

12 Detecção e caracterização molecular do gene da proteína capsial do *Grapevine fanleaf virus*, isolado RS

*Ana Paula Muterle Varela*¹; *Paula Radaelli*²; *Thor Vinicius Martins Fajardo*³; *Marcelo Eiras*⁴; *Gilmar Barcelos Kuhn*³; *Osmar Nickel*³

A degenerescência da videira é causada pelo *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), pertencente ao gênero *Nepovirus* (*Comoviridae*), e constitui-se em importante virose da viticultura mundial. O objetivo deste trabalho foi avançar na caracterização molecular de um isolado de GFLV do Rio Grande do Sul. O isolado viral, denominado RS, foi obtido de *Vitis vinifera* cv. Prosecco Tondo, da coleção de cultivares da Embrapa Uva e Vinho. Primeiramente, foi transmitido, mecanicamente, via extrato foliar tamponado, desta videira para *Chenopodium amaranticolor*. A extração de RNA total foi realizada utilizando-se um kit comercial. Para a amplificação de todo o gene da proteína capsial do GFLV foram realizadas quatro reações de RT-PCR, com os seguintes pares de oligonucleotídeos: 5-CP/GFLVc (549 pb), EV00N3/GFLVc (504 pb), GFLV-int-cp-v1/EV00N1 (1067 pb), GFLV-int-cp-v2/EV00N1 (705 pb) [EV00N1 e EV00N3 (Transg. Res. 13:165. 2004), 5-CP (Arch. Virol. 140:157. 1995), GFLVc (Phytopathol. 83:749. 1993), GFLV-int-cp-v1 e GFLV-int-cp-v2 (este trabalho)]. Os fragmentos de DNA amplificados foram ligados ao vetor pGEM-T, clonados em *E. coli* e seqüenciados. Aliquotas de RNAs totais (cvs. IAC 766 e Rupestris du Lot) foram depositadas sobre membranas de nylon (dot blot), e na síntese das sondas não radioativas foi utilizado um kit comercial (Roche), sendo a marcação do DNA realizada com digoxigenina e a detecção por quimioluminescência. As quatro seqüências obtidas foram alinhadas e a seqüência resultante, correspondente ao gene completo da proteína capsial do GFLV-RS, com 1.515 nucleotídeos e 504 aminoácidos deduzidos (GenBank EU038294), foi comparada a outras seqüências depositadas no GenBank. As identidades verificadas entre o isolado RS e outros isolados de GFLV variaram de 87-89%, para nucleotídeos, e de 94-96% para aminoácidos deduzidos. Sabe-se que alterações no gene da proteína capsial podem ter reflexos em todas as funções desta proteína. Utilizando-se sondas moleculares foi possível detectar todas as amostras infectadas, confirmando os resultados da RT-PCR.

¹ Estudante de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, UERGS. Estagiária da Embrapa Uva e Vinho, Caixa Postal 130, 95700-000 Bento Gonçalves, RS. Bolsista do CNPq. anapaulamut@gmail.com

² Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, UFRPE, Recife, PE. Estagiária da Embrapa Uva e Vinho. Bolsista do CNPq. radaelli@cnpuv.embrapa.br

³ Pesquisadores da Embrapa Uva e Vinho. thor@cnpuv.embrapa.br; kuhn@cnpuv.embrapa.br; nickel@cnpuv.embrapa.br

⁴ CPDSV, Instituto Biológico, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, 04014-002 São Paulo, SP.