

Tiago Camponogara Tomazetti

**TÉCNICAS MOLECULARES E SOROLÓGICAS NA  
DETECÇÃO DE VÍRUS FITOPATOGÊNICOS EM TECIDOS  
DE VIDEIRA (*Vitis* spp.)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciência, área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Leocir José Welter

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Tomazetti, Tiago Camponogara  
TÉCNICAS MOLECULARES E SOROLÓGICAS NA DETECÇÃO DE VÍRUS  
FITOPATOGENICOS EM TECIDOS DE VIDEIRA (*Vitis* spp.) / Tiago  
Camponogara Tomazetti ; orientador, Aparecido Lima da  
Silva Silva ; coorientador, Leocir José Welter Welter. -  
Florianópolis, SC, 2016.  
77 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós  
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Recursos Genéticos  
Vegetais. 3. Videira. 4. RT-qPCR. 5. Virologia. I. Silva,  
Aparecido Lima da Silva. II. Welter, Leocir José Welter.  
III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

Tiago Camponogara Tomazetti

**TÉCNICAS MOLECULARES E SOROLÓGICAS NA  
DETECÇÃO DE VÍRUS FITOPATOGÊNICOS EM TECIDOS  
DE Videira (*Vitis* spp.)**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Florianópolis, 25 de Fevereiro de 2016.

---

Prof. Paulo Emilio Lovato, Dr.  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Aparecido Lima da Silva, Dr.  
Orientador - Universidade Federal de Santa Catarina

---

Marco Antônio Dal Bó, Dr.  
Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

---

José Afonso Voltolini, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Robson Marcelo Di Piero, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

À minha família, em especial ao  
meu irmão Vinícios e meus pais  
Luiz e Elza.

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Ao grande arquiteto do universo, que permitiu construir o caminho trilhado e cuja energia é fonte inesgotável de vida que ilumina a todos.

À Universidade Federal de Santa Catarina, em especial ao PPG em Recursos Genéticos Vegetais que permitiu o aprimoramento de minha formação e forneceu as possibilidades para meu desenvolvimento acadêmico e científico durante o Mestrado.

À província autónoma de Trento, Itália, pelo financiamento do laboratório, permitindo a realização desta pesquisa e no sentido amplo, consolidação da vitivinicultura no estado de Santa Catarina.

Ao Professor Aparecido Lima da Silva, pela amizade, orientação, confiança e oportunidades que depositou na minha trajetória durante o Mestrado.

Ao Professor Leocir José Welter, pela coorientação e sobretudo, pelo apoio, confiança e amizade que depositou em mim, permitindo a realização deste trabalho.

Aos demais Professores do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pelos conhecimentos transmitidos confiança depositada.

Ao Doutor José Afonso Voltolini, pelo acompanhamento, apoio, paciência e atenção durante as atividades do Mestrado, principalmente durante as realizações dos testes sorológicos.

Ao Doutor Thor Vinícius Martins Fajardo, pesquisador da EMBRAPA Uva e Vinho e a sua equipe, pela transferência de conhecimento, atenciosidade e apoio prestado neste estudo.

Aos funcionários do Departamento de Fitotecnia, em especial à secretária do PPG em Recursos Genéticos Vegetais, Bernadete Ribas, ao secretário do Departamento, Newton e ao técnico do laboratório LFDGV André Knopp sempre dispostos a auxiliar.

À toda minha família, principalmente avós, pais, irmãos, tios e sobrinhos, pelo amor, confiança, apoio e pela compreensão dos momentos em que não pude estar presente.

À Marcia Denise Rossarolla, namorada, amiga e companheira, pela contribuição no trabalho, pelo companheirismo de todos os momentos, principalmente nos intermináveis finais de semana no laboratório, pelo carinho e incentivo.

A todos os integrantes e ex-integrantes do Núcleo de Estudo da Uva e do Vinho, em especial ao Doutor Marcelo Borghezán, Diego Poletto de Matos e Isadora Teixeira Coelho Malohlava, que me acompanharam mais ativamente durante as atividades do Mestrado. Agradeço a vocês pelo apoio, amizade e conversas informais.

A todos integrantes e ex-integrantes do LFDGV que estiveram presentes durante o tempo de realização de meu Mestrado, principalmente: Sarah Z., Gustavo K., Vinicius V., Caroline C., Catarina P., Daniel H., Dorival, Edyane, Daniel R., Fabiane, Fernando, Francis, Hugo F., Joseph R., Ihangika, Joana, Josiane (LAPAD), Bianca (LAPAD), Jaiane (LAPAD), Jamilly, Karina, Leila, Liliana, Lilian, Luciano S., Miguel B., Morgana, Montagna, Maiby, Márcia, Newton, Patrick, Ramon, Rafael, Rômulo (LAPAD), Thiago O., Yohan.

À EPAGRI, em especial aos pesquisadores Doutor Marco Antônio Dalbo, da Estação Experimental de Videira-SC, Doutor Emílio Brighenti e Doutor Alberto Brighenti, da Estação Experimental de São Joaquim-SC, pela parceria durante a realização desta pesquisa.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Mestrado durante estes dois anos.

À Capes e à FAPESC pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento das atividades desta pesquisa.

A todos que, de alguma forma, auxiliaram-me na execução deste trabalho.

Aos egípcios, gregos e romanos pela criação e difusão do vinho pelo mundo, sem ele não seria possível o andamento das atividades ou a escrita desta dissertação.

“O papel dos infinitamente  
pequenos na natureza é  
infinitamente grande”  
(Louis Pasteur, 1822 - 1895)

## RESUMO

A videira é uma das frutíferas mais produzidas no mundo. Seu cultivo está presente na cultura de praticamente todos os povos e difundida por várias partes do mundo. Contudo, devido à forma de propagação, predominantemente vegetativa, presença constante de fitófagos e utilização de enxertia, é recorrente a presença de vírus fitopatogênicos em plantas de videira. Por este motivo, ao longo dos anos, muitos estudos foram realizados com o objetivo de desenvolver e aperfeiçoar os métodos de indexagem. Os primeiros métodos adotados para indexagem em videiras, foi a observação de sintomas nas plantas ou em plantas indicadoras, através da enxertia, esta pratica é conhecida como indexagem biológica. Com a necessidade de maior agilidade e precocidade para identificação de plantas com vírus, passou-se a ser utilizados métodos de indexagem sorológica, através dos testes do tipo ELISA. Neste cenário, o objetivo com este trabalho foi testar e desenvolver métodos confiáveis para a indexagem molecular de videiras, assim como conhecer a presença e distribuição dos principais vírus em viveiros nacionais. Um estudo preliminar foi implantado visando estabelecer um protocolo de extração de RNA adequado para obtenção de material genético com qualidade e pureza. Foram coletadas amostras de 109 plantas matrizes em cinco viveiros nacionais e de um Programa do Banco Genético de Melhoramento da Videira, as amostras foram utilizadas para a realização dos testes sorológico (ELISA) e molecular (RT-qPCR), para os vírus GVA, GVB, GFkV, GFIV, GLRaV-1 e GLRaV-3, o teste ELISA foi realizado utilizando o anti-soro comercial AGRITEST (Valenzano, Itália) e o RT-qPCR através de sonda marcada com química Zen<sup>TM</sup> (IDT, Coralville, Estados Unidos das Américas). Para o desenvolvimento dos marcadores moleculares, sequências de ORF's (*Open Read Frame*) de cada vírus, bem como a sequência do gene 18S rRNA para controle interno, foram obtidas a partir do NCBI e posteriormente analisadas com a ferramenta *on line* BLAST, para seleção de regiões adequadas para a construção de marcadores moleculares, dentre as sequências obtidas, foi selecionada as regiões com ausência de pontos de mutação após o alinhamento das fitas, para isto, foi utilizado o *software* BioEdit. Foram construídos marcadores moleculares (*forward* | *probe* | *reverse*) com o *quencher* interno Zen<sup>TM</sup> e fluorescência do *reporter* FAM em três fragmentos genômicos para cada vírus, utilizando o algoritmo da ferramenta *on line* PrimerQuest. Para os testes de amplificação, via T-qPCR, foi utilizado



amostras de três isolados virais distintos e a reação foi realizada com o mastermix QuantiTec Probe (Qiagen, Hilden, Alemanha) em 45 ciclos de amplificação. Nos testes preliminares, foi observado maior qualidade e concentração do RNA obtido extraído a partir de tecidos tenros, como o mesocarpo de frutos e a folha da videira, contudo, devido a estes tecidos possuírem comumente reduzida carga viral, não são utilizados para indexagem, que é tradicionalmente realizada através de segmentos de sarmentos em dormência. Para este tecido, foi observado melhores resultados utilizando o kit de extração RNeasyPlant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha). Devido a isto, este kit foi empregado durante o desenvolvimento deste estudo. Os marcadores sintetizados para os vírus GVA, GVB e GFIV não amplificaram na reação de RT-qPCR, provavelmente devido a dificuldade no anelamento das sequências utilizadas, desta forma, para estes vírus será necessário novos estudos para síntese de sequências a serem empregadas na indexagem. Para o GFkV, GLRaV-1 e GLRaV-3 foi possível utilizar os marcadores desenvolvidos neste estudo. Em todos os viveiros coletados foi identificado a presença de ao menos uma planta contaminada por vírus, somente estando livre de contaminação as mudas da coleção do Programa de Melhoramento Genético. O GVB, seguido pelo GFkV foram os vírus encontrados com maior frequência neste estudo, enquanto o GVA foi o único vírus ausente em todas as amostras indexadas. Não foi observado a presença de GLRaV-1 pelo teste ELISA, sendo uma amostra identificada como positiva para este vírus por meio da indexagem molecular. Para os vírus GVA, GVB e GFIV será necessário o desenvolvimento de maiores estudos para validar marcadores moleculares com a química Zen<sup>TM</sup> (IDT, Coralville, Estados Unidos das Américas), o marcador GLRaV-1 01 e GFkV 01 podem ser empregados para a indexagem para os vírus GLRaV-1 e GFkV respectivamente, bem como os marcadores GFLRaV-3 01 e GLRaV-3 03 podem ser utilizados para indexagem do vírus GLRaV-3 em reações de RT-qPCR a partir de tecidos de videira.

**Palavras-chave:** Viticultura. Biologia Molecular. Virologia. Sanidade vegetal. Mudas.

## ABSTRACT

The grapevine is one of the fruit world's most productive importance, being rooted in almost all cultures and spread in various parts of the world. However, because the propagation method, predominantly vegetative, through grafting, facilitate the presence of pathogenic viruses in vine tissues. For this reason, over the years, many studies objective develop and improve the indexing methods. The old methods used for vine indexing was the simple observation of symptoms in plants or indicator plants through grafting, this known as a biological indexing. Nowadays, improving the speed and precocity for indexing, serological methods are been adopted, the most common is ELISA test. These due to the strong advance in molecular biology in recent years, which stand out for their accuracy, reliability and speed of execution. However, to adopt molecular tests, it is necessary develop solid and reliable approaches. The objective of this work is test and develop reliable methods for molecular grapevine indexing, as well knowing the presence and distribution of the main virus in National Nurseries. A preliminary study was implanted looking for stablish one adequate RNA extraction protocol to obtain quality genetic material. Were collected samples from 109 plants in 5 national nurseries, and from the Grapevine breeding program and genetic bank, the samples were utilized to make the serological test (ELISA) and molecular (RT-qPCR) to the virus GVA, GVB, GFkV, GFIV, GLRaV-1 and GLRaV-3. The ELISA test made using the commercial anti serological AGRITEST (Valenzano, Italy), and the RT-qPCR through the labeled probe from Zen<sup>T</sup> chemical (IDT, Coralville, USA). To develop molecular markers, ORF's sequences (Open Read Frame) of each virus, as well the gene sequence of 18S rRNA to internal control, sequences obtained from NCBI and after analyzed with online BLAST tool. To select adequate regions to build molecular markers, between the obtained sequences, the regions with absence of mutation points after alignment were selected, for this; we made use of BioEdit software. Molecular markers (forward/probe/reverse) designed with internal quencher Zen<sup>TM</sup> and fluorescence from reporter FAM in three genomic fragments for each virus, utilizing the logarithmic online tool PrimerQuest. For the amplification test, through T-qPCR, we made use of three distinct viral samples, and the reaction made using mastermix QuantiTec Probe (Qiagen Hilden, Germany) in 45 amplification cycles.

In the preliminary tests, more RNA quality and concentration obtained from tender tissues, like fruits mesocarp and grapevine leaf. However, due to the reduced viral charge from this tissue, are not widely used for indexing, normally is used segments from dormancy branches. For this tissue, better results utilizing RNeasyPlant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) observed. For this reason, we made use of this kit during this study. The molecular markers were synthesized to the virus GVA, GVB, and GF1V did not amplify in the RT-qPCR reaction, probably due to annealing difficulties in the utilized sequences, this way, to this virus it is necessary new studies to synthesize sequences for indexing using. To the GFkV, GLRaV-1 and GLRaV-3 the markers developed on this study amplified. In all the nurseries, at least one plant had virus contamination, being free only the collection from the Plant breeding program. The GVB, followed by the GFkV are encountered with more frequency in this study, while the GVA is the only absence in all the samples. The ELISA test did not identify GLRaV-1 to any sample, while one positive sample detected through molecular indexing. To the virus GVA, GVB, and GF1V will be necessary develop more studies to validate molecular markers. The marker GLRaV-1 01 and GFkV 01 are ready to use in indexing of GLRaV-1 e GFkV virus respectively, as well the markers GFLRaV-3 01 e GLRaV-3 03 are to the GLRaV-3 virus in RT-qPCR from grapevine tissues.

**Key Works:** Viticulture. Molecular Biology. Virology. Plant health. Seedlings.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1** Sequência do gene 18S rRNA (gb | 13172871) indicando em azul os sítios de ligação para *end point polymerase chain reaction*, em verde os sítios de ligação dos marcadores *forward* e *reverse* empregados neste estudo para reação de *quantitative polymerase chain reaction*, em amarelo o sítio de ligação da sonda marcada com *reporter* fluorescente (FAM), *quencher* não fluorescente Iowa Black® FQ e *quencher* interno ZEN™.....35
- Figura 4.2.** BoxPlot demonstrando a variação do *Cicle threshold* para o gene 18S rRNA extraído a partir de epicarpo do fruto, folha fotossinteticamente ativa, mesocarpo do fruto, ráquis e sarmento lenhoso de videira (*Vitis labrusca*) ‘Bordo’, a partir do kit RNeasyPlant Mini Kit (A) e do protocolo com detergente CTAB (B).....38
- Figura 5.1.** Etapas da extração de RNA .utilizando o kit de extração RNeasyPlant Mini Kit, A) Limpeza da amostra e raspagem do tecido floemático de sarmentos lenhosos de videira; B) maceração do tecido floemático em nitrogênio líquido, utilizando almofariz e pistilo; C) amostragem de aproximadamente 100 mg de tecido macerado para ser adicionado ao tampão de extração; D) amostras em processo de extração do RNA sendo adicionadas à centrifuga para separação dos detritos; E) pipetagem da fase líquida da amostra, para purificação do RNA; F) detritos da amostra separados no fundo do microtubo pelo processo de centrifugação; G) amostra de RNA ao fundo do microtubo, após passar pela primeira etapa de purificação; H) pipetagem da amostra no etanol para adsorção à segunda membrana de purificação; I) homogeneização das amostras e transferência para a segunda membrana de purificação; J e K) Processo de purificação do RNA adsorvido à segunda membrana; L) desligamento da adsorção do RNA à segunda membrana e eluição em água.....54
- Figura 5.2.** Gráficos de amplificação e marcador do “*threshold*” (barra horizontal) dos marcadores moleculares em reação de RT-qPCR para os vírus GFkV, GFIV, GVA, GVB, GLRaV-1 e GLRaV-3, respectivamente de cima para baixo, para os marcadores 01, 02 e 03 respectivamente da esquerda para a direita.....58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 4.1.</b> Sequencia do marcador para RT-qPCR, tamanho do fragmento e localização dentro do loco 18S rRNA.....	35
<b>Tabela 4.2.</b> . Concentração e pureza do RNA extraído através dos diferentes protocolos, a partir de tecidos de videira ( <i>Vitis labrusca</i> ), variedade Bordô, cultivada em Tangara/SC, BR (2015).....	37
<b>Tabela 4.3.</b> <i>Cycle threshold</i> obtido em reação de RT-qPCR com marcadores para o gene 18S rRNA, utilizando RNA extraído através dos diferentes protocolos, a partir de tecidos de videira ( <i>Vitis labrusca</i> ).....	38
<b>Tabela 5.1.</b> Marcadores moleculares ( <i>forward</i>   <i>probe</i>   <i>reverse</i> ) desenvolvidos para RT-qPCR com quencher não fluorescente Iowa Black® FQ e quencher interno ZEN™ para diagnóstico de vírus fitopatogênicos em tecidos de videira.....	56
<b>Tabela 5.2.</b> Amostras de videira com presença dos vírus analisados via teste sorológico (ELISA) e molecular (RT-qPCR) em plantas matrizes de viveiros brasileiros, 2016, Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, UFSC, Florianópolis, SC.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool  
C<sub>t</sub> – Cycle threshold  
cDNA – DNA complementar, sintetizado a partir da duplicação da fita de RNA  
DEPC – Dicarbonato de dietila  
DNA – Ácido Desoxirribonucleico  
ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  
GFkV – *Grapevine fleck virus*  
GFIV – *Grapevine fanleaf virus*  
GLRaV-1 – *Grapevine leafroll-associated virus 1*  
GLRaV-3 – *Grapevine leafroll-associated virus 3*  
GVA – *Grapevine virus A*  
GVB – *Grapevine virus B*  
MGB – Minor Groove Binder  
NCBI – National Center of Biotechnology Information  
NFQ – Non Fluorescent Quencher  
ORF – Open Read Frame  
PCR – Polymerase Chain Reaction  
qPCR – quantitative Polymerase Chain Reaction  
RNA – Ácido Ribonucleico  
RT – Reverse Transcriptase  
RT-qPCR – Reverse Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
2. HIPÓTESES E OBJETIVOS .....	23
2.1. HIPÓTESES .....	23
2.2. OBJETIVOS .....	23
2.2.1. Objetivo Geral .....	23
2.2.2. Objetivos Específicos .....	23
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	25
3.1. Métodos para detecção de virose .....	25
3.2. Teste ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) .....	25
3.3. Testes moleculares .....	26
3.3.1. RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction) .....	26
3.3.2. qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) .....	27
4. CAPITULO I METODOS E TECIDOS EMPREGADOS PARA A EXTRAÇÃO DO RNA EM VIDEIRA .....	29
4.1. Resumo .....	29
4.2. Abstract .....	30
4.3. Introdução .....	32
4.4. Material e Métodos .....	33
4.5. Resultados e Discussão .....	36
4.6. Conclusão .....	40
4.7. Referências .....	40
5. CAPITULO II DESENHO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA VIROSES EM VIDEIRA ( <i>Vitis</i> spp.) E INDEXAGEM SOROLOGICA E MOLECULAR DE PLANTASMATRIZES EM VIVEIROS NACIONAIS .....	45
5.1. Resumo .....	45
5.2. Abstract .....	46
5.3. Introdução .....	46
5.4. Material e Métodos .....	50
5.5. Resultados e Discussão .....	55
5.6. Conclusão .....	61
5.7. Referências .....	61
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	69
7. REFERÊNCIAS .....	71





## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a videira é uma das frutíferas mais cultivadas no mundo. Em 2013, foram produzidos mais de 77 milhões de toneladas de uvas, equivalente a mais de U\$ 44 bilhões (FAO, 2016). A produção de vinho ou uva de mesa está presente em praticamente todos os países do mundo. A vasta difusão da viticultura está relacionada à distribuição cosmopolita e utilização histórica pelas sociedades que mantiveram o seu cultivo.

As videiras (*Vitis* spp.) pertencem à família botânica Vitaceae, sendo, dentre outros treze gêneros, o único cultivado comercialmente nesta família. No mundo são conhecidos 3 centros de biodiversidade da videira. Contudo, estima-se que o surgimento do gênero *Vitis* ocorreu entre os mares Negro e Cáspio. Posteriormente foi levada com a migração humana para a Ásia, Europa, África e América. O processo de domesticação, acompanhado de seleção natural e artificial nas diferentes regiões proporcionou o surgimento de diversas espécies, subespécies e variedades (Levadoux, 1956; This et al., 2006; Tian et al., 2008; Wang et al., 1995; Zoghلامي et al., 2009).

Estima-se que a videira está presente na história da humanidade por milhares de anos. A domesticação das variedades europeias (*Vitis vinifera* L.), produtoras de vinhos finos, ocorreu a partir da *Vitis vinifera* subsp. *Sylvestris*, que teve seu processo de domesticação iniciado a aproximadamente de 8.000 a 4.000 anos A.C. Estima-se que as variedades asiáticas e americanas surgiram também neste período, entretanto seguindo processos distintos de seleção e domesticação (Levadoux, 1956; This et al., 2007).

Ao longo do período evolutivo das videiras, nos diferentes centros de domesticação e diversidade, relata-se a provável coevolução com diversos organismos parasitas. Os vírus aparentemente sempre estiveram presentes com as videiras (Gambino et al., 2012). A disseminação destes foi facilitada ao longo do tempo devido à propagação vegetativa das videiras, assim como riqueza da entofauna, propiciando a transmissão de diversas viroses entre as plantas atacadas. Este longo período de contato e coevolução permitiu o desenvolvimento e a especificação de muitas estirpes e espécies de vírus fitopatogênicos. Por outro lado, as espécies e variedades têm diferentes respostas à convivência com viroses, que vão desde a reação assintomática até a perda completa da produção (Gutha et al., 2010).

Devido à consolidação da cadeia produtiva da videira, principalmente em países da Europa, surgiu a necessidade da produção

de mudas com melhor qualidade fisiológica, genética e sanitária. Novos estudos foram empregados para a identificação, seleção, produção e certificação de mudas para se enquadrarem nos padrões de qualidades dos viveiros (Ribeiro, 2012). Demandando métodos de indexagem cada vez mais precisos e precoces.

O primeiro método utilizado para identificação das infecções virais foi através da observação de sintomas ocorrentes na planta. Contudo, este método é muitas vezes impreciso e subjetivo, tornando-se pouco consistente para diagnose, principalmente em infecções virais onde os sintomas ocasionados são inexpressivos por longos períodos fenológicos ou por vários ciclos.

Passou-se então, a utilizar a indexagem biológica, que consiste na exposição do material da planta matriz a um bioindicador, normalmente através da enxertia em planta suscetível que apresenta claramente os sintomas da presença do vírus. Desta forma, o diagnóstico da presença de viroses se tornou mais precisa (Sankaran et al., 2010). Contudo, na indexagem biológica, muito tempo, infraestrutura e mão-de-obra são necessários desde a indexagem até o diagnóstico, normalmente 24 a 36 meses, onde as plantas são mantidas em casa de vegetação sob constante observação dos sintomas.

Para melhorar a eficiência do processo de indexagem, desenvolveram-se técnicas sorológicas, como o teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), que consiste na identificação da presença do vírus devido à reação do anticorpo ao conjugar-se com a proteína capsidial do vírus, permitindo a obtenção do diagnóstico em poucos dias. Entretanto, este método apresenta alguns pontos fracos, como a necessidade de laboratórios para produção dos anticorpos específicos, presença comum de falsos negativos além de necessitar elevada carga viral para identificação efetiva da virose. Para evitar estes pontos negativos, tem-se adotado técnicas moleculares, onde se busca identificar o material genético (RNA) do vírus, proporcionando maior agilidade e precisão do resultado (Osman et al., 2007; Sankaran et al., 2010; Bester et al., 2014).

As técnicas moleculares empregadas para a identificação de viroses consistem na construção da fita de cDNA através da transcriptase reversa a partir do RNA. Este processo é conhecido como Reverse Transcriptase (RT). Com o cDNA, podem ser adotadas duas técnicas moleculares para a identificação do vírus (PCR e qPCR).

Os primeiros estudos para indexagem via genética molecular, eram baseados na Reação em Cadeia da Polymerase (PCR, na sigla em

inglês). Nesta técnica, conhecida como RT-PCR, o cDNA da amostra é submetido a uma reação de PCR com marcadores moleculares específicos para o alvo a ser amplificado e posteriormente submetido a eletroforese em membrana porosa e marcação com fluorescência dos fragmentos gerados (Bustin et al., 2009; Noorani et al., 2013). Esta técnica apresenta algumas vantagens em comparação ao teste sorológico, como a detecção de infecções mesmo com baixo título viral e a redução de falsos negativos.

Devido ao constante avanço na biologia molecular, o método para identificação de viroses passou a ser também realizado através do PCR quantitativo (qPCR, sigla em inglês). Esta técnica consiste na leitura do número de cópias produzidas durante a reação de PCR (Bustin et al., 2009; Ruijter et al., 2013), gerando um gráfico em tempo real, da amplificação das amostras. Apresenta também maior sensibilidade, possibilitando a identificação de cargas virais ainda menores, pois não há necessidade de eletroforese posterior para visualização dos fragmentos amplificados via a RT-qPCR. Pois nesta técnica a leitura do número de cópias geradas é realizada em cada ciclo através da fluorescência, possibilitando a quantificação da carga viral no hospedeiro (Bustin et al., 2009).

Atualmente, os países da União Europeia possuem a legislação mais consolidada a respeito da certificação de mudas de videira. Bem como, a principal cadeia produtiva de mudas. Entretanto, para estabelecer um acordo de seleção sanitária e certificação de mudas comum aos países integrantes, foram necessárias várias negociações, devido aos conflitos existentes. No continente europeu, as primeiras tratativas para um acordo internacional datam de abril de 1968, com o conselho econômico da comunidade europeia. Neste momento, foi estabelecido a divisão das mudas em três categorias, “Básica”, “Certificada” e “Padronizada”.

A partir de então, foi aplicado uma fiscalização mais severa ao local de produção das mudas básicas e certificadas, onde a indexagem passou a ser uma prática rotineira nestas classes. A forma de indexagem exigida por este acordo é baseado na indexagem biológica, podendo ser assistida por testes sorológicos. Os países que implementaram inicialmente as normas deste tratado foram Alemanha, França e Itália. Posteriormente, Espanha, Grécia e Portugal também entraram no acordo internacional europeu.

Contudo, diferenças na presença e impacto de algumas viroses específicas em alguns países, ocasionou problemas nas relações entre os

membros. Para facilitar o acordo internacional, em 1992, o comitê do conselho internacional para o estudo de vírus e doenças virais em viticultura, reviu os programas de certificações dos estados membros, uniformizando os parâmetros adotados para a certificação, criando o esquema de certificação conhecido como EPPO (Anônimo, 2008).

Com a nova normatização, as mudas de videira passaram a ser classificadas em cinco categorias, sendo estas, “Fonte Primária”, “Pré-básica”, “Básica”, “Certificada” e “Padronizada”. Na ordem, respectivamente de maior controle fitossanitário para menor exigência legal de fiscalização. Também com a nova normatização, foi estabelecido a exigência de testes sorológicos ou moleculares que atestem a negatificação dos indivíduos para os vírus do complexo da degeneração da videira (GFIV, ArMV, GCMV, RpRSV, SLRV e TBRV), complexo do enrolamento (GLRaV - I, II, III, IV, V, VI, VII e IX), complexo do lenho rugoso (GVA, GVB e GRSPV) e GFkV. Além de estabelecer um protocolo padrão para indexagem biológica.

No esquema de certificação EPPO, os organismos oficiais, como os ministérios de agricultura, de cada Estado membro são as entidades responsáveis pela certificação. Sua atuação ocorre por meio de viveiristas e laboratórios certificados. Este esquema de certificação foi conhecido como “padrão ouro” na sanidade de mudas de videira. Contudo, este elevado padrão de controle sanitário não foi prático para fins comerciais. Com isto, foram incorporadas algumas alterações pela comissão da comunidade europeia em 2005 (Comissão Diretiva 2005/43/CE).

A principal alteração trazida pela comissão de 2005, foi a alteração dos vírus a serem indexados. A partir de então, a indexagem, passou a ser obrigatória, somente para cinco espécies, são elas, *Grapevine fanleaf virus*, *Arabis mosaic virus*, *Grapevine leafroll-associated virus-1*, *Grapevine leafroll-associated virus-3* e *Grapevine fleck virus*, sendo esta última, obrigatória somente para porta-enxertos. Contudo, baseado nestas obrigações básicas, cada Estado membro pode implementar suas exigências complementares.

Na Itália, país membro do tratado europeu, o *Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali*, responsável pela implementação das medidas indicadas pela comissão europeia em 2005, emitiu o decreto ministerial de 7 de julho de 2006, onde foi incrementado a exigência da indexagem para o *Grapevine virus A*, bem como, dentre outras providências, regulamentou a perniciosidade da realização dos testes, conforme o tipo de muda a ser comercializado

pelo estabelecimento (Mipaaf, 2006). Alterando e substituindo o decreto ministerial emitido em 8 de fevereiro de 2005, para enquadrar-se nas novas normativas internacionais. Atualmente, esta última legislação continua em vigor.

Na Itália, o controle sanitário dos vinhedos foi incentivado no plano estratégico para inovação e pesquisa no setor agrícola, alimentar e florestal, para os anos 2014-2020 (Mipaaf, 2014). Demonstrando a contínua preocupação dos órgãos reguladores daquele país, assim como da união europeia em geral. Por outro lado, fora da união europeia, poucas normativas estão presentes regulamentando a sanidade das mudas de videira comercializada.

No Brasil, o órgão responsável pela regulamentação da atividade é o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Conforme autoridade conferida pela lei federal brasileira N°. 10.711/03, cabendo ao MAPA, a edição e implementação de normativas para a produção, comercialização, importação e exportação de sementes e mudas dentro do território brasileiro. A mesma lei, também permite a existência de normatizações estaduais, desde que, válido semente para seu território.

Entretanto, atualmente, não existem normativas específicas aprovadas no âmbito federal para a regulamentação da qualidade fitossanitária de mudas de videira, não havendo também obrigação legal da realização de indexagem para quaisquer vírus. Neste cenário, a produção e comercialização de mudas de videira no território brasileiro são regulamentados, mesmo que de forma genérica, principalmente pelo decreto federal brasileiro N°. 24.114 de 1934, conhecido como regulamento de defesa sanitária vegetal.

Neste decreto, o principal foco é o controle para evitar a disseminação de pragas ou doenças no território nacional, também sujeito a normatização pelo MAPA. De toda a forma, faz-se necessário a realização de estudos, com a finalidade de gerar subsídios científicos e tecnológicos suficientes para a implantação de uma legislação visando a seleção sanitária e certificação de mudas de videira nas condições brasileiras.



## **2. HIPÓTESES E OBJETIVOS**

### **2.1. HIPÓTESES**

A) Marcadores moleculares empregados em reação de RT-qPCR podem ser utilizados para identificação molecular da presença de viroses em videira.

B) Protocolos de isolamento do material genético de videira e vírus são possíveis de serem empregados para identificação molecular da presença de viroses em videira.

C) As matrizes de viveiros nacionais possuem contaminação por vírus possíveis de serem identificadas via teste sorológico ou molecular.

### **2.2. OBJETIVOS**

#### **2.2.1. Objetivo Geral**

Gerar marcadores moleculares com a química Zen<sup>tm</sup> confiáveis para serem empregados na identificação molecular de viroses em tecidos de videira, empregar estes marcadores na identificação de viroses e comparar os resultados com o teste sorológico (ELISA) em matrizes provenientes de viveiros nacionais produtores de mudas de videira.

#### **2.2.2. Objetivos Específicos**

A) Desenhar marcadores moleculares possíveis de serem empregados na identificação molecular de viroses em videira.

B) Extrair material genético (RNA) de sarmentos dormentes de videira com elevada qualidade para posterior reação de RT-qPCR.

C) Realizar a identificação da presença de contaminação dos vírus GVA, GVB, GFIV, GFkV, GLRaV-1 e GLRaV-3 em matrizes de videira do estado de Santa Catarina e Minas Gerais, através da indexagem sorológica e molecular.





### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Métodos para detecção de virose

As técnicas empregadas para indexagem de materiais vegetais apresentaram forte evolução nos últimos anos, passando de observação dos sintomas com a indexagem biológica para diagnoses mais complexas e precisas, como técnicas sorológicas (teste ELISA) e moleculares (RT-PCR e RT-qPCR), permitindo a identificação de cargas títulos virais menores em tempo reduzido de diagnóstico (Hill, 1984; Basso et al., 2010 a; Fajardo et al., 2011).

A detecção de viroses através da observação biológica é uma prática ainda utilizada, porém, em videira este é um método que apresenta algumas dificuldades de ser empregado e seus dados são na sua maioria inconsistentes, necessitando de carga viral elevada para que sejam claramente observados os sintomas (Fajardo et al., 2003). Os autores relatam que após a inoculação de 29 mudas com o vírus *Grapevine virus A* (GVA), somente 3 mudas apresentaram acanaladuras no lenho de Kober 5BB, sintoma típico desta infecção (Kuniyuki et al., 2003).

Em outras espécies vegetais, também são descritos dificuldades referentes ao uso da técnica de indexagem biológica. Radaelli et al. (2006) encontraram dificuldades na identificação biológica de um isolado do *Apple stem pitting virus* em pereiras. Os autores referem este impasse ao comportamento biológico diferenciado dos isolados. Devido a estas dificuldades encontradas ao se diagnosticar viroses em tecidos vegetais, foram desenvolvidos e empregados outros métodos, tornando os resultados mais neutros e confiáveis.

#### 3.2. Teste ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Dentre os métodos sorológicos empregadas para detectar a presença de vírus em organismos vegetais, o teste ELISA é atualmente o mais empregado, tanto para espécies herbáceas (Alencar et al., 2012) como lenhosas (Fajardo et al., 2012).

Em videira, o teste ELISA é amplamente empregado em vários estudos de detecção viral, Fajardo et al. (2002) utilizaram esta técnica para identificar a presença do *Grapevine leafroll associated virus* (GLRaV) 1 e 3 em videiras cultivadas em varias regiões de importância vitivinícola nacional, isolando os vírus identificados para posterior sequenciamento genético. Kuniyuki et al. (2006), empregando o teste

ELISA, identificaram vetores possíveis de transmitirem o *Grapevine virus B* (GVB) para mudas sadias.

O teste ELISA apresenta algumas vantagens, como a praticidade e o custo relativamente baixo dos reagentes, entretanto, possui algumas desvantagens, como pouca precisão, necessitando em muitos casos repetir as análises para obtenção de resultados confiáveis, além do custo elevado para produção de novos anticorpos a serem utilizados em análises para novas viroses (Dória et al., 2011).

### **3. 3. Testes moleculares**

Como forma de melhorar a precisão e a eficácia dos testes de análises, os diagnósticos de presença de vírus passaram a ser através de técnicas moleculares. A principal diferença destes para os testes sorológicos consiste na molécula identificada. Testes moleculares baseiam-se na identificação do material genético do vírus. Desta forma, é possível realizar a identificação de vírus, mesmo quando estes estão em estágio de latência e em pequenas concentrações.

Devido à maioria dos vírus descritos para vegetais terem o RNA fita simples como material genético, é necessário realizar a transcriptase reversa, para produção do cDNA (Zhu et al., 2010). Com isto as técnicas de RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) e qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction), apresentam-se como precisas e eficazes no monitoramento e diagnose de viroses (Pereira et al., 2011; Hajizadeh, et al., 2012; López-Fabuel et al., 2013).

#### **3. 3. 1. RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction)**

O primeiro método molecular para identificar material genético de vírus em tecidos vegetais foi o RT-PCR, onde primeiramente se realiza a reação de transcriptase reversa, para formar o cDNA e posteriormente é realizado um PCR convencional, semelhante ao aplicado quando o material genético trata-se do DNA. Gambino e Gribaudo (2006) utilizaram esta técnica para identificar a presença do material genético de ArMV, GFLV, GVA, GVB, RSPaV, GFkV, GLRaV-1, GLRaV-2 e GLRaV-3 em tecidos de videira cultivados *in vitro*. O mesmo método foi empregado por Giampetruzzi et al. (2012) para descrever a existência de novas variantes de vírus em videira ‘Pinot Gris’ cultivada na Itália.

Este método ainda é muito empregado em vários laboratórios que visam a detecção de viroses em tecidos de plantas lenhosas. Contudo, alguns estudos demonstram que seus resultados são pouco sensíveis, dificultando o diagnóstico do material genético do patógeno quando a carga viral no tecido hospedeiro é muito baixa (Osman; Rowhani, 2006).

Em estudos de comparação entre técnicas moleculares para identificação dos vírus GFkV, ToTSV, GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-5, GLRaV-9, RSPaV, GVA e GVB, foi verificado que a indexagem via RT-PCR demonstrou resultados menos sensíveis e eficientes se comparados com a indexagem via RT-qPCR (Osman et al., 2008). Por estes motivos, o uso da RT-PCR passou a ser obsoleto na identificação de material genético de vírus.

### 3. 3. 2. qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction)

Com a necessidade de métodos mais sensíveis e eficientes para detectar o material genético do patógeno no hospedeiro ou suas interações moleculares, foi empregado o uso do qPCR. Este método aborda uma leitura da expressão do gene a cada ciclo de replicação do PCR, possibilitando inferir a quantidade de carga viral no tecido hospedeiro, utilizando para isto alguns genes de referência (controles internos) para normalizar a expressão e o *Cycle threshold* ( $C_t$ ), ciclo em que a fluorescência emitida pela amostra ultrapassa um limite arbitrário, alocado na fase exponencial da curva de amplificação (Polesani et al., 2008; McDavid et al., 2013).

Contudo, devido a tratar-se de uma técnica nova, este método enfrenta alguns entraves que limitam o seu uso, como a necessidade de extração de RNA total da amostra com boa qualidade e o estabelecimento de genes a serem empregados como controles internos (Reid et al., 2006). Para a videira, muitos estudos mencionam a extração do RNA total da amostra através de kits comerciais (MacKenzie et al., 1997; Osman; Rowhani, 2006; Osman et al., 2008). Contudo outros protocolos vêm sendo desenvolvidos e testados para redução de custos nesta etapa (Borges et al., 2014).

Um protocolo de extração de RNA a partir das bagas de *Vitis vinifera* foi desenvolvido por Reid et al. (2006) e posteriormente empregado por Polesani et al. (2010) para extração de RNA de folhas de videiras cultivadas *in vitro*, relatando bons resultados. Visando a extração do RNA utilizando folhas de plantas frutíferas cultivadas,

Foissac et al. (2001) desenvolveram protocolo baseado no uso de guanidina, este protocolo foi testado com sucesso também para extração de RNA a partir de ramos de videira coletados em seu estágio de dormência (Turturo et al., 2005).

Em estudos com videira, é comumente empregado o uso do 18S rRNA que inicialmente foi utilizado para o RT-PCR (Gambino; Gribaudo, 2006) e passou a ser empregado no RT-qPCR (Osman et al., 2008), como gene de controle endógeno. Entretanto, os genes UBQ e EF1- $\alpha$  são os mais estáveis em tecidos de videira cultivados *in vitro* (Peña et al., 2010). Ainda, de acordo com Reid et al. (2006) os genes GAPDH, Actina, EF1- $\alpha$  e SAND são os mais estáveis ao longo do ciclo de desenvolvimento, contudo, estes dados foram avaliados utilizando-se bagas de videira, carecendo de testes para assegurar o emprego dos mesmos em outros tecidos ou estágios do ciclo fenológico da planta.

## 4. CAPÍTULO I MÉTODOS E TECIDOS EMPREGADOS PARA A EXTRAÇÃO DO RNA EM VIDEIRA

### 4. 1. Resumo

A videira está entre as frutíferas mais cultivadas do mundo, difundida em quase todos os países, para produção de uvas de mesa e/ou vinhos. Contudo, estudos de caracterização fenológica de suas variedades são muitas vezes comprometidos devido à elevada plasticidade bem como ampla base genética. Por estas características, estudos moleculares são cada vez mais explorados para esta cultura. Dentre estes estudos, o conhecimento do transcriptoma surge como uma nova área a ser elucidada. Contudo, para o sucesso nestes estudos, faz-se necessário a extração do conteúdo de RNA com qualidade e pureza. Devido a este cenário, o presente estudo foi realizado com o objetivo de testar protocolos para extração de RNA a partir de tecidos de videira (*Vitis labrusca*) para ser utilizado na técnica de Transcriptase Reversa seguida de Reação em cadeia da Polimerase quantitativa (RT-qPCR). Foram utilizadas amostras de cambio vascular (sarmento), folhas, ráquis, epicarpo e mesocarpo do fruto. Para a extração do RNA total, utilizou-se os protocolos de extração orgânica com Trizol<sup>®</sup> modificado, extração com detergente CTAB e kit comercial RNeasyPlant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha). Os tecidos utilizados foram mantidos em baixa temperatura após a coleta e rapidamente transportados ao laboratório, onde foram mantidos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a extração do RNA. A concentração do RNA extraído foi mensurada com espectrofotômetro NanoDrop ND-1000, assim como a relação com proteínas ( $A_{260}/A_{280}$ ) e polifenóis ( $A_{260}/A_{230}$ ) e posteriormente foi realizada a reação de RT-qPCR com 20 ng de RNA amostra, utilizando mastermix QuantiTect Probe (Qiagen, Hilden, Alemanha) com sonda marcada (IDT, Coralville, Estados Unidos das Américas) para o gene 18S rRNA (gb|13172871). Para comparação do Cycle threshold ( $C_t$ ) os dados foram analisados utilizando o teste estatístico SNK ( $\alpha = 0,05$ ) para comparação das médias. A concentração de RNA foi maior quando utilizado o kit comercial, exceto para o sarmento, em que não há diferença entre os protocolos. Este tecido apresentou os menores rendimentos de RNA extraído. As relações  $A_{260}/A_{280}$  e  $A_{260}/A_{230}$  não apresentaram interações significativas, para ambas o kit proporcionou valores superiores e o Trizol as menores médias de pureza da amostra. Devido aos resultados insatisfatórios obtidos pelo protocolo de extração com Trizol, a reação

de RT-qPCR foi realizada somente com amostras dos demais protocolos. Com exceção da amostra obtida a partir do sarmento, a extração com o kit proporcionou menores valores e variação do  $C_t$  em comparação ao CTAB, indicando maior integridade do RNA extraído. O uso deste kit proporcionou maior concentração, pureza e qualidade do RNA extraído em comparação aos demais protocolos, exceto para as amostras obtidas a partir do sarmento. O protocolo empregando o uso de Trizol não apresenta resultados satisfatórios para a extração de RNA a partir do sarmento, folhas, ráquis, epicarpo e mesocarpo do fruto. Dentre os tecidos, o uso do mesocarpo e folha apresentaram maior integridade e pureza do material genético extraído.

**Palavras-Chave:** *Vitis labrusca*. Fruticultura. Expressão gênica. Biologia molecular. Transcriptoma.

#### 4. 2. Abstract

Grapevine it is among the fruits most cultivated in the world, spread in almost all the countries, to wine production and/or table grapes. Even though, phenological characterization studies of different varieties are compromised due to high plasticity as well as large genetic diversity. Due to these characteristics, molecular studies are each day more explored to this culture. Between these studies, the transcriptome knowledge seems a new field of study to be elucidated. However, to the success on this study, it is necessary that the RNA extraction achieve good purity and quality levels. In this scenario, the present study objective is test different RNA extraction protocols from Grapevine tissue (*Vitis labrusca*) to utilize in the Reverse Transcriptase technique, followed by reaction in the Polimerase Chain Reaction quantitative (RT-qPCR). Samples collected from vascular cambio (with) leaves, rachis, epicarp and mesocarp of the fruit. To the RNA total extraction, utilized organic extraction protocol with modified Trizol®, extraction with CTAB detergent and Commercial kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany). The tissue utilized were maintained in low temperature after collect and rapidly transported to the lab, where maintained in  $-20^{\circ}\text{C}$  until the RNA extraction. The RNA concentration extracted was measured with spectrophotometer NanoDrop ND-1000, as well as the protein concentration ( $A_{260}/A_{280}$ ) and polyphenols ( $A_{260}/A_{230}$ ), and after made the RT-qPCR reaction with 20ng of RNA per sample, utilizing mastermix QuantiTect Probe (Qiagen, Germany) with labeled probe (IDT, Coralville, USA) to the 18S rRNA gene(gb|13172871). To

threshold cycle comparison (Ct) the data were analyzed utilizing the statistic test SNK ( $\alpha = 0,05$ ) to average comparison. The RNA concentration was higher when utilized commercial kit, except for the withe, where there is no difference among the protocols. This tissue showed the lower RNA extracted yields. The  $A_{260}/A_{280}$  e  $A_{260}/A_{230}$  relations did not show significant interaction, to both the kit provided higher values and Trizol the lower purity average of samples. Due to the unsatisfactory results obtained using the Trizon extraction protocol, samples from it were not used to the RT-qPCR reaction. The kit extraction provided lower values and Ct compared with CTAB, with the branches samples exception, indicating more RNA integrity from extraction. The kit use also provided more concentration, purity and quality of RNA extracted in comparison to other protocols, except for the branche samples. The Trizol protocol showed unsatisfactory results to RNA extraction from branche, leaf, rachis, fruit epicarp and mesocarp. Among the tissues, the use of mesocarp and leaf presented more integrity and genetic material purity extracted.

**Key Works:** Vitis Labrusca. Fruitculture. Gene Expression. Molecular Biology. Transcriptome.

### 4. 3. Introdução

A videira é atualmente uma das frutíferas mais cultivadas no mundo. Na safra de 2013 produziu mais de 77 milhões de toneladas de frutos, gerando valor de aproximadamente US\$ 44 bilhões (FAO, 2016). O cultivo e a produção de uvas, para consumo *in natura* ou produção de bebidas, está presente em todas as partes do mundo, em decorrência da adaptabilidade e amplitude genética das variedades de videiras distribuídas no globo.

Devido à amplitude genética existente, o genoma da videira é altamente polimórfico (Lijavetsky et al., 2007), fato que aliado ao longo período entre gerações (superior a 3 anos), e elevada plasticidade fenotípica, dificulta estudos genéticos baseados em caracteres morfológicos. Com isto, abordagens moleculares se fazem necessárias para compreender melhor o comportamento genético e epigenético da videira (Venturini et al., 2013).

Com o avanço das técnicas moleculares empregadas em estudos genéticos, novas abordagens visam elucidar a regulação da expressão gênica, comportamento epigenético, entre outros estudos de transcriptoma (Reid et al., 2006). O advento de novas técnicas em biologia molecular, como a análise por PCR quantitativa (qPCR) proporcionou testar novas hipóteses e gerar dados concisos acerca de diversas áreas da biologia vegetal, como melhor entendimento do metabolismo vegetal (Buchanan-Wollaston et al., 2005), interações planta patógeno (Mestre et al., 2015), identificação de viroses (Osman et al., 2007) dentre outras aplicabilidades.

Entretanto, para a aplicabilidade destes métodos, faz-se necessário a obtenção de material genético com qualidade, integridade e pureza (Asif et al., 2000). Concomitante a isto, tecidos de plantas lenhosas, como os provenientes da videira, possuem elevados níveis de componentes fenólicos e polissacarídeos (Gambino et al., 2008). Tais componentes atuam como inibidores nas posteriores reações enzimáticas empregadas na análise molecular (Osman; Rowhani, 2006).

Devido a isto, o objetivo com o presente trabalho foi testar protocolos para a extração e isolamento de RNA a partir de diferentes tecidos de videira, visando sua aplicabilidade em estudos de transcriptoma.



#### 4. 4. Material e Métodos

A coleta das amostras de tecido vegetal foi realizada na Vinícola Panceri, em área de produção comercial, localizada no município de Tangará/SC, Brasil (27° 11' 16" S 51° 10' 24" W, altitude de 1.100 m), a partir de plantas adultas de *Vitis labrusca* (variedade Bordô) onde foram amostrados cachos em final de maturação, folhas fotossinteticamente ativas e sarmentos lenhosos. Após coletados, os tecidos foram mantidos refrigerados durante o transporte. Em laboratório os cachos foram fracionados em ráquis e fruto, que, foram fracionados em epicarpo e mesocarpo. Estes tecidos foram mantidos em temperatura de -20 °C, com exceção dos sarmentos lenhosos que foram mantidos refrigerados até a extração do RNA.

Os tecidos coletados (epicarpo e mesocarpo do fruto, ráquis, folhas e sarmentos) foram utilizados para extração do RNA. Para isto, foram testados três protocolos: kit comercial RNeasyPlant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), Trizol e detergente CTAB. Para cada tratamento (protocolo x tecido) foi realizada a extração de RNA de três indivíduos, considerando cada indivíduo como uma repetição.

Para a extração do RNA, os tecidos foram previamente macerados em nitrogênio líquido. A extração utilizando o kit comercial foi empregada conforme as recomendações do fabricante, utilizando o Tiocianato de Guanidina (RLT) como tampão de extração, acrescido de  $\beta$ -mercaptoethanol (1:100).

A extração utilizando o método detergente CTAB seguiu conforme protocolo desenvolvido por Chang et al. (1993), onde aproximadamente 2 g de tecido macerado em nitrogênio líquido foram adicionados a 15 mL do tampão de extração CTAB (2%) aquecido a 65 °C em banho-maria, seguido da adição de igual volume de solução clorofórmio : ácido indolacético (1:1) e centrifugação a 11.000 g por dois minutos. À fase superior foi adicionado duas vezes o volume de etanol e mantido em - 80 °C por aproximadamente 30 minutos para precipitação do *pellet*, seguido de centrifugação de 10.000 g por 20 minutos, logo foi descartado a fase líquida e o *pellet* foi seco em temperatura de geladeira (4 °C) e suspenso em 200  $\mu$ L de água destilada, esterilizada, tratada com DEPC.

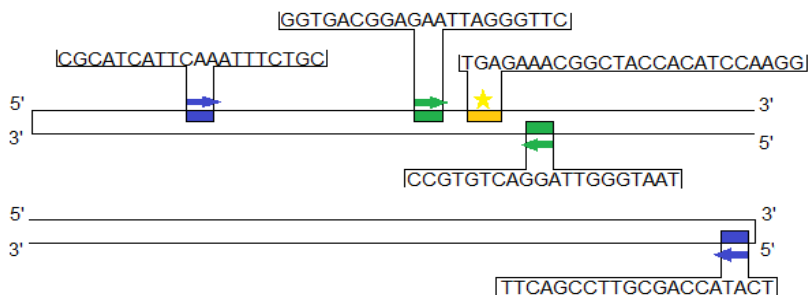
A extração pelo método Trizol foi realizada utilizando aproximadamente 100 mg de tecido macerado foi adicionada a 1 mL de Trizol. Logo a amostra foi vortexada duas vezes por 5 segundos e mantida em banho-maria por 5 minutos a 60 °C, novamente

homogeneizada em vortex por duas vezes de 15 segundos e adicionado 300 µL de solução de clorofórmio gelada (4 °C) seguida de nova vortexagem por 15 segundos e descanso em temperatura ambiente por 2 a 3 minutos, seguida de centrifugação a 11.000 g em 4 °C por 12 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e adicionado 300 µL da solução de isopropanol gelada (4 °C), seguido de lenta homogeneização manual. A amostra foi mantida em temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos (até a precipitação do RNA). As amostras foram então centrifugadas a 10.000 g em 4 °C por 10 minutos, a fase líquida foi descartada e mantido o pellet que foi lavado com 1,5 mL de etanol 75% gelado (-20 °C) e posteriormente lavado com 1,5 mL de etanol 100% gelado (-20 °C), as lavagens foram seguidas de 15 segundos de vortex e centrifugação a 10.000 g em 4 °C por 10 minutos e descarte da fase líquida. O pellet obtido no final do processo foi seco por aproximadamente 1 hora em 4 °C e suspenso em 200 µL de água destilada, esterilizada, tratada com DEPC.

Neste protocolo, a solução de clorofórmio foi preparada imediatamente antes o início da extração, adicionando clorofórmio : β-mercaptoethanol (100:3). A solução de isopropanol foi preparada com ao menos 24 horas de antecedência utilizando álcool isopropílico acrescido de 0,8 M de citrato de sódio e 1,2 M de cloreto sódio.

A concentração e pureza do RNA extraído foi mensurada empregando o uso do espectrofotômetro NanoDrop ND-1000, em 260 nm, assim como a relação  $A_{260}/A_{280}$  e  $A_{260}/A_{230}$ . Posteriormente, a concentração de RNA nas amostras foi padronizada para 10 ng µL<sup>-1</sup>. A reação de RT-qPCR foi realizada utilizando o mastermix QuantiTect Probe (Qiagen, Hilden, Alemanha), com 20 ng de RNA total para volume final da reação de 10 µL.

A sonda (Zen<sup>tm</sup>) utilizada na reação foi confeccionada marcada com *reporter* fluorescente (FAM), *quencher* não fluorescente Iowa Black<sup>®</sup> FQ e *quencher* interno ZEN<sup>TM</sup>, os marcadores empregados na reação (*Forward* | *Probe* | *Reverse*) foram confeccionados com base na sequência do gene ribossômico 18S rRNA (NCBI: gb | 13172871), com auxílio do software *online* PrimerQuest<sup>®</sup> (**Tabela 4.1**). A região genica empregada para síntese dos marcadores foi interna ao amplicon comumente utilizado em estudos científicos para identificação deste gene em reações de RT-PCR (Gambino; Gribaudo, 2006).



**Figura 4.1.** Sequência do gene 18S rRNA (gb | 13172871) indicando em azul os sítios de ligação para *end point polymerase chain reaction*, em verde os sítios de ligação dos marcadores *forward* e *reverse* empregados neste estudo para reação de *quantitative polymerase chain reaction*, em amarelo o sítio de ligação da sonda marcada com *reporter* fluorescente (FAM), *quencher* não fluorescente Iowa Black® FQ e *quencher* interno ZEN™.

**Tabela 4.1.** Sequência do marcador para RT-qPCR, tamanho do fragmento e localização dentro do loco 18S rRNA

Iniciador	Sequencia do iniciador	Sentido
Forward	GGTGACGGAGAATTAGGGTTC	5' - 3'
Probe	TGAGAAACGGCTACCACATCCAAGG	5' - 3'
Reverse	CCGTGTCAGGATTGGGTAAT	3' - 5'

As reações realizadas a partir do RNA extraído pelos diferentes tecidos em ambos os protocolos foram comparados através do *Cycle threshold* ( $C_t$ ), considerando resultados satisfatórios aqueles com menor variabilidade do  $C_t$  e valores abaixo de 35 ciclos. Indicando boa qualidade e integridade do RNA extraído.

O teste de Shapiro-Wilk ( $\alpha=0,05$ ) foi utilizado para verificar a normalidade dos dados coletados. A homogeneidade das variâncias foi verificada através do teste de Bartlett ( $\alpha=0,05$ ). Posteriormente as médias foram submetidas à análise de variância e, quando observadas diferenças ao nível de 5% de probabilidade de erro tipo  $\alpha$ , o teste SNK ( $\alpha=0,05$ ) foi utilizado para separação das médias. Para a análise estatística foi utilizado o pacote ExpDes.pt (Ferreira et al., 2013) do software R (R Core Team, 2015).

#### 4. 5. Resultados e Discussão

Todos os dados coletados neste estudo apresentaram homogeneidade de variância, bem como, normalidade. Devido a isto, adotou-se métodos de análise estatística paramétrica sem efetuar transformação de valores.

Maior concentração de RNA ( $31,7 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) foi obtida com o uso do kit de extração comercial, para todos os tecidos, sendo estatisticamente semelhante ao protocolo com uso do CTAB para os tecidos de epicarpo, ráquis e sarmento. Neste último, não foi verificada diferença na concentração de RNA por qualquer protocolo testado, o que se deve a elevada variabilidade dos resultados verificados. Com exceção do tecido sarmento, o protocolo em que foi empregado o uso de Trizol apresentou os menores valores.

Quando empregado o uso do kit comercial, as amostras obtidas a partir do mesocarpo e da folha apresentaram maior concentração do RNA ( $45,3 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  e  $43,3 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ , respectivamente) em comparação aos demais tecidos. Concentrações menores foram verificadas para a ráquis e o sarmento ( $23,0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  e  $15,0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ , respectivamente). Resultados semelhantes foram obtidos com o uso do protocolo CTAB, em que, as amostras extraídas de sarmento apresentaram a menor concentração do RNA. Com o emprego do Trizol, a concentração de RNA não diferiu estatisticamente entre os tecidos (**Tabela 4.2**).

As relações de absorvância  $A_{260}/A_{280}$  e  $A_{260}/A_{230}$  foram maiores para amostras de RNA extraídas a partir do kit comercial (1,49 e 1,31, respectivamente), estatisticamente superior ao protocolo CTAB que apresentou resultados de pureza também superiores aos obtidos em amostras extraídas a partir do protocolo Trizol. Dentre os tecidos não foi verificado diferença estatística para a relação  $A_{260}/A_{280}$ , contudo, o mesocarpo e o epicarpo apresentaram maiores valores de relação  $A_{260}/A_{230}$  (1,05 e 1,06, respectivamente), diferindo somente de ráquis (0,85) e sarmento (0,84) que apresentaram os menores valores para esta relação (**Tabela 4.2**).

**Tabela 4.2.** Concentração e pureza do RNA extraído através dos diferentes protocolos, a partir de tecidos de videira (*Vitis labrusca*), variedade Bordô, cultivada em Tangara/SC, BR (2015)

Protoc olo*	Meso carpo	Epi carpo	Ráquis	Folha	Sarmento	Média
----- Concentração do RNA ng $\mu\text{L}^{-1}$ -----						
Kit	45,3 aA	31,7 aB	23,0 aBC	43,3 aA	15,0 aC	31,7
CTAB	27,3 bA	27,3 aA	19,7 aAB	27,3 bA	16,7 aB	23,7
Trizol	11,0 cA	10,7 bA	6,3 bA	9,3 cA	7,0 aA	8,9
Média	27,9	23,2	16,3	26,6	12,9	
----- Relação $A_{260}/A_{280}$ -----						
Kit	1,5	1,5	1,5	1,5	1,4	1,49 A
CTAB	1,4	1,3	1,4	1,4	1,2	1,33 B
Trizol	0,7	0,7	0,4	0,6	0,5	0,59 C
Média	1,18 a	1,17 a	1,11 a	1,19 a	1,05 a	
----- Relação $A_{260}/A_{230}$ -----						
Kit	1,4	1,4	1,2	1,3	1,2	1,31 A
CTAB	1,0	1,1	0,9	1,1	0,8	0,99 B
Trizol	0,7	0,7	0,4	0,6	0,5	0,57 C
Média	1,05 a	1,06 a	0,85 b	0,99 ab	0,84 b	

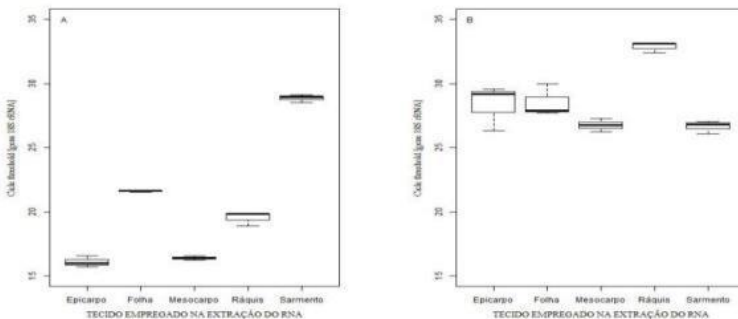
\* Dentro da mesma categoria, letras minúsculas iguais nas colunas e maiúsculas iguais nas linhas não diferem entre si pelo teste SNK ( $\alpha=0,05$ ).

Devido aos resultados não satisfatórios obtidos nas amostras de RNA extraídas com o protocolo em que foi empregado o uso de Trizol, estas não foram utilizadas para a reação de RT-qPCR. Portanto, a reação foi realizada somente com as amostras extraídas com o kit de extração e com o método CTAB. Para a maior parte dos tecidos, o  $C_t$  foi menor para as amostras extraídas a partir do kit de extração, com exceção do sarmento lenhoso, em que menor  $C_t$  foi obtido para as amostras extraídas através do método CTAB (**Tabela 4.3**). Entretanto, em todos os tecidos, a variação do  $C_t$  foi menor nas amostras extraídas a partir do kit (**Figura 4.2**).

**Tabela 4.3.** *Cycle threshold* obtido em reação de RT-qPCR com marcadores para o gene 18S rRNA, utilizando RNA extraído através dos diferentes protocolos, a partir de tecidos de videira (*Vitis labrusca*)

Proto colo*	Mesocar po	Epicar po	Ráquis	Folha	Sarmento	Média
Kit	16,4 bD	16,1 bD	19,5 bC	21,6 bB	28,9 aA	20,5
CTAB	26,8C a	28,3 aB	32,9 aA	28,5 aB	26,7 bC	20,6
Média	21,6	22,2	26,2	25,1	27,8	

\* Dentro da mesma categoria, letras minúsculas iguais nas colunas e maiúsculas iguais nas linhas não diferem entre si pelo teste SNK ( $\alpha=0,05$ ).



**Figura 4.2.** BoxPlot demonstrando a variação do *Cycle threshold* para o gene 18S rRNA extraído a partir de epicarpo do fruto, folha fotossinteticamente ativa, mesocarpo do fruto, ráquis e sarmento lenhoso de videira (*Vitis labrusca*) ‘Bordo’, a partir do kit RNeasyPlant Mini Kit (A) e do protocolo com detergente CTAB (B).

Tecidos de videira possuem elevada concentração de compostos fenólicos e aparentemente estes estão em maior concentração nos tecidos mais lignificados (Doshi et al., 2006), sendo estes mais problemáticos para extração do conteúdo genético com elevada pureza. Contudo, o protocolo que emprega o uso do CTAB foi desenvolvido para extração do RNA de *Pinus*, tecido que possui elevados índices de compostos fenólicos (Pinelo et al., 2003; Dudonné et al., 2009), gerando resultados satisfatórios de concentração de RNA e pureza, principalmente nas amostras extraídas a partir do sarmento e ráquis.

O kit comercial, por ser desenvolvido e utilizado para ampla variabilidade de espécies e tecidos vegetais (Gehrig et al., 2000), apresentou resultados satisfatórios de concentração e pureza do RNA

extraído, exceto para o tecido do sarmento, que possivelmente, devido a baixa concentração de conteúdo genético e elevada lignificação, apresentou resultados inferiores aos demais tecidos para todos os protocolos empregados.

A baixa concentração e pureza do RNA extraído através do protocolo empregando o uso de Trizol permite descartar o emprego deste protocolo. Estes resultados corroboram os verificados em tecidos de plantas lenhosas, como macieira (Gasic et al., 2004), em que o protocolo empregando este reagente não permitiu a obtenção de material genético com qualidade para ser empregado em estudos de transcriptoma. Estudos com folhas de morangueiro (Christou et al., 2014) resultados de baixa pureza também são relatados para o uso do Trizol, demonstrando a fragilidade deste protocolo de extração de RNA em tecidos de plantas lenhosas, possivelmente devido ao elevado nível de polifenóis.

Dentre os tecidos empregados na extração, observa-se maior concentração e pureza naqueles com menor conteúdo fenólico. Mesmo com elevados níveis de polissacarídeos, como mesocarpo e epicarpo do fruto. Resultados distintos foram verificados em *V. vinifera* (Iandolino et al., 2004) que apresentou menores concentrações e pureza de RNA extraído a partir de tecidos com maior concentração de polissacarídeos. Neste estudo não foi relatado a extração a partir de tecidos como o sarmento, rico em polifenóis. Esta diferença pode ser explicada devido às diferentes espécies e protocolos utilizados para a extração do conteúdo genético.

Em protocolo visando extração de RNA com qualidade, a partir de tecidos de *V. lambruscana*, ricos em polissacarídeos ou polifenóis (Salzman et al., 1999) foram obtidos resultados de concentração e pureza do conteúdo genético semelhantes a este trabalho, contudo, o mesmo não relata a utilização de sarmentos lenhosos para obtenção do material genético. Empregando algumas modificações no protocolo CTAB em materiais de plantas lenhosas, são relatadas elevadas concentrações e pureza do RNA obtido, contudo, somente o tecido celular de videira foi testado com estas modificações (Morante-Carriel et al., 2014). Valores de concentração e pureza elevados também são relatados para extração do RNA a partir das bagas da videira, entre outros frutos ricos em metabólitos, empregando um protocolo alternativo (Gudenschwager et al., 2012). Entretanto, não há relatos do mesmo aplicado a outros tecidos ricos em compostos fenólicos.

Mesmo o protocolo com uso de CTAB produzindo valores de concentração e pureza de RNA semelhantes aos do kit, na reação de RT-qPCR, as amostras extraídas a partir do kit, apresentaram  $C_t$  menor e com maior estabilidade, demonstrando maior integridade e homogeneidade do RNA em comparação aos extraídos pelo método CTAB. A exceção ocorreu para as amostras extraídas do sarmento, aparentemente influenciadas pela menor pureza do RNA obtido. A estabilidade do  $C_t$  nas reações de RT-qPCR é essencial para estudos de sequenciamento de transcritos ou expressão gênica (Han et al., 2012; Fracetto et al.; 2013), demonstrando a superioridade do uso do kit comercial para extrações visando esta utilização.

#### 4. 6. Conclusão

A obtenção de RNA com boa concentração e pureza, extraído a partir de folhas, ráquis, epicarpo e mesocarpo do fruto de videira, é possível empregando o uso do kit de extração comercial (RNeasy Plant Mini Kit) ou do protocolo com método CTAB.

Para extração do RNA a partir de amostras do sarmento lenhoso, ainda são encontradas dificuldades, devido ao maior teor de compostos do metabolismo secundário deste tecido.

O uso do protocolo com Trizol apresentou-se inadequado para extração de RNA a partir de quaisquer tecidos de videira testados neste estudo (sarmeto, folhas, ráquis, epicarpo e mesocarpo do fruto).

O uso do RNA obtido através da extração com kit comercial apresentou maior estabilidade da reação de RT-qPCR para todos os tecidos estudados, assim como menor  $C_t$ , indicando maior integridade e qualidade do RNA obtido por este protocolo.

#### 4. 7. Referências

ASIF, M. H.; DHAWAN, P.; NATH, P. A simple procedure for the isolation of high quality RNA from Ripening Banana Fruit. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 18, p. 109-115, 2000.

BUCHANAN-WOLLASTON, V.; PAGE, T.; HARRISON, E.; BREEZE, E.; LIM, P. O.; NAM, H. G.; LIN, J. F.; WU, S. H.; SWIDZINSKI, J.; ISHIZAKI, K.; LEAVER, C. J. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis. **The Plant**



- Journal**, v. 42, p. 567-585, 2005. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2005.02399.x.
- CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAINEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 11, n. 2, p. 113-116, 1993.
- CHRISTOU, A.; GEORGIADOU, E. C.; FILIPPOU, P.; MANGANARIS, G. A.; FOTOPOULOS, V. Establishment of a rapid, inexpensive protocol for extraction of high quality RNA from small amounts of strawberry plant tissues and other recalcitrant fruit crops. **GENE**, v. 537, p. 169-173, 2014. DOI:10.1016/j.gene.2013.11.066.
- DOSHI, P.; ADSULE, P.; BANERJEE, K. Phenolic composition and antioxidant activity in grapevine parts and berries (*Vitis vinifera* L.) cv. Kishmish Chorny (Sharad Seedless) during maturation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, n. 1, 2006. DOI:10.1111/j.1365-2621.2006.01214.x.
- DUDONNÉ, S.; VITRAC, X.; COUTIÈRE, P.; WOILLEZ, M.; MÉRILLON, J. M. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1768-1774, 2009. DOI:10.1021/jf803011r.
- FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. ExpDes.pt: Experimental Designs package (Portuguese). **R package version 1.1.2**. 2013.
- FRACETTO, G. G. M.; PERES, L. E. P.; MEHDY, M. C.; LAMBAIS, M. R. Tomato ethylene mutants exhibit differences in arbuscular mycorrhiza development and levels of plant defense-related transcripts. **Symbiosis**, v. 60, p. 155-167, 2013. DOI:10.1007/s13199-013-0251-1.
- GAMBINO, G.; GRIBAUDO, I. Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex Reverse Transcription-Polymerase

Chain Reaction with coamplification of a plant RNA as internal control. **Virology**, v. 96, n. 11, p. 1223-1229, 2006.

GAMBINO, G.; PERRONE, I.; GRIBAUDO, I. Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. **Phytochemical Analysis**, v. 19, n. 6, p. 520-525, 2008. DOI: 10.1002/pca.1078.

GASIC, K.; HERNANDEZ, A.; KORBAN, S. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 22, p. 437a-437g, 2004.

GEHRING, H. H.; WINTER, K.; CUSHMAN, J.; BORLAND, A.; TAYBI, T. An improved RNA isolation RNA isolation method for succulent plant species rich in polyphenols and polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 18, p. 369-376, 2000.

GUDENSCHWAGER, O.; GONZÁLEZ-AGÜERO, M.; DEFILIPPI, B. G. A general method for high-quality RNA isolation from metabolite-rich fruits. **South African Journal of Botany**, v. 83, p. 186-192, 2012. doi.org/10.1016/j.sajb.2012.08.004.

HAN, X.; LU, M.; CHEN, Y.; ZHAN, Z.; CUI, Q.; WANG, Y. Selection of reliable reference genes for gene expression studies using Real-Time PCR in tung Tree during seed development. **PlosOne**, v. 7, n. 8, 2012. DOI:10.1371/journal.pone.0043084.

IANDOLINO, A. B.; SILVA, F. G.; LIM, H.; CHOI, H.; WILLIAMS, L. E.; COOK, D. R. High-quality RNA, cDNA and Derived EST libraries from grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 22, p. 269-278, 2004.

LJAVETZKY, D.; CABEZAS, J. A.; IBÁÑEZ, A.; RODRÍGUEZ, V.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J. M. High throughput SNP discovery and genotyping in grapevine (*Vitis vinifera* L.) by combining a re-sequencing approach and SNPlex technology. **BMC Genomics**, v. 8, n. 424, 2007. DOI: 10.1186/1471-2164-8-424.

- MESTRE, P.; CARRERE, S.; GOUZY, J.; PIRON, M. C.; LABROUCHE, D. T.; VINCOURT, P.; DELMOTTE, F.; GODIARD, L. Comparative analysis of expressed CRN RXLR effectors from two *Plamopara* species causing grapevine and sunflower downy mildew. **Plant Pathology**, 2015. DOI: 10.1111/ppa.12469.
- MORANTE-CARRIEL, J.; SELLÈS-MARCHART, S.; MARTÍNEZ-MÁRQUEZ, A.; MARTÍNEZ-ESTESO, M. J.; LUQUE, I.; BRU-MARTÍNEZ, R. RNA isolation from loquat and other recalcitrant woody plants with high quality and yield. **Analytical Biochemistry**, v. 452, p. 46-53, 2014. DOI:10.1016/j.ab.2014.02.010.
- OSMAM, F.; ROWHANI, A. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). **Journal of Virological Methods**, v. 133, p. 130-136, 2006. DOI: 10.1016/j.jviromet.2005.11.005
- OSMAN, F.; LEUTENEGGER, C.; GOLINO, D.; ROWHANI, A. Real-time RT-PCR (TaqMan<sup>®</sup>) assays for the detection of *Grapevine Leafroll associated viruses* 1-5 and 9. **Journal of Virological Methods**, v. 141, p. 22-27, 2007. DOI: 10.1016/j.jviromet.2006.11.035.
- PINELO, M.; RUBILAR, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, M. J. Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus abigdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). **Food Chemistry**, v. 85, p. 267-273, 2004. DOI:10.1016/j.foodchem.2003.06.020.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2015.
- REID, K. E.; OLSSON, N.; SCHLOSSER, J.; PENG, F.; LUND, S. T. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during

berry development. **BMC Plant Biology**, v. 6, n. 27, 2006. DOI: 10.1186/1471-2229-6-27.

SALZMAN, R. A.; FUJITA, T.; ZHU-SALZMAN, K.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 17, p. 11-17, 1999.

VENTURINI, L.; FERRARINI, A.; ZENONI, S.; TORNIELLI, G. B.; FASOLI, M.; DAL SANTO, S.; MINIO, A.; BUSON, G.; TONONI, P.; ZAGO, E. D.; ZAMPERIN, G.; BELLIN, D.; PEZZOTTI, M.; DELLEDONNE, M. De novo transcriptome characterization of *Vitis vinifera* cv. Corvina unveils varietal diversity. **BMC Genomics**, v. 14, n. 41, 2013. DOI: 10.1186/1471-2164-14-41.

## 5. CAPÍTULO II DESENHO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA VIROSES EM VIDEIRA (*Vitis spp.*) E INDEXAGEM SOROLÓGICA E MOLECULAR DE PLANTAS MATRIZES EM VIVEIROS NACIONAIS

### 5. 1. Resumo

Os métodos utilizados para identificação de viroses tem evoluído muito nos últimos anos, passando da indexagem biológica, para testes sorológicos e recentemente, o uso de abordagens moleculares. Com o avanço destas ferramentas, torna-se possível desenvolver tecnologias para a identificação de viroses em tecidos de videira, com maior precisão e agilidade. O desenvolvimento destas tecnologias deve visar a indexagem com baixo custo e elevada sensibilidade. Assim, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de desenvolver marcadores moleculares empregando a química Zen<sup>TM</sup> para a técnica de RT-qPCR e posterior indexagem sorológica e molecular de plantas matrizes em viveiros brasileiros. As sequências codantes no genôma dos vírus GVA, GVB, GFIV, GFkV, GLRaV-1 e GLRaV-3 foram obtidas no NCBI e posteriormente analisadas com a ferramenta *on line* BLAST, para seleção de regiões ausentes de similaridade com genomas vegetais e com elevada similaridade com acessos das mesmas espécies virais. Dentre as sequências obtidas, foi selecionada as regiões com ausência de pontos de mutação após o alinhamento das fitas, para isto utilizando o *software* BioEdit. Os marcadores (*forward* | *probe* | *reverse*) foram construídos com o algoritmo da ferramenta *on line* PrimerQuest (IDT, Coralville, Estados Unidos das Américas) e sintetizados com *reporter* fluorescente (FAM), *quencher* não fluorescente Iowa Black<sup>®</sup> FQ e *quencher* interno ZEN<sup>TM</sup>. Foram construídos três marcadores para cada vírus estudado. Para o teste de amplificação dos marcadores, foi utilizado RNA extraído a partir de três isolados para cada vírus. A reação de RT-qPCR utilizando o mastermix QuantiTec Probe (Qiagen, Hilden, Alemanha) em 45 ciclos de amplificação. Foram coletadas amostras de plantas matrizes em viveiros brasileiros e em um Programa de Melhoramento Genético para a videira da Universidade Federal de Santa Catarina. A indexagem foi realizada com teste sorológico ELISA (Agritest, Valenzano, Itália) e molecular, via RT-qPCR, com os marcadores desenvolvidos neste estudo. Não ocorreu amplificação para os vírus GVA, GVB e GFIV em nenhum dos marcadores desenhados.

Necessitando de novos estudos para o desenvolvimento desta abordagem nestes vírus. O marcador GLRaV-1 01, assim como o marcador GFkV 01 foi suficiente para amplificar os três isolados dos respectivos vírus utilizados neste estudo. Os marcadores GLRaV-3 01 e GLRaV-3 03 amplificaram satisfatoriamente com todos os isolados utilizados. A indexagem das plantas matrizes demonstrou presença de vírus em todos os viveiros coletados, somente não foi encontrado contaminação nas mudas da coleção do Programa de Melhoramento Genético. O GVB, seguido pelo GFkV foram os vírus observados com maior frequência. O GVA foi o único vírus ausente em todas as amostras indexadas. Para os vírus GVA, GVB e GFIV é necessário o desenvolvimento de maiores estudos para validar marcadores moleculares com a química Zen<sup>TM</sup>. O marcador GLRaV-1 01, para o vírus GLRaV-1, GFkV 01 para o vírus GFkV, assim como GLRaV-3 01 ou GLRaV-3 03 para o GLRaV-3 podem ser empregados para a identificação destes vírus em reações de RT-qPCR a partir de amostras de tecidos de videira.

**Palavras-Chave:** Indexagem. Vírus. Sanidade vegetal. Viticultura.

## 5. 2. Abstract

The methods used for viruses identification has evolved significantly in recent years, moving from biological indexing for serological tests and recently, the use of molecular approaches. With the advancement of these tools, it is feasible to develop technologies to virus identification in grapevine tissues, with more accuracy and speed. The technology development should focus on low cost and high sustainability. This way, this work developed with the objective of develop molecular markers utilizing the Zen<sup>TM</sup> chemical to the RT-qPCR technique, and after serological indexing and molecular of the plants from Brazilian nurseries. The gene sequences in the GVA, GVB, GFIV, GFkV, GLRaV-1 and GLRaV-3 obtained from NCBI, and after analyzed using the online tool BLAST, to select the absent regions with similarity in vegetal genome and with high similarity with access to the same virus species. Among the sequences obtained, selected the regions with absence of mutation points after alignment of strands, to this utilize the BioEdit software. The markers (*forward/probe/reverse*) built with PrimerQuest logarithmic tool (IDT, Coralville, USA) and synthesized with fluorescent report (FAM), *quencher* not fluorescent Iowa Black®FQ and intern *quencher* Zen<sup>TM</sup>. Three molecular markers

built to each virus studied. For the amplification markers test, made use of RNA extracted from three isolates for each virus. The RT-qPCR reaction made use of mastermix QuantiTect Probe (Qiagen, Hilden Germany) in 45 amplification cycles. Samples collected from mother plants in Brazilian nurseries, and from the Federal University of Santa Catarina breeding program. The indexing made use of serological test ELISA (AgriTest, Valenzano, Italy) and molecular, via RT-qPCR with markers developed for this study. The amplification of GVA, GVB, and GF1V virus did not occur in any of the markers designed, being necessary new studies to the development of this tool for these viruses. The GLRaV-1 01 and GFkV 01 amplified easily with the respective three isolates. The GLRaV-3 01 and GLRaV-3 03 markers amplified satisfactorily with all the isolates. The mother plants indexing prove presence of virus in all the nurseries collected, only not found seedlings contamination in the plant breeding collection. The GVB, followed by the GFkV virus observed with more frequency. The GVA is the only absence in all the samples indexed. To the virus GVA, GVB, and GF1V it is necessary more studies to develop and validate molecular markers with Zen™ chemical. The GLRaV-1 01 marker for the GLRaV-1, as well as the GFkV 01 marker for the GFkV, and the GLRaV-3 01 ou GLRaV-3 03 virus marker for the GLRaV-3 are ready to use in identification of these viruses in RT-qPCR from grapevine tissue samples.

**Key Words:** Indexing. Virus. Vegetal sanity. Viticulture.

### 5. 3. Introdução

Ataques fitopatogênicos estão entre os principais fatores limitantes para a produção agrícola mundial, dentre estes, destacam-se as viroses, em especial para plantas lenhosas propagadas vegetativamente (Verlann et al., 2013; Malandraki et al., 2015). No caso da videira onde a principal forma de propagação é pela formação de clones e fusão de tecidos somáticos (Pelsy, 2010), a presença de viroses é ainda mais acentuada, estando disseminada nas principais áreas de cultivo, tornando-se um gargalo para a viticultura (Catarino et al., 2015). Atualmente são conhecidos aproximadamente 60 espécie de vírus, nove espécies de viroides e três RNA satélites com potencial de infectar a videira (Basso et al., 2014).

As ferramentas utilizadas para diagnósticos de identificação de viroses têm evoluído nos últimos anos, passando da indexagem biológica, onde é realizado a observação de sintomas em uma planta sensível ao vírus, para testes sorológicos (Reynard et al., 2015) e recentemente métodos baseados na biologia molecular, como hibridização de sondas no cDNA ou cRNA (Barbarossa; Savino, 2006), RT-PCR, RT-qPCR e low-density arrays (Osman et al., 2008 Francesco et al., 2015). Ainda novas abordagens vêm sendo geradas e testadas para permitir a indexagem para inúmeros vírus com rapidez e precisão, como o sequenciamento em plataformas de nova geração, buscando fragmentos análogos aos encontrados no genoma viral. Contudo, está técnica necessita ser validada para uso em larga escala (Rwahnih et al., 2015).

Na atualidade, a técnica de RT-qPCR vem sendo consolidada para a indexagem de amostras vegetais em larga escala, utilizando novas químicas e plataformas para o diagnóstico rápido, sensível e de reduzido risco de contaminação cruzada (Malandraki et al., 2015). O uso da técnica qPCR pode ser empregada com interligantes de DNA ou hibridização com sondas fluorescentes (You et al., 2011; Cao; Shockey, 2012).

O uso de interligantes de DNA foi a primeira técnica a ser empregada para a identificação da amplificação em PCR quantitativo. Consiste de um agente que, quando interligado a uma sequência dupla fita, emite fluorescência, assim, permite a quantificação e comparação das moléculas presentes na reação (Fischer et al., 2015). O principal reagente interligante conhecido é o Sybr. Estudos demonstram que seu uso apresenta acurácia e baixo custo (Ferreira et al., 2006; Zhu et al.,



2015), contudo impede o uso de multiplex e necessita a construção de curva de *melting* posterior a reação de amplificação para validar a especificidade do amplicon através da temperatura de dissociação do fragmento gerado (Varga; James, 2005; Monis et al., 2005). Atualmente, o uso de interligantes resume-se a protocolos já consolidados para este fim, estudos com micro RNA interferente, devido ao reduzido espaço para construção da sonda (Varkonyi-Gasic et al., 2007) ou estudos que visam a diferenciação do tamanho do amplicon (Lee et al., 2006).

A adoção de técnicas de hibridização com sondas permitiu um avanço nas técnicas de qPCR, principalmente pela maior especificidade da amplificação, tornando desnecessário e impossibilitando o uso da curva de *melting* com os amplicons, permitindo a realização de multiplex a partir da marcação de sondas com fluorescências distintas na mesma reação (Osman et al., 2015). As sondas, genericamente, são compostas por um fluoróforo (*reporter*) que emite fluorescência, normalmente alocado na extremidade 5' da sonda. Na extremidade 3' é normalmente alocado um *Quencher*, este, absorve o sinal fluorescente emitido pelo *reporter* até o momento em que ocorre a amplificação e a sonda, por ser um marcador interno é fragmentada, separando o *quencher* do *reporter* na reação, permitindo a emissão do sinal luminoso (Wilson et al., 2011).

As primeiras sondas a serem utilizadas possuíam o *quencher* do tipo TaqMan *dye* TAMRA, ou seja, neste tipo de sonda o *quencher* emite fluorescência que anula a fluorescência do *reporter* (Heid, 1996), no entanto, devido ao *quencher* emitir fluorescência, é necessário sondas com maior comprimento em comparação às demais técnicas, muitas vezes inviabilizando seu emprego em alguns amplicons. Por estes motivos, alguns equipamentos não oferecem suporte para sondas deste tipo, que somente é empregada em situações onde seu uso já está validado e consolidado.

As sondas sintetizadas com *quencher* não fluorescentes (NFQ - na sigla em inglês) representaram um grande avanço no uso de sondas para a técnica de qPCR, pois os fragmentos sintetizados para sonda foram expressivamente reduzidos, assim como o ruído de fluorescência nos ciclos iniciais. Estas modificações trouxeram maior estabilidade para a reação e substituíram o uso do *quencher* fluorescente, atualmente é pouco utilizado (Mackay et al., 2002).

Entre as sondas com *quencher* não fluorescentes, varias químicas são encontradas na literatura, dentre as quais, estudos relatam principalmente o uso de MGB-NFQ (*minor groove binder*) e ZEN<sup>TM</sup> (Ehtisham-ul-Haque, 2015; Chan et al., 2015), apesar da sonda do tipo MGB-NFQ ser mais utilizada e citada na literatura, a química ZEN vem ganhando espaço recentemente. Suas principais vantagens são o menor custo para confecção e menor ruído de fluorescência, devido à utilização de um segundo *quencher*, que localizado no interior da sonda, espaçado de aproximadamente 10 bases nucleicas do *reporter*, possuem maior bloqueio do sinal fluorescente anterior à quebra da sonda (Rahman et al., 2015).

As novas tecnologias desenvolvidas nos últimos anos possibilitaram a incorporação de novas ferramentas para a detecção e diagnose de viroses, entre outros patógenos vegetais. Para a videira, a maior parte dos estudos moleculares para diagnose de presença do material genético viral, baseia-se nas sondas TaqMan TAMRA ou MGB-NFQ (Osman; Rowhani, 2006; Osman et al., 2007; Osman et al., 2013). A inexistência de abordagens que empregam sequências marcadoras com a química ZEN demonstra que há possibilidade de redução de custos e aperfeiçoamento da técnica.

As novas abordagens moleculares motivaram a realização deste estudo, com objetivo de desenhar e validar marcadores e sondas moleculares marcadas com a química ZEN<sup>TM</sup> para a identificação de viroses utilizando a RT-qPCR, assim como realizar a indexagem sorológica e molecular com os marcadores construídos, em plantas matrizes em viveiros brasileiros.

#### 5. 4. Material e Métodos

Para desenho dos marcadores moleculares, as sequências depositadas no *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) (Wheeler et al., 2007) para o controle endógeno, gene 18S rRNA, acesso gb | 13172871 e para os vírus GVA, GVB, GFkV, GFIV, GLRaV1 e GLRaV3, foram coletadas através dos acessos NC\_003604 (Minafra et al., 1994), NC\_003602 (Saldareli et al., 1996), NC\_003347 (Sabanadzovic et al., 2001), NC\_003615 (Margis et al., 1994), AF195822 (Fazeli; Rezaian, 2000) e NC\_004667 (Ling et al., 1998), respectivamente.

As sequências obtidas foram submetidas à análise na ferramenta *on line Basic Local Alignment Search Tool* (Altschul et al., 1990), para

encontrar regiões com ausência de homologia ao genoma vegetal, assim como similaridade com sequências para a mesma espécie. As regiões específicas para as espécies em estudo e suas sequências homólogas foram alinhadas no *software* Bioedit (Hall, 2011).

As regiões com menor presença de mutações foram utilizadas para o desenho dos marcadores (*forward* | *probe* | *reverse*), utilizando o algoritmo do *software on line* PrimerQuest (<http://www.idtdna.com/primerquest/home/index>). Para melhor cobertura da região gênica, foram obtidos três marcadores moleculares para cada vírus, utilizando os parâmetros padrões para a química ZEN<sup>TM</sup> (IDT, Coralville, Estados Unidos das Américas).

Os materiais genéticos para validação dos marcadores moleculares consistiram de sarmentos lenhosos em estágio de dormência, extraído de plantas obtidas de diferentes regiões com diagnóstico positivo para os respectivos vírus analisados, parte destes materiais foram gentilmente cedidos de coleção da EMBRAPA Uva e Vinho (Bento Gonçalves, RS). A extração do material genético foi realizada utilizando o kit comercial (RNeasyPlant Mini Kit) de acordo com as recomendações do fabricante (**Figura 5.1**). Após a extração as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop 1000 em 260 nm, e verificado as relações  $A_{260}/A_{280}$  e  $A_{260}/A_{230}$ , as amostras com qualidade satisfatória foram padronizadas para a concentração de  $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  e mantidas em temperatura de  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

As reações de RT-qPCR foram realizadas utilizando o mastermix QuantiTect Probe (One Step), com 20 ng de RNA total para volume final da reação de 10  $\mu\text{L}$ , utilizando o termociclador StepOne<sup>TM</sup> (Applied Biosystems). A temperatura foi mantida por 30 minutos a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  para a reação da transcriptase reversa (RT), seguido de 15 minutos a  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , para desnaturação da fita de cDNA gerada e 45 ciclos de 15 segundos a  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  para desnaturação das amostras e 1 minuto a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  para anelamento dos marcadores e extensão da fita. A leitura da fluorescência emitida pela quebra da sonda foi mensurada ao final de cada ciclo de extensão.

O levantamento de vírus foi realizado em cinco viveiros nacionais, localizados em Caldas/MG, Videira/SC, Caçador/SC e São Joaquim/SC, além de acessos de um Programa de Melhoramento de videira em Curitiba/SC, totalizando 109 indivíduos amostrados. A amostragem consistiu na coleta de segmentos lenhosos do sarmento em período de dormência.

A indexagem foi realizada via teste sorológico ELISA para os vírus *Grapevine virus A*, *Grapevine virus B*, *Grapevine fleck virus*, *Grapevine fanleaf virus*, *Grapevine leafroll associated virus 1* e *Grapevine leafroll associated virus 3*. Para os vírus *Grapevine fleck virus*, *Grapevine leafroll associated virus 1* e *Grapevine leafroll associated virus 3* foi também empregado o teste molecular via RT-PCR.

O teste ELISA foi realizado com o kit comercial Diagnostici per il Rilevamento di Virus Della Vite (AGRITEST, Valenzano, Itália), através do método direto (DAS) para os vírus GVA, GFIV, GLRaV-1 e GLRaV-3 e do método indireto (DASI) para os vírus GVB e GFkV, conforme recomendações do fabricante.

As amostras consistiram de fragmentos do floema de sarmentos macerados em nitrogênio líquido e imediatamente adicionados ao tampão de extração (polivinilpirrolidone [20 g L<sup>-1</sup>], polietilenoglicol [10 g L<sup>-1</sup>], TRIS-HCl [60,5 g L<sup>-1</sup>], NaCl [8 g L<sup>-1</sup>] e Tween20 1:10 [5 mL L<sup>-1</sup>], pH 8,2), na razão de 1 g para 15 mL. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente em agitação constante por 2 h, sendo posteriormente centrifugadas a 5.000 g por 2 min para sedimentação dos fragmentos sólidos. O sobrenadante foi aliquoteado em microtubos de 2 mL para ser armazenado em - 20 °C até sua utilização.

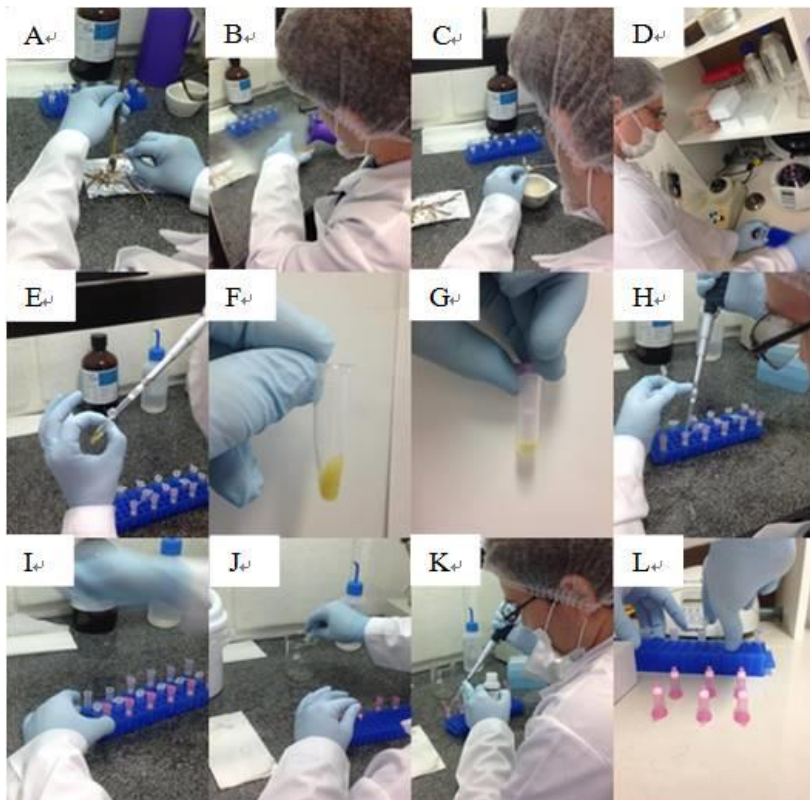
As soluções utilizadas durante os protocolos foram os tampões de sensibilização (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> [1,59 g L<sup>-1</sup>] e NaHCO<sub>3</sub> [2,93 g L<sup>-1</sup>], pH 9,6, mantido em 4 °C), lavagem: PBS-T (NaCl [8 g L<sup>-1</sup>], KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [0,2 g L<sup>-1</sup>], Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O [2,9 g L<sup>-1</sup>], KCl [0,2 g L<sup>-1</sup>] e Tween20 1:10 [5 mL L<sup>-1</sup>], pH 7,3), conjugado (polivinilpirrolidona [20 g L<sup>-1</sup>] e ovoalbumina II [2 g L<sup>-1</sup>], diluído em PBS-T, pH 7,4) e substrato (Dietanolamina [97 mL L<sup>-1</sup>], pH 9,8 mantido em 4 °C, acrescido e p-Nitrofenilfosfato [1 mg mL<sup>-1</sup>] imediatamente anterior a sua utilização).

O protocolo para o método direto (DAS - ELISA) foi realizado com pré-sensibilização para a indexagem do GVA, utilizando a proteína A (provido pelo kit), diluída no tampão de sensibilização e distribuído 200 µL em cada poço da microplaca, que foi mantida em incubação de 120 min a 37 °C. Em seguida foi realizada a lavagem dos poços pré-sensibilizados. Os protocolos de lavagem foram realizados por lavadora de microplaca em protocolo de 3 lavagens de 3 minutos com 200 µL de PBS-T por poço da microplaca.

A pré-sensibilização foi o único diferencial adotado no protocolo DAS-ELISA, especificamente para o GVA, conforme a recomendação

do fabricante do kit. A sensibilização foi realizada para a indexagem de GVA, GFIV, GLRaV-1 e GLRaV-3, utilizando o anticorpo específico (provido pelo kit) diluído no tampão de sensibilização e distribuído 200 µL em cada poço da microplaca, que foi mantida em incubação por 120 min a 37 °C, passando por nova lavagem. Em seguida foi realizada a distribuição das amostras (200 µL em cada poço da microplaca), seguido de nova incubação por 120 min a 37 °C e nova lavagem. O anticorpo específico conjugado (provido pelo kit) foi diluído no tampão conjugado e distribuído 200 µL em cada poço da microplaca, seguido de incubação por 120 min a 37 °C e nova lavagem. O tampão de substrato foi preparado no momento do uso e distribuído 200 µL em cada poço da microplaca, logo as amostras foram incubadas por 120 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz, em seguida foi realizada a leitura das amostras, considerando como positivas aquelas em que pode ser verificada mudança na coloração do substrato.

No protocolo DAS-ELISA, utilizado para indexagem dos vírus GVB e GFkV, a sensibilização foi realizada utilizando o anticorpo específico (provido pelo kit) diluído no tampão de sensibilização e distribuído 200 µL em cada poço da microplaca, seguido de incubação por 120 min a 37 °C e lavagem conforme descrito para o protocolo DAS-ELISA. Em seguida foi realizada a distribuição de 200 µL de amostras em cada poço da microplaca, seguido de nova incubação por 120 min a 37 °C e lavagem. O anticorpo específico (provido pelo kit) foi diluído no tampão conjugado e distribuído 200 µL em cada poço da microplaca, seguido de incubação por 120 min a 37 °C e lavagem. Em seguida foi diluído o anticorpo conjugado (provido pelo kit) no tampão conjugado e distribuído 200 µL em cada poço da microplaca, que foi incubada por 120 min a 37 °C e posteriormente submetida a nova lavagem, sendo então adicionado o tampão de substrato, preparado no momento do uso, utilizando 200 µL em cada poço da microplaca, que foi incubada por 120 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz, em seguida foi realizada a leitura das amostras, considerando como positivas aquelas em que pode ser verificado mudança na coloração do substrato.



**Figura 5.1.** Etapas da extração de RNA utilizando o kit de extração RNeasyPlant Mini Kit, A) Limpeza da amostra e raspagem do tecido floemático de sarmentos lenhosos de videira; B) maceração do tecido floemático em nitrogênio líquido, utilizando almofariz e pistilo; C) amostragem de aproximadamente 100 mg de tecido macerado para ser adicionado ao tampão de extração; D) amostras em processo de extração do RNA sendo adicionadas à centrifuga para separação dos detritos; E) pipetagem da fase líquida da amostra, para purificação do RNA; F) detritos da amostra separados no fundo do microtubo pelo processo de centrifugação; G) amostra de RNA ao fundo do microtubo, após passar pela primeira etapa de purificação; H) pipetagem da amostra no etanol para adsorção à segunda membrana de purificação; I) homogeneização das amostras e transferência para a segunda membrana de purificação; J e K) Processo de purificação do RNA adsorvido à segunda membrana; L) desligamento da adsorção do RNA à segunda membrana e eluição em água.

As reações foram realizadas com controle positivo e negativo para cada vírus (provido pelo kit), sendo descartados os resultados de placas em que não foi verificado diagnóstico correto para estes. As amostras foram realizadas em triplicatas, sendo considerado como positivo ou negativo somente os testes em que as replicatas apresentaram o mesmo diagnóstico. Em caso de discordância entre os resultados, foi realizado novo teste em triplicata e assumido como verdadeiro o resultado de ao menos duas das replicatas.

Para a indexagem molecular, o RNA foi extraído do tecido floemático de cada indivíduo isoladamente, para isto, foi descartada a periderme do sarmento e com auxílio de bisturi com lâminas estéreis foi retirado amostras do floema que foram imediatamente imersas em nitrogênio líquido no interior de um almofariz e maceradas com auxílio de um pistilo, foram amostrados aproximadamente 100 mg do macerado, para isolamento do RNA total utilizando o kit comercial RNeasyPlant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha).

A reação de RT-qPCR foi realizada utilizando o mastermix QuantiTect Probe (Qiagen, Hilden, Alemanha), com 20 ng de RNA total para volume final de 10 µL, em termociclador StepOne™ (Applied Biosystems, Singapura, Singapura), a termociclagem foi configurada para 30 minutos a 50 °C, seguido de 15 minutos a 95 °C e 45 ciclos de 15 segundos a 94 °C e 1 minuto a 60 °C. A leitura do sinal fluorescente foi realizada ao final de cada ciclo de extensão. As reações para cada vírus foram realizadas separadamente com os marcadores GFkV 01, GLRaV-1 01 e GLRaV-3 03 e sonda marcada com a química Zen™.

## 5. 5. Resultados e Discussão

Através dos acessos estudados foi possível construir marcadores para a identificação molecular em três *Open Read Frames* (ORF's) para cada vírus estudado (**Tabela 5.1**). Estas sequências foram isentas de pontos de mutação nas análises *in silico* empregando sequências homologas disponíveis no NCBI.

**Tabela 5.1.** Marcadores moleculares (*forward* | *probe* | *reverse*) desenvolvidos para RT-qPCR com quencher não fluorescente Iowa Black<sup>®</sup> FQ e quencher interno ZEN<sup>™</sup> para diagnóstico de vírus fitopatogênicos em tecidos de videira

Marcador	Sequência (5' - 3')	TA (°C)	ORF's
GFkV 01 f	CCTCGTGTAAAGCATCCATCTC	62	
p	<i>FAM</i> /TTCCTGTGG/ <i>ZEN</i> /TATGACA TCACGGGC/ <i>FQ</i>	68	GFkVgp 2
r	GGACAGGGAGGTGTAGGA	62	
GFkV 02 f	CTTCCTACGGCCACCAATC	62	
p	<i>FAM</i> /TGAAACCCA/ <i>ZEN</i> /TCTCCTC CATGAGCA/ <i>FQ</i>	67	GFkVgp 1
r	TCATGAACATGACCGTGGAC	62	
GFkV 03 f	TTTCCGAGTGGTGCCAAA	62	
p	<i>FAM</i> /CGTGTAGTC/ <i>ZEN</i> /ATTGGCG AGGTGGAC/ <i>FQ</i>	68	GFkVgp 1
r	TTCACCGTGCTGCGATT	62	
GFIV 01 f	TTTGAGTACGATCGCCGATATG	62	
p	<i>FAM</i> /CCTGTCCGGC/ <i>ZEN</i> /AATAGGC AGAGGAAA/ <i>FQ</i>	68	GFLVs1 gp1
r	AGATAGAGAGGCGTCCACAT	62	
GFIV 02 f	GCCATGTACTCGGAAACAGAT	62	
p	<i>FAM</i> /AGTGAAGCG/ <i>ZEN</i> /TGCGTG AAATGTTGC/ <i>FQ</i>	68	GFLVs1 gp1
r	CTGGTTGCTACTCCTACACAAC	62	
GFIV 03 f	GTGCCAAATCCGCATTGATAATA	62	
p	<i>FAM</i> /AGAAAGAAG/ <i>ZEN</i> /AGCTGG CGGGTTCTG/ <i>FQ</i>	68	GFLVs1 gp1
r	CACCACTACCTGCTTACTCTTC	62	
GVA 01 f	AGGGTAGAGATAAGGGCGATAA	62	
p	<i>FAM</i> /CCAACCAAC/ <i>ZEN</i> /TGACGAC GCTTCTGA/ <i>FQ</i>	68	GVAgp4
r	GATGTACCCGAAGAGAGTGTTT	62	
GVA 02 f	CAAGAAGGTTCTCTGGGTACAA	62	
p	<i>FAM</i> /ATCTTGTGG/ <i>ZEN</i> /CTCGAAG GATGAGGC/ <i>FQ</i>	68	GVAgp3
r	GTTGAGAGTTTCGAGGTCTCTG	62	
GVA 03 f	GGCGCATGAATGTGTGTAAG	62	
p	<i>FAM</i> /ACGGTTCGT/ <i>ZEN</i> /GAAAGA GGGAAGAGT/ <i>FQ</i>	67	GVAgp5
r	CAGGAGTCTCGCCTGTAAAG	62	
GVB 01 f	CCTTGGGAGACATGGAAAGAA	62	GVBgp5

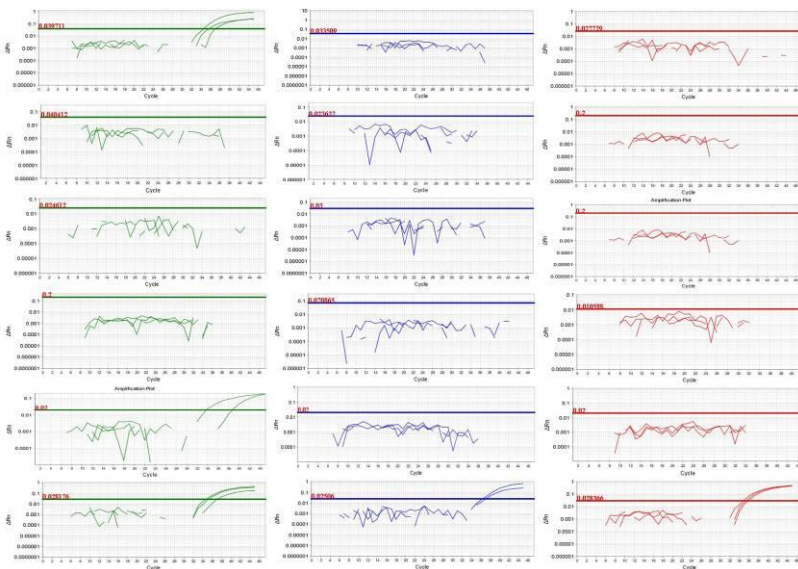


	p		<i>FAM</i> /AGCCTGAGT/ <i>ZEN</i> /ACCAATC GTTGTTCCG/ <i>FQ</i>	68	
	r		CTTGAACCGCGTTGAAATC	62	
GVB 02	f		ATCCCGGATGGCAAAGATAAG	62	
	p		<i>FAM</i> /CAACATTTTC/ <i>ZEN</i> /GGAAGCTC CTGTGCGC/ <i>FQ</i>	68	GVBgp3
	r		CGTTAACGCAATGTACCCAAAG	62	
GVB 03	f		TGCTCTCAGGATTTCCATCATC	62	
	p		<i>FAM</i> /TCAAGAAAG/ <i>ZEN</i> /GTGCCTA CCAAGCCT/ <i>FQ</i>	68	GVBgp3
	r		CCTCGCATTGCACCAAATAAG	62	
GLRaV-1	01	f	AGGATATGGAGGTTTCGGTAGTA	62	
	p		<i>FAM</i> /TCTGTGGAA/ <i>ZEN</i> /ATTGCAG TTGCCACC/ <i>FQ</i>	68	GI:66534 95
	r		TACCCATCACTTCAGCACATAAA	62	
GLRaV-1	02	f	GTTTCAGCTTACTGTGGTCTCT	62	
	p		<i>FAM</i> /TGGGAGTGA/ <i>ZEN</i> /AAGAGG TGATAGCGT/ <i>FQ</i>	67	GI:66534 90
	r		TTGGAGTCACGAATGTCTTCTC	62	
GLRaV-1	03	f	CGGTATGTGCGACTGATGACTTT	62	
	p		<i>FAM</i> /TTAATCTCT/ <i>ZEN</i> /CACACAC CTCGCGC/ <i>FQ</i>	68	GI:66534 91
	r		CACCTTGAGACTTGTCGACTT	62	
GLRaV-3	01	f	TCGAGAAAGATCCAGACAAGTTC	62	
	p		<i>FAM</i> /ATAGCTTTG/ <i>ZEN</i> /GACTTGG CGGGAGTT/ <i>FQ</i>	68	GLRaV3 gp06
	r		GATACTTTCCCTGGCTCGTTAATA	62	
GLRaV-3	02	f	ACCCGGTAAGGCAGTATCTA	62	
	p		<i>FAM</i> /CACGGCGAC/ <i>ZEN</i> /CCTGAAT GGTAAACT/ <i>FQ</i>	68	GLRaV3 gp06
	r		TGCTGTGCCATAACCTTCTC	62	
GLRaV-3	03	f	ATTGGAAGACGCTGAGTTATGT	62	
	p		<i>FAM</i> /ACGTTAGCG/ <i>ZEN</i> /TATGACA CGGCTGAT/ <i>FQ</i>	68	GLRaV3 gp05
	r		TCTGCGGTGTTGATCGTATTT	62	

\* ORF (na sigla em inglês *Open Read Frames*), regiões codantes no genoma viral, a fração do genoma expresso após a limpeza dos UTRs (*Untranslated region*).

Entre os marcadores testados, não foi obtido resultados satisfatórios para GFIV, GVA e GVB (**Figura 5.2**), para os quais, se faz necessário testes com outras ORF's ou conjunto de marcadores e sondas, evitando mutações pontuais que impedem sua ligação. Esta abordagem já é empregada com sucesso em outras técnicas (Osman et al., 2008; Osman et al., 2015; Khan et al., 2015), sendo uma possível solução para diagnósticos destes vírus.

O marcador GLRaV-3 02 não amplificou para um isolado de GLRaV-3, contudo, os marcadores GLRaV-3 01 e GLRaV-3 03, amplificaram com sucesso para todos os isolados testados deste vírus. Para o GFkV, somente o marcador GFkV 01 amplificou satisfatoriamente, este apresentou boa amplificação para os três isolados testados do vírus. O mesmo foi verificado para o GLRaV-1 01 que amplificou satisfatoriamente para os três isolados testados do vírus GLRaV-1.



**Figura 5.2.** Gráficos de amplificação e marcador do “threshold” (barra horizontal) dos marcadores moleculares em reação de RT-qPCR para os vírus GFkV, GFIV, GVA, GVB, GLRaV-1 e GLRaV-3, respectivamente de cima para baixo, para os marcadores 01, 02 e 03 respectivamente da esquerda para a direita.

Este é o primeiro estudo que visa o desenvolvimento de marcadores moleculares para RT-qPCR utilizando a química Zen<sup>TM</sup> a ser desenvolvido para a identificação de viroses em videira. Estudos já consolidados para indexagem molecular são relatados na literatura empregando a técnica de RT-PCR (Gambino; Gribaudo, 2006; Björkman et al., 2015), contudo esta técnica depende de maior carga viral para a identificação dos vírus, com possíveis presenças de resultados falsos negativos devido a carga viral insuficiente para a detecção, sendo atualmente mais usual a utilização de técnicas sensíveis, como o RT-qPCR para identificação de viroses em videira (Rizzo et al., 2015).

Nos estudos para desenvolvimento de marcadores utilizados atualmente, relatam sucesso na identificação de material genético viral via RT-qPCR para muitas espécies de vírus capazes de infestar tecidos de videira, utilizando a química TAMRA, ou MGB-NFQ. Contudo, em muitas espécies é necessário o emprego de mais de uma sequência para marcadores ou sonda, devido a mutabilidade das regiões do genoma destes vírus (Osman; Rowhani, 2006; Osman et al., 2013). Estes relatos corroboram a necessidade de testes com outras ORF's para os vírus GVA, GVB e GFIV, utilizando marcadores para a química Zen<sup>TM</sup>, além da síntese de novos oligonucleotídeos para utilização em conjunto com o marcador GLRaV-1 01.

Na indexagem das plantas matrizes, presentes em viveiros nacionais, observou-se que para os vírus GFkV e GLRaV-3, que foram indexados através do teste sorológico e molecular, que os resultados positivos foram igualmente presentes para os mesmos indivíduos, não sendo verificado a presença de diagnósticos discrepantes em nenhum dos testes para estes vírus. Contudo, para o vírus GLRaV-1, foi possível identificar a presença de um indivíduo infestado na indexagem molecular, ausente na indexagem sorológica, resultados semelhantes são reportados na literatura, e deve-se possivelmente ao título viral no tecido hospedeiro estar abaixo da sensibilidade do teste ELISA (Kogovsek et al., 2008).

Foram encontradas plantas com presença de vírus em todos os viveiros analisados, com exceção dos acessos do Programa de Melhoramento Genético (UFSC, Curitibanos/SC). Ao todo foram encontrados 19 indivíduos (17,43%) com presença de algum vírus, a virose com maior frequência entre os indivíduos foi o GVB, presente em 11,01% das amostras indexadas, seguido pelo GFkV (4,59%). Os

vírus GFIV e GLRaV-1 foram verificados em somente uma planta dentre as avaliadas (0,92%).

Dentre os vírus estudados, somente não foram encontrados resultados positivos para o GVA (**Tabela 5.2**). Estes resultados são inferiores aos encontrados para vinhedos comerciais (Catarino et al., 2015), contudo, a menor incidência de viroses encontrada para as amostras deste estudo, deve-se a origem do material vegetativo empregados neste estudo serem provenientes de material base de plantas matrizes coletados em viveiros, onde o controle fitossanitário deve ser maior.

**Tabela 5.2.** Amostras de videira com presença dos vírus analisados via teste sorológico (ELISA) e molecular (RT-qPCR) em plantas matrizes de viveiros brasileiros, 2016, Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, UFSC, Florianópolis, SC

Viveiro	Variedade	GVA <sup>1</sup>	GVB <sup>1</sup>	GFkV <sup>2</sup>	GFIV <sup>1</sup>	GLRaV 1 <sup>2</sup>	GLRaV 3 <sup>2</sup>
A	Vermentino	-	-	+	-	-	+
A	Verdicchio	-	-	+	-	-	-
A	Rebo	-	+	-	-	-	-
A	Garganega	-	-	+	-	-	-
B	vr 043-43	-	+	-	-	+	-
B	Niagara	-	+	-	-	-	-
B	Rosada	-	-	+	-	-	-
C	Bordô	-	-	-	+	-	-
D	BRS	-	-	-	-	-	+
D	Margot	-	-	-	-	-	-
D	Concord cl. 30	-	+	-	-	-	-
E	Concord cl. 30	-	+	-	-	-	-
E	Syrah cl. 174	-	+	-	-	-	-
E	IAC 572	-	-	+	-	-	-
E	Niágara	-	+	-	-	-	-
E	Rosada	-	-	-	-	-	-
E	Harmony	-	+	-	-	-	-
E	Muscat P. Grain	-	+	-	-	-	-

E	IAC 313	-	+	-	-	-	-
E	Malbec cl. 596	-	+	-	-	-	-
E	Pinot noir cl. 870	-	+	-	-	-	-
Total		0	12	5	1	1	2
<i>f</i> (%)		0,00	11,01	4,59	0,92	0,92	1,83

<sup>1</sup> Vírus indexados somente com o teste sorológico (ELISA); <sup>2</sup> Vírus indexados através de testes sorológicos e moleculares; <sup>3</sup> Amostra positiva para o teste molecular e negativa para o teste sorológico.

## 5. 6. Conclusão

Para os vírus GVA, GVB e GFIV é necessário o desenvolvimento de maiores estudos para validar marcadores moleculares com a química Zen<sup>TM</sup>.

Os marcadores GLRaV-3 01 e GLRaV-3 03 podem ser empregados para a indexagem do vírus GLRaV-3.

Na indexagem para o vírus GFkV e GLRaV-1, recomenda-se o uso dos marcador GFkV 01 e GLRaV-1 01 respectivamente, sendo utilizado com sucesso neste estudo.

Para os vírus em que foi realizada indexagem sorológica e molecular, foi observado resultados similares, exceto para o GLRaV-1, em que foi identificado uma amostra positiva via RT-qPCR, com resultado falso negativo através do teste ELISA.

Todos os viveiros apresentam ao menos uma das espécies de vírus estudadas, sendo *Grapevine virus B* e *Grapevine fleck virus* os vírus encontrados com maior frequência em plantas matrizes nos viveiros brasileiros.

## 5. 7. Referências

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, 215, p. 403-410, 1990.

BARBAROSSA, L.; SAVINO, V. Sensitive and specific digoxigenin-labelled RNA Probes for routine detection of *Citrus tristeza virus* by Dot-blot hybridization. **Journal of Phytopathology**, v. 154, n. 6, p. 329-335, 2006. DOI:10.1111/j.1439-0434.2006.01102.x.

- 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.
- BJÖRKMAN, J; SVEC, D.; LOTT, E.; KUBISTA, M.; SJÖBACK, R. Differential amplicons ( $\Delta$ Amp)-a new molecular method to assess RNA integrity. **Biomolecular Detection and Quantification**, 2015. DOI:10.1016/j.bdq.2015.09.002.
- CAO, H.; SHOCKEY, J. M. Comparison of TaqMan and SYBR Green qPCR methods for quantitative gene expression in tung tree tissues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 12296-12303, 2012. DOI:10.1021/jf304690.
- 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, n. 3, p. 379-385, 2015. DOI:10.1590/0103-8478cr20140587.
- CHAN, L. S. X.; HENG, B.; SYN, C. K. C. Age prediction using the novel dual sjTREC probe assay. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 5, p. E641-e643, 2015. DOI:10.1016/j.fsigss.2015.09.245.
- EHTISHAM-UL-HAQUE, S.; RAHMAN, S. U.; KHAN, M. I.; YOUNUS, M.; AWAIS, M. M.; NASIR, A. A simplified duplex real-time PCR incorporating TaqMan minor groove binder (MGB) probes and an exogenous internal positive control for the simultaneous detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* cultures. **Veterinari Medicina**, v. 60, n. 5, p. 268-273, 2015. DOI:10.17221/8179-VETMED.
- 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.

- FERREIRA, I. D.; DO ROSÁRIO, V. E.; CRAVO, P. V. L. Real-time quantitative PCR with SYBR Green I detection for estimating copy numbers of nine drug resistance candidate genes in *Plasmodium falciparum*. **Malaria Journal**, v. 5, n. 1, 2006. DOI:10.1186/1475-2875-5-1.
- FISCHER, B. M.; NEUMANN, D.; PIBERGER, A. L.; RISNES, S. F.; KÖBERLE, B.; HARTWIG, A. Use of high-throughput RT-pPCR to assess modulations of gene expression profiles related to genomic stability and interactions by cadmium. **Archives Toxicology**, 2015. DOI:10.1007/s00204-015-1621-7.
- FRANCESCO, A.; COSTA, N.; PLATA, M. I.; GARCÍA, M. L. Improved detection of *Citrus psorosis virus* and coat protein-derived transgenes in Citrus plants: Comparison between RT-qPCR and TAS-ELISA. **Journal of Phytopathology**, v. 163, p. 915-925, 2015. DOI: 10.1111/jph.12392.
- GAMBINO, G.; GRIBAUDO, I. Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification of a plant RNA as internal control. **Phytopathology**, v. 96, n. 11, p. 1223-1229, 2006.
- HALL, T. BioEdit: An important software for molecular biology. **GERF Bulletin of Bioscience**, v. 2, n. 1, p. 60-61, 2011.
- HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real Time quantitative PCR. **Genome Methods**, v. 6, p. 986-994, 1996. DOI:10.1101/gr.6.10.986.
- KHAN, S.; MACKAY, J.; LIEFTING, L.; WARD, L. Development of a duplex one-step RT-qPCR assay for the simultaneous detection of apple scar skin viroid and plant RNA internal control. **Journal of Virological Methods**, v. 221, p. 100-105, 2015. DOI:10.1016/j.jviromet.2015.04.032
- KOGOVSEK, P.; GOW, L.; POMPE-NOVAK, M.; GRUDEN, K.; FOSTER, G. D.; BOONHAM, N.; RAVNIKAR, M. Single-step RT real-time PCR for sensitive detection and discrimination of

- Potato virus Y isolates. **Journal of Virological Methods**, v. 149, p. 1-11, 2008. DOI:10.1016/j.jviromet.2008.01.025.
- LEE, C.; KIM, J.; SHIN, S. G.; HWANG, S. Absolute and relative qPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 123, p. 273-280, 2006. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.11.014.
- LING, K. S.; ZHU, H. I.; DRONG, R. F.; SLIGHTOM, J. L.; McFERSON, J. R.; GONSALVES, D. Nucleotide sequence of the 3'-terminal two-thirds of the grapevine leafroll-associated virus-3 genome reveals a typical monopartite closterovirus. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 1299-1307, 1998.
- MACKCAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. **Survey and summary Real-Time PCR in virology**, v. 30, n. 6, p. 1292-1305, 2002.
- MALANDRAKI, I.; VARVERI, C.; OLMOS, A. One-Step multiplex quantitative RT-PCR for the simultaneous detection of viroids and phytoplasmas of pome fruit trees. **Journal of Virological Methods**, v. 2013, p. 12-17, 2015. DOI:10.1016/j.jviromet.2014.11.010.
- MARGIS, R.; VIRY, M.; PINCK, M.; BARDONNET, N.; PINCK, L. Differential proteolytic activities of precursor and mature forms of the 24K proteinase of *Grapevine fanleaf* nepovirus. **Virology**, v. 200, p. 79-86, 1994.
- MINAFRA, A.; SALDARELLI, P.; GRIECO, F.; MARTELLI, G. P. Nucleotide sequence of the 3' terminal region of the RNA of two filamentous grapevine viruses. **Archives of Virology**, v. 137, p. 249-261, 1994.
- MONIS, P. T.; GIGLIO, S.; SAINT, C. P. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplication and DNA melting curve analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 340, p. 24-34, 2005. DOI:10.1016/j.ab.2005.01.046.



- 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 PCR (TaqMan). **Journal of Virological Methods**, v. 133, p. 130-136, 2006. DOI:10.1016/j.jviromet.2005.11.005.
- OSMAN, F.; LEUTENEGGER, C.; GOLINO, D.; ROWHANI, A. Real-time RT-PCR (TaqMan<sup>®</sup>) assays for the detection of Grapevine Leafroll associated viruses 1–5 and 9. **Journal of Virological Methods**, v. 141, p. 22-29, 2007. DOI:10.1016/j.jviromet.2006.11.035.
- OSMAN, F.; LEUTENEGGER, C.; GOLINO, D.; ROWHANI, A. Comparison of low-density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR in detection of grapevine viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 149, p. 292-299, 2008. doi:10.1016/j.jviromet.2008.01.012.
- OSMAN, F.; HODZIC, E.; OMANSKA-KLUSEK, A.; OLINEKA, T.; ROWHANI, A. Development and validation of a multiplex quantitative PCR assay for the rapid detection of *Grapevine virus A, B* and *D*. **Journal of Virological Methods**, v. 194, p. 138-145, 2013. DOI:10.1016/j.jviromet.2013.07.046.
- OSMAN, F.; HODZIC, E.; KWON, S-J.; WANG, J.; VIDALAKIS, G. Development and validation of a multiplex reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) assay for the rapid detection of *Citrus tristeza virus*, *Citrus psorosis virus*, and *Citrus leaf blotch virus*. **Journal of Virological Methods**, v. 220, p. 64-75, 2015. DOI:10.1016/j.jviromet.2015.04.013.
- PELSY, F. Molecular and cellular mechanisms of diversity within grapevine varieties. **Heredity**, v. 104, p. 331-340, 2010.
- RAHMAN, M. M.; HAMID, S. B. A.; BASIRUN, W. J.; BHASSU, S.; RASHID, N. R. A.; MUSTAFA, S.; DESA, M. N. M.; ALI, M. A. TaqMan probe real time polymerase chain reaction assay for the quantification of canine DNA in chicken nugget. **Food Additives & Contaminants**, 2015. DOI:10.1080/19440049.2015.1104558.

- REYNARD, J-S.; SCHNEEBERGER, P. H. H.; FREY, J. E.; SCHAERER, S. Biological, serological, and molecular characterization of a highly divergent strain of *Grapevine leafroll-associated virus 4* causing Grapevine Leafroll Disease. **Phytopathology**, v. 105, n. 9, p. 1262-1269, 2015. DOI:org/10.1094/PHYTO-12-14-0386-R
- RIZZO, D.; MATERAZZI, A.; STEFANI, L.; FARINA, P.; VANARELLI, S.; PANATTONI, A.; LUVISI, A. Distribution of regulated viruses in cv. Sangiovese vineyards in tuscany. **Journal of Plant Pathology**, v. 97, n. 2, p. 131-135, 2015.
- RWAHNIH, M. A.; 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**, v. 105, n. 6, p. 758-763, 2015, doi:10.1094/PHYTO-06-14-0165-R.
- 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.
- SALDARELLI, P.; MINAFRA, A.; MARTELLI, G. P. The nucleotide sequence and genomic organization of grapevine virus B. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 2645-2652, 1996.
- YOU, Y.; TATAUROV, V.; OWCZARZY, R. Measuring thermodynamic details of DNA hybridization using Fluorescence. **Biopolymers**, v. 95, n. 7, 472-486, 2011. DOI 10.1002/bip.21615.
- VARGA, A.; JAMES, D. Detection and differentiation of Plum pox virus using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: a rapid method for strain typing. **Journal of Virological Methods**, v. 123, p. 213-220, 2005. DOI:10.1016/j.jviromet.2004.10.005.
- VARKONYI-GASIC, E.; WU, R.; WOOD, M.; WALTON, E. F.; HELLENS, R. P. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for

detection and quantification of microRNAs. **Plant Methods**, v. 3, n. 12, 2007. doi:10.1186/1746-4811-3-12.

VERLAAN, M. G.; HUTTON, S. F.; IBRAHEM, R. M.; KORMELINK, R.; VISSER, R. G. F.; SCOTT, J. W.; EDWARDS, J. D.; BAI, Y. The tomato yellow leaf curl virus resistance genes Ty-1 and Ty-3 are allelic and code for DFDGD-Class RNA - Dependent RNA polymerases. **PlosGenetics**, v. 9, n. 3, 2013. DOI:10.1371/journal.pgen.1003399.

WHEELER, D. L.; BARRET, T.; BENSON, D. A.; BRYANT, S. H.; CANESE, K.; CHETVERNIN, V.; CHURCH, D. M.; DICUCCIO, M.; EDGAR, R.; FEDERHEN, S.; GEER, L. Y.; KAPUSTIN, Y.; KHOVAYKO, O.; LANDSMAN, D.; LIPMAN, D. J.; MADDEN, T. L.; MAGLOTT, D. R.; OSTELL, J.; VILLER, V.; PRUITT, K. D.; SCHULER, G. D.; SEQUEIRA, E.; SHERRY, S. T.; SIROTKIN, K.; SOUVOROV, A.; STARCHENKO, G.; TATUSOV, R. L.; TATUSOVA, T. A.; WAGNER, L.; YASCHENKO, E. Database resources of the national center for biotechnology information. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. D5-D12, 2007. DOI:10.1093/nar/gkl1031.

WILSON, P. M.; LABONTE, M. J.; RUSSEL, J.; LOUISE, S.; GHOBRIAL, A. A.; LADNER, R. D. A novel fluorescence-based assay for the rapid detection and quantification of cellular deoxyribonucleoside triphosphates. **Nucleic Acids Research**, 2011. DOI:10.1093/nar/gkr350.

ZHU, H.; SUN, Q.; DU, Y.; GAO, Z.; ZHAI, H. Detection of grape phytophloxa on grapevine roots with diagnostic polymerase chain reaction methods targeted to the internal transcribed space region 2 nuclear gene. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 21, p. 143-146, 2015. DOI: 10.1111/ajgw.12111.



## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A extração do material genético das amostras, preservando o RNA viral é de substancial importância para a indexagem futura. A obtenção de RNA com boa concentração e pureza, a partir de tecidos de videira é possível empregando o uso do kit de extração comercial (RNeasy Plant Mini Kit) e o protocolo com método CTAB. Para resultados satisfatórios obtidos a partir de amostras do sarmento ainda é necessário testar outros protocolos para obtenção de maior concentração e pureza do conteúdo genético.

Os marcadores GFkV 01, GLRaV-1 01 e GLRaV3-03 podem ser empregados para indexagem de videira para GFkV, GLRaV-1 e GLRaV3, respectivamente, adicionalmente, o marcador GLRaV-3 01 pode substituir o GLRaV-3 03, contudo este apresenta menor estabilidade de amplificação, devendo ser evitado em estudos quantitativos. A indexagem dos vírus GVA, GVB e GFIV através de RT-qPCR não foi possível de ser realizada neste estudo, necessitando de novas abordagens que permitam o desenho e validação de marcadores em regiões mais estáveis do genoma.

A técnica utilizada neste estudo para indexagem de plantas de videira, através da reação de RT-qPCR pode ser empregada em estudos posteriores, não somente para identificação de contaminação por vírus, como também para compreensão do comportamento da carga viral nos tecidos hospedeiros e as respostas moleculares das plantas.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, foi também demonstrado que há presença de vírus fitopatogênicos em todos os viveiros de mudas amostrados. Os vírus com maior incidência encontrados neste estudo foram o GVB e o GFkV. Estes dados, coletados a partir de plantas matrizes, apontam para um gargalo existente na cadeia nacional de produção de mudas de videira, presença de viroses em matrizes. Elucidando que, torna-se necessário melhor padrão de seleção sanitária nas matrizes utilizadas, a fim de evitar a transmissão destes vírus para o campo de cultivo

Com o conhecimento científico gerado neste estudo, é possível realizar novas pesquisas buscando entender as interações moleculares vírus-planta, assim como adotar novas abordagens para a indexagem de matrizes em viveiro de mudas de videira. Contudo novos estudos devem ser realizados para aprimorar e consolidar tais técnicas.



## 7. REFERÊNCIAS

- ALENCAR, N. E.; FIGUEIRA, A. R.; ALMEIDA, J. E. M.; LUCAS, M. A.; SANTOS, L. B.; NASCIMENTO, I. R. Identificação biológica e molecular de vírus detectados em espécies cucurbitáceas provenientes do estado do Tocantins. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 1, p. 32-37, 2012.
- ANONIMO, Pathogen-tested material of grapevine varieties and rootstocks. **EPPO Bulletin**, v. 38, p. 422-429, 2008.
- 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**, Santa Maria, v. 40, n. 11, p. 2249-2255, 2010, a.
- BESTER, R.; PEPLER, P. T.; BURGER, J. T.; MAREE, H. J. Relative quantitation goes viral: An RT-qPCR assay for a grapevine virus. **Journal of Virological Methods**, v. 210, p. 67-75, 2014. doi:10.1016/j.jviromet.2014.09.022.
- BORGES, A. F.; FONSECA, C.; FERREIRA, R. B.; LOURENÇO, A. M.; MONTEIRO, S. Reference gene validation for quantitative RT-PCR during biotic and abiotic stresses in *Vitis vinifera*. **Plos One**, v. 9, n. 10, 2014. DOI:doi:10.1371/journal.pone.0111399.
- BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GRASON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGET, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFI, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITWER, C. T. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.
- COMISSÃO DIRETIVA. Modifica gli allegati della direttiva 68/193/CEE del Consiglio relativa alla commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite. **Gazzetta Ufficiale Dell'Unione Europea**, L. 164/37 de 24 de junho de 2005.

- DÓRIA, K. M. A. B. V. S.; NOZAKI, D. N.; PAVAN, M. A.; YUKI, V. A.; SAKATE, R. K. Identificação e caracterização de um isolado de *Hydrangea ringspot virus* em hortênsia no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, n. 2, p. 125-128, 2011.
- FAJARDO, T. M. V.; KUHN, G. B.; EIRAS, M.; NICKEL, O. Detecção de *Closterovirus* em videira e caracterização parcial de um isolado do *Grapevine leafroll-associated virus 3*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 58-64, 2002.
- FAJARDO, T. M. V.; 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, n. 5, p. 521-527, 2003.
- FAJARDO; T. V. M.; EIRAS, M. Detecção e caracterização molecular dos genes da proteína capsidial de ilarvírus e ampelovírus que infectam fruteiras temperadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 1, 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 leafroll-associated virus -5 and -6 infecting grapevines in Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 12, p. 2127-2130, 2012.
- FAO STAT, Food and Agriculture Organization of the United Nation: Statistic Division  
<[http://faostat3.fao.org/browse/rankings/commodities\\_by\\_regions/](http://faostat3.fao.org/browse/rankings/commodities_by_regions/)> Acesso em 07 de janeiro de 2016.
- FOISSAC, X.; SVANELLA-DUMAS, L.; DULUQ, M. J.; CANDRESSE, T.; GENIT, P. Polyvalent detection of fruit tree Tricho, Capillo and Fovea viruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PDO RT-PCR). **Acta Horticulturae**, v. 550, p. 37-44, 2001.



- GAMBINO, G.; GRIBAUDO, I. Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification of a plant RNA as internal control. **Phytopathology**, v. 96, n. 11, p. 1223-1229, 2006.
- GAMBINO, G.; CUOZZO, D.; FASOLI, M.; PAGLIARINI, C.; VITALI, M.; BOCCACCIP.; PEZZOTTI, M.; MANNINI, F. Co-evolution between *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* and *Vitis vinifera* L. leads to decreased defence responses and increased transcription of genes related to photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 16, p. 5919-5933, 2012. doi:10.1093/jxb/ers244.
- GIAMPETRUZZI, A.; ROUMI, V.; ROBERTO, R.; MALOSSINI, U.; YOSHIKAWA, N.; NOTTE, P.; TERLIZZI, F.; CREDI, R.; SALDARELI, P. A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in Cv *Pinot gris*. **Virus Research**. V. 163, p. 262-268, 2012.
- GUTHA, L. R.; CASASSA, L. F.; HARBERTSON, J. F.; NAIDU, R. A. Modulation of flavonoid biosynthetic pathway genes and anthocyanins due to virus infection in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 187, 2010. DOI: 10.1186/1471-2229-10-187.
- HAJIZADEH, M.; NAVARRO, B.; BASHIR, N. S.; TORCHETTI, E. M.; SERIO, F. Development and validation of a multiplex RT-PCR method for the simultaneous detection of five grapevine viroids. **Journal of Virological Methods**, v. 179, p. 62-69, 2012.
- HILL, S. A. *Methods in Plant Virology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications Editorial, 1984. 167 p.
- KUNIYUKI, H.; REZENDE, J. A. M.; YUKI, V. A. BETTI, J. A. Detecção sorológica do vírus A da videira em vinhedos do estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 323, 2003.
- KUNIYUKI, H.; GIORIA, R.; REZENDE, J. A. M.; WILLINK, 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**, Botucatu, v. 32, n. 2, p. 151-155, 2006.

LEVADOUX, L. Les populations sauvages et cultivées de *Vitis vinifera* L. **Annales de L'amélioration des Plantes**, v. 1, p. 59-118, 1956

LÓPEZ-FABUEL, I.; WETZEL, T.; BERTOLINI, E.; BASSLER, A.; VIDAL, E.; TORRES, L. B.; YUSTE, A.; OLMOS, A. Real-time multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of the five main grapevine viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 188, p. 21-24, 2013.

MACKENZIE, D. J.; MCLEAN, M. A.; MUKERJI, S.; GREEN, M. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. **Plant Disease**, v. 81, n. 2, p. 222-226, 1997.

McDAVID, A.; FINAK, G.; CHATTOPADYAY, P. K.; DOMINGUEZ, M.; LAMOREAUX, L.; MA, S. S.; ROEDERER, M.; GOTTARDO, R. Data exploration, quality control and testing in single-cell qPCR-based gene expression experiments. **Bioinformatics**, v. 29, n. 4, p. 461-467, 2013. DOI:10.1093/bioinformatics/bts714.

MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE ALIMENTARI E FORESTALI. Decreto Ministeriale 7 luglio 2006. Recepimento della direttiva n. 2005/43/CE della Commissione del 23 giugno 2005, che modifica gli allegati della direttiva n. 68/193/CEE Consiglio, relativa alla commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite. **Gazzetta Ufficiale**, n. 211, 2006.

MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE ALIMENTARI E FORESTALI. Piano strategico per l'innovazione e la ricerca nel settore agricolo alimentare e forestale (2014-2020). **Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e forestali**, 2014.

- NOORANI, M. S.; AWASTHI, P.; SHARMA, M. P.; RAM, R.; ZAIDI, A. A.; HALLAN, V. Simultaneous detection and identification of four cherry viruses by two step multiplex RT-PCR with an internal control of plant nad5 mRNA. **Journal of Virological Methods**, v. 193, p. 103-107, 2013. DOI:10.1016/j.jviromet.2013.05.006.
- 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 PCR (TaqMan). **Journal of Virological Methods**, v. 133, p. 130-136, 2006. doi:10.1016/j.jviromet.2005.11.005.
- OSMAN, F.; LEUTENEGGER, C.; GOLINO, D.; ROWHANI, A. Real-time RT-PCR (TaqMan<sup>®</sup>) assays for the detection of *Grapevine Leafroll associated viruses* 1-5 and 9. **Journal of Virological Methods**, v. 141, p. 22-29, 2007. doi:10.1016/j.jviromet.2006.11.035.
- OSMAN, F.; LEUTENEGGER, C.; GOLINO, D.; ROWHANI, A. Comparison of low-density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR in detection of grapevine viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 149, p. 292-299, 2008. doi:10.1016/j.jviromet.2008.01.012.
- PEÑA, A. A.; BOLS, N. C.; MARSHALL, S. H. An evaluation of potential reference genes for stability of expression in two salmonid cell lines after infection with either *Piscirickettsia salmonis* or IPNV. **Biomed Central**, v. 3, n. 101, p. 1-9, 2010.
- PEREIRA, S. R. F. G.; CHICARINO, C. N.; VIEIRA, L. F. P.; CASTILHO, J. G.; MEIRELES, M. A. D.; KOTAIT, I.; CÂMARA, F. P. Polymorfism of rabies virus nucleoprotein from samples isolated in the Rio de Janeiro state, Brazil. **Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 9, n. 3, 2011.
- POLESANI, M.; DESARIO, F.; FERRARINI, A.; ZAMBONI, A.; PEZZOTTI, M.; KORTEKAMP, A.; POLVERARI, A. cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine

infected with *Plasmopara viticola*. **BMC Genomics**, v. 9, n. 142, 2008. doi: 10.1186/1471-2164-9-142.

POLESANI, M.; BORTESI, L.; FERRARINI, A.; ZAMBONI, A.; FASOLI, M.; ZADRA, C.; LOVATO, A.; PEZZOTI, M.; DELLEDONNE, M.; POLVERARI, A. General and species-specific transcriptional responses to downy mildew infection in a susceptible (*Vitis vinifera*) and a resistant (*V. riparia*) grapevine species. **BMC Genomics**, v. 11, n. 117, 2010. Doi: 10.1186/1471-2164-11-117.

RADAELLI, P.; NICKEL, O.; SCHONS, J.; ARAGÃO, F. J. L.; FAJARDO, T. V. M. Diagnóstico biológico e molecular na análise da sequência de nucleotídeos do gene da proteína capsidial de um isolado do *Apple stem pitting virus*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 51-56, 2006.

REID, K. E.; OLSSON, N.; SCHLOSSER, J.; PENG, F.; LUND, S. T. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. **BMC Plant Biology**, v. 6, n. 27, 2006. DOI: 10.1186/1471-2229-6-27.

RIBEIRO, Ana Paula. **Micropropagação, avaliação da variação somaclonal e detecção de vírus em videira**. Universidade Federal de Lavras: Lavras, 2012, 128 p.

RUIJTER, J. M.; PFAFFL, M. W.; ZHAO, S.; SPIESS, A. N.; BOGGY, G.; BLOM, J.; RUTLEDGE, R. G.; SISTI, D.; LIEVENS, A.; PRETER, K.; DERVEAUX, S.; HELLEMANS, J.; VANDESOMPELE, J. Evaluation of qPCR curve analysis methods for reliable biomarker discovery: bias, resolution, precision and implications. **Methods**, v. 59, p. 32-46, 2013. DOI:10.1016/j.ymeth.2012.08.011.

SANKARAN, S.; MISHRA, A.; EHSANI, R.; DAVIS, C. A review of advanced techniques for detecting plant diseases. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 72, p. 1-13, 2010. doi:10.1016/j.compag.2010.02.007.

- THIS, P.; LACOMBE, T.; THOMAS, M. R. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. **Trends in Genetics**, v. 22, n. 9, p. 511-519, 2006. doi:10.1016/j.tig.2006.07.008.
- THIS, P.; LACOMBE, T.; CADLE-DAVIDSON, M.; OWENS, C. L. Wine grape (*Vitis vinifera*) color associates with allelic variation in the domestication gene *VvmybA1*. **Theoretical Applied Genetics**, v. 114, p. 723-730, 2007. DOI: 10.1007/s00122-006-0472-2.
- TIAN, L.; WANG, Y.; NIU, L.; TANG, D. Breeding of diase-resistant seedless grapes using Chinese wild *Vitis* spp.: I. *In vitro* embryo rescue and plant development. **Scientia horticulturae**, v. 117, n. 2, p. 136-141, 2008. doi:10.1016/j.scienta.2008.03.024.
- TURTURO, C.; SALDARELLI, P.; YAFENG, D.; DIGIARO, M.; MINAFRA, A.; SAVINE, 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.
- WANG, Y.; LIU, Y.; HE, P.; CHEN, J.; LAMIKANRA, O.; LU, J. Evaluation of foliar resistance to *Uncinula necator* in Chinese wild *Vitis* species. **Vitis**, v. 34, n. 3, p. 159-164, 1995.
- ZHU, Y. J.; LIM, S. T. S.; SCHENCK, S.; ARCINAS, A.; KOMOR, E. RT-PCR and quantitative real-time RT-PCR detection of *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) in symptomatic and asymptomatic plants of Hawaiian sugarcane cultivars and the correlation of SCYLV titre to yield. **European Journal of Plant Pathology**, v. 125, p. 263-273, 2010.
- ZOGLAMI, N.; RIAHI, L.; LAUCOU, V.; LACOMBE, T.; MLIKI, A.; GHORBEL, A.; THIS, P. Origin and genetic diversity of Tunisian grapes as revealed by microsatellite markers. **Scientia Horticulturae**, v. 120, p. 479-486, 2009. doi:10.1016/j.scienta.2008.12.011.