

## Detecção e caracterização molecular dos genes da proteína capsidial de ilarvírus e ampelovírus que infectam fruteiras temperadas

### Detection and molecular characterization of ilarvirus and ampelovirus coat protein genes infecting temperate fruit trees

Thor Vinícius Martins Fajardo<sup>I\*</sup> Osmar Nickel<sup>I</sup> Marcelo Eiras<sup>II</sup>

- NOTA -

#### RESUMO

Dentre os principais patógenos que incidem em fruteiras temperadas, destacam-se o Prune dwarf virus (PDV), o Apple mosaic virus (ApMV) e o Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1). Neste trabalho foram realizadas a detecção e a caracterização molecular dos genes da proteína capsidial de isolados destas três espécies virais. RNAs totais foram extraídos de amostras de folhas de pessegueiros, macieiras e videiras e, nas reações de RT-PCR, foram utilizados oligonucleotídeos específicos para cada espécie viral. Os cDNAs amplificados foram clonados e sequenciados. Foram verificadas altas identidades entre as sequências de nucleotídeos dos genes da proteína capsidial dos isolados brasileiros de PDV, ApMV e GLRaV-1 e isolados de outros países, independente da origem geográfica e da hospedeira. O peso molecular da proteína capsidial destes vírus foi estimado por meio de Western blot em cerca de 24kDa (PDV), 26kDa (ApMV) e 39kDa (GLRaV-1).

**Palavras-chave:** PDV, ApMV, GLRaV-1, pessegueiro, macieira, videira.

#### ABSTRACT

Among the main pathogens infecting temperate fruit trees are Prune dwarf virus, Apple mosaic virus and Grapevine leafroll-associated virus 1. In this work the detection and molecular characterization of the coat protein genes of isolates from these viral species were carried out. Total RNA was extracted from peach, apple and grapevine leaves and RT-PCR reactions were performed using specific primers to each virus. The amplified cDNA fragments were cloned and sequenced. High identities were observed between coat protein nucleotide sequences of Brazilian isolates of PDV, ApMV and GLRaV-1 and isolates from other countries, independently from

geographic origin and host. Coat protein molecular weights of these viruses were estimated by Western blot to be ca. 24kDa (PDV), 26kDa (ApMV) and 39kDa (GLRaV-1).

**Key words:** PDV, ApMV, GLRaV-1, peach, apple, grapevine.

A virose do pessegueiro (*Prunus persica*), causada pelo “vírus do nanismo da ameixeira” (*Prune dwarf virus*, PDV), é uma das mais comuns nesta cultura, já tendo sido constatada no Brasil e em outros países do mundo. O PDV, em combinação com o “vírus da mancha anelar necrótica de *Prunus*” (*Prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV), é encontrado em muitas regiões produtoras de *Prunus* do mundo, podendo, neste caso, causar perdas econômicas de até 30% da produção (DANIELS, 2003; CAMBRA et al., 2008).

O “vírus do mosaico da macieira” (*Apple mosaic virus*, ApMV) também é um patógeno cosmopolita. O ApMV e o PDV compartilham algumas hospedeiras naturais nos gêneros *Prunus* (plantas de pêssego, ameixa, nectarina, cereja, amêndoa, avelã e damasco), *Malus* e *Pyrus* (maçã, pêra), *Rosaceae* (morango, framboesa, rosa), além do lúpulo. A sintomatologia normalmente consiste em mosaico foliar com manchas de coloração amarelo-creme a quase brancas. Como os sintomas foliares variam segundo a virulência do isolado e a sensibilidade da cultivar e podem ser muito tênues após invernos/primaveras

<sup>I</sup>Embrapa Uva e Vinho, CP 130, 95700-000, Bento Gonçalves, RS, Brasil. E-mail: thor@cnpuv.embrapa.br. \*Autor para correspondência.

<sup>II</sup>Instituto Biológico, São Paulo, SP, Brasil.

amenos, há o risco de passarem despercebidos. Após períodos de forte expressão de sintomas, podem ocorrer flores anormais, atrofiadas e queda de frutos jovens. O efeito do ApMV é especialmente danoso em infecções mistas (JONES & ALDWINCKLE, 2002; NICKEL & FAJARDO, 2009). O PDV e o ApMV pertencem à família *Bromoviridae*, gênero *Ilarvirus*, apresentam genoma de RNA de fita simples, positivo e trissegmentado, e possuem partículas virais quase isométricas. O RNA3, com cerca de 2000 nucleotídeos (nt), codifica a proteína capsial (CP). Estes vírus podem ser transmitidos via enxertia, na floração com pólen infectado transportado pelo vento, e também por meio de sementes (CAMBRA et al., 2008).

O enrolamento da folha, uma das principais doenças da videira, diminui a produção e a qualidade da uva e pode ser causado por diferentes espécies do “vírus do enrolamento da folha da videira” (*Grapevine leafroll-associated virus*, GLRaV). Pela incidência e importância econômica, no Brasil e em outros países vitícolas, destaca-se o GLRaV-1 (LIMA, 2009; MARTELLI, 2009). Este vírus pertence à família *Closteroviridae*, gênero *Ampelovirus*, e possui partícula alongada e flexuosa. Apresenta genoma composto por RNA fita simples, senso positivo, com cerca de 19500 nucleotídeos. É disseminado de maneira semipersistente por cochonilhas e transmitido através da enxertia, mas não é transmissível por inoculação mecânica (FAZELI & REZAIAN, 2000). A única hospedeira natural é a videira (*Vitis* spp.). Os sintomas típicos de enrolamento dos bordos da folha para baixo são observados nas cvs. europeias (*V. vinifera*), podendo provocar o definhamento das plantas (LIMA, 2009). Estas três espécies virais já foram relatadas em pomares e vinhedos do Brasil (DANIELS, 2003; NICKEL & FAJARDO, 2009; LIMA, 2009), entretanto, os isolados brasileiros ainda não foram caracterizados molecularmente. A sequência completa de nucleotídeos do gene da proteína capsial é empregada na classificação e filogenia de vírus que infectam plantas. Os objetivos deste trabalho foram detectar isolados locais de PDV, ApMV e GLRaV-1 e caracterizar molecularmente o gene da proteína capsial de um isolado de cada espécie viral.

Visando detectar o PDV, vinte amostras de pessegueiros das cvs. ‘Marli’ e ‘Chiripá’, de plantas adultas assintomáticas, provenientes de três pomares comerciais de Pinto Bandeira (RS), foram avaliadas por RT-PCR. Além disso, 20 amostras de macieiras das cvs. ‘Fuji Standard’, ‘Imperial Gala’, ‘Jonagold’, ‘Pink Lady’, ‘Golden Delicious’ e ‘Belgolden’, provenientes de pomares comerciais de Vacaria (RS), exibindo sintomas de mosaico foliar ou assintomáticas, foram avaliadas

por este mesmo teste quanto à presença de ApMV. Cinco amostras de videiras das cvs. ‘Petit Syrah’, ‘Cabernet Franc’ e ‘Red Globe’, provenientes de Petrolina (PE), exibindo sintomas de enrolamento dos bordos da folha e avermelhamento foliar com nervuras verdes, foram avaliadas por ELISA (FAJARDO et al., 2000). As amostras para os testes sorológico e molecular consistiram de folhas novas para PDV e ApMV ou nervuras de folhas maduras de videiras para GLRaV-1.

Os isolados das três diferentes espécies virais, obtidos neste trabalho e caracterizados foram: isolado MC1 de PDV, coletado em pessegueiro cv. Marli; isolado M003 de ApMV, coletado de macieira cv. ‘Fuji Standard’; e isolado PS de GLRaV-1, coletado de videira cv. ‘Petit Syrah’. As extrações de RNA total, a partir de 100mg de folhas de brotações novas de pessegueiro e macieira ou nervuras de folhas maduras de videira, foram realizadas utilizando-se o kit *RNeasy Plant Mini* (Qiagen). Procedeu-se à síntese do cDNA viral e às reações de PCR conforme descrito por FAJARDO et al. (2000). Os oligonucleotídeos empregados na RT-PCR foram: PDV-v1 (5’ ATGCTGGGAAAGCCATTAAT 3’) e PDV-c1 (5’ TCATCCACTGACTATTTTATCC 3’), ApMV-s (5’ ATGGTCTGCAAGTACTGTAATCAT 3’) e ApMV-as (5’ TCATAATTCTAACAAATCTTCATC 3’), GLRaV-1-v (5’ ATGGCTAGCGTTATATCTCAA 3’) e GLRaV-1-r (5’ TTACACCTTAAGCTCGCTAGTA 3’). As reações de PCR consistiram em 35 ciclos de desnaturação (94°C/50s), pareamento (50°C/50s) e extensão (72°C/1min). Os produtos das amplificações foram analisados em géis de agarose a 1,2%, preparados em tampão TBE, pH 8,0. Os fragmentos de DNA de tamanho esperado foram eluídos utilizando-se o kit *Perfectprep Gel Cleanup* (Eppendorf) e ligados aos vetores pGEM-T Easy (Promega) para PDV e GLRaV-1 e pCR2.1 (Invitrogen) para ApMV. As reações de ligação foram utilizadas na transformação, por choque térmico, de células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . O DNA plasmidial das colônias bacterianas transformadas foi extraído utilizando-se o kit *Flexi Prep* (Amersham Biosciences), e a confirmação da presença dos fragmentos correspondentes aos genes das CPs virais, nos plasmídeos recombinantes, foi realizada por digestão com a enzima de restrição *EcoRI*. Procedeu-se ao sequenciamento automático de nucleotídeos, resultando na obtenção das sequências completas dos genes da CP das três espécies virais. As comparações, aos pares, entre as sequências (nt e aminoácidos deduzidos) dos isolados caracterizados e outros disponíveis no GenBank foram realizadas utilizando-se o programa BLAST (bl2seq) do NCBI

([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Como o trabalho não objetivou determinar a diversidade ou a variabilidade genética das três espécies virais estudadas, reduzido número de amostras foi analisado, selecionando-se uma amostra positiva, por vírus, para ser sequenciada. Não foram observadas diferenças entre as sequências de nucleotídeos obtidas de diferentes clones para uma mesma espécie viral.

As proteínas capsidiais foram analisadas por eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE), utilizando-se o sistema de gel descontínuo (FAJARDO et al., 2000). As amostras foliares de pessegueiro, macieira e videira foram trituradas em tampão de extração TBS, pH7,5 com sulfito de sódio 0,2%, na proporção 1:5, e aplicadas no gel de SDS-PAGE. As frações proteicas separadas por eletroforese foram transferidas do gel à membrana de nitrocelulose, utilizando-se o aparelho de transferência Mini Trans-Blot Cell (BioRad), empregando-se tampão de transferência (Tris 25mM, glicina 192mM, metanol 20%, pH8,2). Após a transferência, as membranas foram tratadas com anticorpos, e as proteínas específicas visualizadas conforme FAJARDO et al. (2000), utilizando-se antissoros policlonais comerciais contra PDV (Biorad), ApMV (Bioreba) e GLRaV-1 (Agritest). O peso molecular das proteínas capsidiais dos três vírus foi calculado utilizando-se o *software* disponível em [http://ca.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html).

Das amostras de pessegueiros analisadas, 8 (40%) estavam infectadas com PDV, conforme resultados obtidos por RT-PCR. O cDNA obtido para o isolado MC1 foi clonado e dois clones foram sequenciados. As sequências de nucleotídeos (657 bp) (FJ360750) e de aminoácidos deduzidos (218aa) (ACI96310) do gene completo da proteína capsidial do isolado MC1 de PDV foram depositadas no GenBank. As identidades verificadas entre a sequência do isolado MC1 e 10 sequências de isolados da mesma espécie variaram de 94,5-95,7%, para nucleotídeos, e de 94,5-96,7 para aminoácidos deduzidos, compreendendo diferentes hospedeiras (cerejeira, damasqueiro e pessegueiro) de diferentes países europeus (Tabela 1). O peso molecular da proteína capsidial do PDV, isolado MC1, foi estimado por *Western blot* em cerca de 24kDa e calculado em 24,02kDa, estando de acordo com valores relatados em outros trabalhos (BACHMAN et al., 1994; CAMBRA et al., 2008).

Das amostras de macieiras avaliadas por meio de RT-PCR, 12 (60%) apresentaram-se infectadas pelo ApMV. O cDNA amplificado para o isolado M003 foi clonado, e dois clones foram sequenciados. A sequência completa do gene da proteína capsidial, com 672 nucleotídeos e 223 aminoácidos deduzidos, foi

depositada no GenBank com códigos de acesso GQ131805 e ACS12985, respectivamente. As identidades verificadas entre o isolado M003 e 10 sequências de isolados da mesma espécie variaram de 97-99,2%, para nucleotídeos, e de 97,6-100% para aminoácidos deduzidos, compreendendo diferentes hospedeiras (pereira, macieira e *Prunus* sp.) de duas diferentes regiões geográficas (Europa e Ásia) (Tabela 1). O peso molecular da proteína capsidial do ApMV, isolado M003, foi estimado por *Western blot* em cerca de 26kDa e calculado em 25,28kDa, estando de acordo com valores relatados em outros trabalhos (SHIEL et al., 1995).

Das amostras de videiras avaliadas, três (60%) estavam infectadas pelo GLRaV-1, conforme determinação realizada por ELISA. O cDNA amplificado para o isolado PS foi clonado, e três clones sequenciados. A sequência completa de nucleotídeos do gene da CP do GLRaV-1, com 969nt e 322 aminoácidos deduzidos, foi depositada no GenBank, com os códigos de acesso GQ332536 e ACT79559, respectivamente. O isolado PS apresentou maiores identidades de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos, que variaram de 89,1-94,5% e 89,8-98,7%, respectivamente, com cinco isolados de GLRaV-1 disponíveis no GenBank (Tabela 1), compreendendo isolados de videira de quatro continentes. O peso molecular da proteína capsidial do GLRaV-1, isolado PS, foi estimado em cerca de 39kDa por *Western blot* e calculado em 35,18kDa, resultado semelhante a determinações realizadas em outros trabalhos (FAZELI & REZAIAN, 2000). Pequenas diferenças em relação ao peso molecular da proteína capsidial, determinado por *Western blot* e calculado com base no somatório do peso molecular dos aminoácidos da proteína, são normais e atribuídas às características inerentes de cada processo de determinação.

A caracterização das espécies virais que incidem em *Prunus*, *Malus* e *Vitis* contribui para o desenvolvimento de ferramentas de diagnose mais sensíveis e específicas, e até mesmo para correlacionar tais informações com propriedades biológicas (sintomatologia, virulência, transmissão, etc.) apresentadas pelos vírus.

## AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento das bolsas de Iniciação Científica dos estudantes Jakeline K. Poppe e Salatiel W. da Silva (FAPERGS) e Rosane Giacomini (CNPq).

Tabela 1 - Identidades de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos dos genes da proteína capsidial dos isolados MC1, M003 e PS de PDV, ApMV e GLRaV-1, respectivamente, caracterizados neste trabalho, com outros isolados depositados em banco de dados (GenBank).

Vírus	Isolado	% ident. nt	% ident. aa	País	Hospedeira	Cód. Genbank (nt)	Cód. Genbank (aa)
PDV	SWM1	95,7	96,7	Polônia	cerejeira doce	GU181406	ACZ58168
	SOF15P11	95,7	96,3	Itália	cerejeira ácida	GU181404	ACZ58166
	PD8	95,5	96,7	Turquia	cerejeira	EF524271	ABQ96003
	SO63	95,4	96,3	Polônia	cerejeira ácida	GU181405	ACZ58167
	RS-38/1	95,2	96,3	Hungria	cerejeira ácida	AY554274	AAS59782
	PD2	95,1	95,4	Turquia	cerejeira	EF524265	ABQ95997
	4M2	94,6	95,8	Polônia	damasqueiro	EU170006	ABW04900
	5C3	94,6	95,8	Polônia	cerejeira doce	EU170005	ABW04899
	PE247	94,5	94,5	Polônia	pessegueiro	GU187047	ACZ92270
	SOF17P17	94,5	94,5	Itália	cerejeira ácida	GU181399	ACZ58161
ApMV	Kravare	99,2	99,5	R. Tcheca	pereira	AY542543	AAT11880
	Iv10	99,2	100,0	R. Tcheca	pereira	AY542542	AAT11879
	Roz144	99,1	99,5	R. Tcheca	pereira	AY542545	AAT11882
	It1	98,8	98,6	Itália	pereira	AY542546	AAT11883
	Srinagar	98,3	98,6	Índia	macieira	FN435316	CBA13479
	Cerin	97,4	98,5	R. Tcheca	pereira	AY542544	AAT11881
	n.i.	97,1	98,2	Índia	macieira	FN435314	CBA13477
	Kashmir	97,0	97,6	Índia	<i>Prunus</i> sp.	FN546183	CBB38540
	Shimla	97,0	97,6	Índia	macieira	FN435317	CBA13480
	Palampur	97,0	97,6	Índia	n.i.	FN547927	CBD77426
GLRaV-1	WC*	94,5	96,1	África do Sul	videira	EF103902	ABM05865
	E-9*	91,7	98,7	China	videira	GQ246622	ACT31733
	IR-S7	91,1	94,4	Irã	videira	FJ952151	ACV52939
	n.i.	90,8	93,4	Austrália	videira	AF195822	AAF22742
	Cl-666*	89,1	89,8	Chile	videira	GQ415404	ACZ37434

n.i. = não informado; \*gene incompleto da proteína capsidial.

Obs: Para GLRaV-1, há apenas cinco sequências do gene da proteína capsidial disponíveis no GenBank.

## COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

O CQB da Embrapa Uva e Vinho está registrado na CTNBio sob o n. 0227/06.

## REFERÊNCIAS

BACHMAN, E.J. et al. The complete nucleotide sequence of *Prune dwarf ilarvirus* RNA3: implications for coat protein activation of genome replication in Ilarviruses. **Virology**, v.201, p.127-131, 1994. Disponível em: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MIimg&\\_imagekey=B6WXR-45NJM3J-3B-1&\\_cdi=7165&\\_user=7430124&\\_pii=S0042682284712724&\\_origin=search&\\_coverDate=05%2F15%2F1994&\\_sk=997989998&view=c&wchp=dGLzVzb-zSkzS&md5=2838c4d1c37d7d1534a90c9fcb5b6a24&ie=/sdarticle.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6WXR-45NJM3J-3B-1&_cdi=7165&_user=7430124&_pii=S0042682284712724&_origin=search&_coverDate=05%2F15%2F1994&_sk=997989998&view=c&wchp=dGLzVzb-zSkzS&md5=2838c4d1c37d7d1534a90c9fcb5b6a24&ie=/sdarticle.pdf)>. Acesso em: 06 out. 2010. doi: 10.1006/viro.1994.1272.

CAMBRA, M. et al. Viruses and viroids of peach trees. In: LAYNE, D.R.; BASSI, D. **The peach: botany, production and uses**. Wallingford: CABI, 2008. p.435-466.

DANIELS, J. Doenças causadas por vírus. In: FORTES, J.F.; OSÓRIO, V.A. **Pêssego: fitossanidade**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.21-22.

FAJARDO, T.V.M. et al. Caracterização parcial de um isolado do *Grapevine fanleaf virus*. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.505-511, 2000.

FAZELI, C.F.; REZAIAN, M.A. Nucleotide sequence and organization of ten open reading frames in the genome of *Grapevine leafroll-associated virus 1* and identification of three subgenomic RNAs. **Journal of General Virology**, v.81, p.605-615, 2000. Disponível em: <<http://vir.sgmjournals.org/cgi/reprint/81/3/605>>. Acesso em: 06 out. 2010.

JONES, A.L.; ALDWINCKLE, H.S. **Plagas y enfermedades del manzano y del peral**. Madrid: APS - Ediciones Mundi-Prensa, 2002. 99p.

LIMA, M.F. **Deteção e controle de viroses em videira**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2009. 9p. Disponível em: <[http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/public\\_eletronica/downloads/CTE90.pdf](http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/public_eletronica/downloads/CTE90.pdf)>. Acesso em: 03 set. 2010.

MARTELLI, G.P. Grapevine virology highlights 2006-09. In: MEETING OF INTERNATIONAL COUNCIL OF VIRUSES AND VIRUS DISEASES OF GRAPEVINE, 16., 2009, Dijon, France. **Extended abstracts...** Dijon: ICVG, 2009. p.15-23. Disponível em: <<http://www.icvg.ch/data/icvg%202009%20part%201%20%20%20pp%201-131.pdf>>. Acesso em: 06 out. 2010.

NICKEL, O.; FAJARDO, T.V.M. **Obtenção de material propagativo livre de vírus e diagnóstico de vírus em macieiras e pereiras.** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2009. 55p. (Documentos, 69).

SHIEL, P.J. et al. The complete nucleotide sequence of *Apple mosaic virus* RNA3. **Archives of Virology**, v.140, p.1247-1256. 1995.