



**Contextualização dos aspectos relacionados à produção de uva e vinho e levantamento da ocorrência de vírus e viroides em videiras na região vitivinícola de São Roque, SP**

**Cátia Jacira Martins de Moura**

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Eiras

**São Paulo**

**2017**

**INSTITUTO BIOLÓGICO**

**PÓS-GRADUAÇÃO**

**Contextualização dos aspectos relacionados à produção de uva e vinho e levantamento da ocorrência de vírus e viroides em videiras na região vitivinícola de São Roque, SP**

**Cátia Jacira Martins de Moura**

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Eiras

**São Paulo**

**2017**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo**  
**Núcleo de Informação e Documentação – IB**

---

Moura, Cátia Jacira Martins de.

Contextualização dos aspectos relacionados à produção de uva e vinho e levantamento da ocorrência de vírus e víroides em videiras na região vitivinícola de São Roque, SP. / Cátia Jacira Martins de Moura. – São Paulo, 2017.  
77 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Marcelo Eiras.

Versão do título para o inglês: Contextualization of aspects related to grape and wine production and survey of the occurrence of viruses and viroids infecting vines in the region of São Roque, SP.

1. Detecção 2. RT-PCR em tempo real 3. Vinhedo 4. Virose. I. Moura, Cátia Jacira Martins de II. Eiras, Marcelo III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título

*IB/Bibl./2017/001*

---



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
**INSTITUTO BIOLÓGICO**

Pós-Graduação  
Av. Cons. Rodrigues Alves 1252  
CEP 04014-002 - São Paulo - SP  
[secretariapg@biologico.sp.gov.br](mailto:secretariapg@biologico.sp.gov.br)



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Nome do candidato:** Cátia Jacira Martins de Moura

**Título:** Contextualização dos aspectos relacionados à produção de uva e vinho, e levantamento da ocorrência de vírus e viroides em videiras na região vitivinícola de São Roque, SP

**Orientador(a):** Marcelo Eiras

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

\*Prof. (a) Dr.(a): Marcelo Eiras

\*Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:

\*Prof. (a) Dr.(a): Thor Vinícius Martins Fajardo

\*Instituição: Embrapa Uva e Vinho

Assinatura:

\*Prof. (a) Dr.(a): Juliana Freitas-Astúa

\*Instituição: Instituto Biológico/Embrapa Mandioca e Fruticultura

Assinatura:

*A minha mãe Eurípia e minha filha Nicolle,  
por confiarem e me apoiarem nas minhas  
decisões desde o princípio.*

*Ao meu marido Márcio, pelo amor,  
dedicação e apoio incondicional em cada  
uma das etapas que levaram a este trabalho.*

*DEDICO*

## Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Eiras, pesquisador do Instituto Biológico/SP, pelo apoio, receptividade, ensinamentos, preciosas oportunidades de crescimento profissional que me proporcionou, pela presença constante no desenvolvimento deste trabalho e amizade que levarei para sempre na memória e no coração.

Ao Dr. Thor Vinícius Martins Fajardo, pesquisador da Embrapa Uva e Vinho/RS, por ter disponibilizado o Laboratório de Virologia, pela amizade, pela oportunidade de valioso aprendizado durante o desenvolvimento deste trabalho e, principalmente, pela disposição e competente orientação.

Ao Professor Dr. Marcio Pereira do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, *campus* São Roque pelos ensinamentos, orientação na área de entomologia, e por me auxiliar, oferecendo tudo o que estivesse ao seu alcance para que esta etapa pudesse ser concluída.

Ao Dr. Ricardo Harakava pelo auxílio nas análises moleculares.

À Dra. Yara M. Chagas de Carvalho, pesquisadora do Instituto de Economia Agrícola, que sempre me recebeu de braços abertos e com extrema boa vontade, auxiliando nas análises socioeconômicas e na elaboração dos questionários.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação (PPG) em “Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio” do Instituto Biológico, por proporcionaram experiências de aprendizado na área acadêmica, que levarei para sempre.

À secretária do PPG, Samira F. Pizolato, que esteve sempre à disposição para sanar quaisquer dúvidas e prestar auxílios necessários.

Aos pesquisadores científicos e colegas do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia do Instituto Biológico: Addolorata Colariccio, Alexandre Levi Rodrigues Chaves, Ligia Maria Lembo Duarte, Maria Amélia Vaz Alexandre, Agatha Mota de Oliveira, Alyne de Fátima Ramos, Carolina Faria, Daniel Lima Santos, Danielle Gobatto, Leilane Karam Rodrigues e Renato Brogia Ferreira.

Aos pesquisadores e colegas do Laboratório de Virologia da Embrapa Uva e Vinho de Bento Gonçalves/RS: Dr. Osmar Nickel, Marcos Fernando Vanni, Elisandra Cunha e Alexis Kin, pela acolhida, aprendizado, excelente convivência e bons momentos compartilhados.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa desta dissertação: Dr. Thor Vinícius Martins Fajardo e Dra. Juliana Freitas-Astúa pela participação nessas etapas, disposição, além das excelentes sugestões no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro (bolsa de Mestrado – cota do PPG).

Ao Instituto Biológico, representado por seus dirigentes, por oferecer a oportunidade de crescimento em mais uma etapa da minha vida profissional.

À Embrapa Uva e Vinho/RS, representada por seus dirigentes, por disponibilizar o Laboratório de Virologia Vegetal para a realização deste trabalho.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, *campus* São Roque, por ter atuado na aproximação dos produtores de uva e vinho do município e os responsáveis por este trabalho.

Aos produtores de uva e vinho do município de São Roque/SP, por disponibilizar tempo para conceder entrevistas e por permitir o acesso aos vinhedos para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Vitor Cezar Pacheco da Silva, pelo valioso auxílio na identificação das cochonilhas.

À minha filha Nicolle Moura Aleixo pela compreensão nos momentos da minha ausência, pelo incentivo e por estar sempre presente em todas as etapas da minha vida.

À minha mãe Eurípia Passagem pelo amor incondicional, pelo incentivo, por acreditar na minha capacidade e estar sempre presente em todos os momentos da minha vida.

E por fim, a todos os familiares e amigos, especialmente a Laura Coutinho por sua alegria, amizade, apoio e dedicação, durante minha permanência em Bento Gonçalves/RS.

A todos deixo meu sentimento de eterna gratidão!

Muito obrigada!

*“A persistência é o menor caminho do êxito”.*

*(Charles Chaplin)*



MOURA, Cátia Jacira Martins. **Contextualização dos aspectos relacionados à produção de uva e vinho e levantamento da ocorrência de vírus e viroides em videiras na região vitivinícola de São Roque, SP.** São Paulo - SP. 2017. 80 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2017.

## RESUMO

O cultivo da videira, dentre as fruteiras de clima temperado, por sua importância socioeconômica e área cultivada, é um dos mais expressivos do mundo. Entretanto, diversos patógenos infectam as videiras, resultando em doenças de importância econômica, com destaque para os vírus e viroides. Os objetivos deste trabalho foram: (i) determinar a incidência de vírus e viroides em 119 amostras de 32 cultivares de videira, coletadas em nove vinhedos do município de São Roque, SP; (ii) caracterizar isolados do *Grapevine Syrah virus 1* (GSyV-1) e *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3). Realizaram-se reações de RT-qPCR para a detecção dos seguintes vírus: *Grapevine Cabernet Sauvignon reovirus* (GCSV), GSyV-1, *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), GLRaV-3 e *Grapevine fleck virus* (GFkV), além do *Grapevine yellow speckle viroid 1* (GYSVd-1). Exceto para GCSV, os vírus e o viroide avaliados tiveram ocorrência comum nas áreas amostradas, muitas vezes em alta incidência e em coinfeções, variando de 15% a 76%. Oito isolados de GSyV-1 e seis de GLRaV-3 tiveram o gene da proteína capsidial sequenciado, resultando em elevado percentual de identidade de nucleotídeos (91,7 a 99,8% - GSyV-1 e 98,9 a 100% - GLRaV-3). Este é o primeiro relato de GSyV-1 em vinhedos comerciais no Brasil. Demonstrou-se que as infecções virais foram generalizadas, provavelmente devido ao uso de material propagativo infectado. Foram realizadas entrevistas com produtores de uva e vinho de São Roque, com objetivo de caracterizar o nível tecnológico da produção. Apesar de problemas relativos à fitossanidade, dificuldade em contratar mão de obra especializada e especulação imobiliária, dez dos quatorze produtores entrevistados nunca interromperam as atividades vitivinícolas, 69% das propriedades estão localizadas na “Rota do Vinho”, 92% têm estradas asfaltadas e 69,2% têm área de até 10 hectares. Apesar de ainda dependerem, em grande parte, da uva e dos vinhos trazidos do Rio Grande do Sul, nove produtores possuem vinhedos próprios, e destes, quatro produzem uvas para vinificação. Todos os entrevistados consideraram os parreirais importantes para o enoturismo e têm contribuído para aumentar o interesse pelos produtos vitivinícolas, o que tem gerado aumento de renda para os produtores.

**PALAVRAS-CHAVE:** Detecção. RT-PCR em tempo real. Vinhedo. Virose. *Vitis*.

MOURA, Cátia Jacira Martins. **Contextualization of aspects related to grape and wine production and survey of the occurrence of viruses and viroids infecting vines in the region of São Roque, SP.** São Paulo - SP. 2017 80 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2017.

### ABSTRACT

The cultivation of grape, among the temperate fruit trees, considering its socioeconomic importance and cultivated area, is one of the more expressive in the world. However, several plant pathogens affect grape, resulting in diseases of economic importance, with emphasis on viruses and viroids. The aims of this work were: (i) to determine the incidence of viruses and viroids in 119 samples of 32 grapevine cultivars collected in nine vineyards in the municipality of São Roque, SP; (ii) to characterize isolates of *Grapevine Syrah virus 1* (GSyV-1) and *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3). RT-qPCR reactions were performed to detect the following viruses: *Grapevine Cabernet Sauvignon reovirus* (GCSV), GSyV-1, *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), GLRaV-3 and *Grapevine fleck virus* (GFkV), in addition to *Grapevine yellow speckle viroid 1* (GYSVd-1). Except for GCSV, the evaluated viruses and viroid were considered common in the sampled areas, often at high incidence and in coinfections, ranging from 15% to 76%. Eight isolates of GSyV-1 and six of GLRaV-3 had their coat protein genes sequenced, showing high percentage of nucleotide identity (91.7 to 99.8% - GSyV-1 and 98.9 to 100% - GLRaV-3) among themselves. This is the first report of GSyV-1 in commercial vineyards in Brazil. Viral infections have been reported to be widespread, probably due to the use of infected propagative material. Interviews were conducted with grape and wine producers from São Roque, aiming at characterizing the level of technological production. Despite problems with plant health, difficulty of hiring specialized labor and real estate speculation, ten of the fourteen producers interviewed never interrupted their activities, 69% of the properties are located on the "wine route", 92% have asphalted roads and 69.23% have an area of up to 10 hectares. Although they still depend on the grape and the wines brought from Rio Grande do Sul, nine producers have their own vineyards, and of these, four produce grapes for winemaking. For all the interviewees, the vineyards were considered important for wine tourism, and have contributed to the increase of interest in wine products, which has generated an increase in the producers' income.

**KEYWORDS:** Detection. Real time RT-PCR. Vineyard. *Vitis*.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Espécies de vírus e viroides descritos infectando videira ( <i>Vitis</i> spp.) no Brasil, e seus vetores. Adaptada de Basso et al. (2014).....	9
<b>Tabela 2.</b> Propriedades amostradas no município de São Roque, SP e número de amostras coletadas em cada local.....	21
<b>Tabela 3.</b> Cultivares de videira e amostras por propriedade coletadas no município de São Roque,SP.....	22
<b>Tabela 4.</b> Oligonucleotídeos e sondas utilizadas na detecção de vírus e viroide em videira por RT-PCR em tempo real (TaqMan).....	25
<b>Tabela 5.</b> Informações sobre os isolados de GSyV-1 e GLRaV-3 coletados em São Roque (SP) e caracterizados neste trabalho.....	28
<b>Tabela 6.</b> Resultado da indexação viral por RT-qPCR para sete vírus e um viroide em 119 amostras de videira coletadas no município de São Roque, SP.....	33
<b>Tabela 7.</b> Amostras de cochonilhas e resultados da indexação viral por RT-qPCR.....	42
<b>Tabela 8.</b> Comparação entre as detecções de GLRaV-3 e GSyV-1 por RT-PCR em tempo real e RT-PCR convencional.....	44
<b>Tabela 9.</b> Clonagem e sequenciamento do gene da proteína capsidial (CP) do GSyV-1.....	47
<b>Tabela 10.</b> Clonagem e sequenciamento do gene da proteína capsidial (CP) do GLRaV-3...48	
<b>Tabela 11.</b> Comparação (em porcentagem) dos valores de identidade entre as sequências de nucleotídeos (abaixo diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima diagonal) do gene da proteína capsidial (627 pb e 208 aad) dos isolados brasileiros do <i>Grapevine Syrah virus 1</i> ....	52
<b>Tabela 12.</b> Comparação (em porcentagem) dos valores de identidade entre as sequências de nucleotídeos (abaixo diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima diagonal) do gene da proteína capsidial (942 pb e 313 aad) dos isolados brasileiros do <i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i> .....	53

**Tabela 13.** Caracterização dos produtores em relação ao ano em que a família iniciou o plantio de uva e a elaboração de vinho na região de São Roque/SP.....55

**Tabela 14.** Caracterização do número de propriedades em relação à produção de uva própria, e de terceiros, além de uvas americanas e finas (%).....58

**Tabela 15.** Caracterização dos produtores de uva e vinho de São Roque quanto à faixa etária.....61

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Sintomas de viroses em videira. (A) Caneluras do tronco, (B e F) Complexo do lenho rugoso da videira em ramos apresentando intumescimento e rachaduras na base do ramo, (C, D e E) Enrolamento da folha em diferentes cultivares e estádios de desenvolvimento dos sintomas. Fotos: Cátia J. M. Moura (2016).....8
- Figura 2.** Cochonilhas que infestam videiras, coletadas em vinhedos do município de São Roque/SP. Fotos: Cátia J. M. Moura (2016).....16
- Figura 3.** Vistas de alguns complexos enoturísticos do município de São Roque, SP. **A** – Vinícola Bella Quinta, **B** – Vinícola Palmeiras, **C** – Vinícola Goes, **D** – Vinhos Canguera, **E** – Vinhos Bella Aurora. Fotos: Cátia J. M. Moura (2016).....20
- Figura 4.** Parreirais típicos no município de São Roque, SP. **A** – Fazenda Jubair, **B** - Sítio Pessegueiro, **C** - Sítio Canguera, **D** - Sítio Abaçai, **E** - Sítio Boa Esperança, **F** - Sítio Pessegueiro. Fotos: Cátia J.M. Moura (2016).....20
- Figura 5.** Mapa do estado de São Paulo destacando com a localização do município de São Roque. Fonte: IBGE - Dados 2012.....21
- Figura 6.** Folhas com sintomas de viroses ou semelhantes a virose e folhas assintomáticas coletadas nos vinhedos amostrados. Fotos: Cátia J. M. Moura (2016).....23
- Figura 7.** Vista geral das propriedades vitivinícolas do município de São Roque, com identificação das propriedades conforme numeração na imagem: **1** - Chácara das Flores, **2** - Fazenda Jubair e Cinzano, **3** - Sítio Abaçai, **4** - Sítio Água Branca, **5** - Sítio Boa Esperança, **6** - Sítio Canguera, **7** - Sítio Pessegueiro, **8** - Sítio XV de Novembro, **9** - Vinícola Bella Aurora, **10** - Vinhos Santa Terezinha e Quinta dos Guimarães, **11** - Vinhos Palmeiras, **12** - Vinhos Frank, **13** - Chácara Sabbatini, **14** - Vinhos Quinta do Nino. Os pontos vermelhos destacam a Estrada do Vinho.....30
- Figura 8.** Curvas de amplificação do 18S rRNA para comprovar indiretamente a integridade e a qualidade do RNA total extraído de amostras de videira coletadas em São Roque, SP.....31

- Figura 9.** Representação gráfica da incidência (em % de infecção) para sete espécies virais e um viroide, em 119 amostras de videiras coletadas no município de São Roque, SP, em 2016, e avaliadas por RT-PCR em tempo real (amostras infectadas/amostras analisadas)..... 32
- Figura 10.** Resultado gráfico da amplificação por RT-PCR em tempo real de algumas amostras de videiras infectadas com diferentes isolados de GLRaV-3. Curvas de amplificação para 16 amostras infectadas..... 37
- Figura 11.** Resultado gráfico da amplificação por RT-PCR em tempo real de algumas amostras de videiras infectadas com diferentes isolados de GVA. Curvas de amplificação para 10 amostras infectadas. ....38
- Figura 12.** Resultado gráfico da amplificação por RT-PCR em tempo real de algumas amostras de videiras infectadas com diferentes isolados de GVB. Curvas de amplificação para oito amostras infectadas..... 38
- Figura 13.** Resultado gráfico da amplificação por RT-PCR em tempo real de algumas amostras de videiras infectadas com diferentes isolados de GSyV-1. Curvas de amplificação para 13 amostras infectadas..... 39
- Figura 14.** Resultado gráfico das reações de RT-PCR em tempo real para algumas amostras de videiras saudáveis para o GCSV. Curvas de amplificação para quatro amostras (negativas) saudáveis ..... 39
- Figura 15.** Resultado gráfico da amplificação por RT-PCR em tempo real de algumas amostras de videiras infectadas com diferentes isolados de GRSPaV. Curvas de amplificação para 10 amostras infectadas..... 40
- Figura 16.** Resultado gráfico da amplificação por RT-PCR em tempo real de algumas amostras de videiras infectadas com diferentes isolados de GFkV. Curva de amplificação para 10 amostras infectadas..... 40
- Figura 17.** Resultado gráfico da amplificação por RT-PCR em tempo real de algumas amostras de videiras infectadas com diferentes isolados de GYSVd-1. Curvas de amplificação para 10 amostras infectadas..... 41

**Figura 18.** Resultado gráfico da amplificação por RT-PCR em tempo real de 28 amostras de cochonilhas. **A.** Curva de amplificação para uma amostra infectada com GVB. **B.** Curvas de amplificação para 17 amostras infectadas com GLRaV-3. **C.** Curvas de amplificação para cinco amostras infectadas com GVA..... 43

**Figura 19.** Produtos da amplificação por meio de RT-PCR visualizados em gel de agarose (1,2%), objetivando a caracterização do gene da proteína capsidial do GSyV-1 a partir de diferentes cultivares de videira. Oligonucleotídeos utilizados: GVQCP-F/GVQCP-R. Amostras: (1) videira sadia (controle negativo), (2) amostra 68 (cv. Touriga Nacional), (3) amostra 81 (cv. Touriga Nacional) e (4) amostra 118 (cv. Alfrocheiro). A seta indica o produto da amplificação, DNA de 723 pb. M: marcador DNA  $\lambda$ /PstI.....45

**Figura 20.** Produtos da amplificação por meio de RT-PCR visualizados em gel de agarose (1,2%), objetivando a caracterização do gene da proteína capsidial do GLRaV-3 a partir de diferentes cultivares de videira. Oligonucleotídeos utilizados: 8504v/9445c. Amostras: (1) videira infectada com GLRaV-3 (controle positivo), (2) videira sadia (controle negativo), (3) amostra 5 (cv. Niágara Rosada), (4) amostra 37 (cv. BRS Margot), (5) amostra 48 (cv. Chardonnay), (6) amostra 82 (cv. Touriga Nacional), (7) amostra 100 (cv. BRS Violeta) e (8) amostra 119 (cv. Moscato Setubal). A seta indica o produto da amplificação, DNA de 942 pb. M: marcador DNA  $\lambda$ /PstI.....46

**Figura 21.** Digestão dos plasmídeos recombinantes com *EcoRI* e liberação dos insertos correspondentes à proteína capsidial, visualizados, após eletroforese, em gel de agarose (1,2%). Proteínas capsidiais com 942 pb do GLRaV-3 (seta verde) e 723 pb (seta vermelha) do GSyV-1 M: marcador DNA  $\lambda$  /PstI; poços 17 ao 20: Clones da amostra 119 – ‘Moscato Setubal’; poços 21 ao 24: Clones da amostra 68 – ‘Touriga Nacional’; poços 25 ao 28: Clones da amostra 118 – ‘Touriga Nacional’; poços 29 ao 32: Clones da amostra 118 – ‘Alfrocheiro’..... 46

**Figura 22.** Sequências virais do *Grapevine Syrah virus 1*, isolado TR1-BR (amostra 68, cv. Touriga Nacional), correspondentes aos nucleotídeos (linha superior) e aos aminoácidos deduzidos (linha inferior) do gene completo da proteína capsidial (CP) com 627 pb e 208 aad (fragmento amplificado de 723 bp). Código do depósito no GenBank KX458475. Nucleotídeos em negrito correspondem aos iniciadores utilizados na reação de amplificação por RT-PCR e, em vermelho, ao gene da proteína capsidial..... 47

**Figura 23.** Sequências virais do *Grapevine leafroll-associated virus 3*, isolado NR-BR (amostra 5, cv. Niágara Rosada), correspondentes aos nucleotídeos (linha superior) e aos aminoácidos deduzidos (linha inferior) do gene completo da proteína capsial (CP) com 942 pb e 313 aad. Código do depósito no GenBank KX499443. Nucleotídeos em negrito correspondem aos iniciadores utilizados na reação de amplificação por RT-PCR..... 48

**Figura 24.** Árvore filogenética com base no alinhamento de sequências de nucleotídeos de cinco isolados (REB-BR, MAR-BR, TR1-BR, TR2-BR, ALF-BR) de São Roque e três (MH, TRAJ-BR, VF-BR) de Bento Gonçalves, Sudeste e Sul do Brasil, respectivamente e outros isolados estrangeiros de GSYV-1. A árvore foi construída pelo método de máxima parcimônia, utilizando o MEGA 6.0, com suporte (*bootstrap*) a partir de 10.000 replicações. Os nomes dos isolados de GSYV-1 foram incluídos de acordo com os códigos de acesso no GenBank, sendo que os grupos específicos foram indicados. *Maize rayado fino virus*, MRFV (*Tymoviridae*, *Marafivirus*) (NC\_002786) foi utilizado como grupo externo. Bar = número de substituições por sítio.....49

**Figura 25.** Árvore filogenética com base no alinhamento de sequências de nucleotídeos de seis isolados (NR-BR, MARG-BR, CH-BR, TN-BR, VI-BR, MS-BR) obtidas de São Roque, cinco (RC-PE, Pet-1, Pet-2, Pet-3, Pet-4) de Petrolina e um (IS2) de Bento Gonçalves, Sudeste, Nordeste e Sul do Brasil, respectivamente e outros isolados estrangeiros de GLRaV-3. A árvore foi construída pelo método de máxima parcimônia, utilizando o programa MEGA 6.0 (com teste de *bootstrap* para 10.000 replicações). Os nomes dos isolados de GLRaV-3 foram incluídos de acordo com os códigos de acesso no GenBank, e os grupos específicos foram indicados. *Grapevine-leafroll associated virus 1*, GLRaV-1 (*Closteroviridae*, *Ampelovirus*) (NC\_016509) foi utilizado como grupo externo. Bar = número de substituições por sítio..... 51

**Figura 26.** Tamanho em hectares das propriedades vitícolas no município de São Roque/SP..... 56

**Figura 27.** Representação gráfica da caracterização da distribuição da área (em hectares) das propriedades cultivadas com videira e outras culturas..... 57

**Figura 28.** Números de municípios e de fornecedores por município de uva e derivados para os produtores de São Roque, SP..... 59



- Figura 29.** Números de propriedades localizadas na Rota do Vinho com produção de uva e vinho que possuem acesso ao asfalto..... 60
- Figura 30.** Grau de escolaridade dos produtores de uva e vinho em São Roque..... 61
- Figura 31.** Gráfico com defensivos agrícolas usados no controle de pragas e doenças da videira pelos produtores no município de São Roque, SP..... 64
- Figura 32.** Periodicidade de aplicação de defensivos agrícolas nas propriedades vitícolas de São Roque, SP. .... 64

## APÊNDICE

Apêndice - Questionário apresentado aos produtores vitícolas do município de São Roque, Estado de São Paulo .....	78
--	----

## SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
APÊNDICES.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1. Objetivo geral.....	5
2.2. Objetivos específicos.....	5
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
3.1. A cultura da videira no Brasil.....	6
3.2. A importância das viroses no Brasil.....	7
3.3. Principais vírus e viroides que infectam a videira.....	8
3.3.1. <i>Grapevine Syrah virus-1</i> (GSyV-1):.....	10
3.3.2. <i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i> (GLRaV-3):.....	11
3.3.3. <i>Grapevine virus A</i> (GVA):.....	11
3.3.4. <i>Grapevine fleck virus</i> (GFkV):.....	12
3.3.5. <i>Grapevine Cabernet Sauvignon reovirus</i> (GCSV):.....	12
3.3.6. <i>Grapevine virus B</i> (GVB):.....	13
3.3.7. <i>Grapevine rupestris stem pitting-associated virus</i> (GRSPaV):.....	13
3.3.8. <i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i> (GLRaV-1):.....	13
3.3.9. <i>Grapevine yellow speckle viroid 1</i> (GYSVd-1):.....	14
3.4. Diagnóstico de doenças causadas por vírus e viroides em videira.....	15
3.5. Transmissão de vírus e viroides em videira.....	15
3.6. A história da vitivinicultura em São Roque, estado de São Paulo.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. Coleta dos isolados virais.....	21
4.2. Extração de RNA total.....	23
4.3. Detecção por RT-PCR em tempo real (RT-qPCR TaqMan).....	24
4.4. Detecção por RT-PCR convencional.....	27
4.5. Clonagem e seleção de clones recombinantes.....	27
4.6. Estudo de homologia de sequências.....	28
4.7. Detecção viral por RT-PCR em tempo real em possíveis vetores.....	29

4.8. Aplicação de questionários aos produtores vitícolas .....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30
5.1. Extração e avaliação da qualidade do RNA total.....	30
5.2. Detecção viral por RT-PCR em tempo real (RT-qPCR).....	31
5.3. Detecção de vírus em vetores.....	42
5.4. Comparação entre as técnicas de RT-PCR em tempo real e RT-PCR convencional. ...	44
5.5. Clonagem, sequenciamento e homologia de sequências.....	46
5.6. Análise das respostas obtidas nas entrevistas com os produtores.....	55
6. CONCLUSÕES.....	66
7. REFERÊNCIAS .....	67
APÊNDICE .....	78

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo o Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA, a área cultivada foi com vinhedos no Brasil em 2015 foi de 78.931 ha, distribuída em regiões tropicais e subtropicais. Em 85% destes vinhedos são utilizadas mais de 40 cultivares de videiras americanas (*Vitis labrusca* L.) ou híbridos, e em 15% mais de 120 cultivares viníferas (*Vitis vinífera* L.) (CAMARGO et al., 2011). A produção total de uva no Brasil situa-se em torno de 1,5 milhões de toneladas por ano. A região Sul, principalmente o Estado do Rio Grande do Sul, apresenta a maior área cultivada com videiras, sendo considerada a região produtora mais importante do Brasil. Além da região Sul, a região Nordeste do Brasil tem destaque na produção de uva e vinho. A região do Vale do Submédio São Francisco (VSF), cujas cidades pólos são Petrolina, em Pernambuco, e Juazeiro, na Bahia, é pioneira na produção de uva e vinho sob condições tropicais no Brasil (SILVA, 2012). O VSF é considerado a segunda região produtora de vinhos finos do Brasil, sendo responsável por 15% da produção nacional com oito milhões de litros por ano (SILVA, 2012).

No Estado de São Paulo a viticultura teve seu início na região Leste, nas cidades de São Paulo e de Campinas. Já no início do século XX municípios da região de Jundiaí ganharam destaque tanto na produção de uvas para vinho quanto para mesa. Ainda nesta região do Estado de São Paulo, o cultivo de uvas finas desenvolveu-se nos municípios de São Miguel Arcanjo e Pilar do Sul, com destaque para a produção das cultivares Rubi, Itália, Benitaka e Brasil (VERDI et al., 2011). Ainda referente à produção de uvas finas merece destaque o município de Jales (noroeste do estado), com dois ciclos anuais de produção e pela produção no período de entressafra das demais regiões do estado, entre os meses de julho e outubro.

Na região Sudeste se destaca o município de São Roque no leste do Estado de São Paulo (CAMARGO et al., 2008). Conhecida como a “Terra do Vinho”, São Roque, localizada a 60 quilômetros de São Paulo, tem tradição no cultivo de uva para mesa e para a elaboração de vinho, principalmente devido à influência de imigrantes portugueses e italianos que se estabeleceram na região até a metade do século XX. Atualmente, o município conta com quatorze vinícolas em atividade. Porém, nos últimos cinco anos, devido ao incremento do turismo rural, ocorreu um novo impulso na vitivinicultura, incluindo a criação do “Roteiro do Vinho, Gastronomia e Lazer”. Os turistas além de visitarem a cidade vêm com o intuito de adquirir vinhos, uvas de mesa e derivados (COBELLO, 2010). A retomada do plantio de videiras, principalmente de cultivares viníferas e da elaboração de vinhos de melhor qualidade, criou um novo ciclo na identidade cultural do município.

Das fruteiras de clima temperado, o cultivo da videira, tanto para a produção de uva *in natura* quanto para a elaboração de vinhos, é um dos que mais cresce no mundo, considerando-se sua importância socioeconômica e área cultivada. As videiras, porém, são suscetíveis a vários agentes transmitidos pela enxertia, com ênfase nos vírus e viroides, que estão associados ou causam várias doenças de importância econômica em infecções simples ou múltiplas (MARTELLI, 2014). A propagação vegetativa da videira contribui para a disseminação mundial desses patógenos, e seu ciclo de cultivo perene acelera a introdução de novos patógenos ou resulta em constante ocorrência de infecções múltiplas de vírus e viroides. As principais doenças induzidas por patógenos transmitidos vegetativamente, principalmente por vírus e viroides, podem causar perdas na produção, redução do vigor e da longevidade das plantas, amadurecimento atrasado e irregular, além da redução da qualidade das bagas, com impacto negativo no teor de açúcar, pigmentos e acidez dos vinhos (MALIOGKA et al., 2015).

Atualmente, no mundo, há cerca de 65 espécies de vírus, pertencentes a 24 gêneros e 12 famílias, descritos em videira. Em vinhedos brasileiros, pelo menos 13 espécies de vírus já tiveram sua ocorrência relatada: *Grapevine virus A, B e D* (GVA, GVB e GVD, *Betaflexiviridae, Vitivirus*), *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV-1 e 3, *Closteroviridae, Ampelovirus*), *Grapevine leafroll-associated virus 4* e suas estirpes (GLRaV-4, *Closteroviridae, Ampelovirus*), *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV-2, *Closteroviridae, Closterovirus*), *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV, *Betaflexiviridae, Foveavirus*), *Grapevine fleck virus* (GFkV, *Tymoviridae, Maculavirus*), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV, *Secoviridae, Nepovirus*), e *Grapevine rupestris vein feathering virus* (GRVFV, *Tymoviridae, Marafivirus*) (BASSO et al., 2014).

Além dos vírus, três espécies de viroides, das sete relatadas em videira no mundo, também foram relatadas no Brasil: *Hop stunt viroid* (HSVd, *Pospiviroidae, Hostuviroid*), *Citrus exocortis viroid* (CEVd, *Pospiviroidae, Pospiviroid*) e *Grapevine yellow speckle viroid 1* (GYSVd-1, *Pospiviroidae, Apscaviroid*). Os viroides são transmitidos por meio da enxertia e podem induzir perdas especialmente se associados a vírus (EIRAS et al., 2006; FAJARDO et al., 2016). Os vírus induzem doenças importantes na videira, como será detalhado mais adiante na “Revisão Bibliográfica” deste trabalho. A seguir, foram abordados os principais vírus detectados no levantamento realizado neste trabalho e as doenças por eles induzidas.

Os sintomas de “Declínio de Syrah” em videira podem incluir: rachaduras do lenho, necrose do caule, avermelhamento foliar, declínio e morte das plantas. *Grapevine Syrah virus 1* (GSyV-1, *Tymoviridae, Marafivirus*) foi identificado pela primeira vez em um vinhedo de *V. vinifera* cv. Syrah na Califórnia (EUA) (AL RWAHNIH et al., 2009). Desde então, sua presença tem sido relatada em vinhedos no Chile, Washington (EUA), Canadá, França, Itália, Eslováquia, República Checa e Hungria (ENGEL et al., 2010; GLASA et al., 2015;

CZOTTER et al., 2015) e em germoplasma de videira no Sul do Brasil (FAJARDO et al., 2015a). Um estudo detectou GSyV-1 em cigarrinhas coletadas infestando videiras sintomáticas, infectadas com GSyV-1, sugerindo que esse vírus pudesse ser transmitido por cigarrinhas (AL RWAHNIH et al., 2009). Este vírus tem relacionamento filogenético com o *Grapevine fleck virus* (GFkV, *Tymoviridae*, *Maculavirus*). O GFkV foi relatado em todos os países vitícolas no mundo (MARTELLI, 2014), é um vírus não transmissível mecanicamente e não possui vetores conhecidos associados à sua transmissão (SABANADZOVIC et al., 2001). Infecções pelo GFkV transcorrem sem indução de sintomas em cultivares de *Vitis vinifera*, induzindo, porém, sintomas foliares de clareamento de nervuras, deformação, e redução de crescimento vegetativo em algumas cultivares indicadoras de porta-enxertos (MARTELLI, 2014).

Grapevine leafroll disease (GLRD) é a doença viral economicamente mais prejudicial e generalizada da videira em todo o mundo (ALMEIDA et al., 2013), resultando em perdas de rendimento de até 40% (NAIDU et al., 2015). Várias espécies virais designadas *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV), pertencentes à família *Closteroviridae* estão relacionadas com GLRD, e podem ocorrer isoladas ou em complexos virais (MAREE et al., 2013). O GLRaV-3 (gênero *Ampelovirus*) é a espécie viral mais amplamente presente infectando videiras no mundo (MAREE et al., 2013; MARTELLI, 2014). A cultivares de *V. vinifera* apresentam sintomas evidentes, enquanto que em cultivares de *V. labrusca*, híbridos e porta-enxertos as infecções transcorrem de modo latente, sem a expressão de sintomas, ou com sintomas brandos (BASSO et al., 2014). Os sintomas típicos são avermelhamento ou amarelecimento das folhas, que adquirem textura coriácea, enquanto as nervuras permanecem verdes e as margens das folhas enrolam-se para baixo (NAIDU et al., 2015). Várias espécies de cochonilhas são vetores eficientes de ampelovírus, sendo as transmissões realizadas de modo semi-persistente (LE MAGUET et al., 2012; TSAI et al., 2010).

O Grapevine rugose wood disease (GRWD), lenho rugoso da videira, é uma doença complexa, que ocorre em várias regiões vitícolas. Quatro síndromes distintas são associadas ao GRWD: caneluras do tronco de Rupestris (Rupestris stem pitting), Acanaladura do lenho de Kober (Kober stem grooving), Intumescimento dos ramos (corky bark) e Acanaladura do lenho de LN33 (LN33 stem grooving), esta última sem agente causal definido (MALIOGKA et al, 2015; MARTELLI, 2014). Os agentes causais associados a esta doença são: *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV, gênero *Foveavirus*), *Grapevine virus A* e *Grapevine virus B* (GVA e GVB, gênero *Vitivirus*), respectivamente, todos pertencentes à família *Betaflexiviridae* (MARTELLI et al., 2007). Os sintomas em espécies de *Vitis* e híbridos podem variar, mas normalmente incluem: alterações do diâmetro do tronco da planta, que afetam diretamente o fluxo de água e

nutrientes, causando sintomas de avermelhamento das folhas, formação da casca tipo cortiça, retardamento das brotações, declínio e, eventualmente, a morte da planta (MALIOGKA et al., 2015). GVA e GVB são transmitidos de forma semi-persistente por várias espécies de cochonilhas algodonosas, enquanto GRSPaV não tem inseto vetor conhecido (LE MAGUET et al., 2012; MARTELLI, 2014). GLRD e GRWD são os dois complexos de doenças mais importantes economicamente em vinhedos brasileiros (BASSO et al., 2014).

Recentemente, o Grapevine Cabernet Sauvignon reovirus (GCSV, *Reoviridae*) foi descoberto por sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing*, NGS) como uma nova espécie de vírus infectando videiras na Califórnia (EUA), e logo depois foi detectada também em videiras no Brasil (AL RWAHNIH et al., 2015; FAJARDO et al., 2015b).

A retomada do plantio de videiras em São Roque, conhecida como a “Terra do Vinho”, cria um novo ciclo na identidade cultural do município. Dessa forma, a identificação e caracterização de vírus e viroides em videiras de São Roque é de extrema importância, uma vez que, esses patógenos podem causar efeito deletério na qualidade da uva e na quantidade da produção. Assim, este trabalho teve como objetivos desenvolver um questionário e realizar entrevistas para conhecer a realidade atual dos produtores (vitivinicultores) de São Roque, aprofundar o conhecimento sobre a história da vitivinicultura do município associada à cultura e aos aspectos socioeconômicos regionais, além de levantar a incidência, identificar e caracterizar molecularmente os vírus e viroides presentes em vinhedos da região.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

O objetivo principal do trabalho foi levantar a situação atual das viroses que ocorrem nos vinhedos da Região de São Roque, SP. O diagnóstico foi realizado por meio de métodos de detecção molecular que apresentam elevada sensibilidade e especificidade, visando-se identificar as espécies virais e subvirais presentes nos vinhedos. Para caracterizar a região de São Roque foi realizado levantamento dos sistemas de produção de uva e vinho por meio de entrevista com os produtores.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Levantar a incidência de vírus e viroides em vinhedos na região de São Roque, SP;
- Identificar e caracterizar molecularmente os vírus e viroides presentes nas amostras coletadas;
- Identificar os vírus presentes em insetos vetores;
- Levantar as características histórica, socioeconômica, cultural e técnica dos produtores de uva e vinho na região de São Roque, Estado de São Paulo.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. A cultura da videira no Brasil

A videira pertence à família *Vitaceae* e ao gênero *Vitis*, e possui inúmeras espécies, com destaque para *Vitis vinifera* L., de origem européia e conhecida como produtora de uvas finas, e *Vitis labrusca* L., de origem americana e conhecida como produtora de uvas comuns, que predomina no Brasil (GIOVANNINI, 2008; HERNANDEZ & MORENO, 2009; LEÃO & SOARES, 2000).

Conforme o “Panorama 2010” da vitivinicultura brasileira (MELLO, 2010), a área cultivada com vinhedos no Brasil em 2010 foi de 83.718 hectares, com uma produção de 1.295.442 toneladas, sendo 557.888 toneladas destinadas para processamento e 737.554 toneladas para consumo *in natura*. A viticultura, no Brasil, está concentrada, principalmente, nos Estados da Região Sul, responsável por cerca de 90% da produção nacional, seguida pelas Regiões Sudeste e Nordeste, onde se destacam como maiores produtores, em ordem decrescente de área cultivada: Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco, Paraná, Santa Catarina, Bahia e Minas Gerais. A cultura da videira também tem se expandido para outras regiões não tradicionais a exemplo de áreas situadas no Mato Grosso do Sul, Goiás, Espírito Santo, Ceará e Piauí (MELLO, 2010).

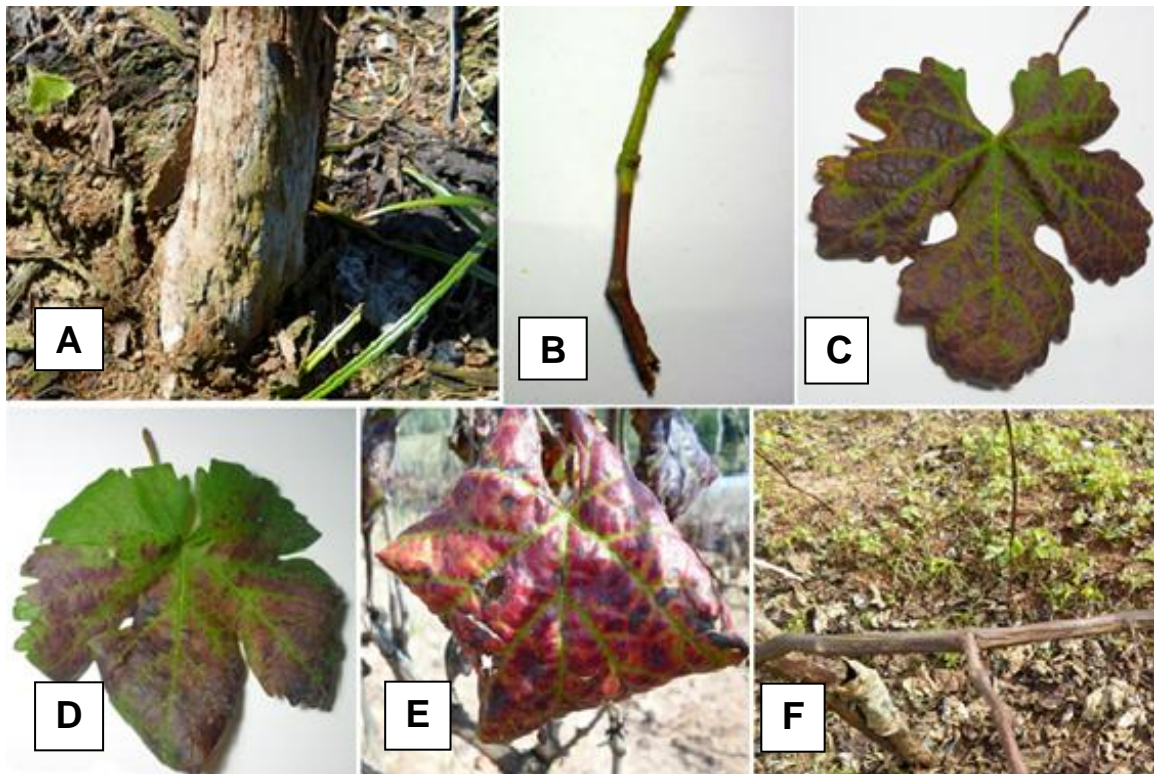
O Brasil, nos últimos anos, tem obtido avanços na produção de uvas, seja para consumo *in natura* ou para processamento. Entretanto, o setor encontra-se constantemente ameaçado devido à ocorrência de doenças, que podem causar danos com consequente aumento dos custos de produção, para tentar minimizá-los. Dentre os patógenos da videira, os vírus e viroides se destacam pelo seu difícil controle, por causarem danos expressivos e por comprometerem diretamente a sustentabilidade econômica desta atividade. Portanto, é importante conhecer os vírus e viroides associados a esta cultura, principalmente aqueles que induzem doenças importantes. Vale destacar que muitas vezes os sintomas são imperceptíveis (infecções latentes) em determinadas cultivares e porta-enxertos, e com isso muitos vírus (e também viroides) passam despercebidos durante a propagação da cultura e o trânsito de material propagativo. Assim, há maior probabilidade de disseminação desses patógenos, o que resulta em elevado grau de infecção dos materiais propagativos e na eficiente dispersão de vírus e viroides entre regiões produtoras de uva (FAJARDO et al., 2003; MARTELLI & BOUDON-PADIEU, 2006).

### 3.2. A importância das viroses no Brasil

No Brasil, o primeiro relato de uma virose ocorrendo em videiras foi realizado em 1972, quando foi descrita a ocorrência do enrolamento da folha da videira no Estado de São Paulo (KUNIYUKI, 1972). Segundo Amorim & Kuniyuki (1997) e Moreira et al. (2004a), as doenças provocadas por vírus em videira se caracterizam por uma lenta e gradual degenerescência da planta, causando perdas quantitativas e qualitativas na produção. Entretanto, há casos em que as perdas são quase totais, principalmente quando as cultivares são bastante suscetíveis à infecção por determinados vírus.

A incidência e a disseminação dessas viroses em um determinado vinhedo variam segundo a relação/estabelecidade entre patógeno, hospedeira, vetor e condição ambiente (LIMA, 2002; MOREIRA, 2004). Dependendo da combinação entre cultivar e espécie viral, os primeiros sintomas característicos podem ser perceptíveis somente 2 a 3 anos após a infecção (LIMA & FAJARDO, 2012). A expressão de sintomas induzidos por vírus em videiras pode variar com as condições do ambiente, estágio fenológico e estado nutricional da planta, práticas de manejo, infecção múltipla entre espécies e estirpes virais, cultivar da planta hospedeira e tempo decorrido desde a infecção (BASSO et al., 2010a; NAIDU et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2015). Para a maioria das viroses, os sintomas são de fácil reconhecimento em cultivares suscetíveis, em especial, no final do ciclo vegetativo, antes da queda das folhas. Em plantas muito afetadas, os sintomas podem ser evidentes a partir da floração, porém são mais comuns em época próxima à maturação da uva (CABALEIRO & SEGURA, 2006).

As viroses causam alterações na expressão de genes da hospedeira, levando a mudanças no metabolismo da planta, com consequente redução da produção (BASSO et al., 2010b; DUBIELA, 2012; BASSO et al., 2014). Nem todas as espécies virais induzem sintomas que levam a perdas econômicas expressivas. Um grupo restrito de viroses se destaca por sua importância econômica em nível mundial, e pode apresentar sintomas característicos resultantes de infecções simples ou múltiplas das espécies virais associadas à doença. As principais viroses da videira são: (i) enrolamento das folhas, causada por vírus da (Família *Closteroviridae*); (ii) lenho rugoso (Família *Betaflexiviridae*); (iii) degenerescência da videira (Família *Secoviridae*); e (iv) mancha das nervuras (Família *Tymoviridae*) (Figura 1).



**Figura 1.** Sintomas de viroses em videira. (A) Caneluras do tronco, (B e F) Complexo do lenho rugoso da videira em ramos apresentando intumescimento e rachaduras na base do ramo, (C, D e E) Enrolamento da folha em diferentes cultivares e estádios de desenvolvimento dos sintomas. Fotos: Cátia J. M. Moura (2016).

### 3.3. Principais vírus e viroides que infectam a videira

A videira pode ser afetada por, por cerca de, 65 espécies de vírus (OOSTHUIZEN et al., 2016), nove espécies de viroides, três RNAs satélites e cinco possíveis doenças de etiologia viral (identidade dos vírus ainda não determinada) (BASSO et al., 2014). Esses patógenos, em infecções simples ou múltiplas, constituem importante e constante ameaça à vitivinicultura. Os vírus e viroides que já foram descritos infectando a videira no Brasil estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Espécies de vírus e viroides descritos infectando videira (*Vitis* spp.) no Brasil, e seus vetores. Adaptada de Basso et al. (2014).

FAMÍLIA	GÊNERO	ESPÉCIE	VETORES	ALGUMAS REFERÊNCIAS
Betaflexiviridae	<i>Foveavirus</i>	<i>Grapevine rupestris stem pitting-associated virus</i> (GRSPaV)	Desconhecido	Pereira (2008) Radaelli et al. (2009) Basso et al. (2010a)
	<i>Vitivirus</i>	<i>Grapevine vírus A</i> (GVA)	Cochonilhas	Fajardo et al. (2003) Moreira et al. (2004a)
		<i>Grapevine vírus B</i> (GVB)	Cochonilhas	Nickel et al. (2002) Moreira et al. (2004b) Catarino et al. (2013a)
		<i>Grapevine vírus D</i> (GVD)	Desconhecido	Fajardo et al. (2012)
Closteroviridae	<i>Closterovirus</i>	<i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i> (GLRaV-2)	Desconhecido	Radaelli et al. (2009)
	<i>Ampelovirus</i> (Subgrupo I)	<i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i> (GLRaV-1)	Cochonilhas	Fajardo et al. (2011)
		<i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i> (GLRaV-3)	Cochonilhas	Fajardo et al. (2007); Basso et al. (2010a).
	<i>Ampelovirus</i> (Subgrupo II)	<i>Grapevine leafroll-associated virus 4</i> (GLRaV-4)	Cochonilhas	Catarino et al. (2013b)
		<i>Grapevine leafroll-associated virus 4 strain 5</i> (GLRaV-4, strain 5)	Cochonilhas	Fajardo et al. (2012)
		<i>Grapevine leafroll-associated virus 4 strain 6</i> (GLRaV-4, strain 6)	Cochonilhas	Fajardo et al. (2012)
Secoviridae	<i>Nepovirus</i> (Subgrupo A)	<i>Grapevine fanleaf vírus</i> (GLFV)	Nematoides	Radaelli et al. (2009)
Tymoviridae	<i>Maculavirus</i>	<i>Grapevine fleck virus</i> (GFkV)	Desconhecido	Fajardo et al. (2012)
	<i>Marafivirus</i>	<i>Grapevine rupestris vein feathering virus</i> (GRVFV)	Desconhecido	Catarino et al. (2013b)
		<i>Grapevine Syrah virus-1</i> (GSyV-1)	Cigarrinhas (sem comprovação por teste de transmissão)	Al Rwahnih et al. (2009)
Reoviridae		<i>Grapevine Cabernet Sauvignon reovirus</i> (GCSV)	Desconhecido	Al Rwahnih et al. (2015)
Pospiviroidae	<i>Hostuviroid</i>	<i>Hop stunt viroid</i> (HSVd)	Ausente	Eiras et al. (2006b)
	<i>Pospiviroid</i>	<i>Citrus exocortis viroid</i> (CEVd)	Ausente	Eiras et al. (2006b)
	<i>Apscaviroid</i>	<i>Grapevine yellow speckle viroid 1</i> (GYSVd-1)	Ausente	Fajardo et al. (2016)

No Brasil, *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV-1, -2, -3, GLRaV-4 strains -5 e -6), *Grapevine virus A, B e D* (GVA, GVB e GVD), *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (GRSPaV), *Grapevine fleck virus* (GFkV) e *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) já foram detectados em videira (LIMA & FAJARDO, 2012; CATARINO et al., 2015). Catarino et al. (2013b) também identificaram GLRaV-4 e *Grapevine rupestris vein feathering virus* (GRVFV) em amostras de videiras comercialmente introduzidas no Brasil. Dentre esses ressalta-se a importância dos vírus causadores do Enrolamento da folha e do Lenho rugoso no Brasil (RADAELLI et al., 2009; BASSO et al., 2010a), e em países vizinhos como Argentina e Chile (VOLPE et al., 2010; FIORE et al., 2008 e 2011). Os vírus pertencentes às famílias *Betaflexiviridae*, *Closteroviridae* e *Tymoviridae* (MARTELLI & BOUDON-PADIEU, 2006) são importantes e afetam a videira (Tabela 1).

Os vírus que mais se destacam pela incidência e importância econômica são aqueles associados às viroses do enrolamento da folha (GLRaV-1, -2 e -3) e do lenho rugoso da videira, que é causada por um complexo formado por quatro viroses: intumescimento dos ramos (GVB), acanaladura do lenho de Kober (GVA), (GRSPaV) e acanaladura do lenho de LN33 (vírus caneluras do tronco de *Rupestris* desconhecido) (KUNIYUKI et al., 2002; MOREIRA et al., 2004a; DUBIELA, 2012). É comum a ocorrência de infecções múltiplas com vírus pertencentes a diferentes famílias, além da ocorrência de agentes subvirais. Fatores como a idade do tecido da planta infectada e concentração viral influenciam a presença de sintomas na planta infectada (CABALEIRO & SEGURA, 2006).

Em relação aos agentes subvirais que ocorrem em videiras destacam-se dois grupos: viroides e RNAs satélites. Os viroides são constituídos de pequenos genomas de RNA (246 a 401 nucleotídeos), circulares e de fita simples. As doenças causadas por viroides apresentam menor incidência e importância econômica do que as viroses da videira (BASSO et al., 2014). Viroides apresentam replicação autônoma e dependem da interação com fatores da hospedeira para completar seu ciclo infeccioso (FLORES et al., 2012; NAVARRO et al., 2012; BASSO et al., 2014), sendo que atualmente são definidas duas famílias, *Pospiviroidae* e *Avsunviroidae* (Tabela 1). A disseminação dos viroides é facilitada pelo intercâmbio de material de propagação vegetativa entre países, sendo que os métodos de controle desses patógenos na videira são semelhantes ao manejo recomendado para o controle das viroses (EIRAS, 2012; EIRAS et al., 2006a).

### **3.3.1. Grapevine Syrah virus 1 (GSyV-1)**

O *Grapevine Syrah virus 1* (GSyV-1) pertence ao gênero *Marafivirus*, família *Tymoviridae*. Esse vírus foi identificado pela primeira vez em vinhedos da Califórnia (EUA) em 2004 (AL RWAHNIH et al., 2009). Posteriormente, o vírus também foi detectado em videiras no Chile, no Brasil (em germoplasma de videira), França, Itália e, mais recentemente, na Eslováquia e República Checa (AL RWAHNIH et al., 2009; ENGEL et al., 2010; GIAMPETRUZZI et al., 2012; GLASA et al., 2015). Além disso, o GSyV-1 foi relatado em uvas muscadina (*Vitis rotundifolia*) com o nome Grapevine virus Q (SABANADZOVIC et al., 2009). GVQ foi descrito logo após GSyV-1 e ambos os genomas compartilham mais de 99% de identidade de nucleotídeos, assim GVQ foi reclassificado como GSyV-1. Os sintomas induzidos pelo GSyV-1 incluem engrossamento na região da enxertia, rachaduras no lenho, necrose do caule, avermelhamento das folhas, declínio da videira, e morte de plantas (MONIS, 2009). Ainda segundo Monis (2009) a etiologia do “Declínio da Syrah” poderia ser devida a combinação de vários agentes patogênicos, fatores de estresse, bem como a constituição genética da cultivar Syrah. Com relação à transmissão por vetores,

outros vírus no gênero *Marafivirus* podem ser transmitidos por cigarrinhas. O GSyV-1 já foi detectado em cigarrinhas coletadas em videiras infectadas que apresentavam sintomas, sugerindo que a transmissão desse vírus por cigarrinhas seria possível (MONIS, 2009).

### 3.3.2. *Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3)*

Pertencente à família *Closteroviridae*, gênero *Ampelovirus*. O GLRaV-3 possui partículas alongadas e flexuosas, com genoma composto de RNA fita simples, senso positivo com 17.919 nucleotídeos organizados em 13 ORFs (LING et al., 1997; MARTELLI et al., 2002a; DUBIELA, 2012). É o principal agente causal da virose do enrolamento da folha da videira, e causa danos econômicos importantes na produção de uvas para elaboração de vinho (ATALLAH et al., 2012) e em uvas de mesa (PIETERSEN, 2004; BOSCIA et al., 1995; MAREE et al., 2008). Esse vírus não é transmissível mecanicamente (DUBIELA, 2012). No campo, a transmissão do GLRaV-3 ocorre devido à ação de várias espécies de pseudococcídeos e coccídeos. Estes insetos, conhecidos como cochonilhas, são considerados os principais vetores de algumas das principais espécies de vírus que infectam a videira, sendo responsáveis pela dispersão destes patógenos (CABALEIRO & SEGURA, 1997; KUNIYUKI et al., 2005). Segundo Botton et al. (2003), as principais espécies transmissoras do GLRaV-3 são *Pseudococcus viburni*, *P. vitis*, *P. longispinus* e *Planococcus citri*. Existem muitas variantes de sequência do GLRaV-3, com sido relatada a existência de 45 isolados deste vírus em 14 países (TURTURO et al., 2005).

### 3.3.3. *Grapevine virus A (GVA)*

O GVA pertence à família *Betaflexiviridae*, gênero *Vitivirus*. Possui partículas alongadas com cerca de 800 nm de comprimento e genoma monopartido de RNA fita simples com 7.351 nucleotídeos (DUBIELA, 2012). É disseminado por cochonilhas algodonosas (*Pseudococcidae*) e de carapaça (*Coccidae*), quando essas se alimentam em uma planta infectada e, ao se alimentarem em uma planta sadia, realizam a transmissão das partículas virais (LIMA, 2009). Este vírus pode ser transmitido mecanicamente para hospedeiras herbáceas, tais como: *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *Gomphrena globosa* e *Nicotiana* spp. (DUBIELA, 2012). Juntamente com o GVB e o GRSPaV (MINAFRA, 2000; DU-PREEZ et al., 2011) e o *Grapevine virus D* (GVD) (ROSA et al., 2011), o GVA constitui o “complexo rugoso da videira”, induzindo alterações no lenho da videira e prejudicando a qualidade da produção (MARTELLI, 1993; CREDI, 1997).

### 3.3.4. *Grapevine fleck virus* (GFkV)

O *Grapevine fleck virus* (GFkV) pertence à família *Tymoviridae* (MARTELLI et al., 2002b), gênero *Maculavirus* (MARTELLI et al., 2002c). Possui partículas isométricas de 30 nm de diâmetro e RNA fita simples com 7.564 nucleotídeos, organizados em quatro ORFs (DUBIELA, 2012). O GFkV induz a mancha das nervuras, uma virose que apresenta alta incidência. Este vírus não é transmissível mecanicamente e é limitado ao floema (DUBIELA, 2012). Essa doença já foi registrada na maioria dos países vitícolas do mundo, inclusive no Brasil (KUHN, 1992; KUNIYUKI & COSTA, 1987, 1995). O GFkV já foi relatado em videiras nos Estados Unidos (Califórnia, Missouri e Washington) (MILKUS & GOODMAN, 1999; NAIDU & MEKURIA, 2010), Austrália (SHI et al., 2003), e na Europa (MARTELLI et al., 2002c).

Não há constatação de infecção de plantas por meio de ferramentas ou tesoura de poda e, até o momento, não se tem comprovação científica da disseminação deste vírus por vetores (MARTELLI et al., 2002c). O GFkV pode ser disseminado por material propagativo infectado e transmitido por enxertia. Os sintomas da doença localizam-se nas folhas novas e de meia idade (durante a fase de brotação na primavera) da cultivar de porta-enxerto *Rupestris* du Lot, utilizada como indicadora desta virose. As plantas muito afetadas são menos desenvolvidas e podem apresentar as folhas com os bordos voltados para cima, além de manchas translúcidas sem forma definida (KUNIYUKI & COSTA, 1994). Nenhuma outra hospedeira natural, além da videira, é conhecida (MARTELLI et al., 2002c; FAJARDO et al., 2003).

### 3.3.5. *Grapevine Cabernet Sauvignon reovirus* (GCSV)

Pertencente à família *Reoviridae*, o GCSV foi descrito pela primeira vez em 2015, em videiras da cultivar Cabernet Sauvignon na Califórnia (EUA), por análise de sequenciamento de nova geração (NGS) (AL RWAHNIH et al., 2015). O vírus foi descoberto em videira que apresentava enrolamento das folhas e que estava infectada com *Grapevine leafroll associated virus* (GLRaV-2 e GLRaV-3), *Grapevine virus A* (GVA) e *Grapevine fleck virus* (GFkV). Ainda segundo Al Rwahnih et al. (2015) esse reovirus foi transmitido para videiras sadias por enxertia utilizando-se gemas infectadas. Subsequentemente, um isolado de GCSV foi identificado em videiras da cultivar Cabernet Sauvignon em um campo experimental no município de Bento Gonçalves, RS, também em infecção viral múltipla (FAJARDO et al., 2015a).



### **3.3.6. Grapevine virus B (GVB)**

O *Grapevine virus B* (GVB) pertence à família *Betaflexiviridae*, gênero *Vitivirus* (MARTELLI et al., 1997; ADAMS et al., 2004), possui partículas com cerca de 800 nm de comprimento e cinco ORF. O GVB é transmitido por cochonilhas algodonosas (*Pseudococcidae*) e de carapaça (*Coccidae*) e por meio de enxertia com material propagativo infectado (MARTELLI, 2012; CATARINO et al., 2015). É um dos vírus que faz parte do “complexo rugoso da videira”, e induz alterações no lenho da videira, tais como engrossamento da casca, intumescimento e fendilhamento cortical dos ramos ou tronco (MARTELLI, 1993; CREDI, 1997). Em estudos de variabilidade genética de diferentes isolados encontrados em vinhedos brasileiros, o GVB foi caracterizado molecularmente por Nickel et al. (2002) e Radaelli et al. (2009).

### **3.3.7. Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV)**

O *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) pertence à família *Betaflexiviridae*, gênero *Foveavirus*. Possui partículas alongadas e flexuosas com cerca de 800 nm de comprimento, genoma de RNA de fita simples, senso positivo, com aproximadamente 8.726 nt organizados em cinco ORF. É um dos mais frequentes e importantes vírus que infectam a videira no Brasil (RADAELLI et al., 2009). O GRSPaV foi identificado e caracterizado molecularmente por Meng et al. (1998) e Zhang et al. (1998) como o agente causal das caneluras do tronco de *Rupestris*, virose conhecida por “lenho estriado de *Rupestris*” em São Paulo e por “caneluras do tronco de *Rupestris*” no Rio Grande do Sul (ESPINHA et al., 2003). Infecções múltiplas com outros vírus também são comumente detectadas em videiras (MENG et al., 1999; 2005). Juntamente com os *Vitivirus* GVA, GVB e GVD, o GRSPaV compõe o “complexo rugoso da videira”. É transmitido por propagação vegetativa. A necrose das nervuras da videira (*Grapevine vein necrosis*), também é uma virose e está associada à presença do GRSPaV (BOUYARIA et al., 2005).

### **3.3.8. Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1)**

Este vírus pertence à família *Closteroviridae*, gênero *Ampelovirus* e possui partícula alongada e flexuosa com cerca de 2.000 nm de comprimento. Apresenta genoma composto por RNA de fita simples, senso positivo, com cerca de 19.500 nucleotídeos (FAJARDO et al., 2005). É uma das principais espécies de vírus envolvidas na etiologia do enrolamento da folha da videira (*Vitis* spp.). 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 associado ao enrolamento da folha da videira" (*Grapevine leafroll-associated virus*, GLRaV). Os sintomas típicos de enrolamento dos bordos da folha para baixo são observados nas cvs. européias (*V. vinifera*), podendo provocar o definhamento das plantas (LIMA, 2009). Pela incidência e importância econômica, no Brasil e em outros países vitícolas, o GLRaV-1 se destaca juntamente com o GLRaV-3 (LIMA, 2009; MARTELLI, 2009). Nos vinhedos, o GLRaV-1 é transmitido de maneira semi-persistente por coccídeos e pseudococcídeos. Pode também ser transmitido através da enxertia, mas não é transmissível por inoculação mecânica (FAZELI & REZAIAN, 2000; MARTELLI et al., 2002a; MARTELLI, 2003; GUGERLI, 2003). A única hospedeira natural deste vírus é a videira (*Vitis* spp.) (FAJARDO et al., 2005).

Isolados de GLRaV-1 já foram relatados em vinhedos do Brasil e, posteriormente, alguns isolados locais foram caracterizados molecularmente por meio do sequenciamento da região genômica correspondente à proteína capsidial (FAJARDO et al., 2011).

### **3.3.9. *Grapevine yellow speckle viroid 1 (GYSVd-1)***

O GYSVd-1 é um viroide pertencente à família *Pospiviroidae*, gênero *Apscaviroid* (EIRAS et al., 2006b). Assim como os demais viroides, o GYSVd-1 apresenta replicação autônoma e depende da interação com fatores da hospedeira para completar seu ciclo infeccioso (FLORES et al., 2005). Também como o *Grapevine yellow speckle viroid 2* (GYSVd-2) e o *Australian grapevine viroid* (AGVd), o GYSVd-1 tem gama de hospedeiras restrita, infectando somente videiras (REZAIAN et al., 1992; LITTLE & REZAIAN, 2003). Recentemente, porém, em análise por sequenciamento de nova geração, o GYSVd-1 foi identificado na Coréia do Sul, em uma *Asteraceae* assintomática da vegetação espontânea, *Ixeridium dentatum* (LEE et al., 2015). O GYSVd-1 e o GYSVd-2 são os agentes etiológicos do salpicado amarelo (*yellow speckle*), uma doença caracterizada por pontuações ou pequenas manchas amarelas espalhadas no limbo foliar. A associação destes viroides com *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), um vírus transmitido por nematoides, pode ter um efeito sinérgico e provocar sintomas mais severos (HAJIZADEH et al., 2015).

Além do GYSVd-1 (FAJARDO et al., 2016), o *Citrus exocortis viroid* (CEVd) e o *Hop stunt viroid* (HSVd) foram descritos em videiras no Brasil (EIRAS et al., 2006a). A presença de viroides em videiras nos vinhedos brasileiros é atribuída à introdução de material propagativo a partir de outros países. O controle desses patógenos em videiras em outros países, como os Estados Unidos, Austrália, Espanha e Itália é baseado em programas de indexação por métodos moleculares e programas de certificação fitossanitária concebidos para a obtenção, manutenção e distribuição de material de propagação livre de viroide para

os agricultores. No Brasil, programas de certificação fitossanitária para viroides, são aplicados apenas em citros.

A origem dos viroides que infectam videiras no Brasil permanece incerta, e uma vez que os viroides encontram-se amplamente disseminados em videiras em outras regiões do mundo, é possível que eles também estejam disseminados nos vinhedos brasileiros (FAJARDO et al, 2016).

### **3.4. Diagnóstico de doenças causadas por vírus e viroides em videira**

O reconhecimento dos sintomas causados pelos vírus pode ser uma tarefa difícil, uma vez que os sintomas podem ser confundidos com deficiências ou excessos de adubação ou com sintomas de outros fitopatógenos (GARRIDO et al., 2008). Com o avanço nos métodos de detecção dos vírus e agentes subvirais, verificou-se que a maioria das ocorrências, desses patógenos em videira, se manifesta na forma de infecções múltiplas, sendo este mais um desafio para o diagnóstico e o controle das doenças resultantes.

Atualmente a detecção por PCR em tempo real tem sido utilizada para superar as limitações apresentadas por outros tipos de ensaios como a indexação biológica, ELISA e/ou PCR convencional (OSMAN et al., 2008), uma vez que apresenta capacidade de gerar resultados quantitativos de forma mais rápida e precisa (SAPONARI et al., 2008).

### **3.5. Transmissão de vírus e viroides em videira**

A propagação vegetativa da videira facilita a disseminação e favorece a ocorrência de doenças complexas pelo acúmulo de diferentes espécies virais em uma mesma planta (MARTELLI, 2012; CATARINO et al., 2015). A transmissão de vírus pode ocorrer por meio da propagação vegetativa, insetos vetores e, em alguns casos, mecanicamente. Até o momento não há comprovação científica da transmissão de vírus por instrumentos usados no manejo da videira, a exemplo de tesouras de poda (MARTELLI, 2012; BASSO et al., 2014). Os viroides não têm vetores, sendo dependentes da ação do homem para a sua transmissão. Propagação vegetativa (via enxertia) e transmissão mecânica são os principais modos de transmissão e disseminação dos viroides em videiras (EIRAS et al., 2006b; FAJARDO et al., 2016). Dentre os vetores de vírus em videiras destacam-se as cochonilhas (Figura 2).



**Figura 2.** Cochonilhas que infestam videiras, coletadas em vinhedos do município de São Roque/SP. Fotos: Cátia J. M. Moura (2016).

Entre as espécies de cochonilhas-farinhentas (Hemiptera: *Pseudococcidae*) relatadas como vetores de vírus na cultura da videira, no Brasil, destacam-se: *Pseudococcus maritimus* (EHRHORN, 1900), *P. longispinus* (TARGIONI-TOZZETTI, 1867), *P. viburni* (SIGNORET, 1875), *Planococcus citri* (RISSO, 1813) e *P. ficus* (SIGNORET, 1875) (FOLDI SORIA, 1989; AFONSO, 2005; KUNIYUKI *et al.*, 2005; KISHINO *et al.*, 2007). As cochonilhas dessa família, entretanto, não têm sido relatadas como pragas-chave, ou seja, normalmente não causam danos diretos à produção de uvas destinadas ao processamento (BOTTON *et al.*, 2003). Os principais prejuízos causados pelas cochonilhas são observados em uvas de mesa da cultivar Itália (*Vitis vinifera*) onde danificam as bagas ao favorecerem o aparecimento da fumagina, o que inviabiliza a fruta para o comércio *in natura*. Em alguns casos, devido às restrições quarentenárias, podem impedir a exportação (KISHINO *et al.*, 2007). Entretanto, a importância dessas cochonilhas na cultura da videira tem aumentado nos últimos anos, principalmente após a comprovação da transmissão do GLRaV-3 GVA e GVB por essas cochonilhas (ROSCIGLIONE; CASTELLANO, 1985; CABALEIRO; SEGURA, 1997; CID *et al.*, 2007). No Brasil, esse fato já foi comprovado para os vírus GLRaV-3 e GVB para *Pseudococcus longispinus* (TARGIONI-TOZZETTI, 1867) (KUNIYUKI *et al.*, 2005; KUNIYUKI *et al.*, 2006; MORANDI FILHO *et al.*, 2009), sendo que no caso de *P. viburni*, somente foi constatada a aquisição do vírus pela cochonilha, faltando à comprovação da transmissão para plantas sadias (AFONSO, 2005). O controle das cochonilhas-farinhentas tem sido uma prática pouco realizada pelos viticultores devido ao desconhecimento da ação vetora e, também, devido ao hábito das cochonilhas localizarem-se nas raízes e/ou sob a casca, o que dificulta a visualização da praga e o contato com inseticidas (FU *et al.*, 2002). Quando a infestação é observada nos cachos, geralmente os produtores aplicam inseticidas fosforados, os quais, além de apresentarem elevada toxicidade, são pouco seletivos aos inimigos naturais e apresentam grande período de carência (BOTTON *et al.*, 2003). Além disso, as pulverizações, dependendo da fase em que são realizadas, apresentam reduzida eficácia devido à localização da praga no solo, sob o

ritidoma e/ou no interior dos cachos, limitando o contato com os ingredientes ativos do inseticida.

### **3.6. A história da vitivinicultura em São Roque, Estado de São Paulo**

No Estado de São Paulo, destacam-se dois polos vitícolas: um na região noroeste (Regional Agrícola de Jales) e outro na região leste (Regionais Agrícolas de Campinas, Itapetininga e Sorocaba). Na região noroeste de São Paulo, a viticultura sofre influência do clima, que se caracteriza por uma estação chuvosa de dezembro a março (com precipitações mensais até superiores a 160 mm) e um período com precipitações inferiores a 100 mm mensais entre abril e novembro. As temperaturas são elevadas ao longo do ano, com risco baixo de ocorrência de geada, viabilizando ciclos vegetativos sucessivos com manejo adequado envolvendo poda, uso de fitorreguladores para quebra de dormência das gemas e irrigação (MELLO, 2009; SILVA et al., 2012).

Segundo Romero (2004), entre 1880 e 1950 ocorreu em São Paulo um importante crescimento na produção vitivinícola ligado, principalmente, a uma série de inovações técnicas e tecnológicas aplicadas ao cultivo da videira e a elaboração de vinho. Essa autora divide a vitivinicultura paulista em dois períodos: (i) 1880-1930; (ii) 1930-1950. No primeiro período (de 1880 a 1930), foram realizadas as primeiras tentativas de cultivar a videira e elaborar vinho como resultado da atividade de alguns proprietários particulares. Nesta época, a maioria das plantações situava-se em fazendas e chácaras próximas ao município de São Paulo, e sempre como cultivo complementar ou secundário ao café. Estes pioneiros tiveram uma clara atitude modernizante, mediante a difusão da informação técnica que tinha por objetivo melhorar a produtividade e qualidade dos vinhedos e a elaboração dos vinhos (MATTOS, 1951; ROMERO, 2004). Entretanto nesse primeiro período, os vinhedos eram conduzidos de maneira incorreta e também em locais que não favoreciam seu desenvolvimento.

No final do século XIX, ocorreu o surgimento da maioria das pragas e doenças (filoxera, cochonilhas, ferrugem, dentre outras) que atacavam as videiras e provocavam importantes danos aos parrerais. Essas dificuldades prejudicaram o desenvolvimento da vitivinicultura, conduzindo ao abandono de cultivos. Além disso, os vinhos paulistanos apresentavam alta acidez, se conservavam por pouco tempo, e apresentavam sabor, aroma e cor pouco atrativos. Geralmente eram misturados com aguardentes e outras bebidas, muitas vezes até prejudiciais à saúde (ROMERO, 2004).

Segundo Romero (2004) a situação da vitivinicultura paulista começa a mudar nas primeiras décadas do século XX devido a condições climáticas e de relevo, mudanças

sociais com o fim da escravidão, políticas de migração e colonização levadas a cabo pelo governo estadual, políticas econômicas favorecedoras do café, possibilidades da diversificação agrícola a partir de 1930 e o papel da pesquisa e da assistência agrícola por parte dos órgãos estatais.

Romero (2004) destaca que houve influência do governo federal e estadual para o desenvolvimento da vitivinicultura, com a criação da Imperial Escola Agrônômica de Campinas, que deu origem ao Instituto Agrônômico de Campinas (IAC). Neste sentido, foram de grande importância as atividades desenvolvidas pelas Estações Experimentais de Jundiaí e São Roque, pertencentes ao Instituto Agrônômico de Campinas da Secretaria de Agricultura do Estado, que apoiou diversos projetos de fomento a pesquisa. Os estudos desenvolvidos por esses centros de pesquisa também ajudaram a identificar os principais problemas para a elaboração do vinho que, de maneira geral, incluíam desde a escolha das cultivares de uvas até o engarrafamento. Inglez de Souza (1996) considera que o surgimento da vitivinicultura no estado de São Paulo também se deve a dois elementos: a introdução de videiras americanas e a presença do imigrante italiano.

A imigração italiana se concentrou nas regiões de Jundiaí, Rocinha (posteriormente Vinhedo) e São Roque. Esses imigrantes influenciaram para que, entre 1920 e 1950, a distribuição geográfica dos vinhedos mudasse da capital paulista e passassem a se concentrar em Jundiaí e São Roque.

De acordo com Inglez de Souza (1996), nas adjacências da capital paulista (Mogi das Cruzes, São Roque e Jundiaí), o colono italiano passou de cafeicultor a viticultor, dando início a viticultura moderna do estado de São Paulo. Na visão desse autor praticamente toda a viticultura paulista, até a década de 1960, estava contida em um polígono que tinha seus vértices marcados pelas cidades de Mogi das Cruzes, Ibiúna, São Roque, Cabreúva, Valinhos, Morungaba e Bragança Paulista. Dentre os municípios que se destacam como importantes centros produtores de uva estão Jundiaí, Louveira, Vinhedo, Itatiba, Jarinu, Atibaia, Itupeva, Campo Limpo Paulista, Indaiatuba, Itaquera e Poá.

Entretanto, a partir do final da década de 1970, vários fatores como a baixa produtividade e a especulação imobiliária, fizeram com que apenas 14 das 116 vinícolas existentes na época em São Roque, permanecessem na atividade (OLIVEIRA, 2004). Os parreirais existentes no município deram lugar a loteamentos, sítios e chácaras, retirando da cidade sua principal identidade. Cobello (2007) afirma que durante as décadas de 1980 e 1990 o cultivo da uva e a produção do vinho passaram por um período de decadência em São Roque, conhecida como “a terra do vinho paulista”.

Segundo Verdi (2007), em seu trabalho de pesquisa sobre a revitalização da cadeia vitivinícola paulista, o estado de São Paulo apresenta decréscimos, tanto de produção de uva para a indústria, quanto no número de vinícolas. A autora destaca que este decréscimo

ocorreu, mesmo com a expansão do mercado/consumidor e dos incentivos de recentes ações dos governos federal e estadual em relação à produção de vinho. Entretanto as perspectivas são positivas para São Paulo em razão da projeção da vitivinicultura brasileira. Verdi (2007) menciona que, o governo do Estado de São Paulo por meio da Secretaria da Agricultura e Abastecimento e o Instituto Paulista de Vitivinicultura, estão implementando fomento ao desenvolvimento do setor. Este projeto implementado visa especificamente a região de São Roque, “Revitalização da Cadeia Vitivinícola Paulista: competitividade, governança e sustentabilidade”. A coordenação do projeto é feita pelo Instituto de Economia Agrícola (IEA), e conforme Verdi (2007) possui parceria com vários outros órgãos públicos. Cobello (2007) afirma ainda que com a criação em 2006 do “Roteiro do Vinho, Gastronomia e Lazer”, que inclui a “Estrada do Vinho”, o resgate da identidade cultural do município está ocorrendo, por exemplo, com o enoturismo. A procura por novos destinos turísticos no espaço rural proporcionaram às vinícolas e às atividades complementares existentes na Estrada do Vinho, uma nova oportunidade de desenvolvimento. Uma estratégia logística em desenvolvimento na região é a utilização de uvas viníferas na produção de vinho, uma vez que, até então, a produção de vinhos em São Roque era baseada em uvas não viníferas, resultando nos “vinhos de mesa”. Esta estratégia objetiva a produção de vinhos denominados “vinhos finos” o que conforme Cobello (2010) estende o enoturismo para uma população que aprecia preferencialmente este produto.

Considerando que a viticultura é marcada pela produção familiar, a proposta de embasar políticas públicas voltadas para a revitalização da cadeia vitivinícola remete a um importante significado social, na medida em que pretende promover condições de sustentabilidade a uma significativa parcela de pequenos produtores, altamente especializados (SCHIRIGATTI et al., 2010). Além disso, pode contribuir para manter uma tradição que contribui com outros setores da economia, sobretudo o turismo (VERDI, 2007).

Observa-se na Figura 3 os complexos enoturísticos, na Figura 4, os parreirais do município de São Roque, SP, e, na Figura 5, o mapa do estado de São Paulo com a localização do município de São Roque, SP.

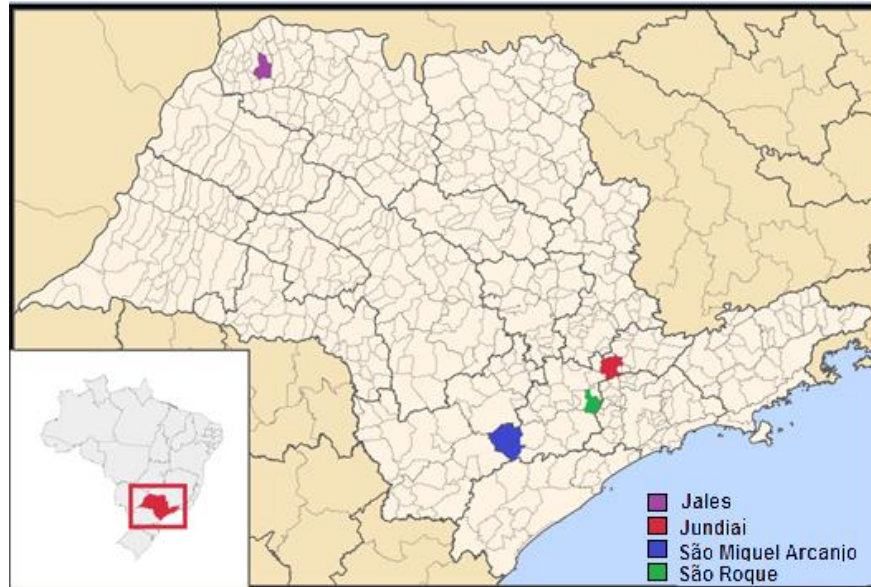


**Figura 3.** Vistas de alguns complexos enoturísticos do município de São Roque, SP. **A** - Vinícola Bella Quinta, **B** - Vinícola Palmeiras, **C** - Vinícola Goes, **D** - Vinhos Canguera, **E** - Vinhos Bella Aurora. Fotos: Cátia J. M. Moura (2016).



**Figura 4.** Parreirais típicos no município de São Roque, SP. **A** – Fazenda Jubair, **B** - Sítio Pessegueiro, **C** - Sítio Canguera, **D** - Sítio Abaçai, **E** - Sítio Boa Esperança, **F** - Sítio Pessegueiro. Fotos: Cátia J. M. Moura (2016).





**Figura 5.** Mapa do estado de São Paulo, destacando a localização do município de São Roque.  
Fonte: IBGE - Dados 2012.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Coleta dos isolados virais

Em 2015 e 2016 foram realizadas visitas aos produtores de uva e vinho do município de São Roque, no estado de São Paulo, ocasião em que foram realizadas entrevistas com os produtores vitícolas (2015) e coletas de amostras de materiais vegetais com suspeita de infecções por vírus e viroides (2016). As amostras foram coletadas em nove vinhedos que utilizavam diferentes cultivares de videiras (Tabela 2).

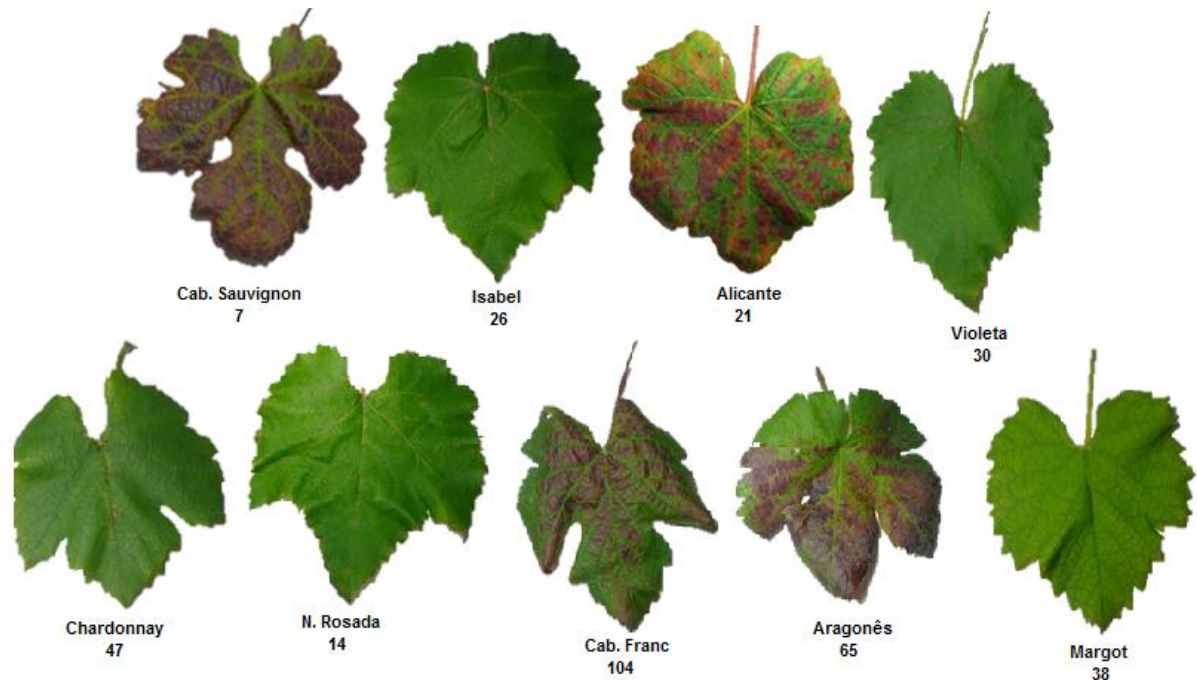
**Tabela 2.** Propriedades amostradas no município de São Roque, SP e número de amostras coletadas em cada local.

Propriedades amostradas	Nº amostras coletadas
Chácara Flores	4
Fazenda Cinzano	28
Fazenda Jubair	43
Sítio Abaçai	8
Sítio Água Branca	4
Sítio Boa Esperança	6
Sítio Canguera	2
Sítio Pessegueiro	22
Sítio XV de Novembro	2
<b>Total</b>	<b>119</b>

Folhas sintomáticas e assintomáticas (Figura 6) e ramos de 119 videiras de 32 cultivares (Tabela 3) foram coletados em nove vinhedos do município de São Roque, Estado de São Paulo, Brasil, durante o verão de 2016. As cultivares de uva amostrada foram: *V. vinifera* (Alfrocheiro, Alicante, Alvarinho, Aragonês, Arinto D'ouro, Cabernet Franc, C. Sauvignon, Chardonnay, Fernão Dias, Malbec, Marselan, Moscato Setubal, Pinot Noir, Pinotage, Rebo, Sauvignon Blanc, Syrah, Tinta Cão, Tinta Roriz, Touriga Nacional, Verdelho), *V. labrusca* (Bordô, Bordô Grano D'oro, Concord, Isabel, Niágara Branca, N. Rosada) e **híbridos** (cultivares BRS: Carmem, Isis, Lorena, Margot, Violeta).

**Tabela 3.** Cultivares de videira e amostras por propriedade coletadas no Município de São Roque, SP.

CULTIVARES	Nº DE AMOSTRAS
Alfrocheiro	3
Alicante	2
Alvarinho	4
Aragonês	3
Arinto Douro	2
Bordô	4
Bordo Grano D'oro	2
BRS Carmem	2
BRS Isis	4
BRS Lorena	8
BRS Margot	2
BRS Violeta	4
Cabernet Franc	7
Cabernet Sauvignon	4
Chardonnay	2
Concord	2
Fernão Dias	2
Isabel	10
Malbec	4
Marselan	2
Moscato Setubal	3
Niágara Branca	12
Niágara Rosada	6
Pinot Noir	4
Pinotage	2
Rebo	2
Sauvignon Blanc	4
Syrah	2
Tinta Cão	3
Tinta Roriz	2
Touriga Nacional	4
Verdelho	2
Total	119



**Figura 6.** Folhas com sintomas de viroses ou semelhante à virose e folhas assintomáticas coletadas nos vinhedos amostrados. Fotos: Cátia J. M. Moura (2016).

#### 4.2. Extração de RNA total

As extrações de RNA total das amostras coletadas foram efetuadas utilizando o método de adsorção de ácidos nucleicos em partículas de sílica (ROTT & JELKMANN, 2001). Utilizou-se 1 g de pecíolos ou nervuras das folhas, ou, ainda, raspas do lenho de ramos maduros, que foram macerados em nitrogênio líquido. Após a trituração do tecido vegetal, adicionou-se tampão de extração, composto por tiocianato de guanidina 4M. A precipitação do ácido nucleico foi realizada com 150  $\mu$ L de etanol absoluto, 300  $\mu$ L de iodeto de sódio 6 M e 25  $\mu$ L de sílica (60 g de sílica, Sigma S5631, em 500 mL de água livre de RNase) e o sedimento, pós centrifugação, foi ressuscitado em 150  $\mu$ L de água livre de RNase. A qualidade do RNA total extraído foi avaliada utilizando-se oligonucleotídeos e sonda específicos para o rRNA 18S (OSMAN et al., 2007).

### 4.3. Detecção por RT-PCR em tempo real (RT-qPCR TaqMan)

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Virologia Vegetal da Embrapa Uva e Vinho (Bento Gonçalves, RS).

Em todas as análises realizadas por RT-PCR em tempo real (RT-qPCR), água livre de RNase, RNAs extraídos de videiras comprovadamente sadias e controles positivos foram incluídos. Reações de RT-PCR em tempo real foram realizadas em placas de 96 poços utilizando o kit *TaqMan Fast Virus-1 One-Step Master Mix* (Life Technologies): 3 µl de 4X TaqMan Fast Virus One-Step Master Mix, 0,6 µl da mistura de oligonucleotídeos e sonda (415 nM de oligonucleotídeos e 85 nM de sonda), 3 µl de RNA total (cerca de 300 ng) ajustando o volume final para 12 µl. As reações foram realizadas em termociclador *StepOnePlus Real-time PCR System* (Applied Biosystems) como segue: 45 °C por 35 minutos (para a transcrição reversa), 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 15 s (desnaturação) e 60 °C por 1 min (pareamento e extensão). Os dados da reação foram analisados como ensaios de presença/ausência e graficamente, com o auxílio do *StepOne Software v.2.3* (Applied Biosystems), determinando-se o C<sub>q</sub> (ciclo de quantificação). Os oligonucleotídeos e sondas utilizados nas detecções de vírus e viroide por RT-PCR em tempo real, foram anteriormente descritos (OSMAN & ROWHANI, 2008; OSMAN et al., 2007; OSMAN et al., 2008; BIANCHI et al., 2015) ou definidos neste trabalho para GCSV, iniciadores Ctg 468F (5'ACGTTGGATCAACTAGCCGAAG3') (AL RWAHNIH et al., 2015) e GCSV-CS103r (5'ACCCATGTAAATTACACGCCTTC3') e sonda GCSV-CS103 (5'TGCTCCTATGTTTCGTTATGCCATG3'). Todas as sondas foram marcadas com 6-FAM ou VIC e TAMRA nas extremidades 5' e 3', respectivamente.

Os oligonucleotídeos e sondas utilizados na RT-qPCR estão listadas na tabela 4.

**Tabela 4.** Oligonucleotídeos e sondas utilizados para a detecção de vírus e viroide em videira por RT-PCR em tempo real (TaqMan).

Vírus	Oligonucleotídeo e sonda	Fluoróforo / bloqueador	Orientação	Gene alvo	Sequência do oligonucleotídeo (5'-3')	Tamanho do produto (pb)	Referência
GRSPaV	RSPaV-52 F1	----	F	CP	AGACGGGAATACCACCAGCTAA	78	Osman & Rowhani (2008)
	RSPaV-52 F2	----	F		AGACGGGAATCCACCCGCTAA		
	RSPaV-52 F3	----	F		AGACGGGATACCACCAGCTAA		
	RSPaV-130 R1	----	R		AGGAAGAAGTCAAAGGCTGCAA		
	RSPaV-130 R2	----	R		AAGAAAAATCAAAGGCTGCAA		
	RSPaV-75 P1	VIC / TAMRA	P		TGGGCCAAGAAAGGATTTAATGAGAATGAAAAG		
	RSPaV-75 P2	VIC / TAMRA	P		TGGGCCAAGAAAGGGTTTAAATGAGAATGAAAAA		
RSPaV-75 P3	VIC / TAMRA	P	TGGGCCAAGAAGGGATTTAATGAAAATGAGAAA				
GVA	GVA-77 F1	----	F	CP	CGACCGAAATATGTACCTGAATACTC	115	Osman & Rowhani (2008)
	GVA-77 F2	----	F		CGACCGAACTATGTACCTGAATACTC		
	GVA-192 R1	----	R		TTTGCTAGCTTTAGGACCTACTATATCTACCT		
	GVA-192 R2	----	R		CTTGCTAGCCTTAGGTCCTACTATATCTACCT		
	GVA-104 P	VIC / TAMRA	P		CTTCGGGTACATCGCCTTGGTCGG		
GVB	GVB-92 F1	----	F	CP	CTAGGAGTGC GGCTAAACGAA	110	Osman & Rowhani (2008)
	GVB-92 F2	----	F		GGAGTGC GGCCAAACGA		
	GVB-92 F3	----	F		CAAGGAGTGC GGCTAAACGAA		
	GVB-202 R1	----	R		CCTTAACCTCGTCTGTGATATGGT		
	GVB-202 R2	----	R		CCTTACCTCATCYTGGGATCGTGT		
	GVB-119 P1	6-FAM / TAMRA	P		CTCGTTATGGTCGCTGTTACTGTTGTGGTAG		
	GVB-119 P2	6-FAM / TAMRA	P		ACCGTTACGGCCGTTGTTACTGTTGTGGTAG		
GLRaV-3	GLRaV-3 56 F	----	F	HSP70	AAGTGCTCTAGTTAAGGTCAGGAGTGA	254	Osman & Rowhani (2006); Osman et al. (2007)
	GLRaV-3 285 R	----	R		GTATTGGACTACCTTTCCGGGAAAAT		
	GLRaV-3 181 P	VIC / TAMRA	P		CAGGTAATAGCGGACTGAGACTGGTGGACA		
GFkV	Fleck 239 F	----	F	RdRP	CAACATCGAATGCCAATTTGG	89	Osman et al. (2008)
	Fleck 328 R	----	R		GCCAGGCTGTAGTCGGTGTGT		
	Fleck 261 P1	6-FAM / TAMRA	P		CCTCTCACGTGCATGCGCATC		
	Fleck 261 P2	6-FAM / TAMRA	P		CCTCTCACGTGCATGCGGATC		
	Fleck 261 P3	6-FAM / TAMRA	P		CCTCTGACGTGCATGCGCATC		
18S rRNA	18S rRNA 449 F	----	F	18S rRNA	GTGACGGAGAATTAGGGTTCGA	70	Osman et al. (2007)
	18S rRNA 498 R	----	R		CTGCCTTCCTTGGATGTGGTA		
	18S rRNA 475 P	6-FAM / TAMRA	P		CCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGG		
GLRaV-1	LR1 HSP70-149 F	----	F	HSP70	ACCTGGTTGAACGAGATCGCTT	145	Osman et al. (2007); Klaassen et al. (2011)
	LR1 HSP70-293 R	----	R		GTAAACGGGTGTTCTTCAATTCTCT		
	LR1 HSP70-225 P	6-FAM / TAMRA	P		ACGAGATATCTGTGGACGGA		
	LR1-149 f2	----	F		ACTTGGTTGAACGAGATTGCTT		
	LR1-149 f3	----	F		ACCTGGTTGAATGAGATCGCTT		
	LR1-225 p2	6-FAM / TAMRA	P		ACGAGATATCAGTGGACGGA		
GCSV	Ctg 468F	----	F	componente 4 do dsRNA	ACGTTGGATCAACTAGCCGAAG	103	Al Rwahnih et al. (2015); Moura et al. (2017)
GCSV	GCSV-CS103r	----	R		ACCCATGTAAATTACACGCCTTC		

	GCSV-CS103 probe	6-FAM / TAMRA	P	viral	TGCTCCTATGTTGTTATGCCATG		
GSyV-1	GSyV-1PozF	----	F	gene da poliproteína	CTCAGCCTTCTCTGCCTCTG	121	Bianchi et al. (2015)
	GSyV-1PozR	----	R		TCAACGGTGAAGATGGTGGA		
	GSyV-1PozP probe	6-FAM / TAMRA	P		CCCTTCCAATGGGTCGCACTTGTT		
GYSVd-1	GYSVd-1 PozFa	----	F	RNA viroidal	GTGGTTCCTGTGGTTTCACC	126	Bianchi et al. (2015)
	GYSVd-1 PozFb	----	F		GTGGTTCCTGTGGTTACACC		
	GYSVd-1 PozR	----	R		GACGTCCGACCAGCTCAGG		
	GYSVd-1P probe	6-FAM / TAMRA	P		AGAAGAAGATAGGGGCAGAGGGG		

Legenda: F (forward, viral), R (reverso, complementar), P (probe, sonda), CP (coat protein, proteína capsidial), RdRp (polimerase de RNA dependente de RNA).

#### 4.4. Detecção por RT-PCR convencional

Visando-se comparar as técnicas de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) e RT-PCR convencional na detecção de GSyV-1 e GLRaV-3, dezessete amostras, selecionadas aleatoriamente dentre aquelas previamente determinadas positivas para GSyV-1 ou GLRaV-3 por RT-qPCR, foram analisadas por RT-PCR convencional utilizando iniciadores específicos para amplificar estes dois vírus.

Para caracterização molecular do gene da proteína capsidial (CP), cinco (GSyV-1) e seis (GLRaV-3) isolados detectados foram selecionados dentre as plantas infectadas. Também, outros três isolados de GSyV-1, coletados em Bento Gonçalves, região Sul do Brasil, foram molecularmente caracterizados para comparação entre isolados de regiões diferentes. Os pares de iniciadores utilizados para amplificar o GSyV-1 por One-Step RT-PCR foram GVQCP-R (5'GCATTGCTGCGCATTGGAGG3') e GVQCP-F (5'TCCCAGCTTCAGGGTGAATT3') (ENGEL et al., 2010) e para amplificar o GLRaV-3 foram LR3-9445c (5'CTACTTCTTTTGCAATAGTT3') e LR3-8504v (5'ATGGCATTGAACTGAAATT3') (FAJARDO et al., 2007), complementares e virais, respectivamente. A RT-PCR em etapa única foi realizada utilizando o kit One-Step RT-PCR (Qiagen) e as reações foram realizadas de acordo com o fabricante, com 4 µl de RNA total (cerca de 400 mg) e volume final da reação de 20 µl. Os ciclos de amplificação foram constituídos por: 50 °C por 30 min, 95 °C por 15 minutos, 35 ciclos: 94 °C por 50 s, 50 °C por 50 s, 72 °C por 1 min, e uma extensão final de 72 °C por 10 min. Os produtos da RT-PCR foram analisados em géis de agarose a 1,2% preparado com tampão TBE pH 8,0, e visualizados na presença de brometo de etídeo sob luz UV. As bandas de DNA de tamanho esperado foram recortadas dos géis e o DNA eluído utilizando-se o kit Wizard SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega).

#### 4.5. Clonagem e seleção de clones recombinantes

Os fragmentos de DNA eluídos foram ligados ao vetor pGEM-T Easy (Promega). O produto das reações de ligação foi utilizado para a transformação de células competentes de *Escherichia coli* DH5α por choque térmico. Os plasmídeos recombinantes de colônias bacterianas transformadas foram extraídos utilizando o kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). A presença do fragmento de DNA viral clonado em plasmídeos recombinantes foi confirmada por digestão com a enzima de restrição *EcoRI* (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). O sequenciamento automático de nucleotídeos pelo método de Sanger foi realizado em dois clones por isolado.

#### 4.6. Estudo de homologia de sequências

Os alinhamentos de sequências de nucleotídeos (nt) e aminoácidos deduzidos (aad) e a geração da matriz de identidades de nt e aad foram realizados com auxílio dos programas Clustal X 1.8 (THOMPSON et al., 1997) e BioEdit 7.2.5 (HALL, 1999). As sequências obtidas para GSyV-1 foram alinhadas com o isolado de GSyV-1 (GenBank NC\_012484) e com outras sequências do gene da proteína capsidial (CP) disponíveis no GenBank. Da mesma forma, comparou-se as sequências CP obtidas para o GLRaV-3 com o isolado de GLRaV-3 (NC\_004667) e outros 13 isolados de GLRaV-3, selecionados dentre isolados com genoma completo disponíveis no GenBank, além de seis isolados brasileiros previamente caracterizados. Utilizou-se o programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013) para as análises filogenéticas. Os códigos de acesso no GenBank das sequências de nucleotídeos dos isolados obtidos neste trabalho e utilizados para, a análise filogenética são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Informações sobre os isolados de GSyV-1 e GLRaV-3 coletados em São Roque (SP) e caracterizados neste trabalho.

Vírus	Fragmentos de DNA amplificados por RT-PCR	Cultivar (espécie e amostra de videira)	Nome do isolado
GSyV-1	723 bp (CP completa, 627 bp)	Rebo ( <i>V. vinifera</i> , amostra 19)	REB-BR
GSyV-1	723 bp (CP completa, 627 bp)	BRS Margot (híbrido, amostra 38)	MAR-BR
GSyV-1	723 bp (CP completa, 627 bp)	Touriga Nacional ( <i>V. vinifera</i> , amostra 68)	TR1-BR
GSyV-1	723 bp (CP completa, 627 bp)	Touriga Nacional ( <i>V. vinifera</i> , amostra 81)	TR2-BR
GSyV-1	723 bp (CP completa, 627 bp)	Alfrocheiro ( <i>V. vinifera</i> , amostra 118)	ALF-BR
GSyV-1 <sup>(*)</sup>	723 bp (CP completa, 627 bp)	<i>Vitis flexuosa</i> (videira selvagem, amostra 2M-BG)	VF-BR
GSyV-1 <sup>(*)</sup>	723 bp (CP completa, 627 bp)	Moscato de Hamburgo ( <i>V. vinifera</i> , amostra 6-BG)	MH
GSyV-1 <sup>(*)</sup>	723 bp (CP completa, 627 bp)	Trajadura ( <i>V. vinifera</i> , amostra 18-BG)	TRAJ-BR
GLRaV-3	942 bp (CP completa)	Niagara Rosada ( <i>V. labrusca</i> , amostra 5)	NR-BR
GLRaV-3	942 bp (CP completa)	BRS Margot (híbrido, amostra 37)	MARG-BR
GLRaV-3	942 bp (CP completa)	Chardonnay ( <i>V. vinifera</i> , amostra 48)	CH-BR
GLRaV-3	942 bp (CP completa)	Touriga Nacional ( <i>V. vinifera</i> , amostra 82)	TN-BR
GLRaV-3	942 bp (CP completa)	BRS Violeta	VI-BR



		(híbrido, amostra 100)	
GLRaV-3	942 bp (CP completa)	Moscato Setubal ( <i>V. vinifera</i> , amostra 119)	MS-BR

Legenda: (\*) Amostras coletadas em Bento Gonçalves, RS.

As relações filogenéticas foram determinadas a partir do alinhamento múltiplo das sequências utilizando-se o método máxima parcimônia (10.000 replicações de bootstrap) no programa MEGA 6.0. A massa molecular das proteínas capsidiais dos vírus GSyV-1 e GLRaV-3 foram calculadas utilizando-se o software ExpAsy ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)).

#### 4.7. Detecção viral por RT-PCR em tempo real em possíveis vetores

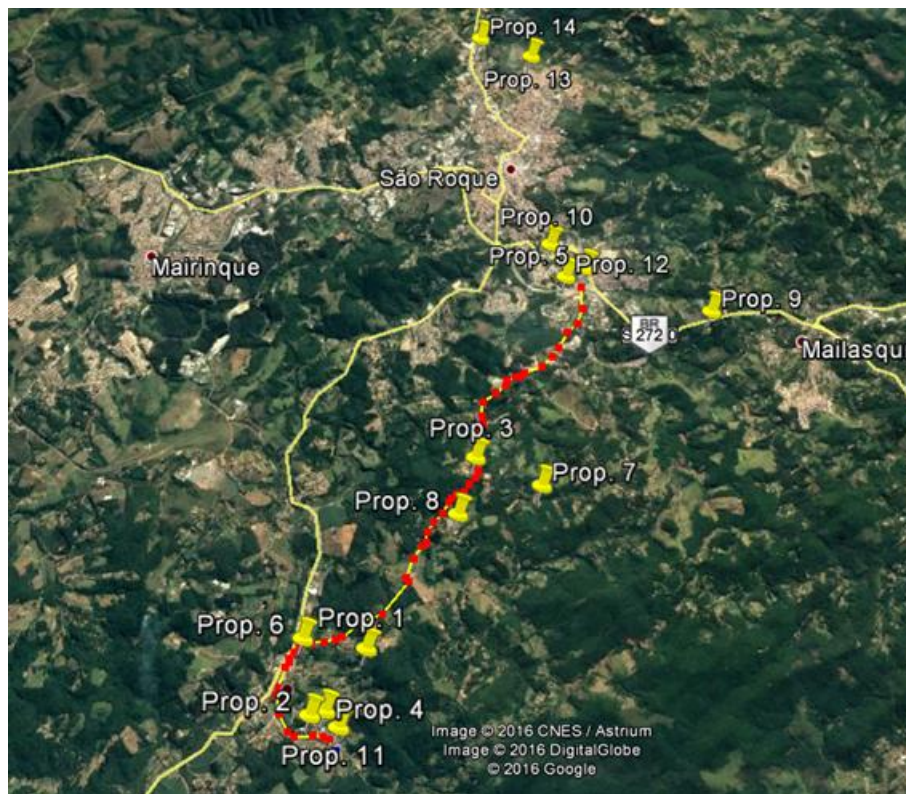
Vinte e oito amostras, sendo constituídas por cochonilhas de carapaça (11 amostras) e cochonilhas farinhentas (17 amostras), foram coletadas nos vinhedos amostrados para tecidos vegetais em São Roque (SP) e depois testadas para a presença de GLRaV-1, GLRaV-3, GVA e GVB por RT-qPCR. As espécies de cochonilhas coletadas foram identificadas por Vitor C. P. da Silva, como sendo: *Partenolecanium* spp, família *Coccidae* e *Pseudococcus longispinus* (Targioni-Tozzetti) e *Planococcus citri* (Risso), família *Pseudococcidae*. A extração do RNA total foi realizada com o reagente TRIzol (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante. As amostras extraídas foram compostas de 6 a 8 insetos adultos ou ninfas em diferentes estádios de desenvolvimento, maceradas em tampão de extração [0,5 M Tris-HCl, pH 8,3, 0,14 M NaCl, 2% PVP-40 (p/v), 0,05% Tween 20 (v/v)] e homogeneizadas em TRIzol. Foram utilizados clorofórmio e álcool isopropílico para a separação das fases por centrifugação, coletando-se, a seguir, o RNA<sub>t</sub> contido na fase aquosa. O sedimento final seco foi ressuscitado em água autoclavada. Em seguida, realizou-se as reações RT-qPCR conforme descrito anteriormente.

Como controles negativos e positivos, utilizou-se RNA total foi extraído de cochonilhas criadas em laboratório, livres de vírus, e cochonilhas virulíferas, mantidas em videiras infectadas com vírus em casa de vegetação, respectivamente.

#### 4.8. Aplicação de questionários aos produtores vitícolas

Foi aplicado um questionário (Apêndice) a treze dos quatorze produtores de uva e vinho atualmente em atividade em São Roque, SP. Os vinhedos foram analisados quanto ao histórico da uva e vinho no município, tipo de cultivo (convencional ou orgânico) e práticas para o manejo de pragas. As entrevistas foram realizadas com os responsáveis pelas

seguintes propriedades: Chácara das Flores, Fazenda Cinzano, Fazenda Jubair, Sítio Abaçai, Sítio Água Branca, Sítio Boa Esperança, Sítio Canguera, Sítio Pessegueiro, Sítio XV de Novembro, Vinícola Bella Aurora, Vinhos Santa Terezinha e Quinta dos Guimarães, Vinhos Palmeiras, Vinhos Frank e Vinhos Sabbatini. O responsável por uma das quatorze propriedades vitivinícolas do município (Vinhos Quinta do Nino) não concedeu entrevista. A localização das 14 propriedades está indicada na Figura 7.



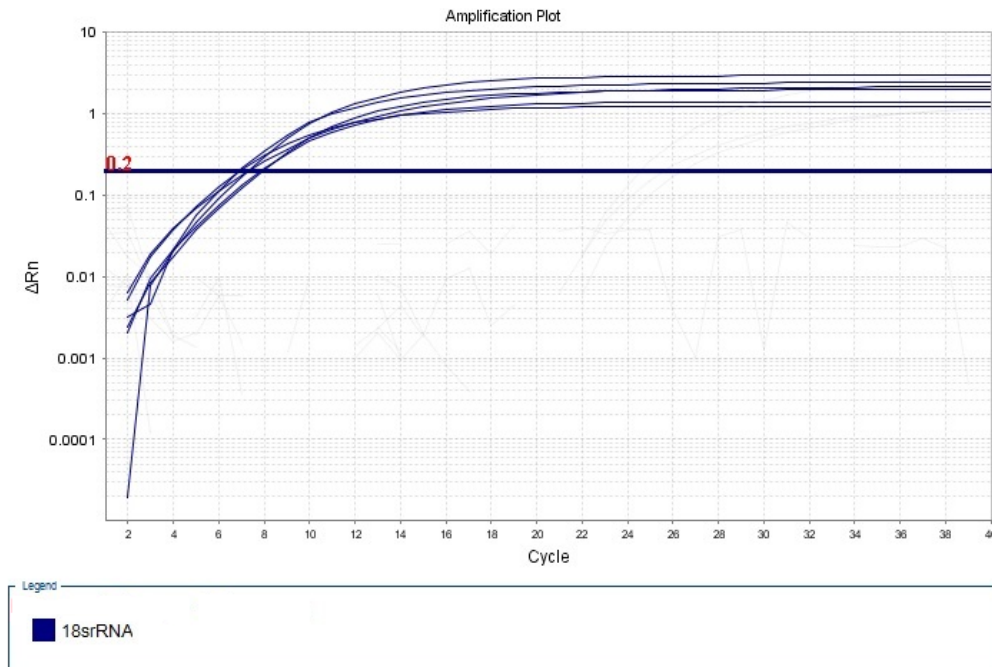
**Figura 7.** Vista geral das propriedades vitivinícolas do município de São Roque, com identificação das propriedades conforme numeração na imagem: **1** - Chácara das Flores, **2** - Fazenda Jubair e Cinzano, **3** - Sítio Abaçai, **4** - Sítio Água Branca, **5** - Sítio Boa Esperança, **6** - Sítio Canguera, **7** - Sítio Pessegueiro, **8** - Sítio XV de Novembro, **9** - Vinícola Bella Aurora, **10** - Vinhos Santa Terezinha e Quinta dos Guimarães, **11** - Vinhos Palmeiras, **12** - Vinhos Frank, **13** - Chácara Sabbatini, **14** - Vinhos Quinta do Nino. Os pontos vermelhos a estrada do vinho.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Extração e avaliação da qualidade do RNA total

A integridade do RNA total extraído das videiras indexadas foi avaliada por meio de RT-PCR em tempo real (Figura 8). Conforme se observa nesta figura, é possível inferir, de forma indireta, a partir dos resultados das ampliações, que as extrações realizadas

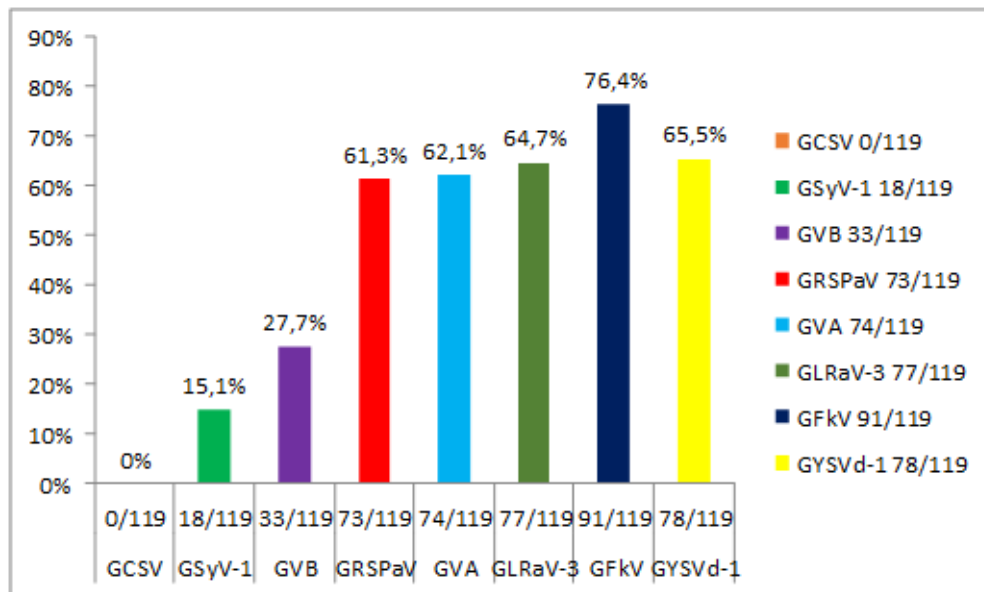
resultaram em RNA total com qualidade em relação à integridade e à pureza. Isto permite supor que as indexações virais por RT-PCR em tempo real, utilizando-se as mesmas extrações de RNA, resultaram em detecções confiáveis e precisas.



**Figura 8.** Curvas de amplificação do 18S rRNA, onde é possível comprovar indiretamente a integridade e a qualidade do RNA total extraído de amostras de videira coletadas em São Roque, SP.

## 5.2. Detecção viral em reação única por RT-PCR em tempo real (RT-qPCR)

Os vírus e viroide que infectam videiras no município de São Roque eram desconhecidos, e o conhecimento do estado fitossanitário de uma cultura em uma região específica é o primeiro passo para se propor estratégias de manejo e práticas de controle. Por conseguinte, 119 amostras de videira, testadas por RT-PCR em tempo real revelaram um nível elevado e variado de infecções virais e viroidal nas amostras analisadas: 0% (GCSV), 15,1% (GSyV-1), 27,7% (GVB), 61,3% (GRSPaV), 62,1 % (GVA), 64,7% (GLRaV-3), 76,4% (GFkV) e 65,5% (GYSVd-1) (Figura 9). Os resultados demonstraram haver frequente ocorrência de infecções múltiplas, com somente 10,9% de amostras aparentemente saudias (ou seja, pelo menos, estariam livres dos oito agentes patogênicos avaliados), 7,6% infectadas com apenas um agente patogênico, e a grande maioria, 81,5%, infectada com dois ou mais vírus e ou viroide. A infecção média das amostras considerando-se os oito patógenos, foi de 46,6%.



**Figura 9.** Representação gráfica da incidência (em % de infecção) para sete espécies virais e um viroide, em 119 amostras de videiras coletadas no município de São Roque, SP, em 2016, e avaliadas por RT-PCR em tempo real (amostras infectadas/amostras analisadas).

Na tentativa de estabelecer hipóteses para os resultados obtidos da indexação viral por RT-qPCR (Tabela 6) é possível analisar a situação apresentada por duas amostras da cv. BRS Margot (enxertadas no porta-enxerto cv. IAC 766, plantio em agosto/2008) da Fazenda Jubair e de duas amostras/cada das cvs Fernão Dias e Touriga Nacional (enxertadas na cv. P1103, plantios em agosto/2013) da Fazenda Cinzano, pois todos estes materiais apresentaram alta taxa de infecção (5-6 vírus e/ou um viroide). Estes materiais, segundo relato dos produtores, teriam a mesma origem, ou seja, foram adquiridos na forma de mudas enxertadas de raiz nua do mesmo viveiro (registrado) que comercializa mudas de videira. O fato dessas mudas ter origem comum poderia sugerir que a infecção viral múltipla tivesse se originado na fonte do material propagativo, utilizada para a produção das mudas.

Em relação a duas amostras da cv. Pinotage da Fazenda Jubair (enxertadas na cv. SO4, plantio em agosto/2015) e de duas amostras da cv. Pinot Noir da Chácara Flores (enxertadas em P1103 e com mesma data de plantio) não foram observadas infecções com os patógenos testados. Segundo os produtores dessas cultivares, também neste caso, há uma origem comum das mudas que foram adquiridas em um município da Serra Gaúcha. Assim, nesta situação, também seria possível levantar a hipótese do efeito da origem/fonte comum do material propagativo (muda) adquirido pelos produtores. Além desse fator específico, outros podem ter influenciado as taxas de infecção viral que foram determinadas (Tabela 6) tais como, idade do plantio, presença de vetores (principalmente cochonilhas),

presença de fonte de inóculo viral (vinhedo antigo infectado) próxima ao vinhedo novo, dentre outros.

**Tabela 6.** Resultado da indexação viral por RT-qPCR para sete vírus e um viroide em 119 amostras de videira coletadas no município de São Roque, SP.

Nº amostra	Cultivar	Local de coleta	GRSPaV	GYSVd-1	GVB	GSyV-1	GCSV	GLRaV-3	GVA	GFkV	Nº de infecções
1	Isabel	Sítio Boa Esperança	+	+	+	-	-	+	+	+	≥2
2	Isabel	Sítio Boa Esperança	-	+	+	-	-	+	+	+	≥2
3	Niagara Branca	Sítio Boa Esperança	-	+	+	-	-	+	+	+	≥2
4	Niagara Branca	Sítio Boa Esperança	-	-	-	-	-	+	+	+	≥2
5	Niagara Rosada	Sítio Boa Esperança	+	+	+	-	-	+	+	+	≥2
6	Niagara Rosada	Sítio Boa Esperança	+	+	+	-	-	+	+	+	≥2
7	Cabernet Sauvignon	Fazenda Jubair	+	+	-	+	-	+	+	+	≥2
8	Cabernet Sauvignon	Fazenda Jubair	+	+	-	+	-	-	-	+	≥2
9	Pinot Noir	Fazenda Jubair	+	+	-	-	-	-	-	-	≥2
10	Pinot Noir	Fazenda Jubair	-	-	-	-	-	-	-	+	1
11	Niagara Branca	Fazenda Jubair	+	-	-	-	-	+	+	+	≥2
12	Niagara Branca	Fazenda Jubair	+	+	-	-	-	+	+	+	≥2
13	Niagara Rosada	Fazenda Jubair	-	+	+	-	-	+	+	+	≥2
14	Niagara Rosada	Fazenda Jubair	-	-	+	-	-	+	+	-	≥2
15	Malbec	Fazenda Jubair	-	-	-	-	-	-	-	-	0
16	Malbec	Fazenda Jubair	+	-	-	-	-	+	+	+	≥2
17	Pinotage	Fazenda Jubair	-	-	-	-	-	-	-	-	0
18	Pinotage	Fazenda Jubair	-	-	-	-	-	-	-	-	0
19	Rebo	Fazenda Jubair	+	+	-	+	-	+	+	+	≥2
20	Rebo	Fazenda Jubair	-	+	-	-	-	-	-	-	1
21	Alicante	Fazenda Jubair	-	-	-	-	-	-	+	+	≥2
22	Alicante	Fazenda Jubair	-	-	-	-	-	-	+	+	≥2
23	Alvarinho	Fazenda Jubair	+	+	-	-	-	+	+	+	≥2
24	Alvarinho	Fazenda Jubair	+	-	-	-	-	-	-	-	1
25	Isabel	Fazenda Jubair	+	-	-	-	-	-	-	-	1
26	Isabel	Fazenda Jubair	+	+	-	-	-	+	+	+	≥2
27	BRS Lorena	Fazenda Jubair	+	-	+	+	-	+	+	+	≥2
28	BRS Lorena	Fazenda Jubair	+	+	+	-	-	+	+	+	≥2
29	BRS Violeta	Fazenda Jubair	+	+	-	-	-	+	+	+	≥2
30	BRS Violeta	Fazenda Jubair	-	+	-	-	-	+	+	+	≥2
31	Bordo Grano D'oro	Fazenda Jubair	+	+	+	-	-	+	+	+	≥2
32	Bordo Grano D'oro	Fazenda Jubair	+	+	+	-	-	+	+	+	≥2
33	Sauvignon Blanc	Fazenda Jubair	+	-	-	-	-	-	+	+	≥2
34	Sauvignon Blanc	Fazenda Jubair	+	+	-	-	-	-	-	-	≥2
35	BRS Carmem	Fazenda Jubair	-	-	-	-	-	+	+	-	≥2
36	BRS Carmem	Fazenda Jubair	-	-	-	-	-	+	+	+	≥2
37	BRS Margot	Fazenda Jubair	+	+	+	-	-	+	+	+	≥2
38	BRS Margot	Fazenda Jubair	+	+	+	+	-	+	+	+	≥2

39	Concord	Fazenda Jubair	+	+	-	-	-	+	+	+	≥2
40	Concord	Fazenda Jubair	+	+	+	-	-	+	+	+	≥2
41	Syrah	Fazenda Jubair	-	+	-	+	-	-	+	+	≥2
42	Syrah	Fazenda Jubair	+	+	-	-	-	-	+	+	≥2
43	Marselan	Fazenda Jubair	-	+	-	-	-	-	-	-	1
44	Marselan	Fazenda Jubair	+	-	-	-	-	-	+	-	≥2
45	Cabernet Franc	Fazenda Jubair	+	+	-	-	-	+	+	+	≥2
46	Cabernet Franc	Fazenda Jubair	+	+	+	-	-	+	+	+	≥2
47	Chardonnay	Fazenda Jubair	+	+	+	-	-	+	+	+	≥2
48	Chardonnay	Fazenda Jubair	+	+	+	-	-	+	+	+	≥2
49	Niagara Branca	Sítio Água Branca	+	+	+	-	-	+	+	-	≥2
50	Niagara Branca	Sítio Água Branca	-	+	-	-	-	+	+	+	≥2
51	Isabel	Sítio Água Branca	+	+	-	-	-	+	+	+	≥2
52	Isabel	Sítio Água Branca	+	+	+	-	-	-	+	+	≥2
53	Verdelho	Fazenda Cinzano	-	-	-	-	-	-	+	+	≥2
54	Verdelho	Fazenda Cinzano	+	+	-	-	-	-	+	+	≥2
55	Fernão Dias	Fazenda Cinzano	+	+	+	+	-	+	+	+	≥2
56	Fernão Dias	Fazenda Cinzano	+	+	+	+	-	+	+	+	≥2
57	Alvarinho	Fazenda Cinzano	+	+	-	-	-	-	+	+	≥2
58	Alvarinho	Fazenda Cinzano	-	-	-	-	-	-	+	+	≥2
59	Arinto Douro	Fazenda Cinzano	+	+	-	-	-	-	-	+	≥2
60	Arinto Douro	Fazenda Cinzano	+	+	-	+	-	+	+	+	≥2
61	Moscato Setubal	Fazenda Cinzano	+	+	-	-	-	+	+	+	≥2
62	Moscato Setubal	Fazenda Cinzano	-	-	-	-	-	-	-	-	0
63	Alfrocheiro	Fazenda Cinzano	+	+	-	+	-	+	-	+	≥2
64	Alfrocheiro	Fazenda Cinzano	+	+	-	+	-	+	-	+	≥2
65	Aragonês	Fazenda Cinzano	+	-	-	+	-	+	+	+	≥2
66	Aragonês	Fazenda Cinzano	+	-	-	-	-	+	-	+	≥2
67	Touriga Nacional	Fazenda Cinzano	+	+	-	-	-	+	+	+	≥2
68	Touriga Nacional	Fazenda Cinzano	+	+	+	+	-	+	+	+	≥2
69	Tinta Cão	Fazenda Cinzano	+	+	-	-	-	+	-	+	≥2
70	Tinta Cão	Fazenda Cinzano	-	+	-	-	-	-	+	+	≥2
71	BRS Lorena	Fazenda Cinzano	-	-	+	+	-	+	+	+	≥2
72	BRS Lorena	Fazenda Cinzano	+	+	+	-	-	+	-	+	≥2
73	Cabernet Franc	Fazenda Cinzano	+	+	-	-	-	-	-	-	≥2
74	Cabernet Franc	Fazenda Cinzano	-	-	-	-	-	-	-	-	0
75	Cabernet Sauvignon	Fazenda Cinzano	-	+	-	-	-	-	-	-	1
76	Cabernet Sauvignon	Fazenda Cinzano	-	-	-	-	-	-	-	-	0
77	Bordô	Sítio XV de Novembro	+	+	-	-	-	+	+	+	≥2
78	Bordô	Sítio XV de Novembro	+	+	-	-	-	+	-	+	≥2
79	Niagara Branca	Sítio Canguera	-	+	-	-	-	+	-	+	≥2
80	Niagara Branca	Sítio Canguera	+	+	-	-	-	+	+	+	≥2
81	Touriga Nacional	Sítio Aباçai	+	+	-	+	-	+	+	+	≥2
82	Touriga Nacional	Sítio Aباçai	+	+	-	+	-	+	+	+	≥2
83	BRS Lorena	Sítio Aباçai	-	+	-	-	-	+	+	+	≥2
84	BRS Lorena	Sítio Aباçai	-	+	-	-	-	-	+	+	≥2

85	Niagara Branca	Sítio Abaçai	+	+	-	-	-	+	+	+	≥2
86	Niagara Branca	Sítio Abaçai	+	+	-	-	-	+	+	+	≥2
87	Isabel	Sítio Abaçai	-	+	-	-	-	+	+	+	≥2
88	Isabel	Sítio Abaçai	+	+	-	-	-	-	-	-	≥2
89	Niagara Branca	Sítio Pessegueiro	+	+	+	-	-	+	+	+	≥2
90	Niagara Branca	Sítio Pessegueiro	+	+	+	-	-	+	+	+	≥2
91	BRS Lorena	Sítio Pessegueiro	+	+	-	-	-	+	-	+	≥2
92	BRS Lorena	Sítio Pessegueiro	+	+	-	-	-	+	-	+	≥2
93	Sauvignon Blanc	Sítio Pessegueiro	-	-	-	-	-	+	-	+	≥2
94	Sauvignon Blanc	Sítio Pessegueiro	+	+	+	-	-	+	-	-	≥2
95	Bordô	Sítio Pessegueiro	-	-	-	-	-	+	-	+	≥2
96	Bordô	Sítio Pessegueiro	-	-	-	-	-	-	-	-	0
97	Niagara Rosada	Sítio Pessegueiro	+	+	+	-	-	+	+	+	≥2
98	Niagara Rosada	Sítio Pessegueiro	+	+	+	-	-	+	+	+	≥2
99	BRS Violeta	Sítio Pessegueiro	-	-	-	-	-	-	-	-	0
100	BRS Violeta	Sítio Pessegueiro	+	+	+	-	-	+	+	+	≥2
101	Isabel	Sítio Pessegueiro	+	+	+	-	-	+	+	+	≥2
102	Isabel	Sítio Pessegueiro	+	+	+	-	-	+	+	+	≥2
103	Cabernet Franc	Sítio Pessegueiro	+	-	-	-	-	+	-	+	≥2
104	Cabernet Franc	Sítio Pessegueiro	+	-	-	-	-	+	-	+	≥2
105	Tinta Roriz	Sítio Pessegueiro	-	-	-	+	-	-	-	-	1
106	Tinta Roriz	Sítio Pessegueiro	-	-	-	-	-	-	+	+	≥2
107	BRS Isis	Sítio Pessegueiro	-	+	-	-	-	+	+	+	≥2
108	BRS Isis	Sítio Pessegueiro	-	-	-	-	-	-	-	-	0
109	Malbec	Sítio Pessegueiro	-	-	-	-	-	+	-	+	≥2
110	Malbec	Sítio Pessegueiro	-	-	-	-	-	-	-	+	1
111	Pinot Noir	Chácara Flores	-	-	-	-	-	-	-	-	0
112	Pinot Noir	Chácara Flores	-	-	-	-	-	-	-	-	0
113	BRS Isis	Chácara Flores	-	-	-	-	-	-	-	+	1
114	BRS Isis	Chácara Flores	-	-	-	-	-	-	-	-	0
115	Cabernet Franc	Fazenda Jubair	-	-	-	-	-	-	-	-	0
116	Tinta Cão	Fazenda Cinzano	+	+	-	-	-	+	+	+	≥2
117	Aragonês	Fazenda Cinzano	-	+	-	-	-	+	+	+	≥2
118	Alfrocheiro	Fazenda Cinzano	+	+	-	+	-	+	-	+	≥2
119	Moscato Setubal	Fazenda Cinzano	+	+	+	-	-	+	-	+	≥2
	% de infecção		73/119 (61,3%)	78/119 (65,5%)	33/119 (27,7%)	18/119 (15,1%)	0/119 (0%)	77/119 (64,7%)	74/119 (62,1%)	91/119 (76,4%)	13/119 (10,9%, sem infecção) 9/119 (7,6%, uma infecção) 97/119 (81,5%, duas ou mais infecções)

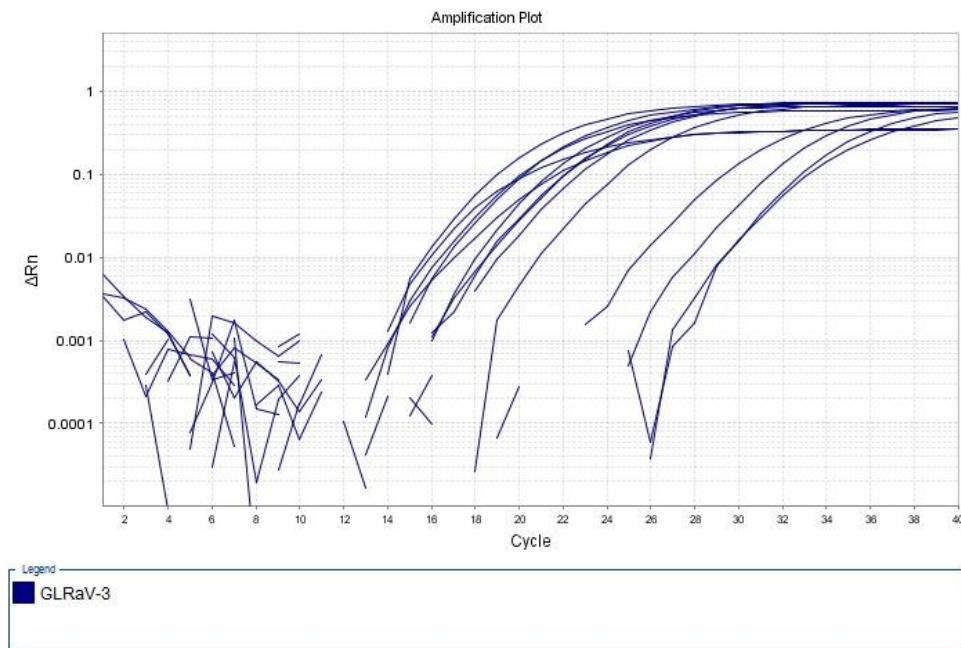
Legenda: (-) ausência de infecção para o vírus testado; (+) presença de infecção para o vírus testado

Em geral, estes agentes patogênicos estão amplamente distribuídos em todos os vinhedos amostrados. Este resultado foi apoiado no fato de que muitas das videiras amostradas (34,4%) apresentaram baixo vigor vegetativo e geralmente algum tipo de sintoma característico de infecções virais, tais como: coloração incomum (avermelhamento ou amarelecimento) ou aparência atípica (aspecto coriáceo) das folhas; e tronco com rachaduras na casca e caneluras no lenho como uma consequência da manutenção dessas infecções a longo prazo (média de 7 anos) nos vinhedos amostrados. Videiras infectadas por vírus podem não apresentar sintomas perceptíveis, uma vez que a infecção pode ocorrer de forma latente (ou assintomática) em alguns genótipos de cultivares comerciais, sendo mais comum em *Vitis labrusca* e híbridos. No Brasil, são plantadas cultivares (cvs.) de *Vitis vinifera* (uva vinífera), videira mais sensível a viroses, e cvs. de *Vitis labrusca* e híbridas (uva comum), tolerantes a viroses. Como base nos resultados das indexações virais, foi possível relacionar a expressão de sintomas com infecção viral e genótipos de videira. Das 63 amostras (21 cvs.) de *V. vinifera*, 9 (14%) não estavam infectadas com nenhum dos patógenos avaliados e 33 amostras (52%) apresentavam sintomas típicos de infecção viral (alterações na cor, formato e textura do limbo foliar). Das 56 amostras (11 cvs.) de *V. labrusca* e híbridas, apenas 4 (7%) não estavam infectadas e 8 amostras (14%) apresentavam sintomas foliares. Do total, 41 amostras (34%) apresentavam sintomas foliares de virose. Demonstrou-se, assim, que as cvs. de *V. labrusca* e híbridas foram, em maior frequência, hospedeiras assintomáticas de vírus quando comparadas a *V. vinifera*, sendo que ambas as espécies apresentaram alta incidência de infecção por um ou mais vírus simultaneamente. Isto reforça a importância da indexação na determinação da condição fitossanitária das videiras. Mesmo nos casos de infecções virais assintomáticas ou latentes, danos menos expressivos também podem ser verificados. Tais danos seriam consequência da diminuição da taxa fotossintética, aumento da respiração, alteração do metabolismo da planta, o que resulta em menor produção de açúcares nos frutos, dentre outros efeitos, causados por vírus. Apesar das possíveis perdas na colheita das uvas não terem sido avaliadas nos vinhedos amostrados, provavelmente elas ocorreram, conforme determinado em outros trabalhos (NAIDU et al., 2015; VEGA et al., 2011). A correlação entre infecções virais e também viroidais, e a expressão de sintomas pode estar relacionada a outros fatores, tais como temperatura, isolados virais (ou de viroides), co-infecções entre vírus (e/ou viroide) e co-infecção entre patógeno virais e não viral. Portanto, não é confiável diagnosticar infecções por vírus e viroides, baseando-se exclusivamente na avaliação de sintomas (OLMOS et al., 2016). Além dos resultados obtidos, há a necessidade de uma avaliação mais extensa em outras áreas de cultivo da videira, visando-se determinar precisamente a distribuição geográfica desses patógenos no Brasil. Estes resultados ampliam o conhecimento sobre a incidência de vírus infectando videiras em uma região

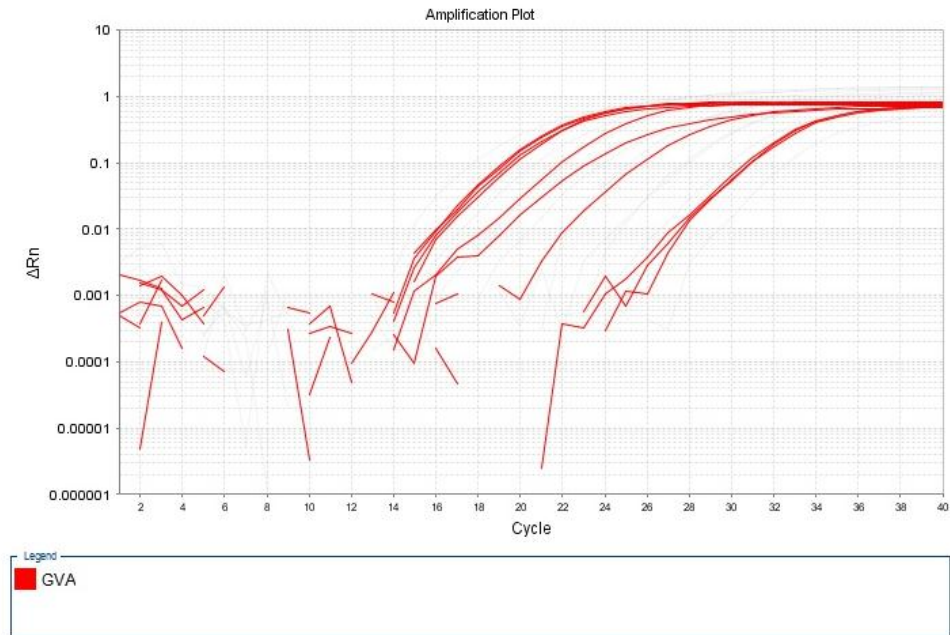


representativa de cultivo de videiras no Brasil, fornecendo informações relevantes para o desenvolvimento de estratégias de controle e manejo destas doenças, com ênfase na importância do uso de material propagativo de videira livre de vírus no estabelecimento de novos vinhedos.

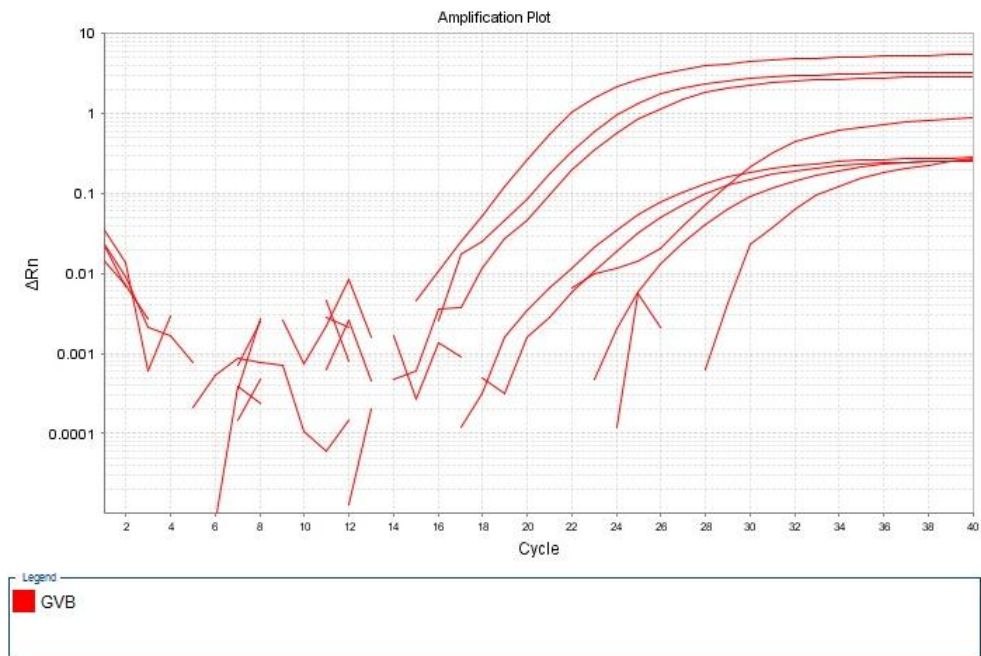
Os vírus GLRaV-3, GVA e GVB detectados por RT-qPCR, (Figuras 10 a 12), são transmitidos por cochonilhas de forma semi-persistente, enquanto GSyV-1 (Figura 13) pode ser transmitido por cigarrinhas como foi demonstrado pela presença do vírus neste inseto (AL RWAHNIH et al., 2009) e GCSV, GRSPaV, GFkV e GYSVd-1 (Figuras 14 a 17) não têm vetores conhecidos. Todos esses patógenos são transmitidos pela enxertia com materiais propagativos infectados (MARTELLI, 2014). Em alguns casos, o modo de transmissão poderia explicar as incidências observadas, em outros não haveria nenhuma correlação.



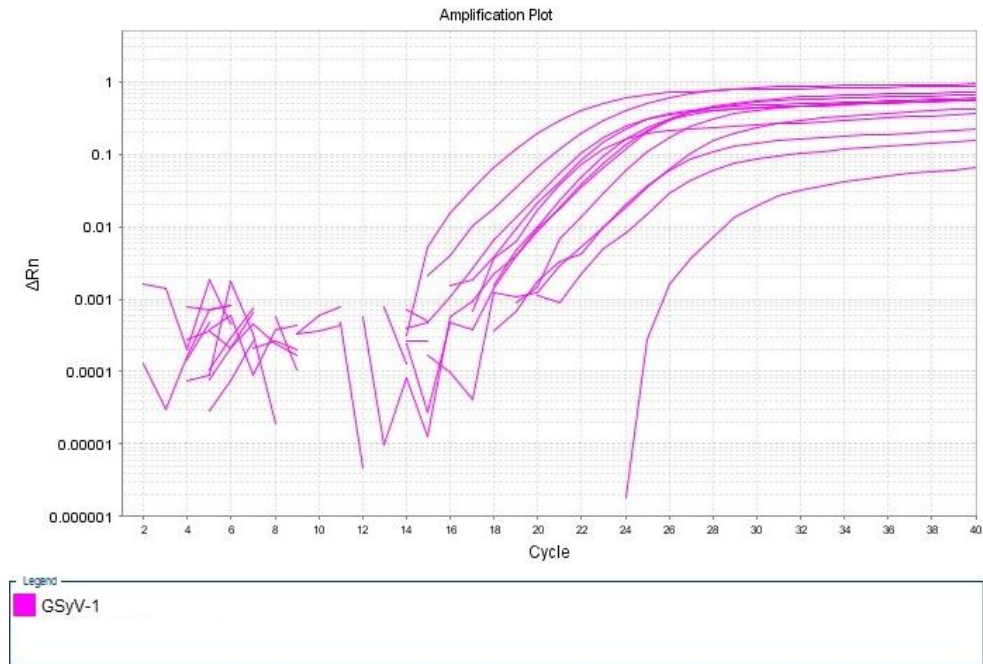
**Figura 10.** Resultado gráfico da amplificação por RT-PCR em tempo real de algumas amostras de videiras infectadas com diferentes isolados de GLRaV-3. Curvas de amplificação para 16 amostras infectadas.



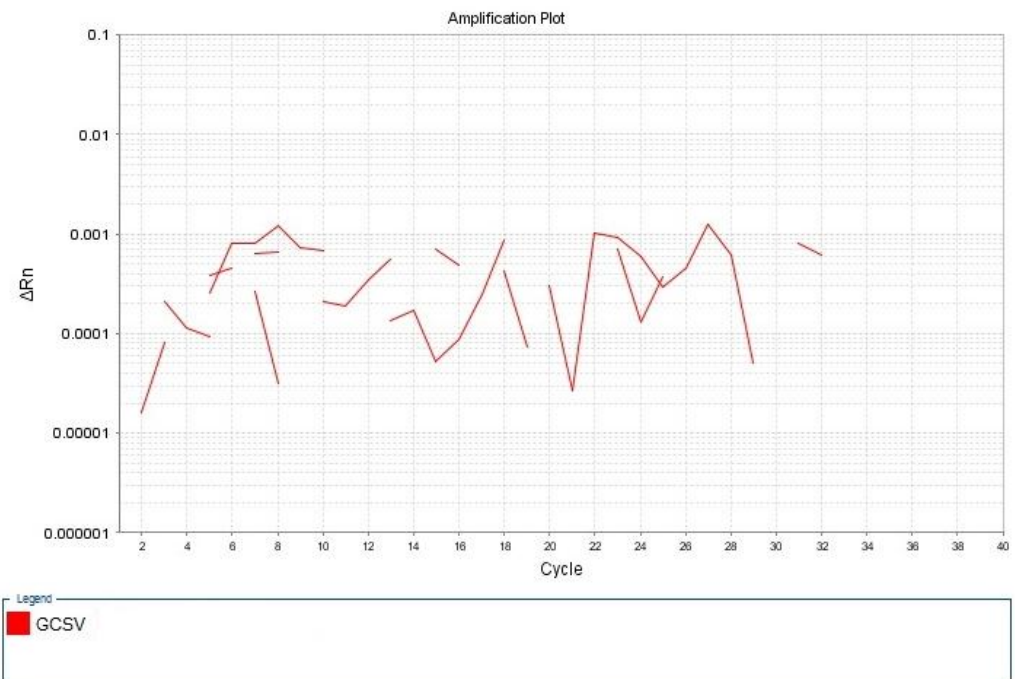
**Figura 11.** Resultado gráfico da amplificação por RT-PCR em tempo real de algumas amostras de videiras infectadas com diferentes isolados de GVA. Curvas de amplificação para 10 amostras infectadas.



**Figura 12.** Resultado gráfico da amplificação por RT-PCR em tempo real de algumas amostras de videiras infectadas com diferentes isolados de GVB. Curvas de amplificação para oito amostras infectadas.

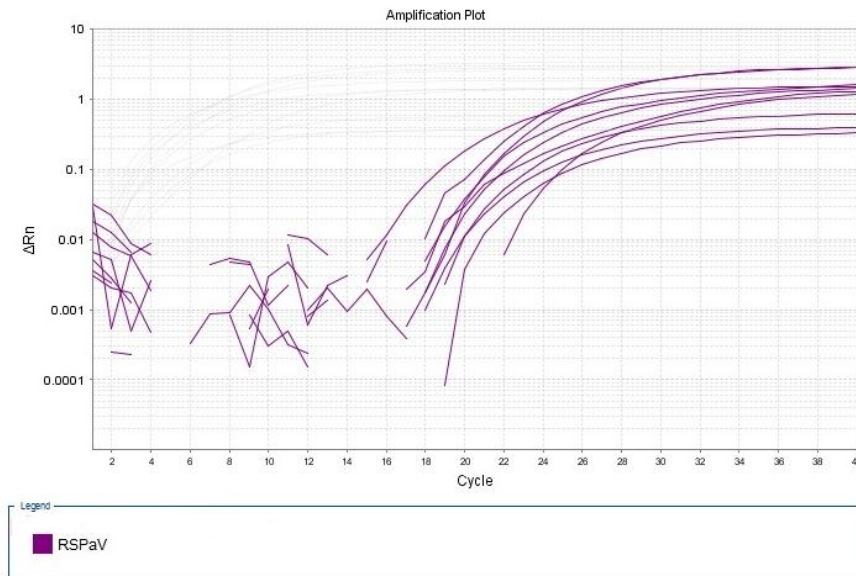


**Figura 13.** Resultado gráfico da amplificação por RT-PCR em tempo real de algumas amostras de videiras infectadas com diferentes isolados de GSYV-1. Curvas de amplificação para 13 amostras infectadas.

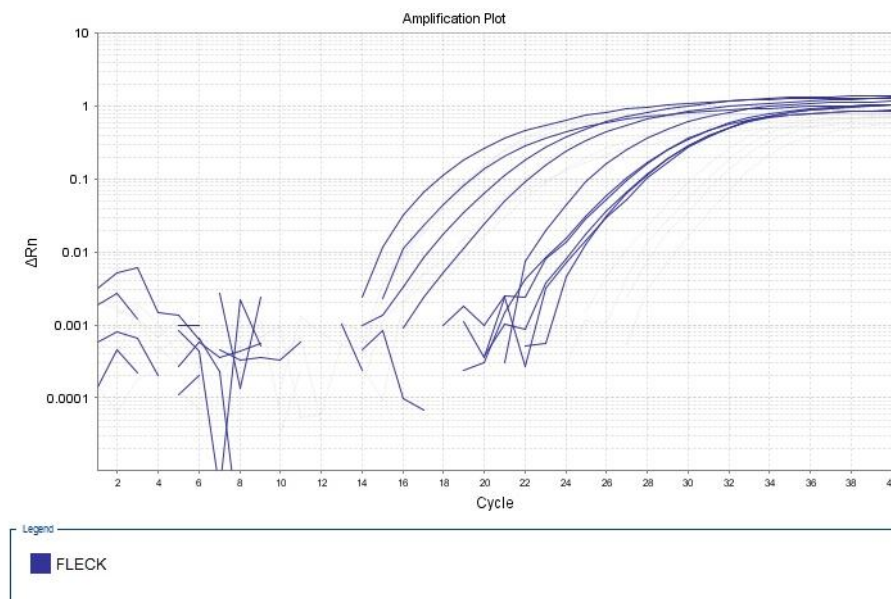


**Figura 14.** Resultado gráfico das reações de RT-PCR em tempo real para algumas amostras de videiras sadias para GCSV. Curvas de amplificação (negativas) para quatro amostras sadias.

Verificou-se alta incidência dos vírus GRSPaV (Figura 15), GFkV (Figura 16) e do viroide GYSVd-1 (Figura 17) por RT-qPCR, todos esses patógenos sem vetor conhecido. Nesta condição, a disseminação das doenças teria ocorrido por meio do uso de estacas ou gemas infectadas no estabelecimento dos vinhedos amostrados. Em outros casos, onde altas incidências também foram observadas, ou seja, para GLRaV-3 e GVA, provavelmente estaria envolvida a atuação de cochonilhas, na transmissão desses vírus. Para os vírus restantes (GCSV, GSyV-1, GVB), argumentos com a mesma lógica, poderiam ser válidos.

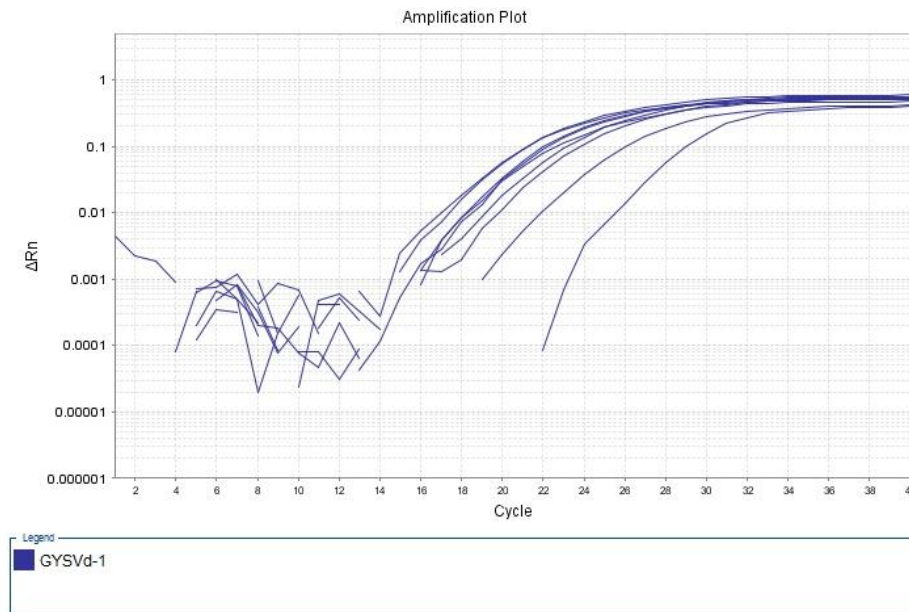


**Figura 15.** Resultado gráfico da amplificação por RT-PCR em tempo real de algumas amostras de videiras infectadas com diferentes isolados de GRSPaV. Curvas de amplificação para 10 amostras infectadas.



**Figura 16.** Resultado gráfico da amplificação por RT-PCR em tempo real de algumas amostras de videiras infectadas com diferentes isolados de GFkV. Curva de amplificação para 10 amostras infectadas.

Com o objetivo de confirmar os resultados obtidos por RT-qPCR (Figura 17), fragmentos amplificados de 126 pb, obtidos para o GYSVd-1, foram sequenciados, resultando em 97-98% identidade de nucleotídeos com outros isolados brasileiros deste viroide [TR-BR (KU880716), MH-BR (KU880714), VI-BR (KU668664), VF-BR (KU880712) e NR-RS-BR (KU668661)].



**Figura 17.** Resultado gráfico da amplificação por RT-PCR em tempo real de algumas amostras de videiras infectadas com diferentes isolados de GYSVd-1. Curvas de amplificação para 10 amostras infectadas.

Os vírus GRSPaV, GVA, GVB, GLRaV-3, GFkV, e o viroide GYSVd-1 já haviam sido detectados no Brasil (BASSO et al., 2014). Porém, GSyV-1 ainda não havia sido detectado em vinhedos comerciais brasileiros, pois sua detecção anterior no país foi realizada em germoplasma e coleções de acessos de videira (FAJARDO et al., 2015a). Em muitos países, levantamentos de vírus e viroides foram realizados em videiras, por exemplo, na Argentina (VOLPE et al., 2010), Chile (FIORE et al., 2011), China (LIU et al., 2013), Estados Unidos (JONES et al., 2015) além de duas regiões do Nordeste do Brasil (CATARINO et al., 2015). Nesses estudos e em outros, a incidência de vírus é altamente variável, dependendo da espécie viral, cultivares da videira e regiões amostradas. Entretanto, invariavelmente, taxas significativas foram verificadas, de modo similar à situação observada neste trabalho.

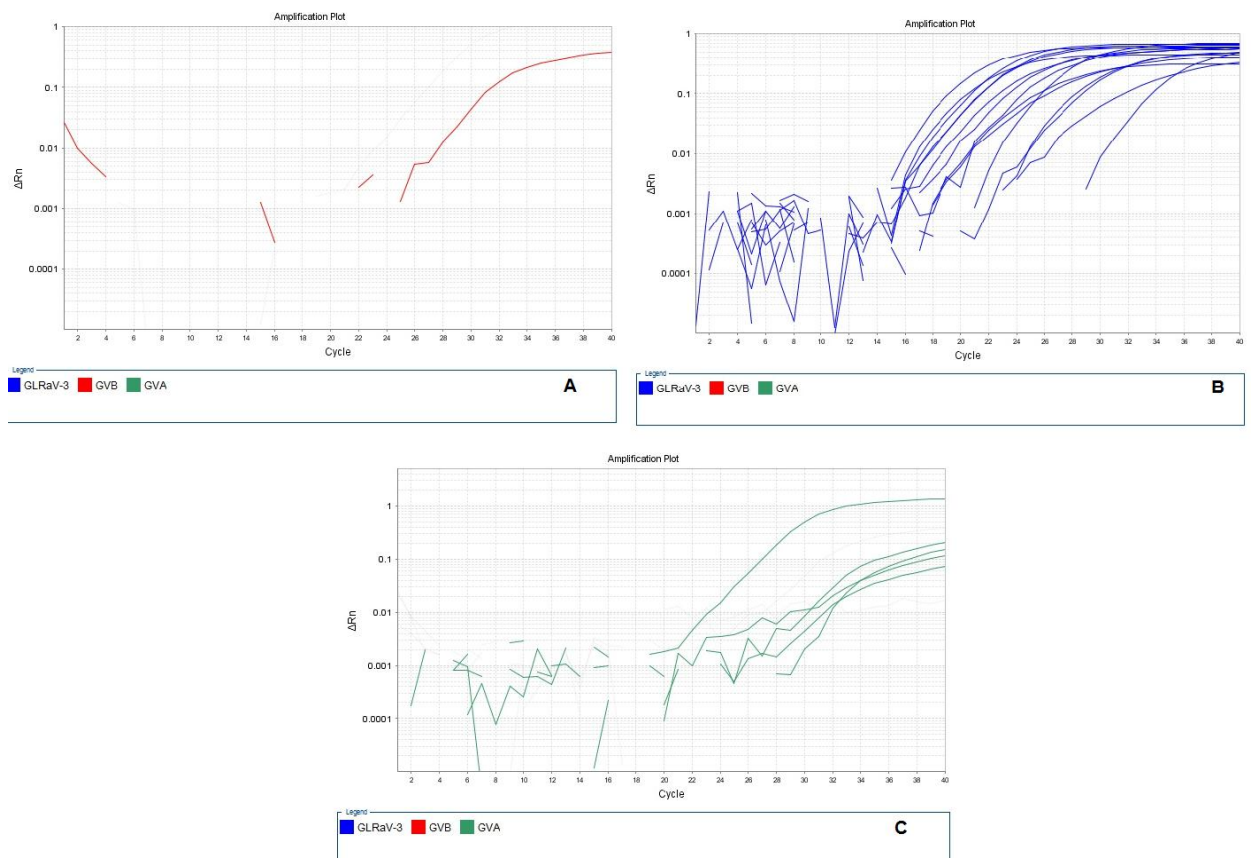
### 5.3. Detecção de vírus em vetores

Cochonilhas, vetoras de algumas espécies de vírus que infectam videiras, foram capturadas em videiras de alguns vinhedos amostrados neste trabalho, para avaliar a presença de vírus por RT-qPCR nesses insetos. Os resultados mostraram que 0% (GLRaV-1), 3,5% (GVB), 17,8% (GVA) e 60,7% (GLRaV-3) das 28 amostras de cochonilhas eram virulíferas, ou seja, carregavam vírus e, muito provavelmente, poderiam atuar como vetores (Tabela 7 e Figura 18). As taxas determinadas para cochonilhas virulíferas com três vírus sugerem que as cochonilhas poderiam estar atuando como vetores e disseminando essas espécies virais nos vinhedos amostrados. As espécies de cochonilhas testadas já foram relatadas como vetores dos quatro vírus mencionados em videira (ALMEIDA et al., 2013, TSAI et al., 2010).

**Tabela 7.** Amostras de cochonilhas e resultados da indexação viral por RT-qPCR.

Número da amostra	Pseudococcídeos ou Coccídeos (Carapaça)	GVA	GVB	GLRaV-3	GLRaV-1
Controle Positivo	Cochonilha virulífera	+	+	+	+
Controle Negativo	Cochonilha avirulífera	-	-	-	-
1	Coccídeos (Carapaça)	-	-	-	-
2	Coccídeos (Carapaça)	-	-	-	-
3	Pseudococcídeos	-	-	-	-
4	Coccídeos (Carapaça)	-	-	-	-
5	Coccídeos (Carapaça)	-	-	+	-
6	Coccídeos (Carapaça)	-	-	-	-
7	Coccídeos (Carapaça)	-	-	-	-
8	Pseudococcídeos	-	-	+	-
9	Pseudococcídeos	+	-	+	-
10	Pseudococcídeos	-	-	+	-
11	Pseudococcídeos	+	-	+	-
12	Pseudococcídeos	-	-	+	-
13	Coccídeos (Carapaça)	-	-	-	-
14	Coccídeos (Carapaça)	-	-	-	-
15	Pseudococcídeos	+	-	+	-
16	Pseudococcídeos	-	-	+	-
17	Coccídeos (Carapaça)	+	+	+	-
18	Coccídeos (Carapaça)	-	-	+	-
19	Pseudococcídeos	-	-	+	-

20	Pseudococcídeos	-	-	+	-
21	Pseudococcídeos	-	-	+	-
22	Coccídeos (Carapaça)	-	-	-	-
23	Pseudococcídeos	-	-	+	-
24	Pseudococcídeos	-	-	-	-
25	Pseudococcídeos	-	-	+	-
26	Pseudococcídeos	+	-	+	-
27	Pseudococcídeos	-	-	-	-
28	Pseudococcídeos	-	-	+	-
Total		5/28	1/28	17/28	0/28
(% de cochonilhas virulíferas)		(17,8%)	(3,5%)	(60,7%)	(0%)



**Figura 18.** Resultado gráfico da amplificação por RT-PCR em tempo real de 28 amostras de cochonilhas. **A.** Curva de amplificação para uma amostra infectada com GVB. **B.** Curvas de amplificação para 17 amostras infectadas com GLRaV-3. **C.** Curvas de amplificação para cinco amostras infectadas com GVA.

#### 5.4. Comparação entre as técnicas de RT-PCR em tempo real e RT-PCR convencional

Nos ensaios realizados para comparar RT-qPCR e RT-PCR convencional, utilizando iniciadores específicos para amplificar os dois vírus, foi possível, por meio de RT-PCR convencional, detectar somente 35,3% (GLRaV-3) e 29,4% (GSyV-1) das dezessete amostras positivas (100%), como previamente determinado por RT-qPCR. Divergências em identidades de nucleotídeos entre isolados destas espécies virais já foram publicadas (FAJARDO et al., 2007; GLASA et al., 2015), o que poderia resultar em ausência de pareamento entre iniciadores e ou sondas e o ácido nucleico do vírus. Este resultado ressalta a relevância de se determinar a variabilidade das sequências visando-se definir iniciadores e sondas para uma detecção confiável de vasta gama de isolados de um determinado vírus alvo. Além da RT-PCR convencional, a RT-qPCR também foi utilizada neste trabalho para avaliar sua capacidade de detectar uma gama de isolados de GSyV-1 e GLRaV-3, independentemente da variabilidade genética existente. Com base nos resultados obtidos, foi demonstrado que os iniciadores e sondas definidos por Bianchi et al. (2015) e Osman et al. (2007) foram adequados para um amplo diagnóstico do GSyV-1 e do GLRaV-3, respectivamente. A variabilidade de sequências do GSyV-1 e GLRaV-3, observadas nas amostras caracterizadas molecularmente, poderia explicar que os iniciadores utilizados na RT-PCR convencional não foram adequados para cobrir toda a variabilidade existente nas regiões genômicas, alvo das reações de amplificação. Outra explicação estaria relacionada à sensibilidade inerente das técnicas de RT-qPCR e RT-PCR convencional (Tabela 8).

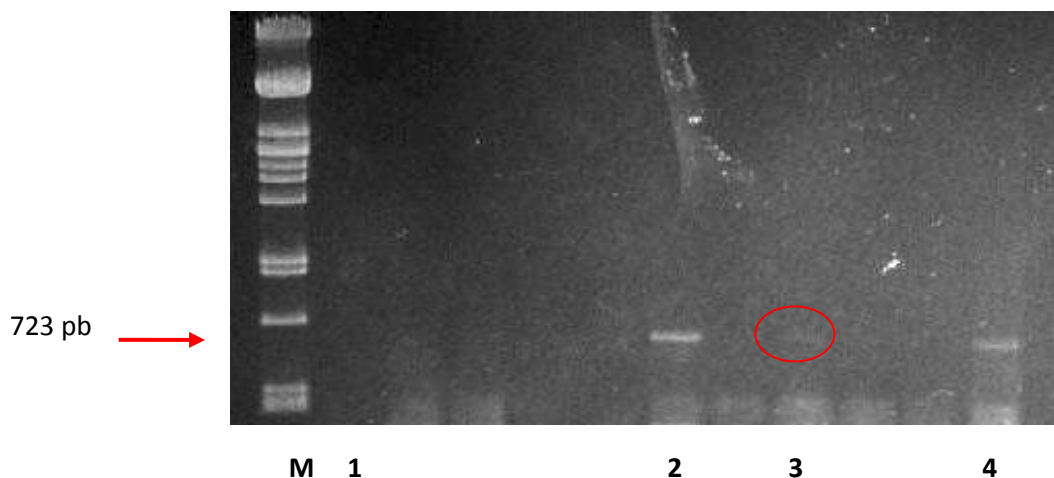
**Tabela 8.** Comparação entre as detecções de GLRaV-3 e GSyV-1 por RT-PCR em tempo real e RT-PCR convencional.

GLRaV-3					GSyV-1				
Nº sequencial	Nº Am.	Cultivar	GLRaV-3 (RT-qPCR)	GLRaV-3 (PCR conv.)	Nº seq.	Nº Am.	Cultivar	GSyV-1 (RT-qPCR)	GSyV-1 (PCR conv.)
1	1	Isabel	+	-	1	7	Cabernet Sauvignon	+	-
2	5	Niagara Rosada	+	+	2	8	Cabernet Sauvignon	+	-
3	27	BRS Lorena	+	-	3	19	Rebo	+	+
4	31	Bordo Grano D'oro	+	-	4	27	BRS Lorena	+	-
5	37	BRS Margot	+	+	5	38	BRS Margot	+	+
6	40	Concord	+	-	6	41	Syrah	+	-
7	48	Chardonnay	+	+	7	55	Fernão Dias	+	-
8	55	Fernão Dias	+	-	8	56	Fernão Dias	+	-
9	60	Arinto Douro	+	-	9	60	Arinto Douro	+	-
10	63	Alfrocheiro	+	-	10	63	Alfrocheiro	+	-
11	65	Aragonês	+	-	11	64	Alfrocheiro	+	-
12	82	Touriga Nacional	+	+	12	68	Touriga Nacional	+	+

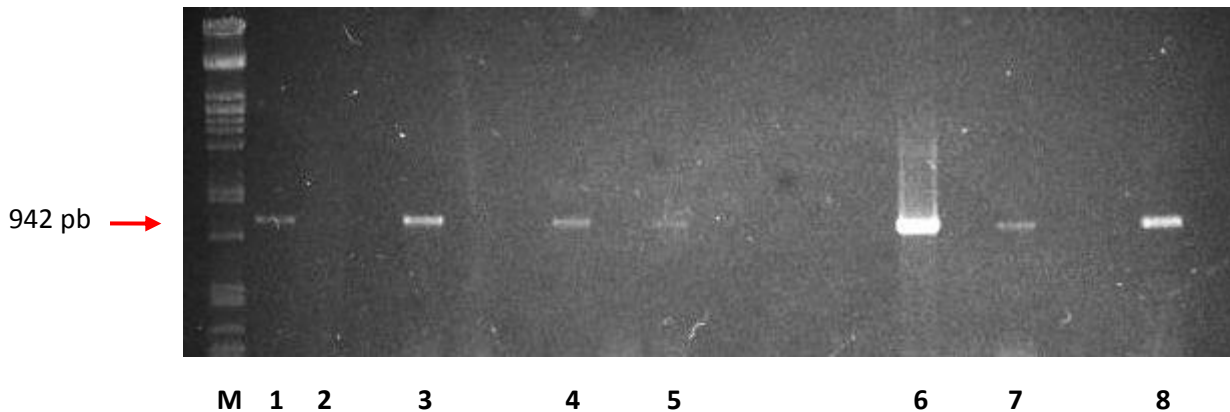


13	94	Sauvignon Blanc	+	-	13	71	BRS Lorena	+	-
14	100	BRS Violeta	+	+	14	81	Touriga Nacional	+	+
15	104	Cabernet Franc	+	-	15	82	Touriga Nacional	+	-
16	109	Malbec	+	-	16	105	Tinta Roriz	+	-
17	119	Moscato Setubal	+	+	17	118	Alfrocheiro	+	+
		<b>% de infecção</b>	<b>17+/17 (100%)</b>	<b>6+/17 (35,3%)</b>			<b>% de infecção</b>	<b>17+/17 (100%)</b>	<b>5+/17 (29,4%)</b>

Quando se utilizou o par de iniciadores GVQCP-R/GVQCP-F, que permite a amplificação de DNA com 723 pb, contendo o gene completo da proteína capsidial do *Grapevine Syrah virus 1* (GSyV-1), observaram-se reações positivas para várias amostras incluindo as cvs Rebo, BRS Margot e *V. flexuosa* (BG). Esse resultado demonstrou a eficiência parcial da utilização deste par de iniciadores na detecção de isolados de GSyV-1 (Figura 19 e 20). Vale destacar que esta foi a primeira detecção do GSyV-1 em campo no Brasil.



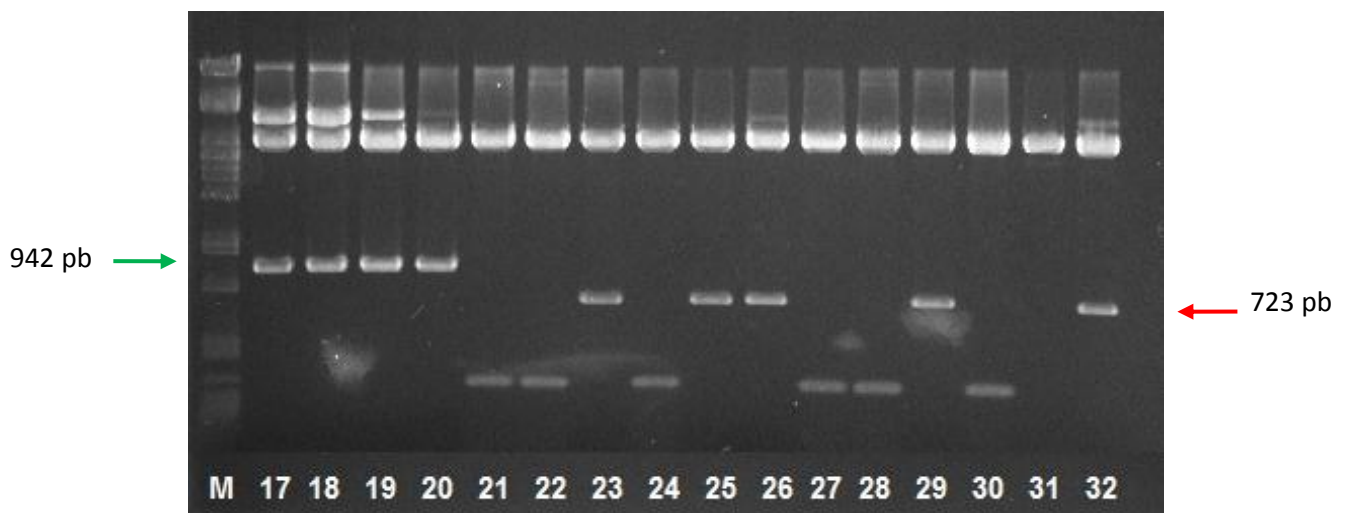
**Figura 19.** Produtos da amplificação por meio de RT-PCR visualizados em gel de agarose (1,2%), objetivando a caracterização do gene da proteína capsidial do GSyV-1 a partir de diferentes cultivares de videira. Oligonucleotídeos utilizados: GVQCP-F/GVQCP-R. Amostras: (1) videira sadia (controle negativo), (2) amostra 68 (cv. Touriga Nacional), (3) amostra 81 (cv. Touriga Nacional) e (4) amostra 118 (cv. Alfrocheiro). A seta indica o produto da amplificação, DNA de 723 pb. M: marcador DNA *λ*PstI.



**Figura 20.** Produtos da amplificação por meio de RT-PCR visualizados em gel de agarose (1,2%), objetivando a caracterização do gene da proteína capsial do GLRaV-3 a partir de diferentes cultivares de videira. Oligonucleotídeos utilizados: 8504v/9445c. Amostras: (1) videira infectada com GLRaV-3 (controle positivo), (2) videira sadia (controle negativo), (3) amostra 5 (cv. Niágara Rosada), (4) amostra 37 (cv. BRS Margot), (5) amostra 48 (cv. Chardonnay), (6) amostra 82 (cv. Touriga Nacional), (7) amostra 100 (cv. BRS Violeta) e (8) amostra 119 (cv. Moscato Setubal). A seta indica o produto da amplificação, DNA de 942 pb. M: marcador DNA  $\lambda$ /PstI.

### 5. 5. Clonagem, sequenciamento e homologia de sequências

Os produtos de DNA amplificados por RT-PCR para o GLRaV-3 e o GSyV-1 foram clonados em pGEM-T Easy e utilizados para transformar *E. coli*. Os plasmídeos recombinantes, contendo os fragmentos clonados, foram extraídos e digeridos com a enzima *EcoRI* (Figuras 21).



**Figura 21.** Digestão dos plasmídeos recombinantes com *EcoRI* e liberação dos insertos correspondentes à proteína capsial visualizados, após eletroforese, em gel de agarose (1,2%). Proteínas capsiais com 942 pb do GLRaV-3 (seta verde) e 723 pb (seta vermelha) do GSyV-1. M: marcador DNA  $\lambda$ /PstI; poços 17 a 20: Clones da amostra 119 – ‘Moscato Setubal’; poços 21 a 24: Clones da amostra 68 – ‘Touriga Nacional’; poços 25 a 28: Clones da amostra 118 – ‘Touriga Nacional’; poços 29 a 32: Clones da amostra 118 – ‘Alfrocheiro’.

Os fragmentos de DNA de 723 pb, contendo o gene completo da proteína capsidial (627 nucleotídeos e 208 aminoácidos deduzidos) do GSyV-1, foram amplificados a partir de cinco isolados coletados em São Roque (SP) e três em Bento Gonçalves (RS) por RT-PCR, utilizando iniciadores específicos e as suas seqüências de nucleotídeos foram obtidas e depositadas no GenBank (Tabela 9) e (Figura 22).

**Tabela 9.** Clonagem e sequenciamento do gene da proteína capsidial (CP) do GSyV-1.

Nº am.	Cultivar	Gene e tamanho	Código GenBank (nome do isolado)
19	Rebo	CP seq. (627 bp)	KX258765 (REB-BR)
38	BRS Margot	CP seq. (627 bp)	KX258766 (MAR-BR)
68	Touriga Nacional	Fragmento (723 bp) com CP (627 bp)	KX458475 (TR1-BR)
81	Touriga Nacional	Fragmento (723 bp) com CP (627 bp)	KX458476 (TR2-BR)
118	Alfrocheiro	Fragmento (723 bp) com CP (627 bp)	KX458477 (ALF-BR)
2M (BG)	<i>Vitis flexuosa</i>	CP seq. (627 bp)	KX258767 (VF-BR)
6 (BG)	Moscato de Hamburgo	CP seq. (627 bp)	KX258763 (MH)
18 (BG)	Trajadura	CP seq. (627 bp)	KX258764 (TRAJ-BR)

```

tttcccagcttcagggtgaattgcttcaaaagcttctcaatgatgcaaccgacccttcctctc
S  Q  L  Q  G  E  L  L  Q  S  F  S  M  M  Q  P  T  L  P  L
actggcggcttgcttccctcctgctgttgacgctccaatgctctgatgactcgctctct
T  G  G  L  L  L  P  P  A  V  D  A  P  M  S  D  D  S  L  S
ggcgcctcccgctcacaacgtgatcctgaccattgctgtgatcctcagccttctctgctt
G  R  S  R  S  Q  R  D  P  D  H  C  V  D  P  Q  P  S  L  P
ttggctccctcgggtgcaggaaacccccggcggccggcgatcacggtccccttccaatgg
L  A  P  S  V  Q  E  T  P  G  G  P  A  I  T  V  P  F  Q  W
gtcgcaattgttgtaaatccgaatccaccatcttcaccggttgatccccggcggccaag
V  A  L  V  V  K  S  E  S  T  I  F  T  V  D  P  P  R  A  K
tctctcaccagctcatcggccttaccgtcatgcccgtctcctctctctcgaagccatt
S  L  T  Q  L  I  G  P  Y  R  H  A  R  L  L  S  L  E  A  I
ctcatgccactctgaacgccttccaaaacccccgtcacggtccacatggtctggaccgtc
L  M  P  T  L  N  A  F  Q  N  P  V  T  V  H  M  V  W  T  V
aacaccgtgcagccccgctccggggaagaactcttctaccggggcggccaggctctcact
N  T  V  Q  P  A  S  G  E  E  L  F  Y  P  G  G  Q  A  L  T
gttgccggccgggtctccatgctccgcttgctaccgtcccagccgacgtctcggccta
V  G  G  P  V  S  M  S  A  L  A  T  V  P  A  D  V  S  R  L
aacctgtcatcaagggcggcctcgccttccctggacactccccgtctcaccggcaccacc
N  P  V  I  K  G  A  V  A  F  L  D  T  P  R  L  T  G  T  T
atgaagtgtgccaatctgaaacctccccatggcctacgtggtcatccgqggaccctc
M  K  C  A  K  S  E  T  S  P  M  A  Y  V  V  I  R  G  T  L
gccctctccgggctgtgggtactcgcctctctgaataaagcctccaatgcccagcaatgc
A  L  S  G  P  V  G  T  R  L  S  E  *

```

**Figura 22.** Sequências virais do *Grapevine Syrah virus 1*, isolado TR1-BR (amostra 68, cv. Touriga Nacional), correspondentes aos nucleotídeos (linha superior) e aos aminoácidos deduzidos (linha inferior) do gene completo da proteína capsidial (CP) com 627 pb e 208 aad (fragmento amplificado de 723 bp). Código do depósito no GenBank KX458475. Nucleotídeos em negrito correspondem aos iniciadores utilizados na reação de amplificação por RT-PCR e, em vermelho, ao gene da proteína capsidial.

Os fragmentos de DNA de 942 pb contendo o gene completo da proteína capsial (313 aminoácidos deduzidos) do GLRaV-3 foram amplificados por RT-PCR a partir de seis isolados coletados em São Roque, utilizando-se iniciadores específicos e as suas seqüências de nucleotídeos foram obtidas e depositadas no GenBank (Tabela 10) e (Figura 23).

**Tabela 10.** Clonagem e sequenciamento do gene da proteína capsial (CP) do GLRaV-3.

Nº am.	Cultivar	Gene e tamanho	Código GenBank (nome do isolado)
5	Niagara Rosada	CP seq. (942 bp)	KX499443 (NR-BR)
37	BRS Margot	CP seq. (942 bp)	KX499444 (MARG-BR)
48	Chardonnay	CP seq. (942 bp)	KX499445 (CH-BR)
82	Touriga Nacional	CP seq. (942 bp)	KX499446 (TN-BR)
100	BRS Violeta	CP seq. (942 bp)	KX499447 (VI-BR)
119	Moscato Setubal	CP seq. (942 bp)	KX499448 (MS-BR)

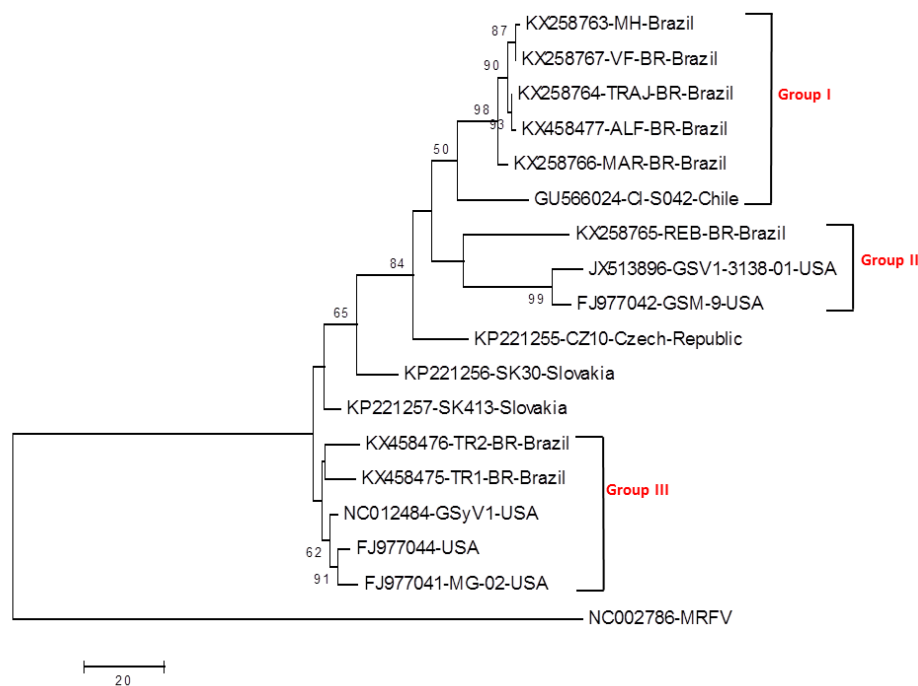
```

atggcatttgaactgaaattagggcagatatatgaagtcgtcccgaaaaataatttgaga
M A F E L K L G Q I Y E V V P E N N L R
gttagagtaggggatgccggcacaaggaaaatttagtaaggcgagtttcttaaaagtacgtt
V R V G D A A Q G K F S K A S F L K Y V
aaggacgggacacaggggaattaacgggaatcgccgtagtgcggcaaaaatacgtattc
K D G T Q A E L T G I A V V P E K Y V F
gccacagcggctttggctacagcggcagggagccacctaaggcagccaccagcgaagtg
A T A A L A T A A Q E P P R Q P P A Q V
gtggaaccacaggaaccgatatagggtagtgcgggaatctgagactctcacacaaat
V E P Q E T D I G V V P E S E T L T P N
aagttggttttcgagaaagatccagacaagttcttgaagactatggcgaaggaatagct
K L V F E K D P D K F L K T M G K G I A
ttggacttgacgggagttaccacaaaacgaaagtatttaacgagccagggaaaatcatca
L D L T G V T H K P K V I N E P G K V S
gtagaggtggcaatgaagattaatgcccattgatggagctgtgtaagaaggttatgggc
V E V A M K I N A A L M E L C K K V M G
gccgatgacgcagcaactaagacaaaattcttctgtacgtgatgcagattgcttgcacg
A D D A A T K T K F F L Y V M Q I A C T
ttctttacatcgtcttcgacggagttcaaaagagtttgactacatagaaaccgatgatgga
F F T S S S T E F K E F D Y I E T D D G
aagaagatatatgcccgtgtgggtatatgattgcattaaacaagctgctgcttcgacgggt
K K I Y A V W V Y D C I K Q A A A S T G
tatgaaaaccggtaaggcagtatctagcgtacttcacaccaaccttcattacggcgacc
Y E N P V R Q Y L A Y F T P T F I T A T
ctgaaatggtaaactagtgatgaacgagaaggttatggcacagcatggagtaccaccgaaa
L N G K L V M N E K V M A Q H G V P P K
ttctttccgtacacgatagactgcgttcgacgtagatctggttcaacaacgacgca
F F P Y T I D C V R P T Y D L F N N D A
atactagcatggaatttagctagacagcagggcgtttagaacaagacggtaaacggcgtat
I L A W N L A R Q Q A F R N K T V T A D
aacaccttacacaacgtcttccaactattgcaaaagaagtag
N T L H N V F Q L L Q K K *

```

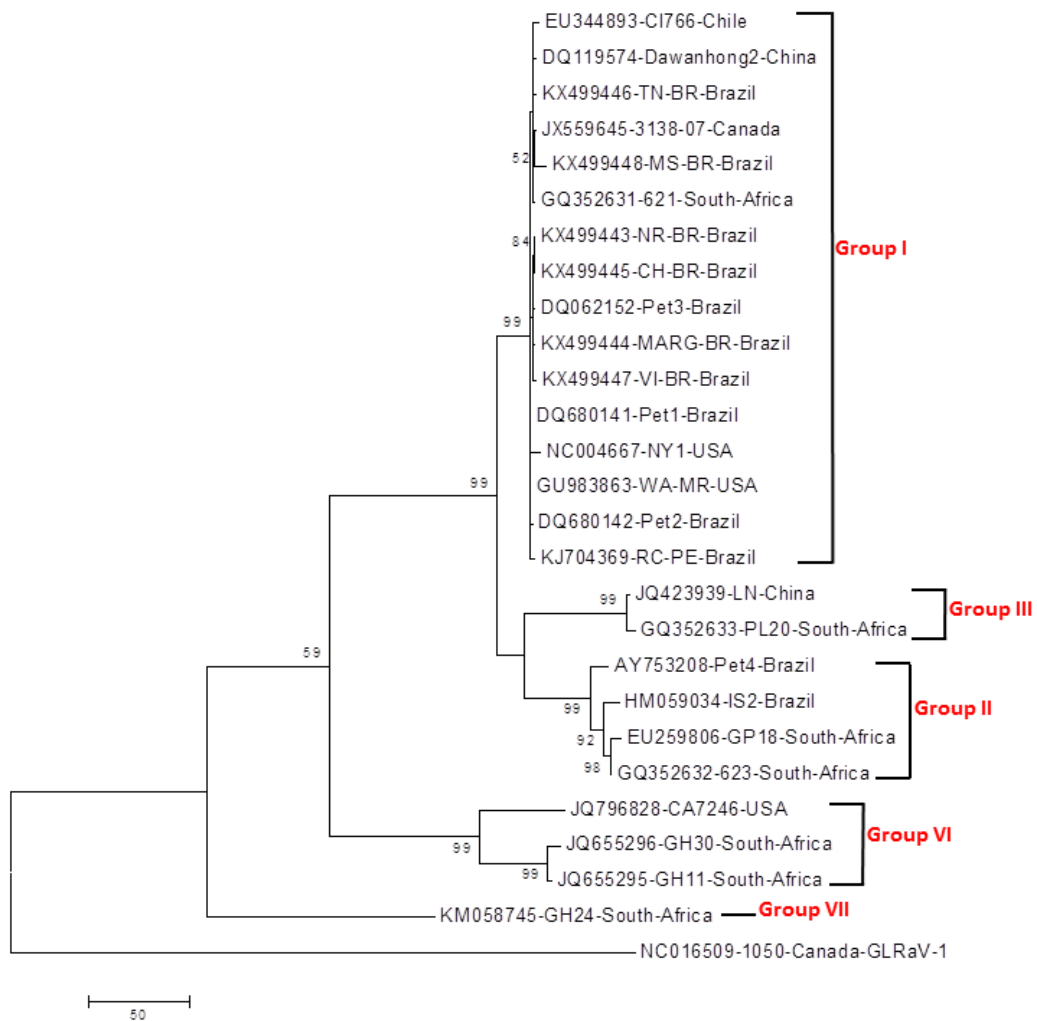
**Figura 23.** Sequências virais do *Grapevine leafroll-associated virus 3*, isolado NR-BR (amostra 5, cv. Niágara Rosada), correspondentes aos nucleotídeos (linha superior) e aos aminoácidos deduzidos (linha inferior) do gene completo da proteína capsial (CP) com 942 pb e 313 aad. Código do depósito no GenBank KX499443. Nucleotídeos em negrito correspondem aos iniciadores utilizados na reação de amplificação por RT-PCR.

O alinhamento múltiplo das sequências da CP do GSyV-1, de isolados brasileiros, revelou expressivas divergências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos entre alguns isolados, sugerindo existir considerável variabilidade entre os isolados analisados. As sequências de nucleotídeos dos oito isolados brasileiros foram distribuídas em três grupos na árvore filogenética: I (MH, VF-BR, ALF-BR, TRAJ-BR, MAR-BR), II (REB-BR) e III (TR1-BR e TR2-BR) (Figura 24), com porcentagens de identidades de nt e aad variando de 91,7% a 99,8% e de 96,6% a 100%, entre si, respectivamente. As identidades de nt e aad entre o isolado-tipo do GSyV-1 (NC\_012484) e os isolados brasileiros variaram de 92,1% até 98% e de 97,1% até 99%, respectivamente (Tabela 11). As comparações entre isolados de GSyV-1 da Eslováquia, República Checa e Hungria também demonstraram haver alta variabilidade entre isolados europeus (CZOTTER et al., 2015; GLASA et al., 2015). Variabilidade entre isolados chilenos de GSyV-1 também já havia sido constatada por Engel et al. (2010). A massa molecular (MW) calculada para as CPs dos isolados brasileiros de GSyV-1 foi de, cerca de, 22 kDa, semelhante ao relatada por Al Rwahnih et al. (2009).



**Figura 24.** Árvore filogenética com base no alinhamento de sequências de nucleotídeos de cinco isolados (REB-BR, MAR-BR, TR1-BR, TR2-BR, ALF-BR) de São Roque e três (MH, TRAJ-BR, VF-BR) de Bento Gonçalves, Sudeste e Sul do Brasil, respectivamente e outros isolados estrangeiros de GSyV-1. A árvore foi construída pelo método de máxima parcimônia, utilizando o MEGA 6.0, com suporte (*bootstrap*) a partir de 10.000 replicações. Os nomes dos isolados de GSyV-1 foram incluídos de acordo com os códigos de acesso no GenBank, sendo que os grupos específicos foram indicados. *Maize rayado fino virus*, MRFV (*Tymoviridae*, *Marafivirus*) (NC\_002786) foi utilizado como grupo externo. Bar = número de substituições por sítio.

O alinhamento múltiplo das sequências de nt do gene da proteína capsidial de isolados brasileiros do GLRaV-3 (Tabela 12) revelou restrita divergência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos entre os isolados, sugerindo haver baixa variabilidade entre os isolados analisados. As sequências de nucleotídeos dos seis isolados brasileiros (NR-BR, CH-BR, VI-BR, MARG-BR, TN-BR e MS-BR) constituíram apenas um grupo filogenético (Figura 25). O grupo I, tal como definido por Maree et al. (2015), mostrou identidades de nt e aad entre 98,9% e 100% e entre 98,4% e 100%, respectivamente, entre os isolados brasileiros (Tabela 12). As identidades de nt e aad entre o isolado-tipo de GLRaV-3 (NC\_004667) e isolados brasileiros variaram de 98,6% a 99,2% e de 97,7% a 99%, respectivamente, posicionando o isolado norte-americano no Grupo I, juntamente com todos isolados de GLRaV-3 de São Roque, Brasil (Figura 25). A massa molecular (MW), calculada para as CPs dos isolados brasileiros de GLRaV-3, foi de, cerca de, 35 kDa, semelhante ao relatado por Fajardo et al. (2007). A variabilidade entre isolados de GLRaV-3 já havia sido verificada (MAREE et al., 2015), inclusive considerando alguns isolados do sul e nordeste do Brasil (FAJARDO et al, 2007; CATARINO et al., 2015). Outros isolados brasileiros de GLRaV-3 previamente caracterizados molecularmente (FAJARDO et al., 2007; BASSO et al., 2010b; CATARINO et al., 2015) também foram posicionados no grupo I (Pet-1, Pet-2, Pet-3 e RC-PE) e no grupo II (Pet-4 e IS2) (Figura 25), sugerindo que a restrita variabilidade observada no Sudeste do Brasil (São Roque) foi notada anteriormente em outras regiões de cultivo da videira no Brasil como verificado alguns isolados das regiões Sul e Nordeste.



**Figura 25.** Árvore filogenética com base no alinhamento de sequências de nucleotídeos de seis isolados (NR-BR, MARG-BR, CH-BR, TN-BR, VI-BR, MS-BR) obtidos em São Roque, cinco (RC-PE, Pet-1, Pet-2, Pet-3, Pet-4) de Petrolina e um (IS2) de Bento Gonçalves, Sudeste, Nordeste e Sul do Brasil, respectivamente e outros isolados estrangeiros de GLRaV-3. A árvore foi construída pelo método de máxima parcimônia, utilizando o programa MEGA 6.0 (com teste de *bootstrap* para 10.000 replicações). Os nomes dos isolados de GLRaV-3 foram incluídos de acordo com os códigos de acesso no GenBank, e os grupos específicos foram indicados. *Grapevine-leafroll associated virus 1*, GLRaV-1 (*Closteroviridae*, *Ampelovirus*) (NC\_016509) foi utilizado como grupo externo. Bar = número de substituições por sítio.

**Tabela 11.** Comparação (em porcentagem) dos valores de identidade entre as sequências de nucleotídeos (abaixo diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima diagonal) do gene da proteína capsial (627 pb e 208 aad) dos isolados brasileiros do *Grapevine Syrah virus 1*.

Isolados	KX258763 (MH)	KX258764 (TRAJ-BR)	KX258765 (REB-BR)	KX258766 (MAR-BR)	KX258767 (VF-BR)	KX458475 (TR1-BR)	KX458476 (TR2-BR)	KX458477 (ALF-BR)	NC012484 (GSyV-1)
KX258763 (MH)	---	99,5	97,1	99,5	100	99,5	98,0	99,5	99,0
KX258764 (TRAJ-BR)	99,3	---	96,6	99,0	99,5	99,0	97,5	100	98,5
KX258765 (REB-BR)	92,0	91,8	---	97,1	97,1	96,6	96,6	96,6	97,1
KX258766 (MAR-BR)	98,7	99,0	92,5	---	99,5	99,0	97,5	99,0	98,5
KX258767 (VF-BR)	99,8	99,5	91,8	98,8	---	99,5	98,0	99,5	99,0
KX458475 (TR1-BR)	94,4	94,2	92,1	94,2	94,2	---	97,5	99,0	98,5
KX458476 (TR2-BR)	93,4	93,3	91,7	93,3	93,3	97,4	---	97,5	98,5
KX458477 (ALF-BR)	99,2	99,8	91,7	98,8	99,3	94,0	93,1	---	98,5
NC012484 (GSyV-1)	93,3	93,1	92,1	93,1	93,1	98,0	97,9	92,9	---

Nome do isolado (código de acesso no GenBank, Estado e País): MH, RS/Brasil (KX258763); TRAJ-BR, RS/Brasil (KX258764); REB-BR, SP/Brasil (KX258765); MAR-BR, SP/Brasil (KX258766); VF-BR, RS/Brasil (KX258767); TR1-BR, SP/Brasil (KX458475); TR2-BR, SP/Brasil (KX458476); ALF-BR, SP / Brasil (KX458477); GSyV-1, EUA (NC\_012484).



**Tabela 12.** Comparação (em porcentagem) dos valores de identidade entre as sequências de nucleotídeos (abaixo diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima diagonal) do gene da proteína capsidial (942 pb e 313 aad) dos isolados brasileiros do *Grapevine leafroll-associated vírus 3*.

Isolados	KX499443 (NR-BR)	KX499444 (MARG-BR)	KX499445 (CH-BR)	KX499446 (TN-BR)	KX499447 (VI-BR)	KX499448 (MS-BR)	KJ704369 (RC-PE)	DQ680141 (Pet1)	DQ680142 (Pet2)	DQ062152 (Pet3)	AY753208 (Pet4)	HM059034 (IS2)	NC004667 (NY1)
KX499443 (NR-BR)	---	100	100	99,6	99,6	98,7	100	100	99,6	99,6	95,8	94,8	99,0
KX499444 (MARG-BR)	99,7	---	100	99,6	99,6	98,7	100	100	99,6	99,6	95,8	94,8	99,0
KX499445 (CH-BR)	100	99,7	---	99,6	99,6	98,7	100	100	99,6	99,6	95,8	94,8	99,0
KX499446 (TN-BR)	99,4	99,4	99,4	---	99,3	98,4	99,6	99,6	99,3	99,3	95,5	94,5	98,7
KX499447 (VI-BR)	99,6	99,6	99,6	99,3	---	99,0	99,6	99,6	99,3	99,3	95,5	94,5	98,7
KX499448 (MS-BR)	98,9	98,9	98,9	99,0	99,2	---	98,7	98,7	98,4	98,4	95,2	94,2	97,7
KJ704369 (RC-PE)	99,5	99,5	99,5	99,4	99,4	98,9	---	100	99,6	99,6	95,8	94,8	99,0
DQ680141 (Pet1)	99,7	99,7	99,7	99,6	99,6	99,1	99,7	---	99,6	99,6	95,8	94,8	99,0
DQ680142 (Pet2)	99,6	99,6	99,6	99,5	99,5	99,0	99,6	99,8	---	99,3	95,5	94,5	98,7
DQ062152 (Pet3)	99,7	99,7	99,7	99,4	99,6	98,9	99,5	99,7	99,6	---	95,5	94,5	98,7
AY753208 (Pet4)	93,2	93,4	93,2	93,3	93,3	93,2	93,4	93,4	93,3	93,2	---	96,4	94,8
HM059034 (IS2)	92,6	92,8	92,6	92,7	92,7	92,6	92,8	92,8	92,7	92,6	97,7	---	93,9
NC004667 (NY1)	99,2	99,2	99,2	99,1	99,1	98,6	99,2	99,4	99,3	99,2	92,8	92,3	---

Nome do isolado (código de acesso no GenBank, Estado e País): NR-BR, SP / Brasil (KX499443); MARG-BR, SP / Brasil (KX499444); CH-BR, SP / Brasil (KX499445); TN-BR, SP / Brasil (KX499446); VI-BR, SP / Brasil (KX499447); MS-BR, SP / Brasil (KX499448); RC-PE, PE / Brasil (KJ704369); Pet-1, PE / Brasil (DQ680141); Pet-2, PE / Brasil (DQ680142); Pet-3, PE / Brasil (DQ062152); Pet-4, PE / Brasil (AY753208); IS2, RS / Brasil (HM059034); NY1, EUA (NC\_004667).

Os resultados revelaram que a diversidade genética, previamente relatadas para destes dois vírus em diferentes países vitícolas, também foi observada no Brasil, e esta informação deve ser levada em consideração nas avaliações de expressão de sintomas e nas indexações biológica e molecular. As alterações mais marcantes foram observadas nas sequências de nucleotídeos, pois as sequências de aminoácidos deduzidos das proteínas capsidiais têm propensão a menor variação entre isolados de diferentes origens (regiões geográficas e/ou hospedeiras). A proteína do capsídeo é uma proteína estrutural, assim, fatores evolutivos poderiam restringir mutações e alterações deletérias para o vírus. Isto talvez explique a menor variabilidade de aad observada para o GSyV-1 e GLRaV-3. Por exemplo, alterações na proteína capsidial podem resultar em perda de interação com vetores ou fatores da planta hospedeira. Além disso, o GSyV-1 e GLRaV-3 têm a videira como única hospedeira natural conhecida, o que restringiria ainda mais a perpetuações de possíveis alterações (CATARINO et al., 2015).

A presença de sete patógenos (vírus e viroides) de oito avaliados, infectando videiras de diferentes cultivares em vinhedos de São Roque pode ser devida à redistribuição e plantio, de materiais propagativos infectados a partir de outras regiões produtoras de uva no Brasil ou mesmo de outros países, via importação. Quanto à variabilidade genética dos dois vírus analisados, verificou-se no geral, altas identidades de aminoácidos deduzidos entre os isolados coletados em São Roque e em outras regiões de cultivo da videira no Brasil, enfatizando a validade da hipótese sobre possíveis fontes comuns de materiais propagativos de videira infectados utilizados no país. Cinco isolados de GSyV-1 de São Roque (Sudeste do Brasil) compartilham 96,6-100% de identidade de aad com três isolados de Bento Gonçalves (Sul do Brasil) (códigos de acesso no GenBank na Tabela 12) e seis isolados de GLRaV-3 de São Roque compartilham 94,2-100%, de identidade de aad com cinco isolados de Pernambuco (GenBank KJ704369, DQ680141, DQ680142, DQ062152, AY753208) e um de Bento Gonçalves (GenBank HM059034)(Tabela 13).

Entretanto, também foi demonstrada a existência de expressiva variabilidade no gene CP de alguns isolados de GSyV-1 e GLRaV-3, infectando diferentes de cultivares de videira, tais como os isolados REB-BR, TR1-BR e TR2-BR de GSyV-1 e Pet4 e IS2 de GLRaV-3 (previamente caracterizados). Além disso, foi mostrado pela indexação e sequenciamento que os vírus e viroide estavam infectando 106 de 119 amostras analisadas, de 32 diferentes genótipos de videira que incluíram cultivares de uvas americanas (*V. labrusca*), uvas européias (*V. vinifera*), híbridos interespecíficos e porta-enxertos.

A determinação da identidade de agentes patogênicos é importante não apenas para fins taxonômicos, mas também constitui um requisito essencial para o desenvolvimento de espectro mais amplo e preciso dos métodos de detecção (OLMOS et al., 2016). O levantamento e a caracterização molecular com base nos métodos de RT-qPCR e PCR

convencional permitiu detectar e avaliar a variabilidade genética e a distribuição geográfica dos patógenos virais e viroidal em uma área de cultivo restrita a um município de videira na Brasil, fornecendo informações valiosas para a implementação regional de determinadas práticas para controlar ou manejar as doenças virais, tais como monitoramento da transmissão por vetores em vinhedos e estabelecimento de novos vinhedos com materiais propagativos livres de agentes patogênicos.

### 5.6. Análise das respostas obtidas nas entrevistas com os produtores

A vitivinicultura brasileira começou com a chegada dos colonizadores portugueses. No entanto, somente com os imigrantes italianos, no final do século XIX e início do século XX, que a produção de uvas e vinhos se tornou economicamente importante para o país (GUERRA et al., 2005; ALMEIDA et al., 2015). O desenvolvimento da produção de uva no estado de São Paulo contou com a influência da cultura italiana e de seus costumes, dos conhecimentos técnicos tradicionais sobre a condução das videiras e do trabalho em família (VERDI et al., 2011). De uma maneira geral, as vinícolas se aproveitavam da mão de obra familiar, contratando esporadicamente funcionários de fora da família. Em São Roque não foi diferente. As famílias que cultivam a uva e elaboram o vinho no município, atualmente, são de origem italiana ou portuguesa. A viticultura no município de São Roque ganhou expressão nas primeiras décadas do século XX. Algumas das propriedades vitícolas do município estão em atividade desde a década de 1930 (Tabela 13).

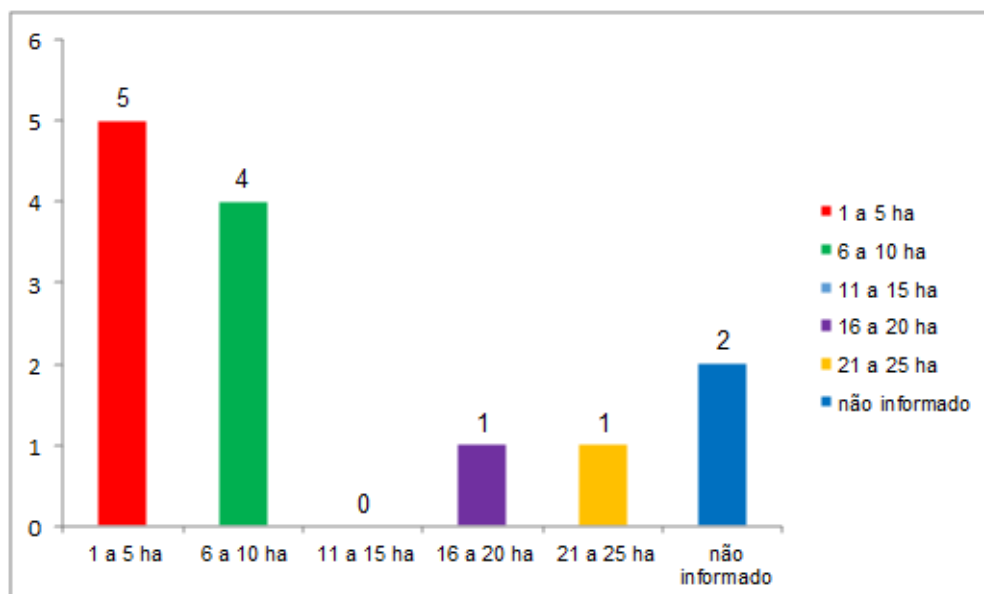
**Tabela 13.** Caracterização dos produtores em relação ao ano em que a família iniciou o plantio de uva e a elaboração de vinho na região de São Roque/SP.

Ano	Cultivo de uva (nº de estabelecimento)	Elaboração de vinho (nº de estabelecimento)
Anterior 1930	2	1
1930 até 1940	3	3
1941 até 1950	4	2
1951 até 1960	1	2
1961 até 1980	1	1
1981 até 2000	0	1
2001 até 2010	2	1
Após 2011	0	2
Total	13	13

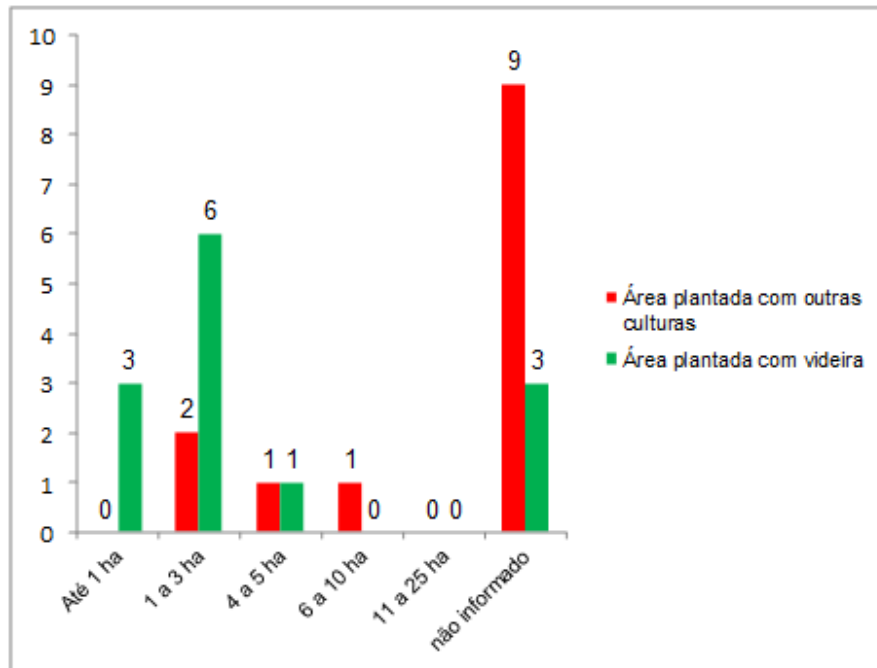
Na entrevista com os produtores, observou-se que das treze propriedades, dez não interromperam suas atividades em nenhum momento desde a sua fundação. Naquelas onde

houve interrupção, uma ficou de 1938-1946 e outras duas ficaram de 1980-1990 sem exercer a atividade. Os motivos que forçaram a paralização nas atividades com uva e vinho durante os períodos mencionados, foram variados. Problemas como o aparecimento de pragas, a opulência da cafeicultura em detrimento da viticultura, reflexos da crise econômica de 1929 e geadas que ocorreram na primeira metade do século XX constituíram obstáculos para os produtores de uva e vinho no início do século passado no estado de São Paulo (VERDI et al., 2011). A partir do final da década de 70 problemas como a baixa produtividade e a especulação imobiliária, diminuíram o número de vinícolas existentes em São Roque de 116 para apenas 14 (OLIVEIRA, 2004; VERDI et al. 2011). De qualquer maneira, alguns produtores retomaram as atividades a partir de 1990 e outros iniciaram após 2000, mostrando certa retomada do setor.

Segundo Verdi et al. (2011) é predominante, no estado de São Paulo, a produção de uvas em pequenas propriedades. Ainda segundo esses autores, os municípios de Jundiaí, Jarinu, São Roque e São Miguel Arcanjo possuem a maioria das propriedades produtoras de uva com área de até 5 hectares. Nos municípios com maior concentração de propriedades produtoras de uva, São Miguel Arcanjo e Jundiaí, a predominância das propriedades com áreas inferiores a 20 ha é bastante expressiva, atingindo 90% do total. No atual estudo foi constatado que 69,23% das propriedades produtoras de uva e vinho em São Roque apresentam área de até 10 hectares (Figura 26). Em muitas dessas propriedades o cultivo de uva divide espaço com outras culturas (Figura 27).



**Figura 26.** Tamanho em hectares das propriedades vitícolas de uva e vinho no município de São Roque/SP.



**Figura 27.** Representação gráfica da distribuição da área (em hectares) das propriedades cultivada com videira e outras culturas.

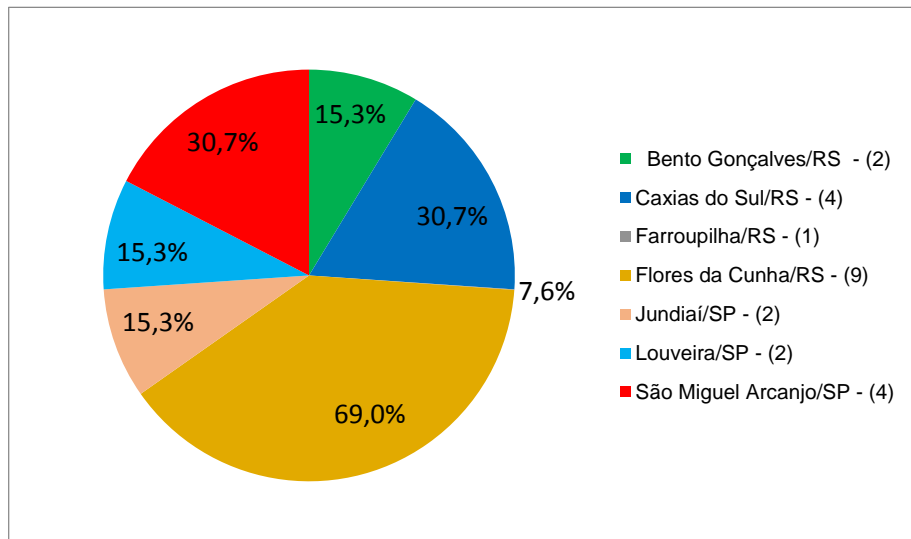
Segundo Sato (2010), a elaboração de vinho no estado de São Paulo ocorre principalmente, de forma artesanal, utilizando cultivares americanas, cv. Isabel e Bordô. Entretanto, São Roque e outros municípios paulistas produtores de vinho, passaram a depender muito da uva e do vinho trazidos do Rio Grande do Sul. No entanto, das treze propriedades pesquisadas, nove apresentam vinhedos próprios, que são importantes para o enoturismo nessas propriedades. Além disto, os agricultores também têm obtido fonte adicional de renda com a venda de produtos *in natura* e produtos elaborados artesanalmente nas propriedades para os turistas.

Assim, das nove propriedades com vinhedos, quatro possuem produção própria de uva para vinificação, sendo que em duas propriedades a produção própria é expressiva (Tabela 14). Atualmente há uma tendência dos produtores de São Roque visarem a autossuficiência, eliminando a dependência de uva e vinho adquirida no Sul do país. A tabela 15 também mostra que em todas as propriedades há predominância de vinhedos com cultivares americanas de uva.

**Tabela 14.** Caracterização do número de propriedades (em porcentagem) em relação à produção própria, e de terceiros, além de uvas americanas e finas (%).

<b>Localidade</b>	<b>Participação da uva própria na produção</b>	<b>Utilização de uva produzida por terceiros para vinificação</b>	<b>Vinhedos com cultivares americanas</b>	<b>Vinhedos com cultivares de uva fina</b>
Propriedade 1	0	0	0	0
Propriedade 2	2	98	40	60
Propriedade 3	70	30	100	0
Propriedade 4	0	100	99	1
Propriedade 5	0	100	100	0
Propriedade 6	10	90	100	0
Propriedade 7	100	0	40	60
Propriedade 8	0	100	100	0
Propriedade 9	0	100	0	100
Propriedade 10	0	100	100	0
Propriedade 11	0	100	100	0
Propriedade 12	0	100	100	0
Propriedade 13	0	100	100	0

As uvas adquiridas de terceiros para elaboração de vinho e derivados são originárias de municípios dos estados de São Paulo e do Rio Grande do Sul, sendo que a maioria dos fornecedores é proveniente do município de Flores da Cunha (RS) (Figura 28).



**Figura 28.** Números de municípios e de fornecedores de uva e derivados por município (em %) para os produtores de São Roque, SP.

No âmbito da produção industrial de vinho no estado de São Paulo, as grandes empresas também demonstram interesse em reativar a produção de uva para processamento, numa estratégia que visa a diminuição da dependência paulista por uva e vinho importados do Rio Grande do Sul.

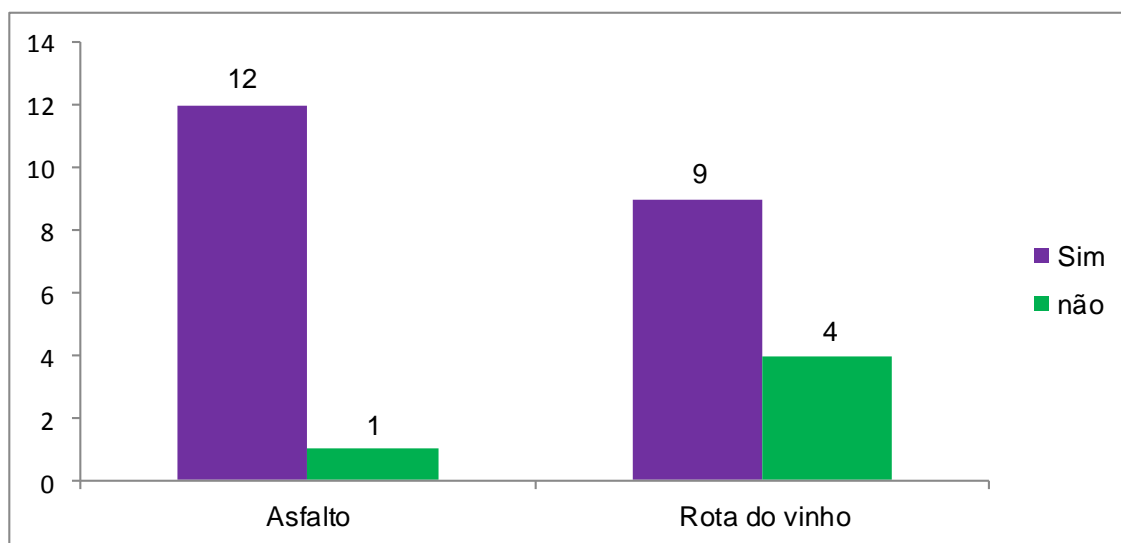
Outra tendência observada é que algumas vinícolas paulistas estão investindo na produção de uvas de *Vitis vinifera* e híbridas, desenvolvidas por institutos de pesquisa, para produzir vinhos finos ou de melhor qualidade. A revitalização do setor fez com que São Roque tentasse mudar a imagem de ser uma cidade conhecida pelo vinho comum e doce de garrafão. Em São Roque, o vinho seco da cv. BRS Lorena, produzido pela Vinícola Góes, vem ganhando conceito e mercado, assumindo um papel referencial na região (PROTAS; CAMARGO, 2011). Essa vinícola produz 10% de vinhos finos com 100% de uva própria, cultivada na propriedade de 90 hectares. Só essa propriedade investiu 3 milhões de reais no desenvolvimento da produção de frutas, iniciado em 2001. Há alguns anos, a empresa iniciou o processo de exportação para o Reino Unido, Angola, China e Portugal. Segundo a Vinícola Góes, a exportação representa 3% do faturamento da empresa.

O valor dos produtos vendidos no município de São Roque varia entre R\$ 5,00 e R\$ 6,00 para o quilo de uva; e R\$ 5,50 e R\$ 100,00 para a garrafa de vinho; e R\$ 7,00 e R\$ 17,50 para suco. De acordo com a avaliação dos produtores, os vinhos vendidos na “Terra do Vinho” são considerados de boa qualidade, e o crescimento da produção no período de 2005-2009 teve uma variação de até 40%, e entre 2010-2014 foi de até 100%.

As ações voltadas à estruturação do turismo ligado à produção de uva e vinho têm contribuído para o aumento do interesse pelos produtos vitivinícolas. O enoturismo ocorre

com a visitação de vinícolas e parreirais, ligando a degustação de produtos às atividades culturais, como cursos sobre vinhos e gastronomia (SATO, 2010). Visando a revitalização do setor vitivinícola no município de São Roque, a parceria entre o Sindicato de Produtores de Vinho (Sindusvinho) e a prefeitura municipal organizou o “Roteiro do Vinho, Gastronomia e Lazer”, que recebeu 70 mil turistas em 2009. O Roteiro do Vinho é formado pela Estrada do Vinho, Estrada dos Venâncios e Rodovia Quintino de Lima. Nesse roteiro é possível encontrar restaurantes portugueses e italianos, cantinas, adegas, pousadas e locais onde se pode comprar salames, queijos, compotas, doces caseiros, e os vinhos da região. Segundo Verdi et al. (2011) essas ações favorecem a manutenção dos produtores na atividade rural, pois eles resistem à pressão imobiliária de venda de suas propriedades para a construção de condomínios e chácaras de veraneio.

Das treze propriedades pesquisadas, 69% estão localizadas na rota do vinho e 92% possuem acesso ao asfalto, facilitando o enoturismo na região (Figura 29).



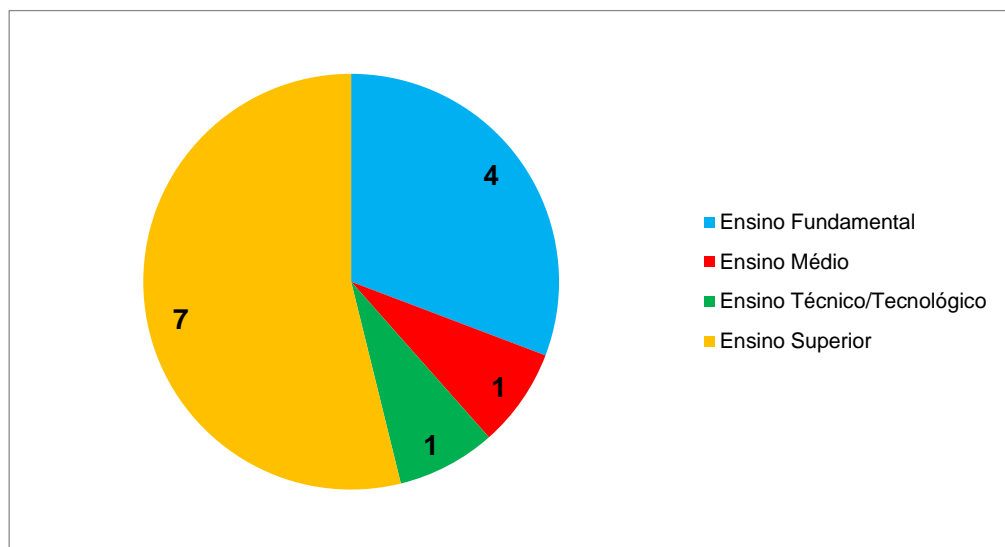
**Figura 29.** Número de propriedades produtoras de uva e vinho que possuem acesso ao asfalto e que estão localizadas na Rota do vinho.

Os responsáveis pela administração dessas propriedades na atualidade são os filhos e netos dos fundadores das vinícolas. A tabela 15 mostra que a maioria (53,8%) desses administradores é relativamente jovem, na faixa etária de 33 a 50 anos e possuem formação universitária (Figura 30). Esta transição despertou uma visão inovadora sobre a atividade da uva e do vinho no município, e os novos administradores investiram em novos equipamentos, mudança de rótulos e diversificação dos produtos, ampliação da estrutura física com instalação de restaurantes, cantinas e lojas para venda de produtos a varejo.



**Tabela 15.** Caracterização dos produtores de uva e vinho de São Roque quanto à faixa etária

Faixa etária	Quantidade (nº)	Porcentagem
33 até 40 anos	4	30,8%
41 até 50 anos	3	23%
51 até 60 anos	2	15,4%
61 até 70 anos	2	15,4%
Acima de 71 anos	2	15,4%
Total	13	100%

**Figura 30.** Grau de escolaridade dos produtores de uva e vinho em São Roque (SP).

Segundo a ABE (Associação Brasileira de Enologia), a formação de profissionais de enologia deve acompanhar o desenvolvimento da produção de uva e vinho no Brasil. Além de melhorias em instalações e equipamentos atualmente também há em São Roque a preocupação com o aperfeiçoamento dos funcionários ligados a propriedades vitivinícolas. Entre os treze entrevistados, oito relataram que têm consciência dessa necessidade e disponibilizam treinamento para seus funcionários de campo e da vinícola. Entretanto, escolas que forneçam esse tipo de capacitação ainda são escassas no Brasil.

O Brasil conta com apenas três Institutos Federais (IFRS, IF Sul - RS, IF Sertão - PE) e uma Universidade Federal (Unipampa - RS) ofertando cursos superiores na área de Viticultura e Enologia. No primeiro semestre de 2013 foi iniciado o Curso Superior de

Tecnologia em Viticultura e Enologia em São Roque no *Campus* do Instituto Federal. O curso tem como objetivo principal suprir a necessidade de mão de obra qualificada para a produção de uva e elaboração de vinho, bem como formar profissionais para gerenciar empreendimentos vinícolas e desenvolver atividades complementares tais como a gastronomia e o enoturismo.

Todos os produtores pesquisados disseram ter conhecimento de que o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo - *Campus* São Roque (IFSR) possui o Curso de Viticultura e Enologia. Todos também relataram considerar boa a atuação dos professores e profissionais dessa instituição na divulgação de informações sobre uva e vinho em São Roque. Entretanto, eles também declararam que o IFSR poderia incrementar a colaboração com os produtores, e deram algumas sugestões: 1) Disponibilizar um laboratório na instituição para análise do vinho produzido em São Roque; 2) Formar profissionais para elevar o nível da mão de obra especializada; 3) Investir em pesquisa e desenvolvimento direcionados a produção de uva e vinho; 4) Abrir vagas para o curso de Viticultura e Enologia no período noturno; 5) Realizar minicursos para profissionais que trabalham no campo; 6) Realizar curso de curta duração para funcionários e cantineiros ligados a vitivinicultura do município; 7) Disponibilizar aos produtores de uva e vinho curso sobre o uso correto de defensivos agrícolas.

Entretanto, o apoio técnico aos produtores do município passou por vários momentos distintos. Os entrevistados disseram que, no passado, esse apoio vinha dos próprios produtores vitícolas e dos estabelecimentos que comercializavam produtos agrícolas. Ainda segundo os entrevistados somente a partir de 1936 a vitivinicultura recebeu apoio técnico da Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo. A viticultura do município de São Roque ganhou avanços técnicos com a chegada do enólogo italiano Antônio Maria Picena, em 1950, que implementou alguns métodos de produção de uva e plantio da videira e elaboração de vinho (SANTOS, 1938). Assim na, década de 1950, mais de 116 vinícolas se encontravam instaladas na região ao identificarem a potencialidade da cidade como grande centro produtor de vinho, inclusive intitulando a região como a Terra do Vinho (COBELLO; VERDI, 2010). Atualmente o apoio aos produtores vem do Sindicato da Indústria do Vinho de São Roque (SINDUSVINHO) e do Sindicato Rural. Produtores entrevistados declararam ainda que não houve visita de técnico da APTA (Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios) em suas propriedades. Entretanto, eles também relataram que a UPD (Unidade de Uva e Vinho) poderia colaborar com os produtores, e deram algumas sugestões de como isso poderia ser implementado: 1) Revitalização e melhoria do plantio de videiras no estado de São Paulo; 2) Colaboração entre o técnico e o profissional do campo, quando o produtor necessitar; 3) Retomada da UPD (Unidade de Uva e Vinho) no município

de São Roque; 4) Construção de um site para dar assistência técnica via internet; 5) Disponibilização de minicursos sobre plantio de videiras e elaboração de vinhos.

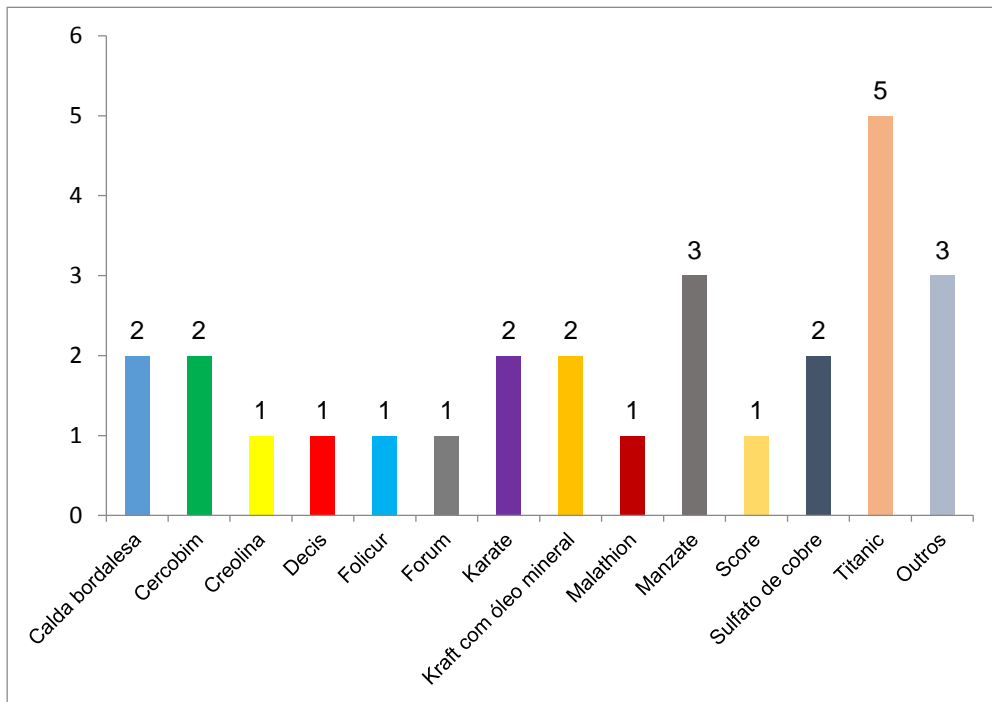
Segundo Marin (2008), o Estado de São Paulo apresenta solos propícios ao cultivo da videira e condições climáticas similares às diversas regiões tradicionais de produção de vinhos finos no mundo, indicando alto potencial para expansão da vitivinicultura no Estado. Dos treze produtores entrevistados, dez consideraram o clima e o solo de São Roque bons para o plantio da videira, dois disseram ser ruins e um relatou ser ótimo.

Além dos fatores citados acima, a região de São Roque também tem vários outros fatores favoráveis à retomada da atividade vitivinícola, pois além de sua origem colonial e cultural, é reconhecida como uma das regiões pioneiras na elaboração de vinho e conhecida nacionalmente como a “Terra do Vinho”. Outro fator importante para a revitalização do setor é a posição estratégica do município, situado entre Jundiaí e São Miguel Arcanjo, dois dos maiores municípios produtores de uvas do Estado, e distante apenas 60 km da capital paulista, maior mercado consumidor de vinhos no Brasil.

Entretanto, os produtores também apontaram alguns problemas a serem superados. Eles alegaram que os principais problemas para a produção de uva na região são a incidência de doenças, pragas, pombos, pássaros e formigas, dificuldade em contratar mão de obra especializada e especulação imobiliária.

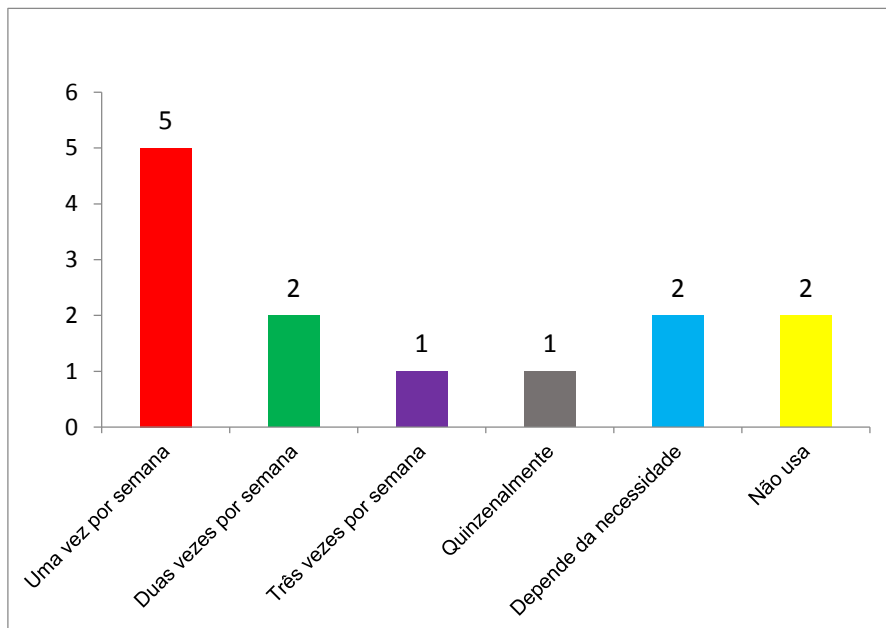
Dentre os principais problemas fitossanitários da cultura da videira, apontado por nove produtores, estão os fungos, em seguida, a cochonilha Pérola da terra, conforme relato de por quatro produtores. Contudo, quando o assunto são as viroses, apenas dois dos treze entrevistados relataram algum conhecimento sobre este tipo de doença, sua disseminação e sintomas, com destaque para o enrolamento das folhas. Dois entrevistados relataram ter tido problemas devido às viroses em seus plantios. Em caso de infecção por vírus no plantio, situação colocada na entrevista, seis produtores disseram que continuariam com o plantio da mesma maneira, quatro mencionaram que eliminariam a cultura infectada e três procurariam por recomendações técnicas especializadas.

Um dos métodos de prevenção utilizado contra às pragas, pássaros e granizo é o uso da tela de proteção, adotada por dez produtores. O controle químico nas propriedades avaliadas é realizado com inseticidas, fungicidas, acaricidas e outros defensivos, conforme detalhado na Figura 31.



**Figura 31.** Gráfico com produtos químicos e comerciais utilizados no controle de pragas e doenças da videira pelos produtores no município de São Roque, SP.

A periodicidade de aplicação dos defensivos agrícolas na cultura da videira varia de quinzenalmente a três vezes por semana conforme resposta dos produtores entrevistados (Figura 32).



**Figura 32.** Periodicidade de aplicação de defensivos agrícolas nas propriedades vitícolas de São Roque, SP.

Quando os produtores foram questionados sobre a visão do setor que eles tinham no passado, a resposta foi objetiva. Foi uma época difícil, era elaborado vinho colonial, vendia-se pouco, mas um vinho “de certa qualidade”. Já a visão de futuro é bastante positiva, todos acreditam que o investimento no aprimoramento do vinho, dando continuidade a tradição, a divulgação do produto, ao investimento em estrutura física, e enoturismo e ao lançamento de vinhos de uvas viníferas cultivadas na região viabilizariam o potencial desenvolvimento do setor.

Uma força que os produtores possuem é a participação em grupos de discussão sobre uva e vinho, e a participação de doze produtores no SINDUSVINHO, seis na Câmara Setorial e nove no Roteiro do Vinho. Todos os produtores apontam que para promover a produção de uva e vinho no município de São Roque, é preciso que o governo conceda incentivos para o plantio da videira no estado de São Paulo, realize mais investimentos na Festa da Uva e conceda isenção ou diminuição do valor de impostos para produtos derivados da uva cultivada no estado de São Paulo.

VERDI (2007) relata que o Governo do Estado de São Paulo, por meio da Secretaria da Agricultura e Abastecimento, e o Instituto Paulista de Vitivinicultura, também têm apresentado sugestões importantes para o desenvolvimento do setor. As instituições estaduais firmaram um “Protocolo de Intenções”, tendo por objetivo estabelecer cooperação destinada ao planejamento e implementação do “Programa Paulista de Desenvolvimento Vitivinícola – Pró-Vinho”.

## 6. CONCLUSÕES

- ✓ O levantamento e a caracterização molecular, com base nos métodos utilizados, permitiram detectar e avaliar a variabilidade genética e a incidência dos patógenos virais e viroidais que ocorrem em cultivos de videira no município de São Roque, SP;
- ✓ As informações geradas são valiosas para a implementação regional de determinadas práticas de manejo visando controlar as doenças virais, tais como monitoramento das transmissões por vetores em vinhedos, e o estabelecimento de novos vinhedos com materiais propagativos isentos de vírus e viroides;
- ✓ Constatou-se, pela primeira vez, a ocorrência do GSyV-1 infectando videiras em vinhedos comerciais no Brasil;
- ✓ Verificaram-se diferenças de resultados entre técnicas de diagnóstico, e constatou-se a existência de variabilidade genética entre isolados dos vírus GSyV-1 e GLRaV-3;
- ✓ A sanidade dos vinhedos amostrados (com relação às infecções virais e viroidal) pode ser considerada ruim, o que evidencia a necessidade de adoção de medidas de manejo/controle na região, como o uso de materiais propagativos e mudas sadias;
- ✓ As cochonilhas virulíferas poderiam estar atuando como vetoras de vírus nos vinhedos amostrados;
- ✓ As informações levantadas nas entrevistas com os produtores, sobre a realidade atual da produção de uva e vinho em São Roque/SP, poderiam ser utilizadas em prol do setor, por exemplo, se incorporadas e aplicadas no âmbito de estruturas curriculares do curso de Viticultura e Enologia (IFSP- Campus São Roque);
- ✓ Os resultados obtidos neste trabalho, se repassados aos produtores, poderão contribuir para a tomada de decisões mais adequadas e vinculadas à realidade do setor, visando incrementar as atividades vitivinícolas na região, e influenciar positivamente alguns elos da cadeia de produção de uva e vinho em São Roque.

## 7. REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. J.; ANTONIW, J.F.; BAR-JOSEPH, M.; BRUNT, A. A.; CANDRESSE, T.; FOSTER, G. D.; MARTELLI, G. P.; MILNE, R. G.; FAUQUET, C. M. The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. **Archives of Virology**, v.149, n.5, p.1045-1060, 2004.
- AFONSO, A.P.S. **Biologia e controle de *Parthenolecanium persicae* (Fabricius, 1776) (Hemiptera: Coccidae) e transmissão de vírus por *P. persicae* e *Pseudococcus viburni* (Signoret, 1875) (Hemiptera: Pseudococcidae) em videira**. 2005. 70f. Tese (Doutorado em Fruticultura de Clima Temperado) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.
- AL RWAHNIH, M.; DAUBERT, S.; GOLINO D, ROWHANI, A. Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. **Virology**, New York, v 387, n.2, p. 395-401, 2009.
- AL RWAHNIH, M. ;DAUBERT, S.; GOLINO, D.; ISLAS, C.; ROWHANI, A. Comparison of next-generation sequencing versus biological indexing for the optimal detection of viral pathogens in grapevine. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 105, n.6, p. 758-763, 2015.
- ALMEIDA, A. N.; BRAGAGNOLO, C.; CHAGAS, A. L. S. A Demanda por vinho no Brasil: elasticidades no consumo das famílias e determinantes da importação. **Revista de economia e sociologia rural**, v. 53, n. 3, p. 433-454, 2015.
- ALMEIDA, R. P. P.; DAANE, K. M.; BELL, V. A.; BLAISDELL, G. K.; COOPER, M. L.; HERRBACH, E.; PIETERSEN, G. Ecology and management of grapevine leafroll disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 4: article 94, 2013.
- AMORIM, L.; KUNIYUKI, H. Doenças da videira. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN, A.; ARANHA, L. E. A; REZENDE, J.A.M., (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres. 1997. p. 736-757.
- ATALLAH, S.; GOMEZ, M.; FUCHS, M.; MARTINSON, T. Economic impact of grapevine leafroll disease on *Vitis vinifera* cv. Cabernet franc in Finger Lakes vineyards of New York. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 63, p. 73-79, 2012.
- BASSO, M.F.; FAJARDO, T.V.M.; EIRAS, M.; AYUB, R.A.; NICKEL, O. Detecção e identificação molecular de vírus associados a videiras sintomáticas e assintomáticas. **Ciência Rural**, v.40, p.2249-2255, 2010a.
- BASSO, M. F.; FAJARDO, T. V. M.; SANTOS, H. P.; GUERRA, C. C.; AYUB, R. A.; NICKEL, O. Fisiologia foliar e qualidade enológica da uva em videiras infectadas por vírus. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, p. 351-359, 2010b.
- BASSO, M. F.; FAJARDO, T. V. M.; PIO-RIBEIRO, G.; EIRAS, M.; ZERBINI, F. M. Avanços e perspectivas no estudo das doenças virais e subvirais em videira com ênfase na realidade brasileira. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v 22, p. 160-207, 2014.
- BIANCHI, G. L.; AMICIS, F.; SABBATA, L.; BERNARDO, N.; GOVERNATORI, G.; NONINO, F.; PRETE, G.; MARRAZZO, T.; VERSOLATTO, S.; FRAUSIN, C. Occurrence of Grapevine Pinot gris virus in Friuli Venezia Giulia (Italy): field monitoring and virus quantification by real-time RT-PCR. **European and Mediterranean Plant Protection Organization Bulletin**, p. 45:22-32, 2015.
- BOSCIA, D.; GREIF, C.; GUGERLI, P.; MARTELLI, G. P.; WALTER, B.; GONSALVES, D. Nomenclature of grapevine leafroll-associated putative closteroviruses. **Vitis**, v. 34, p. 171-175, 1995.

- BOTTON, M.; FAJARDO, T. V. M.; MORANDI FILHO, W. J.; GRUTZMACHER, A. D.; PRADO, E. Vetor encoberto, cochonilhas algodonosas em uva. **Revista Cultivar Hortaliças e Frutas**, Pelotas, v. 7, p. 28-29, 2003.
- BOUYAHIA, H.; BOSCIA, D.; SAVINO, V.; LA NOTTE, P.; PIROLO, C.; CASTELLANO, M. A.; MINAFRA, A.; MARTELLI, G. P.; *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* is linked with grapevine vein necrosis. **Vitis**, v. 44, p. 133-137, 2005.
- CABALEIRO, C.; SEGURA, A. Field transmission of *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3) by the mealybug *Planococcus citri*. **Plant Disease**, v. 81, p. 283-287, 1997.
- CABALEIRO, C. & SEGURA, A. Temporal analysis of *Grapevine leafroll-associated virus 3* epidemics. **European Journal of Plant Pathology**, v. 114, p. 441-446, 2006.
- CAMARGO, U. A.; PROTAS, J. F. S.; MELLO, L. M. R. Grape growing and processing in Brazil. **Acta Horticulturae International Society for Horticultural Science**, v 785, p. 51-57, 2008.
- CAMARGO, U. A.; TONIETTO, J.; HOFFMANN, A. Progressos na viticultura brasileira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, volume especial, p. 144-149, 2011.
- CATARINO, A. M.; FAJARDO, T. V. M.; PIO-RIBEIRO, G.; EIRAS, M.; NICKEL, O. Detection and coat protein gene characterization of *Grapevine virus B* isolates from different grapevine species. *Virus Reviews and Research* 18 (suppl. 1): 185-186. (**Annals of XXIV Brazilian Congress of Virology & VIII Mercosur Meeting of Virology**, Porto Seguro, Bahia, Brazil), 2013a.
- CATARINO, A. M.; FAJARDO, T. V. M.; PIO-RIBEIRO, G.; EIRAS, M.; NICKEL, O. Detection and partial molecular characterization of isolates of *Grapevine leafroll-associated virus 4* and *Grapevine rupestris vein feathering virus*. **Tropical Plant Pathology**, v.38, supl., p.840, 2013b.
- CATARINO, A. M.; FAJARDO, T. V. M.; PIO-RIBEIRO, G.; EIRAS, M.; NICKEL, O. Incidência de vírus em videiras no Nordeste brasileiro e caracterização molecular parcial de isolados virais locais. **Ciência Rural**, v 45, p. 379-385, 2015.
- CID, M.; PEREIRA, S.; CABALEIRO, C. Presence of grapevine leafroll-associated virus 3 in primary salivary glands of the mealybug vector *Planococcus citri* suggests a circulative transmission mechanism. **European Journal of Plant Pathology**, v.118, p. 23-30, 2007.
- COBELLO, S. M. Resgate da identidade cultural da estância turística de São Roque através do roteiro do vinho, gastronomia e lazer - um estudo preliminar. In: X ENTBL - ENCONTRO NACIONAL DE TURISMO DE BASE LOCAL, 2007, João Pessoa-PB. **Anais - Encontro Nacional de Turismo com Base Local**, 2007.
- COBELLO, S.M. **Alcachofra roxa de São Roque: turismo no meio rural e gastronomia em São Roque SP uma análise preliminar**. Encontro Nacional de Turismo com Base Local. Rio de Janeiro: Universidade Federal Fluminense, 2010.
- COBELLO, S.M; VERDI, A.R. **Possibilidades de resgate da tradição e origem portuguesa nas vinícolas de São Roque-SP através do enoturismo**. Congresso Internacional de Turismo. Portugal: Universidade do Porto, 2010.
- CREDI, R. Characterization of grapevine rugose wood disease sources from Italy. **Plant Disease**, v. 81, p. 1288-1292, 1997.
- CZOTTER, N.; SZABÓ, E.; MOLNAR, J.; KOCSIS, L.; DEÁK, T.; BISZTRAY, G. Y.; TUSNÁDY, G. E.; BURGYN, J.; VÁRALLYAY, É. First description of Grapevine Syrah virus 1 in vineyards of Hungary. **Journal of Plant Pathology**, v 97, n. 4, S74, 2015.



- DUBIELA, C.R. **Utilização da RT-PCR em Tempo Real (Taqman) para a detecção de vírus em videira e caracterização molecular de vírus que infectam esta cultura.** 2012. 127 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.
- DU-PREEZ, J.; STEPHAN, D.; MAWASSI, M.; BURGER, J. T. The grapevine infecting vitiviruses, with particular reference to grapevine virus A. **Archives of Virology**, v. 156, p. 1495-1503, 2011.
- EIRAS, M. Viroides. In: EIRAS, M. & GALLETI, S. R. (Ed.) **Técnicas de diagnóstico de fitopatógenos.** São Paulo: Devir Livraria, 2012, p.137-154.
- EIRAS, M.; DARÔS, J. A.; FLORES, R. & KITAJIMA, E. W. Viroides e virusóides: relíquias do mundo de RNA. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 229-246, 2006a.
- EIRAS, M.; TARGON, M. L. P. N.; FAJARDO, T. V. M.; FLORES, R.; KITAJIMA, E. W. Citrus exocortis viroid and Hop Stunt viroid Doubly infecting grapevines in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.5, p. 440-446, 2006b.
- ENGEL, E. A.; RIVERA, P. A.; VALENZUELA, P. D. T. First Report of Grapevine Syrah virus-1 in Chilean Grapevines. **Plant Disease**, v. 94, n. 5, p. 633-633, 2010.
- ESPINHA, L. M.; GASPAR, J. O.; KUNIYUKI, H.; CAMARGO, L. E. A. Molecular detection of *Rupestris stem pitting-associated virus* in grapevines in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 206, 2003.
- FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O.; EIRAS, M.; KUHN, G. B. Detecção de um isolado de *Grapevine virus A* e caracterização do gene da proteína capsidial. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 521-527, 2003.
- FAJARDO, T. V. M., EIRAS, M.; SCHENATO, P. G.; NICKEL, O.; KUHN, G. B. Avaliação da variabilidade do *Grapevine leafroll-associated virus 1* e 3 por análise de sequências de nucleotídeos e polimorfismo conformacional de fita simples. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 177-182, 2005.
- FAJARDO, T. V. M.; DIANESE, E. C.; EIRAS, M.; CERQUEIRA, D. M.; LOPES, D. B.; FERREIRA, M. A. S. V.; MARTINS, C. R. F. Variability of the coat protein gene of *Grapevine leafroll-associated virus 3* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 335-340, 2007.
- FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O.; EIRAS, M. Detecção e caracterização molecular dos genes da proteína capsidial de *ilarvírus* e *ampelovírus* que infectam fruteiras temperadas. **Ciência Rural**, v. 41, p. 5-9, 2011.
- FAJARDO, T. V. M.; EIRAS, M.; NICKEL, O.; DUBIELA, C. R. & SOUTO, E. R. 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**, v. 42, p. 2127-2130, 2012.
- FAJARDO, T. V. M.; NAGATA, T.; MELO, F. L. Next Generation Sequencing applied for identification of three new viruses infecting grapevine in Brazil. In: XIII CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA/XV CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, **Resumos...** Bento Gonçalves. Embrapa, p. 288, 2015a.
- FAJARDO, T. V. M.; AL RWAHNIH, M; NAGATA, T.; MELO, F. L. First report of grapevine reovirus infecting Cabernet Sauvignon grapevine in Brazil. **Virus Reviews and Research**, v. 20 (suppl.1), p. 188, 2015b.
- FAJARDO, T. V. M.; EIRAS, M.; NICKEL, O. Detection and molecular characterization of Grapevine yellow speckle viroid 1 isolates infecting grapevines in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v.41, p. 246-253, 2016.

- 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.
- FIORE, N.; PRODAN, S.; MONTEALEGRE, J.; ABALLAY, E.; PINO, A. M. & ZAMORANO, A. Survey of grapevine viruses in Chile. **Journal of Plant Pathology**, v. 90, p. 125-130, 2008.
- FIORE, N.; ZAMORANO, A.; RIVERA, L.; GONZÁLEZ, F.; ABALLAY, E.; MONTEALEGRE, J. & PINO, A. M. 2011. Grapevine viruses in the Atacama Region of Chile. **Journal of Phytopathology**, v. 159, p. 743-750, 2011.
- FLORES, R.; HERNANDEZ, C.; MARTÍNEZ DE ALBA, A.E.; DARÓS, J.A. & DI SERIO, F. Viroids and viroid-host interactions. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 117-139, 2005.
- FLORES, R.; SERRA, P.; MINOIA, S.; DI SERIO, F. & NAVARRO, B. Viroids: from genotype to phenotype just relying on RNA sequence and structural motifs. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-13, 2012.
- FOLDI, I.; SORIA, S.J. Les cochonilles nuisibles a la vigne em Amérique du Sud (Homoptera: Coccoidea). **Annales de la Societé Entomologique de France**, v.24, n.25, p.411-430, 1989.
- FU, C.A.A.; OSORIO, G.A.; MÁRQUEZ, C.A.; MIRANDA, B.J.L.; GRAGEDA, J.; MARTÍNEZ, D.G. **Manejo integrado del piojo harinoso de la vid**. Hermosillo: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigación Regional del Noroeste, Campo Experimental Costa Hermosillo, 2002. 16p. (Folleto Técnico, n.25).
- GARRIDO, L. R. ; BOTTON, M. ; MELLO, G. W. ; FAJARDO, T. V. M. ; NAVES, R. de L. **Guia de identificação de doenças, pragas e deficiências nutricionais na cultura da videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. v.1, 78 p, 2008.
- GIAMPETRUZZI, A.; ROUMI, V.; ROBERTO, R.; MALLOSSINI, U.; YOSHIKAWA, N.; LA NOTTE, P.; TERLIZZI, F.; CREDI, R.; SALDARELLI, P. A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in cv Pinot gris. **Virus Research**, v. 163, n. 1, p. 262-268, 2012.
- GIOVANNINI, E. Produção de uvas para vinho, suco e mesa. **Porto Alegre: Renascença**, 3th ed., 368p., 2008.
- GLASA, M.; PREDAJNA, L.; SOLTYS, K.; SABANADZOVIC, S.; OLMOS, A. Detection and molecular characterisation of *Grapevine Syrah virus-1* isolates from Central Europe. **Virus Genes**, v. 51, n. 1, p. 112-121, 2015.
- GUERRA, C. C.; MANDELLI, F.; TONIETTO, J.; ZANUS, M. C.; CAMARGO, U. A. **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos**. Documentos Embrapa n. 48, 2005.
- GUGERLI, P. Grapevine leafroll and related viruses. In: EXTENDED ABSTRACTS, 14<sup>TH</sup> MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUS AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE, 2003, Locorotondo, Italy, p. 25-31, 2003.
- HAJIZADEH, M.; TORCHETTI, E.M.; SOKHANDAN-BASHIR, N.; NAVARRO, B.; DOULATI-BANEH, H.; MARTELLI, G.P.; DI SERIO, F. Grapevine viroids and *Grapevine fanleaf virus* in north- west Iran. **Journal of Plant Pathology**, v. 97, n. 2, 2015.
- HALL, T. A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HERNÁNDEZ, D. M. S.; MORENO, P. M. **Viticultura – Técnicas de cultivo de la vid, calidad de la uva y atributos de los vinos**. 1 ed., Madrid: Mundi-Prensa, 2005. 325pp.

INGLEZ DE SOUSA, J. S. **Uvas para o Brasil**. (coord), Piracicaba: Fealq, 1996.

JONES, T. J.; RAYAPATI, N. A.; NITA, M. Occurrence of Grapevine leafroll associated virus-2, -3 and Grapevine fleck virus in Virginia, U.S.A., and factors affecting virus infected vines. **European Journal of Plant Pathology**, v. 142, p. 209-222, 2015.

KISHINO, A.Y.; CARVALHO, S.L.C.de; ROBERTO, S.R. **Viticultura tropical o sistema de produção do Paraná**. Londrina: IAPAR, 2007. 366p.

KLAASSEN, V. A., SIM, S. T., DANGL, G. S., OSMAN, F., AL RWAHNIH, M., ROWHANI, A., GOLINO, D. A. *Vitis californica* and *Vitis californica* × *Vitis vinifera* hybrids are hosts for *Grapevine leafroll-associated virus-2* and *-3* and *Grapevine virus A* and *B*. **Plant Disease**, v. 95, p. 657-665, 2011.

KUHN, G. B. Manchas das nervuras da folha da videira (*Vitis* spp.), doença constatada no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, p. 435-440, 1992.

KUNIYUKI, H. Evidência preliminar de transmissão do enrolamento (vermelhão ou amarelo) da videira de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, v. 5, p. 165-166, 1972.

KUNIYUKI, H.; COSTA, A. S. Incidência de vírus da videira em São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 12, p. 240-245, 1987.

KUNIYUKI, H.; COSTA, A. S. Mosaico das nervuras, uma virose da videira em São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 20, p. 152-157, 1994.

KUNIYUKI, H.; COSTA, A. S. Ocorrência de mais um isolado do vírus do mosaico das nervuras da videira que não causa sintomas no porta-enxerto Kober 5 BB. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 618-622, 1995.

KUNIYUKI, H.; REZENDE, J. A. M.; SCAGLIUSI, S. M. M.; VEGA, J.; YUKI, V. A. Incidência de Grapevine leafroll-associated virus 1, 2 e 3 em vinhedos do Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v.28, p.311-314, 2002.

KUNIYUKI, H.; REZENDE, J. A. M.; WILLINK, M. C. G.; NOVO, J. P. S.; YUKI, V. A. Transmissão do *Grapevine leafroll-associated virus 3* pela cochonilha *Pseudococcus longispinus* Targioni-Tozzetti (Hemiptera: Pseudococcidae). **Summa Phytopathologica**, v. 31, p. 65-68, 2005.

KUNIYUKI, H.; GIORIA, R.; REZENDE, J.A.M.; WILLINK, M.C.G.; NOVO, J.P.S.; YUKI, V.A. Transmissão experimental do Grapevine virus B pela cochonilha *Pseudococcus longispinus* Targioni-Tozzetti (Hemiptera:Pseudococcidae). **Summa Phytopathologica**, v.32, n.2, p.151-155, 2006.

LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M. (Eds.). **A Viticultura no Semi-Árido Brasileiro**. Embrapa Semi Árido, 2000. 366p.

LEE, J.H.; LIM, S.; LEE, S.W.; YOO, R.H.; IGORI, D.; ZHAO, F.; YOON, Y.; LEE, S.H.; MOON, J.S. Complete genome sequences of Grapevine yellow speckle viroid 1 and Hop stunt viroid assembled from the transcriptome of *Ixeridium dentatum* plants. **Genome Announcements**, 3(5), p. e01248-15, 2015.

LE MAGUET, J.; BEUVE, M.; HERRBACH, E.; LEMAIRE, O. Transmission of six ampeloviruses and two vitiviruses to grapevine by *Phenacoccus aceris* (Signoret). **Phytopathology**, v. 102, p. 717-723, 2012.

- LIMA, M. F. Principais viroses da videira. In: LIMA, M. F. **Uvas de Mesa: Fitossanidade**. Brasília. Embrapa Informação Tecnológica, p. 35-44, 2002.
- LIMA, M. F. Detecção e controle de viroses em videiras. **Circular Técnica 90**, Petrolina: Embrapa Semi-árido, 2009. 9pp. 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: 08 junho 2016.
- LIMA, M. F. & FAJARDO, T. V. M. Doenças causadas por vírus. In: LIMA, M. F. & MOREIRA, F. R. B. (Ed.) **Uva de mesa: fitossanidade**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa. il. p. 43-58, 2012.
- LING, K. S., ZHU, H. Y., ALVIZO, H., HU, J. S., DRONG, R. F., SLIGHTOM, J. L., AND GONSALVES, D. The coat protein gene of grapevine leafroll associated closterovirus-3: Cloning, nucleotide sequencing and expression in transgenic plants. **Archives of virology**, v. 142, p. 1101-1116, 1997.
- LITTLE, A. & REZAIAN, M.A. Grapevine viroids. IN: HADIDI, A., FLORES, R., RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J.S., eds **Viroids**. Australia: CSIRO Publishing, p.195-206, 2003.
- LIU, M. H.; LI, M. J.; QI, H. H.; GUO, R.; LIU, X. M.; WANG, Q.; CHENG, Y. Q. Occurrence of grapevine leafroll-associated viruses in China. **Plant Disease**, v. 97, p. 1339-1345, 2013.
- MALIOGKA, V. I.; MARTELLI, G. P.; FUCHS, M.; KATIS, N. I. Control of viruses infecting grapevine. In: LOEBENSTEIN, G.; KATIS, N. I. (Eds.) **Advances in Virus Research**. Burlington: Academic Press. p.175-227. v. 91. 2015.
- MAREE, H. J.; FREEBOROUGH, M. J.; BURGER, J. T. Complete nucleotide sequence of a South African isolate of *Grapevine leafroll-associated virus 3* reveals a 5'UTR of 737 nucleotides. **Archives of Virology**, v. 153, p. 755-757, 2008.
- 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.; BURGER, J. T. Grapevine leafroll-associated virus 3. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, article 82, 2013.
- MAREE, H. J.; PIRIE, M. D.; BESTER, R.; OOSTHUIZEN, K.; BURGER, J. T. Phylogenomic analysis reveals deep divergence and recombination in an economically important grapevine virus. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0126819, 2015.
- MARIN, F.R. et al. Potencial de clima e solo para a viticultura, no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v.16, n. 2, p.163-174, 2008.
- MARTELLI, G. P. Rugose wood complex. In: MARTELLI, G.P. (Ed.). **Graft-transmissible Diseases of Grapevine, Handbook for Detection and Diagnosis**. Rome: **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, p. 45-54, 1993.
- MARTELLI, G.P. Grapevine virology highlights. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE (ICVG), 12, Lisboa, 1997. **Extended abstracts**. Oeiras: Estação Agronómica Nacional. p.7-14, 1997.
- MARTELLI, G.P. Grapevine virology highlights 2010-2012. In: Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine, 17., 2012, Davis, USA. **Proceedings of the 17<sup>th</sup> Congress of ICVG**. Davis: ICVG, 2012. p.13-31.
- MARTELLI, G.P. Grapevine virology highlights 2000-2003. **Extended Abstracts**, 14<sup>th</sup> Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine, Locorotondo, Italy. p.3-10, 2003.

- MARTELLI, G. P. Grapevine Virology Highlights 2006-09. **Extended abstracts, 16th Meeting of International Council of Viruses and Virus Diseases of Grapevine**, Dijon, France, p. 15-23, 2009.
- MARTELLI, G.P. Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. **Journal of Plant Pathology**, v. 96, p.105-120, 2014.
- MARTELLI, G. P.; AGRANOVSKY, A. A.; BAR-JOSEPH, M.; BOSCIA, D.; CANDRESSE, T.; COUTTS, R. H. A.; 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. The family *Closteroviridae* revised. **Archives of Virology**, v. 147, p. 2039-2044, 2002a
- MARTELLI, G. P.; SABANADZOVIC, S.; GHANEM-SABANADZOVIC, N. A.; EDWARDS, M. C.; DREHER, T. The family *Tymoviridae*. **Archives of Virology**, v.147, p.1837-1846, 2002b.
- MARTELLI, G.P.; SABANADZOVIC, S.; GHANEM-SABANADZOVIC, N. A.; SALDARELLI, P. *Maculavirus*, a new genus of plant virus. **Archives of Virology**, v.147, p.1847-1853, 2002c.
- MARTELLI G.P., ADAMS M.J. , KREUZE J.F., DOLJA V.V. Family Flexiviridae: a case of study in virion and genome plasticity. **Annual Review of Phytopathology**, v. 45, p. 73–100, 2007.
- MARTELLI, G.P.; BOUDON-PADIEU, E. (Eds.) Directory of infectious diseases of grapevines and viruses and virus-like diseases of the grapevine: bibliographic report 1998-2004. CIHEAM-IAMB. **Options Méditerranéennes**, Série B n. 55, 194p., 2006.
- MATTOS, D. L. de. **Vinhedos e Viticultores de São Roque e Jundiáí**. Tese (provisão da cátedra de geografia humana) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, SP, 1951. 126 f.
- MELLO, L. M. R. **Viticultura Brasileira: Panorama 2009**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/prodvit2009vf.pdf>. Acesso em 12 de abril de 2017.
- MELLO, L. M. R. **Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2010**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2010. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/prodvit2010.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2015.
- MENG, B.; PANG, S. Z.; FORSLINE, P. L.; McFERSON, J. R.; GONSALVES, D. Nucleotide sequence and genome structure of *Grapevine rupestris stem pitting associated virus-1* reveal similarities to *Apple stem pitting virus*. **Journal of General Virology**, v. 79, n. 8, p. 2059-2069, 1998.
- MENG, B., ZHU, H.; GONSALVES, D. *Rupestris stem pitting associated virus-1* consists of a family of sequence variants. **Archives of Virology**, v. 144, p. 2071-2085, 1999
- MENG, B.; LI, C.; WANG, W.; GOSZCZYNSKI, D.; GONSALVES, D. Complete genome sequences of two new variants of *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* and comparative analyses. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 1555-1560, 2005.
- MILKUS, B. N.; GOODMAN, R. N. A survey of Missouri vineyards for the presence of five grape viruses. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 50, p. 133, 1999.
- MINAFRA, A. Rugose wood of grapevines. **Extended Abstracts, 13th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG)**, Adelaide, Australia, p. 30-34, 2000.

- MONIS, J. New test added to HealthCheck Panel A: Grapevine Syrah virus-1. **Eurofins STA Today**, 2009. Disponível em: <[http://www.eurofinsus.com/media/161949/eurofins\\_sta\\_update\\_new\\_red\\_blotch\\_test.pdf](http://www.eurofinsus.com/media/161949/eurofins_sta_update_new_red_blotch_test.pdf)> Acesso em: 16 nov. 2016.
- MORANDI FILHO, W. J.; GRUTZMACHER, A D ; BOTTON, M. ; BERTIN, A. . Controle Químico da cochonilha-farinhenta *Planococcus citri* (Risso, 1813) (HEMIPTERA: PSEUDOCOCCIDAE) em diferentes idades da videira. Arquivos do Instituto Biológico (Impresso), v. 76 n.3, p. 427-435, 2009.
- MOREIRA, A. E. **Detecção e caracterização molecular do *Grapevine virus A* e *Grapevine virus B* em videiras no estado de São Paulo**. 2004. 94 f. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2004.
- MOREIRA, A. E.; GASPAR, J. O.; CAMARGO, L. E. A.; KUNIYUKI, H. Caracterização do gene da proteína capsidial do *Grapevine virus A* em videiras afetadas pela acanaladura do lenho de Kober no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 205-208, 2004a.
- MOREIRA, A. E.; GASPAR, J. O.; CAMARGO, L. E. A.; KUNIYUKI, H. Caracterização do gene da proteína capsidial de dois isolados, patologicamente distintos e sorologicamente semelhantes, do *Grapevine vírus B* em videiras no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 75-80, 2004b.
- MOURA, C. J. M. ; FAJARDO, T.V.M. ; EIRAS, M. . Relação entre sintomas, infecção viral e genótipos de videiras. In: 40º CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 2017, Campinas, SP. **Anais do 40º Congresso Paulista de Fitopatologia**. Botucatu, SP: Associação Paulista de Fitopatologia, 2017. v. 1. p. 8.
- NAIDU, R. A.; MEKURIA, T. A. First report of *Grapevine fleck virus* from Washington Vineyards. **Plant Disease**, v. 94, p. 784, 2010.
- NAIDU, R.; ROWHANI, A.; FUCHS, M.; GOLINO, D.; MARTELLI, G.P. Grapevine leafroll: a complex viral disease affecting a high-value fruit crop. **Plant Disease**, v.98, p.1172-1185, 2014.
- NAIDU, R. A.; MARRE, H. J.; BURGER, J. T. Grapevine leafroll disease and associated viruses: A unique pathosystem. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, p. 613-634, 2015.
- NASCIMENTO, M. B.; FAJARDO T. V. M.; EIRAS, M.; CZERMAINSKI, A.B.C.; NICKEL, O. ; PIO-RIBEIRO, G. Desempenho agrônomo de videiras com e sem sintomas de viroses, e comparação molecular de isolados virais. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.50, n.7, p.541-550, 2015.
- NAVARRO, B.; GISEL, A.; RODIO, M. E.; DELGADO, S.; FLORES, R. & DI SERIO, F. Viroids: How to infect a host and cause disease without encoding proteins. **Biochimie**, v. 94, p.1474-1480, 2012.
- NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M.; ARAGÃO, F. J. L.; CHAGAS, C. M. & KUHN, G. B. Detection and coat protein gene characterization of an isolate of *Grapevine virus B* from corky bark-affected grapevines in Southern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.279-284, 2002.
- OLIVEIRA, I. V. Um estudo sobre cluster vinícola. Revista **Universitária da UNISO**. Sorocaba - SP, v. 30, p. 49-52, 2004.
- OLMOS, A.; BERTOLINI, E.; RUIZ-GARCÍA, A. B.; MARTÍNEZ, C.; PEIRÓ, R.; VIDAL, E. Modeling the accuracy of three detection methods of Grapevine leafroll-associated virus 3 during the dormant period using a Bayesian approach. **Phytopathology**, v. 106, p. 510-518, 2016.

- OOSTHUIZEN, K.; COETZEE, B.; MAREE, H. J.; BURGER, J. T. First Report of *Grapevine Syrah virus 1* in South African Grapevines. **Plant Disease**. V. 100, n. 6, p. 1252, 2016.
- OSMAN, F.; LEUTENEGGER, C.; GOLINO, D.; ROWHANI, A. Real-time RT-PCR (TaqMan) assays for the detection of Grapevine leafroll associated viruses 1-5 and 9. **Journal of Virological Methods**, v. 141, p. 22-29, 2007.
- OSMAN, F.; LEUTENEGGER, C.; GOLINO, D.; ROWHANI, A. Comparison of low-density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan RT-PCR in detection of grapevine viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 149, p. 292-299, 2008.
- OSMAN, F.; ROWHANI, A. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time RT-PCR (TaqMan). **Journal of Virological Methods**, v. 133, p.130-136, 2006.
- OSMAN, F.; ROWHANI, A. Real-time RT-PCR (TaqMan) assays for the detection of viruses associated with Rugose wood complex of grapevine. **Journal of Virological Methods**, v. 154, p. 69-75, 2008.
- PEREIRA, A. C. B. **Proteína capsial do rupestris stem pitting-associated vírus: seqüenciamento do gene, expressão em Escherichia coli, purificação e produção de anti-soro policlonal**. 2008. 66f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, São Paulo, 2008.
- PIETERSEN, G. **Spread of grapevine leafroll disease in South Africa - a difficult, but not insurmountable problem**. 2004. Disponível em: <<http://www.wynboer.co.za/recentarticles/articles.php3>>. Acesso em: 08 jun. 2016.
- PROTAS, J.F.S.; CAMARGO, U.A. **Diagnóstico da Vitivinicultura Brasileira**. Relatório Preliminar. Embrapa Uva e Vinho, SEBRAE e IBRAVIN, 2011.
- RADAELLI, P.; FAJARDO, T.V.M.; NICKEL, O.; EIRAS, M.; PIO-RIBEIRO, G. Variabilidade do gene da proteína capsial de três espécies virais que infectam videiras no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, p. 297-305, 2009.
- REZAIAN, M.A., KRAKE, L.R. & GOLINO, D.A. Common identity of grapevine viroids from USA and Australia revealed by PCR analysis. **Intervirology**, v. 34, p. 38-43, 1992.
- ROMERO, L. A. B. **A viticultura no Estado de São Paulo. 1880-1950**. 2004. 217 f. Dissertação (Mestrado em História Econômica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- ROSA, C.; JIMENEZ, J. F.; MARGARIA, P.; ROWHANI, A. Symptomatology and effects of viruses associated with rugose wood complex on the growth of four different rootstocks. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 62, p. 207-213, 2011.
- ROSCIGLIONE, B.; CASTELLANO, M.A. Further evidence that mealybugs can transmit Grapevine virus A (GVA) to herbaceous hosts. **Phytopathology Mediterranean**, v.24, p.186-188, 1985.
- ROTT, M. E.; JELKMANN, W. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: Adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR) and modification of an RNA extraction protocol. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107:411-420, 2001.
- SABANADZOVIC, S.; GHANEM-SABANADZOVIC, N. A.; SALDARELLI, P.; MARTELLI, G. P. Complete nucleotide sequence and genome organization of Grapevine fleck virus. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 2009-2015, 2001.

- SABANADZOVIC, S.; ABOU GHANEM-SABANADZOVIC, N.; GORBALENYA, A. E. Permutation of the active site of putative RNA-dependent RNA polymerase in a newly identified species of plant alpha-like virus. **Virology**, v. 394, Ed. 1, p. 1-7, 2009.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999p.
- SANTOS, J. S. **São Roque de Outrora**. São Roque: O Democrata, 1938.
- SAPONARI, M.; MANJUNATH, K. & YOKOMI, R. K. Quantitative detection of Citrus tristeza virus in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan). **Journal of Virological Methods**, 147, p. 43-53, 2008.
- SATO, G.S.; STREHLAU, V.; H. S. ALVES. Estratégias de Mercado das Vinícolas Paulistas através de Estudo de Múltiplos Casos. **Informações Econômicas**, SP, v.40, n.4, abr. 2010.
- SCHIRIGATTI, E. L. ; KASPRZAK, L. F. F. ; HOEFLICH, V. A. . **Cadeia Produtiva da Uva e do Vinho em Pequenas Propriedades Rurais: Estudo de Caso do Caminho do Vinho na Colônia Mergulhão em São José dos Pinhais - PR**. In: 48º Congresso SOBER Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2010, Campo Grande, 2010.
- SHI, B. J.; HABILI, N.; SYMONS, R. H. Nucleotide sequence variation in a small region of the *Grapevine fleck virus* replicase provides evidence for two sequence variants of the virus. **Annals of Applied Biology**, v. 142, p. 349-355, 2003.
- SILVA, D. M. **Fungos filamentosos e micotoxinas em uvas, sucos, mostos e vinhos das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil**. Lavras: UFLA, 2012. 184 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- SILVA, G.G. da; TREDEZINI, C. A. O.; ANDRADE, E. S.; CORDEIRO, K. W. . O ambiente institucional na viticultura do município de Jales-SP. **Revista IDEAS** (Online), v. 5, p. 184-220, 2012.
- TAMURA, K.; STECHER, G; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.
- THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p. 4876-4882, 1997.
- TSAI, C. W.; ROWHANI, A.; GOLINO, D. A.; DAANE, K. M.; ALMEIDA, R. P. P. Mealybug transmission of Grapevine leafroll viruses: An analysis of virus-vector specificity. **Phytopathology**, v. 100, p. 830-834, 2010.
- TURTURO, C.; SALDARELLI, P.; YAFENG, D.; DIGIARO, M.; MINAFRA, A.; SAVINO, V.; MARTELLI, G. P. Genetic variability and population structure of grapevine leafroll-associated virus 3 isolates. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 217-224, 2005.
- VEGA, A.; GUTIÉRREZ, R. A.; PEÑA-NEIRA, A.; CRAMER, G. R.; ARCE-JOHNSON, P. Compatible GLRaV-3 viral infections affect berry ripening decreasing sugar accumulation and anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera*. **Plant Molecular Biology**, v. 77, p. 261-274, 2011.
- VERDI. A. R. **Revitalização da Cadeia Vitivinícola Paulista. Análise e Indicadores do Agronegócio**. São Paulo: IEA – Instituto de Economia Agrícola. Volume 1, n. 1, 2007.



VERDI, A. R., OTANI, M. N., MAIA, M. L., FREDO, C. E., OLIVEIRA, A. L. R., & HERNANDES, J. L. Panorama da vitivinicultura paulista, Censo 2009. **Informações Econômicas**, v. 41, p. 5-20, 2011.

VOLPE, M. L.; TALQUENCA, S. G.; ENGEL, E. A.; GRACIA, O. Incidence of *Grapevine leafroll associated viruses* -1, -2, and -3 in Mendoza vineyards. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, p. 377-380, 2010.

ZHANG, Y. P.; UYEMOTYO, J. K.; KIRKPATRICK, B. C. Analysis of double stranded RNAs from cherry trees with stem pitting in California. **Plant Disease**, v. 82, p. 871-74, 1998.

## APÊNDICE



Programa de Pós-Graduação em “Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio”

Discente: Cátia J. M. Moura

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Eiras

Colaboradora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Yara C. Carvalho

## Questionário para produtores de Uva, Vinho e Suco

### I – IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTOR

- 1) Nome da propriedade: \_\_\_\_\_
- 2) Nome do proprietário/produtor (a): \_\_\_\_\_
- 3) Idade: \_\_\_\_\_ 4) Grau de escolaridade: \_\_\_\_\_
- 5) Formação profissional: \_\_\_\_\_
- 6) Município: \_\_\_\_\_ 7) Telefone: \_\_\_\_\_

### II – CARACTERIZAÇÃO DA PROPRIEDADE

- 1) Área total da propriedade? \_\_\_\_\_ ha    área plantada: \_\_\_\_\_ ha    área com uva: \_\_\_\_\_ ha.
  - 2) Local: \_\_\_\_\_ 3) Acesso de asfalto: ( ) sim ( ) não
  - 4) Está localizada na rota do vinho ( ) sim ( ) não
  - 5) Tem outras propriedades com uva? Quantas: \_\_\_\_\_
- Na região: \_\_\_\_\_ Área total: \_\_\_\_\_ ha    área com uva total: \_\_\_\_\_ ha    Nº estabelecimentos \_\_\_\_\_
- Municípios: \_\_\_\_\_
- No estado: \_\_\_\_\_ Área total: \_\_\_\_\_ ha    área com uva: \_\_\_\_\_ ha    Nº estabelecimentos \_\_\_\_\_
- RS: \_\_\_\_\_ Área total: \_\_\_\_\_ ha    área com uva : \_\_\_\_\_ ha    Nº Estabelecimentos \_\_\_\_\_
- Outros: \_\_\_\_\_ Área total: \_\_\_\_\_ ha    área com uva : \_\_\_\_\_ ha    Nº Estabelecimentos \_\_\_\_\_

### III – CARACTERIZAÇÃO DA FAMÍLIA

- 1) Desde quando a sua família pratica a agricultura na região? De onde vieram \_\_\_\_\_
- 2) Quando a família começou a produzir uva e vinho? \_\_\_\_\_
- 3) Houve interrupção na atividade:
 

comercial ( ) sim ( ) não    voltada para o consumo próprio? ( ) sim ( ) não

De \_\_\_\_\_ até \_\_\_\_\_    De \_\_\_\_\_ até \_\_\_\_\_
- 4) Você diria que esta interrupção aconteceu por qual motivo?
 

( ) climático ( ) econômico ( ) patógenos ( ) pragas ( ) solo ( ) outros
- 5) Se interrompeu, porque houve a retomada da atividade? Qual o ano? \_\_\_\_\_
- 6) Quando você passou a ser responsável pela atividade na propriedade? Fez mudanças? Quais? \_\_\_\_\_

### IV – CARACTERIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO VINHO

- 1) Você elabora um destes produtos? Informe quanto representa do percentual da sua renda e o volume produzido:
 

Vinho: ( ) sim \_\_\_\_\_% ( ) não \_\_\_\_\_% da Renda    litros \_\_\_\_\_

Suco: ( ) sim \_\_\_\_\_% ( ) não \_\_\_\_\_% da Renda    litros \_\_\_\_\_

Uva: ( ) sim \_\_\_\_\_% ( ) não \_\_\_\_\_% da Renda    Toneladas \_\_\_\_\_
- 2) Qual o percentual (%) de produção própria e de terceiros da uva que usa?
 

Própria: \_\_\_\_\_ %    Terceiros: \_\_\_\_\_ %

3) Quais as variedades do plantio de uva em sua propriedade?

( ) Americanas \_\_\_\_\_ % ( ) Europeias \_\_\_\_\_ %

4) Quantas cultivares diferentes produz? \_\_\_\_\_

Cultivares/para elaboração de:

( ) **Bordô** \_\_\_\_\_ % ( ) vinho branco \_\_\_\_\_ % ( ) vinho tinto \_\_\_\_\_ % ( ) suco \_\_\_\_\_ % ( ) uva in natura \_\_\_\_\_ %

( ) **Cabernet Franc** \_\_\_\_\_ % ( ) vinho branco \_\_\_\_\_ % ( ) vinho tinto \_\_\_\_\_ % ( ) suco \_\_\_\_\_ % ( ) uva in natura \_\_\_\_\_ %

( ) **Cabernet Sauvignon** \_\_\_\_\_ % ( ) vinho branco \_\_\_\_\_ % ( ) vinho tinto \_\_\_\_\_ % ( ) suco \_\_\_\_\_ % ( ) uva in natura \_\_\_\_\_ %

( ) **Chardonnay** \_\_\_\_\_ % ( ) vinho branco \_\_\_\_\_ % ( ) vinho tinto \_\_\_\_\_ % ( ) suco \_\_\_\_\_ % ( ) uva in natura \_\_\_\_\_ %

( ) **Concord** \_\_\_\_\_ % ( ) vinho branco \_\_\_\_\_ % ( ) vinho tinto \_\_\_\_\_ % ( ) suco \_\_\_\_\_ % ( ) uva in natura \_\_\_\_\_ %

( ) **Isis** \_\_\_\_\_ % ( ) vinho branco \_\_\_\_\_ % ( ) vinho tinto \_\_\_\_\_ % ( ) suco \_\_\_\_\_ % ( ) uva in natura \_\_\_\_\_ %

( ) **Isabel** \_\_\_\_\_ % ( ) vinho branco \_\_\_\_\_ % ( ) vinho tinto \_\_\_\_\_ % ( ) suco \_\_\_\_\_ % ( ) uva in natura \_\_\_\_\_ %

( ) **Lorena** \_\_\_\_\_ % ( ) vinho branco \_\_\_\_\_ % ( ) vinho tinto \_\_\_\_\_ % ( ) suco \_\_\_\_\_ % ( ) uva in natura \_\_\_\_\_ %

( ) **Malbec** \_\_\_\_\_ % ( ) vinho branco \_\_\_\_\_ % ( ) vinho tinto \_\_\_\_\_ % ( ) suco \_\_\_\_\_ % ( ) uva in natura \_\_\_\_\_ %

( ) **Marselan** \_\_\_\_\_ % ( ) vinho branco \_\_\_\_\_ % ( ) vinho tinto \_\_\_\_\_ % ( ) suco \_\_\_\_\_ % ( ) uva in natura \_\_\_\_\_ %

( ) **Merlot** \_\_\_\_\_ % ( ) vinho branco \_\_\_\_\_ % ( ) vinho tinto \_\_\_\_\_ % ( ) suco \_\_\_\_\_ % ( ) uva in natura \_\_\_\_\_ %

( ) **Moscato Branco** \_\_\_\_\_ % ( ) vinho branco \_\_\_\_\_ % ( ) vinho tinto \_\_\_\_\_ % ( ) suco \_\_\_\_\_ % ( ) uva in natura \_\_\_\_\_ %

( ) **Niágara Branca** \_\_\_\_\_ % ( ) vinho branco \_\_\_\_\_ % ( ) vinho tinto \_\_\_\_\_ % ( ) suco \_\_\_\_\_ % ( ) uva in natura \_\_\_\_\_ %

( ) **Niágara Rosada** \_\_\_\_\_ % ( ) vinho branco \_\_\_\_\_ % ( ) vinho tinto \_\_\_\_\_ % ( ) suco \_\_\_\_\_ % ( ) uva in natura \_\_\_\_\_ %

( ) **Pinot Noir** \_\_\_\_\_ % ( ) vinho branco \_\_\_\_\_ % ( ) vinho tinto \_\_\_\_\_ % ( ) suco \_\_\_\_\_ % ( ) uva in natura \_\_\_\_\_ %

( ) **Sauvignon Blanc** \_\_\_\_\_ % ( ) vinho branco \_\_\_\_\_ % ( ) vinho tinto \_\_\_\_\_ % ( ) suco \_\_\_\_\_ % ( ) uva in natura \_\_\_\_\_ %

( ) **Syrah** \_\_\_\_\_ % ( ) vinho branco \_\_\_\_\_ % ( ) vinho tinto \_\_\_\_\_ % ( ) suco \_\_\_\_\_ % ( ) uva in natura \_\_\_\_\_ %

( ) **Touriga Nacional** \_\_\_\_\_ % ( ) vinho branco \_\_\_\_\_ % ( ) vinho tinto \_\_\_\_\_ % ( ) suco \_\_\_\_\_ % ( ) uva in natura \_\_\_\_\_ %

( ) **Violeta** \_\_\_\_\_ % ( ) vinho branco \_\_\_\_\_ % ( ) vinho tinto \_\_\_\_\_ % ( ) suco \_\_\_\_\_ % ( ) uva in natura \_\_\_\_\_ %

( ) **Outras** \_\_\_\_\_ % Quais: \_\_\_\_\_

5) Em caso de produção de terceiros, qual a origem?

Município: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_ Quantidade: \_\_\_\_\_

6) Tem interesse na produção de vinho orgânico? ( ) sim ( ) não

7) Precitaria de uma orientação/apoio técnico? ( ) sim ( ) não

## V – ASPECTOS TÉCNICOS

1) Como avalia a tipo de solo e de clima na sua propriedade para a produção de uva?

( ) Ruim ( ) Boa ( ) Ótima

2) Quais os principais problemas técnicos para produção de uva na região? \_\_\_\_\_

3) Tem conhecimento de quais doenças (agente causal) mais afetam o cultivo da uva?

( ) Bactérias ( ) Fungos ( ) Vírus ( ) Outros – Qual? \_\_\_\_\_

4) Tem conhecimento sobre vírus? ( ) sim ( ) não

5) Reconhece os sintomas apresentados em geral, pelas videiras? ( ) sim ( ) não

6) Em caso positivo, cite alguns sintomas apresentados? \_\_\_\_\_

7) Sabe como os patógenos se disseminam? ( ) sim ( ) não

8) Já teve ou tem problemas com vírus na sua produção? ( ) sim ( ) não

9) Em caso positivo, qual o destino das plantas infectadas?

( ) Continua com o plantio mesmo com sintomas ( ) Descarte ( ) Procura auxílio especializado ( ) Queima

10) Tem conhecimento de quais pragas mais atacam as suas cultivares? \_\_\_\_\_

11) Qual o tipo de produto é usado para o controle químico das pragas e doenças em suas videiras? \_\_\_\_\_

12) Com que periodicidade é realizado este controle químico? \_\_\_\_\_

13) Existem telas de proteção contra inseto ou outros animais instaladas? ( ) sim ( ) não

14) Há algum tipo de treinamento para os profissionais?

No campo: ( ) sim ( ) não Na vinícola/embalagem: ( ) sim ( ) não

15) Quem realiza este treinamento? Pessoal: ( ) próprio ( ) contratado

16) Quais as recomendações fitossanitárias utilizadas? \_\_\_\_\_

## VI – APOIO TÉCNICO

1) Qual o apoio técnico que recebeu no passado e no presente? \_\_\_\_\_

2) Frequenta ou recebe visita de alguém da Unidade de Pesquisa de Uva e Vinho (UPD - APTA)? \_\_\_\_\_

3) Tem conhecimento que o Instituto Federal de São Paulo – campus São Roque (IFSR) possui curso de graduação em Viticultura e Enologia? ( ) sim ( ) não

4) O que acha que o IFSR e a UPD podem fazer para os produtores de Uva e Vinho?

IFSR: \_\_\_\_\_

UPD: \_\_\_\_\_

5) Como avalia a atuação do IFSR na promoção da uva e vinho em São Roque?

( ) Ruim ( ) Boa ( ) Ótima

## VII – ORGANIZAÇÃO SOCIAL

1) Você participa de algum grupo de discussão da atividade Uva e Vinho? ( ) sim ( ) não

Qual? ( ) Câmara Setorial ( ) Roteiro do vinho ( ) Sindusvinho ( ) Outros: Qual? \_\_\_\_\_

2) Como começou o circuito do vinho? Quem participava? \_\_\_\_\_

3) O que fazer para promover a produção do vinho em São Roque? \_\_\_\_\_

## VIII – COMERCIALIZAÇÃO E QUALIDADE

1) Qual o valor dos produtos vendidos (em reais) por litro ou tonelada?

Uva: R\$ \_\_\_\_\_ (mais caro) Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ .

R\$ \_\_\_\_\_ (mais barato) Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ .

Vinho: R\$ \_\_\_\_\_ (mais caro) Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ .

R\$ \_\_\_\_\_ (mais barato) Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ .

Suco: R\$ \_\_\_\_\_ (mais caro) Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ .

R\$ \_\_\_\_\_ (mais barato) Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ .

2) Qual percentual (%) vendido na sua propriedade? \_\_\_\_\_

3) Importância em percentual (%) renda proveniente do: ( ) turismo \_\_\_\_\_%

Produção de: ( ) Vinho \_\_\_\_\_% ( ) Suco \_\_\_\_\_% ( ) Uva \_\_\_\_\_%

4) Como estima o % de crescimento da sua renda proveniente da uva e derivados, nos últimos dez anos?

\_\_\_\_\_ % (2005 a 2009) \_\_\_\_\_ % (2010 a 2014)

5) Qual a sua visão do passado e do potencial desenvolvimento futuro? \_\_\_\_\_

6) Como você e outros produtores de São Roque avaliam a qualidade do suco e do vinho produzido aqui?

Você: \_\_\_\_\_

Outros: \_\_\_\_\_

7) Querem melhorar a qualidade? ( ) sim ( ) não

8) Quanto perdeu da produção pelas viroses (porcentagem/produção/reais)? Quando foi a última safra com perda?

\_\_\_\_\_ % Uva \_\_\_\_\_ % Renda com uva \_\_\_\_\_ % Renda com vinho e suco

\_\_\_\_\_ % Renda da propriedade Perda em R\$: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

**OBSERVAÇÃO** \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_

Data da entrevista: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201....

\_\_\_\_\_  
Assinatura do produtor (a)

\_\_\_\_\_  
Assinatura do entrevistador (a)



SECRETARIA DE  
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO



GOVERNO DO ESTADO DE  
**SÃO PAULO**  
TRABALHANDO POR VOCÊ