



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

COMPARAÇÃO DE DUAS TÉCNICAS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE VÍRUS E VIROIDE EM VIDEIRA: RT-qPCR E HIBRIDIZAÇÃO COM POLIRIBOSSONDA

Cátia Jacira Martins de Moura^{1,3}, Thor Vinícius Martins Fajardo², Marcelo Eiras^{1,3}

¹Instituto Biológico, São Paulo, SP. catiaaleixo@yahoo.com.br, eiras@biologico.sp.gov.br;

²Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. thor.fajardo@embrapa.br ³Bolsistas do CNPq

RESUMO - Os vírus podem afetar tanto a qualidade quanto a quantidade da produção da videira. O objetivo deste trabalho foi comparar a detecção de vírus e viroide em videiras por meio de RT-qPCR e hibridização com poliribossonda. Em cerca de 86% dos casos, houve concordância entre os resultados obtidos com os dois métodos de indexação avaliados. Assim, demonstrou-se que as duas técnicas foram sensíveis e eficientes na detecção de infecções virais em videira, recaindo a opção pelo emprego de uma ou outra técnica em razão da finalidade da indexação.

Palavras-chave: *Vitis*, sonda não-radioativa, indexação, RT-PCR em tempo real.

INTRODUÇÃO

Dentre os patógenos que infectam a videira, os vírus merecem destaque, devido aos danos que causam e por induzirem a degenerescência das plantas ao longo dos anos, com consequente redução na produção e na qualidade da uva (MALIOGKA et al., 2015). Já foram relatadas cerca de 65 espécies virais infectando a videira em diferentes países vitícolas do mundo (MARTELLI, 2014). Em combinações específicas de porta-enxerto/cultivar e espécie viral, as viroses da videira podem ser latentes e, assim, podem passar despercebidas e serem propagadas sucessivamente.

As ferramentas voltadas ao diagnóstico dos vírus que infectam a videira têm evoluído ao longo dos anos, da indexação biológica em plantas indicadoras, passando pela sorologia e chegando aos testes moleculares. A indexação biológica, normalmente, permite a identificação da virose. Entretanto, tem a desvantagem do longo período de tempo e do espaço em casa de vegetação requeridos até a obtenção do resultado final. Em relação à sorologia, algumas desvantagens incluem a incapacidade da detecção de vírus com título muito baixo, indisponibilidade comercial de alguns antissoros e dificuldade para se produzir os anticorpos. Já a RT-PCR convencional apresenta como desvantagens a inerente limitada capacidade de processamento das amostras e a necessidade de avaliação do resultado em géis. Em relação à RT-PCR em tempo real (RT-qPCR), a principal desvantagem ainda recai sobre alguns custos de reagentes e do equipamento (termociclador).



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

A utilização de poliribossomas para vários vírus/viroides (2 a 10), marcadas com digoxigenina, visando à detecção simultânea desses patógenos em plantas (videira, pomáceas, fruteiras de caroço), por meio da hibridização molecular não-radioativa, já foi relatada. Demonstrou-se que a hibridização *dot-blot* com polissonda apresenta simplicidade, especificidade e sensibilidade comparáveis a ribossomas individuais, rapidez, reprodutibilidade, custo compatível com a detecção simultânea de patógenos, além de apresentar potencial para uso rotineiro em procedimentos nos quais muitas amostras são testadas simultaneamente (FAJARDO & NICKEL, 2014; FIORE et al., 2012; HERRANZ et al., 2005; PEIRÓ et al., 2012; ZHANG et al., 2012).

O controle de vírus e viroides, baseia-se na prevenção para reduzir a incidência e a dispersão desses patógenos nas regiões de cultivo. Neste sentido, a utilização de métodos de diagnóstico é imprescindível para cultivos com vários anos de ciclos produtivos, como a videira. O objetivo deste trabalho foi comparar a detecção de vírus e viroide em videiras por meio de RT-qPCR e hibridização com poliribossoma.

MATERIAL E MÉTODOS

Videiras infectadas com vírus e viroides, mantidas em casas de vegetação, foram utilizadas como controles positivos das reações. Como controles negativos foram utilizadas videiras sadias, provenientes de tratamentos de termoterapia e/ou de cultura de tecidos. Foram coletadas para indexação 113 amostras de 32 cultivares de videira em nove vinhedos no município de São Roque, SP. A extração de RNA total, a partir de nervuras e pecíolos de folhas ou de fragmentos do lenho de videira, foi realizada utilizando-se o método de adsorção em sílica.

Os oligonucleotídeos e as sondas para as reações de RT-PCR em tempo real (TaqMan) foram definidos com base em sequências de nucleotídeos previamente publicadas (DUBIELA et al., 2013; OSMAN et al., 2007; OSMAN & ROWHANI, 2008). As sondas foram marcadas com os fluoróforos 6-FAM ou VIC no terminal 5' e TAMRA (3') para possibilitar reações do tipo duplex. As amostras foram indexadas por RT-qPCR para 7 patógenos: *Grapevine Syrah virus-1* (GSyV-1), *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3), *Grapevine fleck virus* (GFkV) e *Grapevine yellow speckle viroid 1* (GYSVd-1).

As reações de RT-qPCR (TaqMan) foram conduzidas em placas usando-se o kit *TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix* (Life Technologies) conforme descrito a seguir: 3 µL do tampão



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agrônômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

4X, 0,6 μ L da mistura de oligonucleotídeos e sonda (400 nM oligonucleotídeos e 80 nM de sonda), 3 μ L de RNA total (300 ng) para volume final de 12 μ L (DUBIELA et al., 2013). As reações de RT-qPCR foram conduzidas em termociclador com sistema apropriado de emissão e excitação da fluorescência, conforme segue: 45°C/35 min, 95°C/10 min, seguidos de 40 ciclos a 95°C/15 seg e 60°C/1 min. Os resultados das reações foram analisados quantitativamente e graficamente pela determinação do C_q .

Previamente, um plasmídeo (pBluescript II SK+, Fermentas), contendo fragmentos de genes de 14 espécies virais e três viroides que infectam videiras (cerca de 300 pb por patógeno), fusionados em sequência, foi construído visando sintetizar uma polissonda de RNA, marcada com digoxigenina (FIORE et al., 2012). Os vírus/viroides presentes no plasmídeo "poli17" são (sentido 5'-3'): GYSVd-1, HSVd (*Hop stunt viroid*), CEVd (*Citrus exocortis viroid*), GLRaV-5 (*Grapevine leafroll-associated virus 4 strain 5*), GVD (*Grapevine virus D*), GFLV (*Grapevine fanleaf virus*), GFkV, GRSPaV, GLRaV-2 (*Grapevine leafroll-associated virus 2*), GRVFV (*Grapevine rupestris vein feathering virus*), GVB, GLRaV-6 (*Grapevine leafroll-associated virus 4 strain 6*), GVA, GLRaV-9 (*Grapevine leafroll-associated virus 4 strain 9*), GLRaV-4 (*Grapevine leafroll-associated virus 4*), GLRaV-3 e GLRaV-1 (*Grapevine leafroll-associated virus 1*). Na poliribossonda "poli 14" estão ausentes as sequências de nucleotídeos dos três viroides mencionados.

Para a síntese da polissonda, o plasmídeo recombinante foi digerido com *Xho*I para sua linearização e posterior transcrição das sequências virais/viroidais com a enzima T7 RNA polimerase. A seguir realizou-se a marcação da polissonda com digoxigenina utilizando o kit *DIG RNA Labeling Mix* (Roche). Os procedimentos de hibridização e revelação das membranas foram conduzidos conforme descrito por HERRANZ et al. (2005) e PEIRÓ et al. (2012), com pequenos ajustes, em um forno de hibridização com rotação lenta.

Na hibridização *dot-blot*, 5 μ L RNA total (cerca de 300-500 ng de RNA), 3 μ L SSC 20x e 2 μ L formaldeído 37% foram desnaturados a 65°C/10 min, aplicados em membrana de *nylon* e fixados à membrana em equipamento cross-linker UV (5 min a 700 μ J/cm²). A pré-hibridização foi conduzida a 60°C por 2 h em solução contendo 50% formamida, SSC 5x, 0,1% N-laurilsarcosina, 0,02% SDS e 2% reagente bloqueador (Roche). Em seguida realizou-se a hibridização (60°C por 15 h) com a polissonda para a detecção de 14 vírus ou 17 vírus/viroides, previamente desnaturada (65°C por 10 min) e diluída (1:1666) em solução de pré-hibridização. Seguiram-se as lavagens com SSC 2x e SDS 0,1% (2x por 5 min/temp. ambiente), com SSC 0,5x e SDS 0,1% (2x por 15 min/60°C) e com tampão maleico (ác.



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA **Instituto Agronômico - Campinas, SP**

7 a 9 de Fevereiro de 2017

maleico 0,1M, NaCl 0,15M, pH 7,5) e 0,3% Tween 20 (1x por 10 min/temp. ambiente). As membranas foram bloqueadas por uma hora a temperatura ambiente em tampão maleico com reagente bloqueador a 1% (Roche). À solução bloqueadora foi acrescido anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Roche) (1:500), incubando-se por 3 h a temperatura ambiente. Duas lavagens foram realizadas com tampão maleico e 0,3% Tween 20 por 15 min e uma lavagem com tampão Tris-HCl 0,1M pH 9,5, NaCl 0,1M por 5 min. A revelação foi realizada com a adição de substrato quimioluminescente CSPD (Roche) sobre a membrana e posterior exposição da mesma a um filme de raio X por cerca de 60 min.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à indexação das 113 amostras de videira por RT-qPCR e por hibridização, foram verificadas três situações ao se compararem os resultados obtidos pelas duas técnicas (Figura 1, Tabela 1):

- Em 85,9% (97 amostras) houve concordância entre os resultados positivos obtidos por ambas as técnicas, ou seja, a amostra estava infectada por pelo menos um dos sete patógenos avaliados por RT-qPCR e a reação de hibridização foi, coincidentemente, positiva.

- Em 10,6% (12 amostras) não foi detectada a presença de nenhum dos sete patógenos avaliados por RT-qPCR, porém a reação de hibridização foi positiva. Nestes casos, como a poliribossonda é capaz de detectar até 17 patógenos é provável que a reação positiva de hibridização seja decorrente da detecção de um patógeno não testado por RT-qPCR.

- Em 3,5% (4 amostras) foi detectada a presença de pelo menos um dos sete patógenos avaliados por RT-qPCR, porém não houve reação de hibridização. Nestes casos, ou o título viral na amostra estava abaixo do limite de detecção da técnica de hibridização ou não houve suficiente complementaridade de nucleotídeos que permitisse a hibridização entre o isolado viral presente na amostra e a correspondente sequência de nucleotídeos da mesma espécie viral presente na sonda.

CONCLUSÃO

Em cerca de 86% dos casos houve concordância entre os resultados obtidos pelos dois métodos de indexação avaliados e, no restante dos casos (cerca de 14%), onde não foi verificada concordância entre os resultados, há uma consistente explicação técnica para explicar o fato. Assim, demonstrou-se que as duas técnicas foram sensíveis e eficientes na detecção de infecções virais em videira, recaindo a opção pelo emprego de uma ou outra técnica em razão do requerimento da indexação: se houver necessidade de identificação da



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA
Instituto Agrônomo - Campinas, SP
7 a 9 de Fevereiro de 2017

espécie viral, recomenda-se a RT-qPCR ou caso seja suficiente a detecção simultânea de vários patógenos, sem a identificação da(s) espécie(s) viral(is), então, recomenda-se a hibridização com poliribossonda.

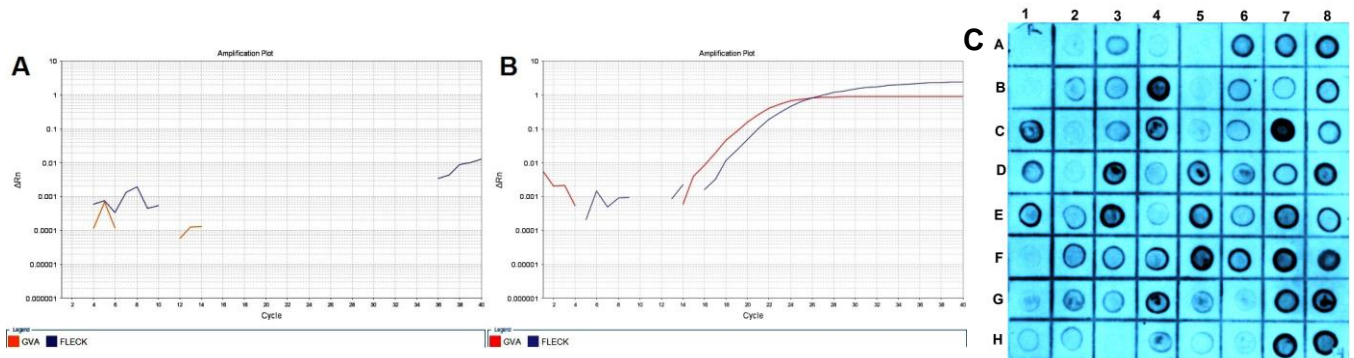


Figura 1. Resultados da indexação de videiras com duas técnicas de diagnóstico. Amostra sadia indexada por RT-qPCR (TaqMan) para GVA e GFkV (reação duplex) (A) e amostra infectada utilizando-se a mesma técnica (B). Autoradiografia da hibridização molecular com uma poliribossonda para a detecção simultânea de 14 vírus. Amostras: 1A (tampão SSC), 1B (RNA total de videira sadia), 1C-1D (videiras com infecção viral múltipla), 1E a 8H (RNA total de 60 amostras de videiras coletadas em São Roque, SP).

Tabela 1. Resultados de detecção de seis vírus e um viroide por meio de RT-qPCR e hibridização molecular com poliribossonda a partir de RNA total extraído de amostras de videiras coletadas no município de São Roque, SP.

Amostra	Cultivar	RT-qPCR							Hibridização
		GRSPaV	GYSVd-1	GVB	GSyV-1	GLRaV-3	GVA	GFkV	
38	BRS Margot	+	+	+	+	+	+	+	++
39	Concord	+	+	-	-	+	+	+	+++
40	Concord	+	+	+	-	+	+	+	+++
41	Syrah	-	+	-	+	-	+	+	++
42	Syrah	+	+	-	-	-	+	+	+
43	Marselan	-	+	-	-	-	-	-	+++
44	Marselan	+	-	-	-	-	+	-	++
45	Cabernet Franc	+	+	-	-	+	+	+	++
46	Cabernet Franc	+	+	+	-	+	+	+	++
47	Chardonnay	+	+	+	-	+	+	+	++
48	Chardonnay	+	+	+	-	+	+	+	+++
49	Niagara Branca	+	+	+	-	+	+	-	+
15	Malbec	-	-	-	-	-	-	-	++
17	Pinotage	-	-	-	-	-	-	-	++
62	Moscato Setubal	-	-	-	-	-	-	-	+++
74	Cabernet Franc	-	-	-	-	-	-	-	+
76	Cabernet Sauvignon	-	-	-	-	-	-	-	++
96	Bordô	-	-	-	-	-	-	-	+++
99	BRS Violeta	-	-	-	-	-	-	-	+++
108	BRS Isis	-	-	-	-	-	-	-	+
111	Pinot Noir	-	-	-	-	-	-	-	+++
112	Pinot Noir	-	-	-	-	-	-	-	++
114	BRS Isis	-	-	-	-	-	-	-	++
115	Cabernet Franc	-	-	-	-	-	-	-	++
25	Isabel	+	-	-	-	-	-	-	-
35	BRS Carmem	-	-	-	-	+	+	-	-
82	Touriga Nacional	+	+	-	+	+	+	+	-
86	Niagara Branca	+	+	-	-	+	+	+	-



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agrônômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

Legenda: RT-qPCR (- ausência e + presença de reação). Hibridização: - ausência de reação e sinal da hibridização com intensidade fraca (+), média (++) e forte (+++).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DUBIELA, C.R.; FAJARDO, T.V.M.; SOUTO, E.R.; NICKEL, O.; EIRAS, M.; REVERS, L.F. Simultaneous detection of Brazilian isolates of grapevine viroses by TaqMan real-time RT-PCR. *Tropical Plant Pathology*, v.38, p.158-165, 2013.

FAJARDO, T.V.M.; NICKEL, O. Simultaneous detection of four viruses affecting apple and pear by molecular hybridization using a polyprobe. *Ciência Rural*, v.44, p.1711-1714, 2014.

FIORE, N.; ZAMORANO, A.; FAJARDO, T.V.M.; PALLÁS, V.; SÁNCHEZ-NAVARRO, J.A. Simultaneous detection of the main viruses and viroids affecting grapevine by molecular hybridization using a unique riboprobe or 'polyprobe'. In: *Proceedings of the 17th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine*, Davis, USA. 2012. pp.146-147.

HERRANZ, M.C.; SANCHEZ-NAVARRO J.A.; APARICIO, F.; PALLÁS V. Simultaneous detection of six stone fruit viruses by non-isotopic molecular hybridization using a unique riboprobe or 'polyprobe'. *Journal of Virological Methods*, v.124, p.49-55, 2005.

MALIOGKA, V.I.; MARTELLI, G.P.; FUCHS, M.; KATIS, N.I. Control of viruses infecting grapevine. In: LOEBENSTEIN, G.; KATIS, N.I. (Eds.). *Control of plant virus diseases: Vegetatively-propagated crops*. *Advances in Virus Research*, v.91, p.175-227, 2015.

MARTELLI, G.P. Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology*, v.96, p.S1-S136, 2014.

OSMAN, F.; LEUTENEGGER, C.; GOLINO, D.; ROWHANI, A. Real-time RT-PCR (TaqMan) assays for the detection of *Grapevine leafroll associated viruses* 1-5 and 9. *Journal of Virological Methods*, v.141, p.22-29, 2007.

OSMAN, F.; ROWHANI, A. Real-time RT-PCR (TaqMan) assays for the detection of viruses associated with Rugose wood complex of grapevine. *Journal of Virological Methods*, v.154, p.69-75, 2008.

PEIRÓ, A.; PALLÁS, V.; SÁNCHEZ-NAVARRO, J.A. Simultaneous detection of eight viruses and two viroids affecting stone fruit trees by using a unique polyprobe. *European Journal of Plant Pathology*, v.132, p.469-475, 2012.

ZHANG, Z.; PENG, S.; JIANG, D.; PAN, S.; WANG, H.; LI, S. Development of a polyprobe for the simultaneous detection of four grapevine viroids in grapevine plants. *European Journal of Plant Pathology*, v.132, p.9-16, 2012.