



DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE VÍRUS EM VIDEIRA POR HIBRIDIZAÇÃO COM POLISSONDA

THOR VINÍCIUS MARTINS FAJARDO¹; OSMAR NICKEL¹; NICOLA FIORE²; JESÚS
ÁNGEL SANCHEZ-NAVARRO³

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 conseqüente redução na produção e na qualidade da uva (BASSO et al., 2010). Já foram relatadas pelo menos 60 doenças virais infectando a videira em diferentes países vitícolas do mundo (MARTELLI, 2009). 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 de 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, identifica a virose. Tem, entretanto, a desvantagem do longo tempo e do espaço requeridos até a obtenção do resultado. Em relação à sorologia, algumas desvantagens incluem a incapacidade em detectar título viral muito baixo, indisponibilidade comercial de alguns antissoros e dificuldade para se produzir 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 a técnica de RT-PCR em tempo real, a principal desvantagem ainda recai sobre os custos dos reagentes.

A utilização de poliribossondas para vários vírus/viróides (2 a 10), marcadas com digoxigenina, visando a detecção simultânea de patógenos virais em plantas (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 ribossondas individuais, rapidez, reprodutibilidade, custo compatível com a detecção simultânea de patógenos e apresenta potencial para uso rotineiro em procedimentos nos quais muitas amostras serão testadas simultaneamente (HERRANZ et al., 2005; PEIRÓ et al., 2012; ZHANG et al., 2012).

O controle de vírus e viróides se baseia na prevenção para reduzir a incidência e a dispersão destas doenças na região de cultivo. Neste sentido, a utilização de métodos diagnósticos, que permitam análise em larga escala, é particularmente necessária para cultivos com vários anos de

¹ Eng. Agr., pesquisador Embrapa Uva e Vinho-RS, Brasil, e-mail: thor@cnpuv.embrapa.br; nickel@cnpuv.embrapa.br

² Pesq., Universidade do Chile, Santiago, Chile, e-mail: nfiore@uchile.cl

³ Pesq., Instituto de Biología Molecular e Celular de Plantas (CSIC), Valencia, Espanha, e-mail: jesanche@ibmcp.upv.es

ciclo produtivo, como a videira. Atualmente não se dispõe de uma técnica otimizada para a detecção rotineira, em larga escala e com custo reduzido que permita a detecção simultânea dos principais vírus e viróides que afetam a videira. O objetivo deste trabalho foi testar uma polissonda para a detecção simultânea dos principais vírus/viróides da videira por meio da hibridização molecular não-radioativa.

MATERIAL E MÉTODOS

Previamente, um plasmídeo (pBluescript II SK+, Fermentas), contendo fragmentos de genes de vírus e viróides (com cerca de 300 pb por vírus ou viróide), fusionados em sequência, de 14 espécies virais e três viróides que infectam videiras, foi construído visando sintetizar uma polissonda de RNA, marcada com digoxigenina (FIORE et al., 2012). Os vírus/viróides presentes no plasmídeo "poli17" são (sentido 5'-3'): GYSVd-1 (*Grapevine yellow speckle viroid 1*), HSVd (*Hop stunt viroid*), CEVd (*Citrus exocortis viroid*), GLRaV-5 (*Grapevine leafroll-associated virus 5*), GVD (*Grapevine virus D*), GFLV (*Grapevine fanleaf virus*), GFkV (*Grapevine fleck virus*), GRSPaV (*Grapevine rupestris stem pitting-associated virus*), GLRaV-2 (*Grapevine leafroll-associated virus 2*), GRVfV (*Grapevine rupestris vein feathering virus*), GVB (*Grapevine virus B*), GLRaV-6 (*Grapevine leafroll-associated virus 6*), GVA (*Grapevine virus A*), GLRaV-9 (*Grapevine leafroll-associated virus 9*), GLRaV-4 (*Grapevine leafroll-associated virus 4*), GLRaV-3 (*Grapevine leafroll-associated virus 3*) e GLRaV-1 (*Grapevine leafroll-associated virus 1*).

Para a síntese da polissonda, o plasmídeo recombinante foi digerido com *XhoI* 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 um kit comercial (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.

Na hibridização *dot-blot*, 5 µL RNA total (concentração aprox. de 60 ng de RNA/µL), 3 µL SSC 20x e 2 µL formaldeído 37% foram desnaturados a 65°C/10 min e 5 µL desta mistura foram aplicados em membrana de *nylon* e fixados à membrana (5 min sob luz UV). A pré-hibridização foi conduzida a 60°C por 1 h em solução contendo 50% formamida, SSC 5x, 0,1% N-lauroilsarcosina, 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 17 vírus/viróides, previamente desnaturada (65°C por 10 min) e diluída (1:5000) em solução de pré-hibridização. Seguiram-se as lavagens com SSC 2x e SDS 0,1% (2x por 5 min/temp. ambiente), SSC 0,1x e 0,1% SDS (2x por 15 min/60°C) e com tampão maléico (ác. maléico 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

maléico com reagente bloqueador a 1% (Roche). À solução bloqueadora foi acrescido anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Roche), incubando-se por 1 h a temperatura ambiente. Duas lavagens foram realizadas com tampão maléico 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, 20 min.

A extração de RNA total, de nervuras e pecíolos de folhas ou de fragmentos do lenho de videira, foi realizada utilizando-se o kit *RNeasy Plant Mini* (Qiagen) ou por meio da utilização do método de adsorção em sílica (ROTT; JELKMANN, 2001).

Videiras infectadas com algumas das espécies virais e viróides mencionados, mantidas em casas-de-vegetação, foram utilizadas como controles positivos das reações. Como controles negativos foram utilizadas videiras saudias, proveniente de tratamentos de termoterapia e/ou de cultura de tecidos. Matrizes de videira, obtidas por termoterapia e cultura de tecidos, mantidas em telados, também foram indexadas por hibridização.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes de hibridização *dot-blot* foi utilizada uma polissonda para a detecção simultânea de 14 espécies virais e 3 viróides. Foi possível detectar a presença específica de diferentes espécies virais em amostras-controle, previamente indexadas por meio de outros testes diagnósticos, com evidente contraste das reações entre amostras infectadas e saudias (Figura 1). As amostras de videiras matrizes, livres de vírus, não apresentaram reação de hibridização com a polissonda (Figura 1). As condições de hibridização (estringência), bem como a homologia entre as sequências de nucleotídeos dos vírus e viróides presentes na polissonda e as sequências de nucleotídeos dos vírus efetivamente detectados, permitiram o desenvolvimento de reações de hibridização confiáveis.

A possibilidade de implementação da indexação viral por hibridização no âmbito de programas de produção de mudas certificadas aportaria um salto de escala e de qualidade à viticultura brasileira.

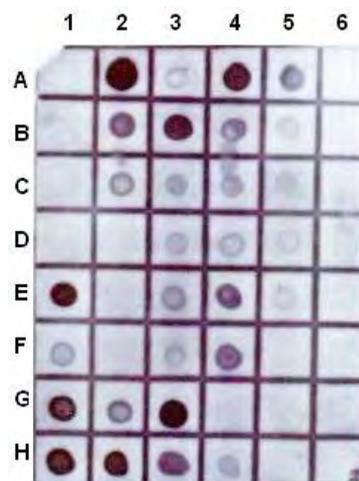


Figura 1 - Autorradiografia da hibridização molecular não-radioativa com a polissonda de RNA para a detecção simultânea de 17 vírus/viróides. Localização do RNA total de videira: 1A (tampão SSC), 1B-1C (videiras livres de vírus), 1E (com GLRaV-1), 1F (com GLRaV-2), 1G (com GLRaV-3), 1H (com GVA), 2A (com GVB), 2B (com GFLV), 2C (com GFkV), 2G-5E (23 videiras com sintomas de infecção viral), 5F-6H (11 matrizes de videira). Quadrado com mancha arredondada cinza a preta (infecção viral) ou sem mancha nitidamente perceptível (planta sadia). Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, 2012.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que a hibridização com sonda não-radioativa viabiliza a detecção simultânea de diferentes vírus em videira de modo versátil, eficiente e muito sensível, constituindo-se em um método de diagnóstico aplicável para a indexação de maior número de amostras.

REFERÊNCIAS

- BASSO, M.F.; FAJARDO, T.V.M.; SANTOS, H.P.; GUERRA, C.C.; AYUB, R.A.; NICKEL, O. Fisiologia foliar e qualidade enológica da uva em videiras infectadas por vírus. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v.35, n.6, p.351-359. 2010.
- FIORE, N.; ZAMORANO, A.; FAJARDO, T.V.M.; PALLÁS, V.; SÁNCHEZ-NAVARRO, J.A. Simultaneously detection of the main viruses and viroids affecting grapevine by molecular hybridization using a unique riboprobe or 'polyprobe'. In: Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine, 17., 2012, Davis, USA. **Extended Abstracts...** Davis: ICVG, 2012. 2p.
- 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.
- MARTELLI, G.P. Grapevine virology highlights 2006-09. In: Meeting of International Council of Viruses and Virus Diseases of Grapevine, 16., 2009, Dijon, France. **Extended Abstracts...** Dijon: ICVG, 2009. p.15-23.
- 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.
- ROTT, M.E.; JELKMANN, W. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: Adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR) and modification of an RNA extraction protocol. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p.411-420, 2001.

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.