., Rast, H., Johnson, R. e Monette, P. (2006)** *Grapevine virus C* and *grapevine leaf roll associated virus 2* are serologically related and appear to be the same virus. *Vitis.* **45**(2): 93-96.
- Mengden K. (1971).** Untersuchungen über eine Vergilbungskrankheit der Reben an Rhein, Mosel und Saar. *Weinberg und Keller* **18**, 345-431.
- Minafra, A., Saldarelli, P., Grieco, F., Martelli, G.P. (1994).** Nucleotide sequence of the 3' terminal region of the RNA of two filamentous grapevine viroses. *Arch. Virol.* **137**:249-261.
- Monette, P.L. e James, D. (1990).** Detection of two strains of *Grapevine virus A*. *Plant Disease* **74**, 898-900.
- Monette, P. L. e James, D. (1991)** Detection of a closterovirus-like particle from a corky bark-affected grapevine cultivar. *Vitis* **30**, 37-43.
- Monette, P. e Green, M. (1992)** Molecular weight and serological comparison of capsid protein of *Grapevine virus A* and a grapevine Corky bark-associated virus. *Canad. J. Plant Pathol.* **14**, 267-270.
- Nakaune, R., Toda, S., Mochizuki, M. e Nakano, M. (2008).** Identification and characterization of a new *Vitivirus* from grapevine. *Arch Virol.* **153**:1827-1832.
- Namba S., Boscia, D., Azzam O., Maixner, M., Hu, J.S., Golino, D. Gonsalves, D. (1991).** Purification and properties of closteroviruslike particles associated with grapevine corky bark disease. *Phytopathology* **81**, 964-970.
- Olmo, H.P. (1995)** The origin and domestication of vinifera grape. In: McGovern P, Fleming SJ, Katz SH (eds) The origin and ancient history of wine. Gordon and Breach, Luxembourg, pp 31–43

- Orita, M., et al.** (1989) Detection of Polymorphisms of Human DNA by Gel Electrophoresis as SSCPS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **86**: 2766-70.
- Osman, F., Hodzic, E., Omanska-Klusek, A., Olineka, T. e Rowhani, A.** (2013). Development and validation of a multiplex quantitative PCR assay for the rapid detection of *Grapevine virus A, B and D*. *Journal of Virology Methods*. **194**:138-145
- Rosciglione, B., Castellano, M.A., Martelli, G.P., Savino, V., Cannizzaro, G.** (1983). Mealybug transmission of *Grapevine virus A*. *Vitis* **22**, 331-347.
- Rosciglione, B., Gugerli, P.** (1986). Maladies de l'enroulement et du bois strié de la vigne: analyse microscopique et sérologique. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture* **18**, 207-211.
- Rosciglione, B. e Gugerli, P.** (1989). Transmission of grapevine leafroll disease and an associated closterovirus to healthy grapevine by the mealybug *Planococcus ficus*. *Phytoparasitica*. **17**, 63.
- Rozas, J.** (2009). DNA Sequence Polymorphism Analysis using DnaSP. Pp. 337-350. In Posada, D. (ed.) *Bioinformatics for DNA Sequence Analysis; Methods in Molecular Biology Series*. **537**. Humana Press, NJ, USA.
- Saldarelli, P., Keller, H., Dell'Orco, M., Schots, A., Elicio, V. e Minafra, A.** (2005). Isolation of recombinante antibodies (scFvs) to *Grapevine virus B*. *Elsevier*. *Journal of Virological Methods*. **124**: 191-195.
- Sefc, K.M., Lopes, M.S., Lefort, F., Botta, R., Roubelakis-Angelakis, K.A., Ibanez, I., Peji, H.W., Wagner, J., Glossl, H. e Steinkellner, H.** (2000) Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European region and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. *Theor Appl Genet*. **100**:489– 505
- Schauer, S. E., Jacobsen, S. E., Meinke, D. W. & Ray, A.** (2002). DICER-LIKE1: blind men and elephants in Arabidopsis development. *Trends Plant Sci*. **7**: 487–491.
- Shi, B., Habili, N., Gafny, R. e Symons, R.H.** (2004). Extensive Variation of Sequence within Isolates of *Grapevine virus B*⁺. *Virus Genes*. **29**:2, 279-285.
- Tajima, F.** (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**:585–595
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D. e Kumar, S.** (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 1- 5.
- Tanne, E., Ben-Dov, Y., Raccah, B.** (1989). Transmission of closterolike particles associated with grapevine leafroll by mealybugs (Pseudococcidae) in Israel. *Proceedings 9th Meeting of ICVG, Kiryat Anavim, Israel*. 71-73.
- Terral, J.F., Tabard, E., Bouby, L., Ivorra, S., Pastor, T., Figueiral, I., Picq, S., Chevance, J.B., Jung, C., Fabre, L., Tardy, C., Compan, M., Bacilieri, R.,Lacombe, T. e This, P.** (2010). Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome ans reveal origins of ancient European cultivars. *Annals of Botany*. **105**: 443-455.
- Turturo, C., Saldarelli, P., Yafeng, D., Digiario, M., Minafra, A., Savino, V., Martelli, G.P.** (2005). Genetic variability and population structure of Grapevine leafroll-associated virus 3 isolates. *J Gen Virol*. **86**:217–224.
- Xie, Z., Johansen, L. K., Gustafson, A. M., Kasschau, K. D., Lellis, A. D., Zilberman, D., Jacobsen, S. E. & Carrington, J. C.** (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol*. **2**: 642–652.
- Zimmermann, D., Bass, P., Legin, R., Walter, B.** (1990). Characterization and serological detection of four closterovirus-like particles associated with leafroll disease on grapevine. *Journal of Phytopathology* **130**, 205-218.

- Zohary, D.** e Spiegel-Roy, P. (1975) Beginnings of fruit growing in the old world. *Science* **187**:319–327
- Zohary D.** (1995). Domestication of the grapevine *Vitis vinifera* L. in the Near East. In: McGovern PE, Fleming SJ, Katz SH, eds. The origins and ancient history of wine. New York: Gordon and Breach, 23–30.
- Zohary, D.** e Hopf, M. (2000) Domestication of plants in the Old World, 3rd edn. New York: Oxford University Press, 151–159.
- Zorloni, A., Prati, S., Bianco, P.A. e Belli, G.** (2006). Transmission of *Grapevine virus A* and *Grapevine Leafroll-associated virus 3* by *Heliococcus bohemicus*. *Journal of Plant Pathology*. **88**:3, 325-328.

9. Anexos

9.1. Géis de DNA

9.1.1 Gel para PCR

Fez-se um gel de 1.5% de agarose em TAE (10X), adicionou-se 50µl de brometo (1mg/ml) e correu-se entre a 50V (para amostras de RNA) e 75V (para amostras de cDNA) para que as amostras entrem nos poços; depois colocou-se o transformador a uma voltagem de 100V para o resto da corrida.

9.2.1 Gel para Produto de Amplificação de colónias

Fez-se um gel de 1,5% de agarose em TAE (1X), adicionou-se 5µl de Green safe – 5µl de Green safe por cada 100ml de gel – e correu-se primeiramente a 75V, para entrar nos poços, e 100V para o restante tempo de corrida. Adicionou-se 8µl de amostra e 4µl de marcador.

9.3.1 Gel de acrilamida

Fez-se um gel de 8% de acrilamida em TBE (10X) com TEMED (10X) e APS 10%, para diferenciar os padrões SSCP. Adiciona-se H₂O (Sigma) estéril para prefazer o volume final, 10 ml. Corre a 4°C durante 3 horas a 200V e 400A.

9.2. Tampões e meios

9.2.1. Tampão TBE

O tampão TBE ou Tris/Borato/EDTA é vendido comercialmente e vem com uma concentração de 10X. Visto que para fazer um gel com a finalidade de correr amostras de RNA, o tampão tem de estar a 10X, é retirado diretamente do frasco comercial, com um pipeta descartável. Na tina de eletroforese coloca-se o volume necessário de TBE (10X) para correr o gel.

9.2.2 Tampão TAE

O tampão TAE é vendido comercialmente a uma concentração de 50X. Para a produção do gel de PCR, o tampão tem de ser diluído até atingir uma concentração final de 1X. Na tina de eletroforese, coloca-se o volume necessário de TAE (1X) para correr o gel.

9.2.3. Meio LB líquido

O meio LB (LuriaBertani) líquido foi feito da seguinte forma: adicionou-se 5g de tripton, 2,5g de extrato levedura e 5g de NaCl. Adicionou-se 450 ml de água destilada e deionizada e agitou-

se. Perfez-se o volume com o mesmo tipo de água até termos um volume final de 500ml. Autoclavou-se e armazenou-se no frigorífico (-20°C). Para o meio LB agar, procede-se da mesma forma que par o meio anterior, mas antes de autoclavar, adicionou-se 7,5g de agar e agitou-se. Armazenou-se também a -20°C.

9.2.5. Meio LB agar

Para o meio LB agar, procede-se da mesma forma que par o meio anterior, mas antes de autoclavar, adicionou-se 7,5g de agar e agitou-se. Armazenou-se também a -20°C.

9.2.6. Meio SOC

O meio SOC é feito através do LB líquido onde se adiciona glucose (1M).

9.2.7. Loading buffer 6%

Adiciona-se 60% de glicerol, com 60mM de EDTA e azul de bromofenol para corar. Para adicionar o loading buffer à amostra, este deve ter uma concentração final de 1%, logo procede-se à respetiva diluição.