

11^o ENCONTRO DE Iniciação Científica

7º Encontro de Pós-graduandos

Embrapa Uva e Vinho



29 e 30 de julho de 2013

Auditório da Embrapa Uva e Vinho

Bento Gonçalves, RS

Embrapa

Uva e Vinho



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Uva e Vinho
Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento*

11º Encontro de Iniciação Científica e 7º Encontro de pós-graduandos da Embrapa Uva e Vinho

29 e 30 de julho de 2013
Embrapa Uva e Vinho
Bento Gonçalves, RS

Resumos

Editores

*César Luís Girardi
Carlos Alberto Ely Machado
Henrique Pessoa dos Santos
Luís Fernando Revers
Marcos Botton
Mauro Celso Zanús*

Bento Gonçalves, RS
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Uva e Vinho

Rua Livramento, 515
95700-000 Bento Gonçalves, RS, Brasil
Caixa Postal 130
Fone: (0xx)54 3455-8000
Fax: (0xx)54 3451-2792
<http://www.cnpuv.embrapa.br>
sac@cnpuv.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: Mauro Celso Zanus
Secretária-Executiva: Sandra de Souza Sebben
Membros: Alexandre Hoffmann, César Luís Girardi, Flávio Bello Fialho,
Henrique Pessoa dos Santos, Kátia Midori Hiwatashi, Thor Vinícius Martins
Fajardo e Viviane Zanella Bello Fialho

Produção gráfica da capa: Luciana Elena Mendonça Prado

1ª edição

1ª impressão (2013): 200 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Uva e Vinho

Encontro de Iniciação Científica da Embrapa Uva e Vinho (11. : 2013 : *Bento Gonçalves, RS*).
Resumos / 11º Encontro de Iniciação Científica da Embrapa Uva e Vinho e 7º Encontro de
Pós-graduandos da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, 29 a 30 de julho de 2013 ;
editores-técnicos, César Luis Girardi ... [et al.] – Bento Gonçalves : Embrapa Uva e Vinho, 2013.
58 p.

Editores técnicos: César Luis Girardi, Carlos Alberto Ely Machado, Henrique Pessoa dos
Santos, Luís Fernando Revers, Marcos Botton e Mauro Celso Zanus.

1. Pesquisa. 2. Embrapa Uva e Vinho. 3. Iniciação científica. 4. Ensino superior. 5. Agricultura.
I. Girardi, César Luis, ed. II. Encontro de pós-graduandos da Embrapa Uva e Vinho (7. : 2013 :
Bento Gonçalves, RS). III. Título.

CDD 630.72 (21. ed.)

©Embrapa 2013

Quantificação absoluta de quatro vírus em videiras utilizando RT-PCR em tempo real com curvas-padrão geradas a partir de cDNA viral clonado

Jordana Sakis Sonza¹, Aricleia de Moraes Catarino², Thor Vinícius Martins Fajardo³, Osmar Nickel³, Gilvan Pio-Ribeiro⁴

No Brasil, foram identificados 13 vírus associados a videiras, o que compromete qualitativa e quantitativamente a produção de uva. A quantificação absoluta determina a quantidade absoluta de um alvo, expressa em número de cópias ou concentração. O objetivo deste trabalho foi gerar equações de curvas-padrão para quantificar, de forma absoluta, o título de quatro vírus em videiras: *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus D* (GVD) e *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3). Plasmídeos recombinantes, contendo cDNA viral clonado (genes HSP70 ou proteína capsial), foram purificados de cultivos de *Escherichia coli* transformada e quantificados por espectrofotometria ($A_{260nm} = 1 \text{ OD} = 50 \mu\text{g dsDNA/mL}$). Nos quatro plasmídeos recombinantes utilizados, as sequências virais serviram de molde específico para amplificação com os oligonucleotídeos utilizados na RT-PCR em tempo real. A amostra-padrão de DNA foi utilizada para plotar a curva-padrão, com base na qual, os títulos virais das plantas infectadas foram determinados. Os reagentes e as condições das reações para a amplificação dos vírus foram previamente descritos. Para gerar as curvas-padrão, a amostra-padrão foi ajustada para concentrações conhecidas (5-6 pontos, em duplicatas, fator de diluição 10) e, posteriormente, detectadas por RT-PCR em tempo real. O número de moléculas de cDNA viral na amostra-padrão foi calculado pela fórmula: $Y \text{ moléculas}/\mu\text{L} = (X \text{ g}/\mu\text{L DNA} / [\text{pares de base plasmídeo recombinante} \times 660]) \times 6,022 \times 10^{23}$. Após a curva-padrão ser gerada, 100 videiras infectadas foram avaliadas por RT-PCR em tempo real visando a determinação do título viral. A equação da curva-padrão (gráfico do valor de C_T , ciclo limiar, versus log da quantidade do padrão) foi gerada para os quatro vírus. Para o GVA, a equação da curva-padrão foi: $y = -1,528 \ln(x) + 39,43$ ($R^2 = 0,9988$, $y = \text{valor de } C_T$, $x = \text{moléculas de DNA}/\mu\text{L}$). O valor de C_T , obtido para cada planta infectada por RT-PCR em tempo real, foi comparado ao da curva-padrão (usada como referência em todas as reações subsequentes), permitindo determinar o título viral nas videiras. A quantidade absoluta de ácido nucleico do GRSPaV, GVA, GVD e GLRaV-3 nas videiras infectadas foi bastante variável, porém concentrou-se entre 1.000 a 50.000 cópias de vírus/ μL . O uso de DNA molde, na geração da curva-padrão, não considera a eficiência variável da transcrição reversa na RT-PCR. Este resultado contribui para a melhoria da diagnose viral, pois permite quantificar, com razoável precisão, variações do título viral em videiras infectadas.

¹ Graduanda Universidade Estadual do Rio Grande do Sul. 95700-000 Bento Gonçalves, RS, Brasil. Estagiária Embrapa Uva e Vinho. Bolsista de Iniciação Científica PIBIC CNPq. E-mail: jordana.sonza@gmail.com

² Doutoranda, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil. Estagiária Embrapa Uva e Vinho. Bolsista CAPES. E-mail: aricleiamc@yahoo.com.br

³ Pesquisadores da Embrapa Uva e Vinho, Caixa Postal 130, 95700-000 Bento Gonçalves, RS, Brasil. E-mail: thor.fajardo@embrapa.br; osmar.nickel@embrapa.br

⁴ Professor do Departamento de Agronomia. UFRPE, Recife, PE, Brasil. gilvan@depa.ufrpe.br