



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL  
DE PERNAMBUCO**  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM FITOPATOLOGIA**

**Tese de Doutorado**

**Detecção de vírus da videira por RT-PCR em Tempo  
Real e por Extensão de Primers Alelo-Específicos e  
caracterização molecular de isolados do Nordeste  
Brasileiro**

**Aricléia de Moraes Catarino**

**Recife – PE  
2015**

**ARICLÉIA DE MORAES CATARINO**

**DETECÇÃO DE VÍRUS DA VIDEIRA POR RT-PCR EM TEMPO REAL E POR  
EXTENSÃO DE PRIMERS ALELO-ESPECÍFICOS E CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULAR DE ISOLADOS DO NORDESTE BRASILEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fitopatologia.

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

Prof. Dr. Gilvan Pio Ribeiro (UFRPE) – Orientador  
Pesquisador Dr. Thor Vinícius Martins Fajardo – Co-Orientador  
Pesquisador Dr. Angelantonio Minafra – Co-Orientador

**RECIFE-PE  
FEVEREIRO - 2015**

**DETECÇÃO DE VÍRUS DA VIDEIRA POR RT-PCR EM TEMPO REAL E POR  
EXTENSÃO DE PRIMERS ALELO-ESPECÍFICOS E CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULAR DE ISOLADOS DO NORDESTE BRASILEIRO**

**ARICLÉIA DE MORAES CATARINO**

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 27/02/2015

**ORIENTADOR:**

---

Prof.<sup>o</sup>. Dr. Gilvan Pio Ribeiro  
(UFRPE)

**EXAMINADORES:**

---

Prof.<sup>o</sup>. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama (UFRPE)

---

Dr. Francisco Miguel de Assis Filho (MAPA)

---

Dr.<sup>a</sup>. Waléria Lima Guerreiro (UFRPE)

---

Dr.<sup>a</sup>. Genira Pereira de Andrade (UFRPE)

**RECIFE-PE  
FEVEREIRO - 2015**

A Deus, pela minha existência, por me dar força, coragem e por sempre iluminar e guiar o meu caminho. Sem Ele eu não teria conseguido chegar até aqui.

Aos meus queridos pais, Amadeu Alves Catarino e Etelina de Moraes Catarino, por todo amor e carinho e em especial, à minha mãe, o meu alicerce, pelo esforço e apoio dedicados em todas as fases dessa caminhada e naquelas que me conduziram a esse objetivo.

Às minhas irmãs pela união, carinho, amor e amizade a mim dispensados.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha existência e por permitir concluir mais essa etapa da minha vida;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelos auxílios concedidos;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, pela oportunidade de realização do meu doutorado;

À Embrapa Uva e Vinho, ao Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (CNR-IPSP) e ao Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università degli Studi “Aldo Moro” pela estrutura e apoio oferecidos para a realização dos meus experimentos;

Ao professor e orientador Dr. Gilvan Pio Ribeiro pela amizade, apoio, presteza, ensinamentos, confiança e oportunidades oferecidas, as quais tornaram o meu aprendizado mais produtivo;

Aos pesquisadores co-orientadores Dr. Thor Vinicius Martins Fajardo e Dr. Angelantonio Minafra pela amizade, valiosos ensinamentos, apoio, orientação e pelo exemplo de profissionalismo;

Ao Assistente do Laboratório de Virologia da Embrapa Uva e Vinho, Marcos Fernando Vanni pelos conhecimentos transmitidos, apoio, confiança, presteza, amizade e boas risadas;

Aos professores do Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade da UFRPE, pelas aulas e esclarecimentos dentro e fora de sala de aula, além da amizade;

Aos funcionários do Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade da UFRPE e da Embrapa Uva Vinho pelo auxílio prestado;

A todos os funcionários, pesquisadores e estagiários do Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (CNR-IPSP) e ao Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università degli Studi “Aldo Moro” por terem me acolhido como uma família, pelo carinho, presteza e amizade;

Às Dras. Selma Cavalcanti, Maria Angélica Guimarães e Genira Andrade e aos estagiários Carla Motta e Fernando J. Menezes pela valiosa colaboração neste trabalho e pela amizade;

À minha família querida, pelo apoio, palavras de carinho, força e amor a mim oferecidos;

Aos alunos de iniciação científica Letícia Inês Bucker, Paulo Raiser, Jordana Sakis Sonza, Camila Junkes, Flávia Zenin de Villa pelo auxílio na execução dos experimentos e amizade;

Aos queridos amigos do Rio Grande do Sul, Recife e Maranhão são tantos que não caberão aqui (eu tentei), mas cabem no meu coração. Agradeço-os pela inesquecível amizade, apoio, carinho, companheirismo, e por todos os momentos compartilhados.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMO GERAL</b>	<b>ix</b>
<b>GENERAL ABSTRACT</b>	<b>x</b>
<b>CAPÍTULO I – Introdução Geral</b>	<b>01</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>02</b>
<b>1. A cultura da videira</b>	<b>02</b>
<b>2. Importância econômica dos vírus para a cultura da videira</b>	<b>04</b>
<b>3. Características das principais espécies de vírus que causam doenças em videira</b>	<b>05</b>
<b>4. Ferramentas moleculares na diagnose de viroses</b>	<b>08</b>
<b>4.1 PCR e PCR em Tempo Real</b>	<b>08</b>
<b>4.2 Extensão de primers alelo-específicos</b>	<b>09</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>11</b>
<b>CAPÍTULO II – Incidência de vírus em videira no Nordeste brasileiro e caracterização molecular parcial de isolados virais locais</b>	<b>16</b>
<b>RESUMO</b>	<b>17</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>19</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>22</b>
<b>CONCLUSÃO</b>	<b>26</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>26</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>26</b>
<b>CAPÍTULO III – Multiple detection of grapevine viruses by hybridization of allele-specific primer extension from cDNA amplicons</b>	<b>32</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>33</b>
<b>RESUMO</b>	<b>34</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>34</b>
<b>MATERIAL AND METHODS</b>	<b>35</b>
<b>Extraction of total RNA and cDNA synthesis</b>	<b>36</b>
<b>Design of PCR/ASPE Primers and Probes</b>	<b>36</b>
<b>Synthesis of PCR products and Primer Extension</b>	<b>37</b>

<b>VeraCode-ASPE hybridization using Streptavidin-Alexafluor</b>	<b>38</b>
<b>Hybridization based ASPE–ELISA (System streptavidin-AP on single specific digoxigenin-oligonucleotide coated plates)</b>	<b>39</b>
<b>Hybridization based ASPE–ELISA (System NeutrAvidin™ Agarose Resins coated plates ELISA)</b>	<b>40</b>
<b>RESULTS</b>	<b>41</b>
<b>Detection of Single Nucleotide Polimorphisms by ASPE methods</b>	<b>41</b>
<b>Analysis performed in BeadXpress (Bx) Reader</b>	<b>41</b>
<b>Analysis performed in the thermocycler Real-time PCR System (BioRad)</b>	<b>41</b>
<b>Analysis performed in a ELISA plate reader</b>	<b>42</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>42</b>
<b>ACKNOWLEDGEMENTS</b>	<b>46</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>56</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b>	<b>63</b>

## RESUMO GERAL

A videira (*Vitis* spp.) pertence à família Vitaceae, sendo as espécies botânicas *V. vinifera* L. e *V. labrusca* L. cultivadas em maior escala devido seus produtos, consumidos na forma de frutos in natura, geleias, sucos e vinhos. Apesar da grande importância econômica, vários fatores podem comprometer a produção desta cultura, incluindo as doenças causadas por vírus. O presente trabalho teve como objetivos verificar a incidência de vírus presentes em vinhedos comerciais de duas áreas produtoras do Nordeste do Brasil e avaliar a eficiência de alguns métodos moleculares para detecção e identificação de espécies virais associadas à videira. Amostras, apresentando ou não sintomas, foram coletadas de genótipos de videira em propriedades situadas em Pernambuco, Paraíba, Bahia e Rio Grande do Sul, Brasil, e em Locorotondo, Província de Bari, Região da Puglia, Itália. A primeira parte do trabalho foi conduzida no Laboratório de Virologia da Embrapa Uva e Vinho, RS, Brasil. Visando a identificação dos agentes virais, nas amostras coletadas no Brasil, foram realizadas as extrações do RNA total, obtidos os cDNAs e testados por PCR em Tempo Real, empregando-se primers e sondas, específicos para os seguintes vírus: *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine leafroll-associated virus 2, 3 e 4* (GLRaV-2, -3 e -4), *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine rupestris vein feathering virus* (GRVFV) e *Grapevine fanleaf virus* (GFLV). Fragmentos de DNA, produtos da RTq-PCR, correspondentes ao gene da CP de cada vírus foram eluídos, ligados ao vetor pGEM-T Easy (Promega) e utilizados na transformação de bactéria. Foi extraído o DNA plasmidial das colônias bacterianas transformadas, confirmando-se a presença dos fragmentos clonados, os quais foram sequenciados. A segunda parte, realizada com o material coletado em Locorotondo, foi processada no Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (CNR-IPSP) e no Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università degli Studi “Aldo Moro”. Foram utilizadas, a partir de cDNAs obtidos, técnicas de amplificação baseadas na Allele Specific Primer Extension (ASPE), visando detectar em teste multiplex os vírus mais relevantes envolvidos na etiologia da degenerescência e nos complexos do enrolamento das folhas e do lenho rugoso da videira. Os resultados obtidos mostraram que as técnicas agregam algumas vantagens, como a redução no tempo e relativa simplicidade de execução, eliminando completamente o uso de reagentes tóxicos, a exemplo do brometo de etídeo. O uso de multiplex facilita a amplificação de múltiplos alvos em uma única reação, reduzindo o tempo e o custo das análises.

**Palavras-chaves:** diagnose, teste multiplex, degenerescência da videira, complexo rugoso, enrolamento da folha.



## GENERAL ABSTRACT

The grapevine (*Vitis* spp.) belongs to the family of Vitaceae, being the botanical species *V. vinifera* L. and *V. labrusca* L. the most and widely cultivated, due to their products consumed as fresh fruits, jam, juices and wines. Despite the high economical importance, several factors may severely affect this crop, including the diseases caused by viruses. This study aimed to verify the incidence of virus present in commercial vineyards of two producing areas in Northeastern Brazil and evaluate the efficiency of some molecular methods for detecting and identifying viral species associated with grapevine. Materials showing or not symptoms were collected from grapevine genotypes in vineyards of Pernambuco, Paraíba, Bahia and Rio Grande do Sul, Brazil, and Locorotondo, Province of Bari, of the Puglia Region, Italy. The first part of the work was conducted at the Virology Laboratory of the Embrapa Uva e Vinho, RS, Brazil. For the identification of viral agents in the samples collected in Brazil, the extraction of total RNA was performed, cDNAs were obtained and tested by real time RT-PCR, using primers and probes specific for the following viruses: *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine leafroll-associated virus 2, 3 e 4* (GLRaV-2, -3 e -4), *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine rupestris vein feathering virus* (GRVFV) and *Grapevine fanleaf virus* (GFLV). DNA fragments, products of the RT-qPCR, corresponding to the CP gene of each virus were eluted, linked to pGEM-T Easy vector (Promega) and used to transform bacteria. The plasmid DNA was extracted from transformed bacterial colonies, confirming the presence of the cloned fragments, which were sequenced. The grapevine material collected in Locorotondo was processed at the Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (CNR-IPSP) and at the Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università degli Studi “Aldo Moro”. In order to detect in multiplex test the most relevant viruses involved in the aetiology of fanleaf degeneration and the complexes of leafroll and rugose wood of grapevine, amplification techniques based on Allele Specific Primer Extension (ASPE) were tested by using the obtained cDNAs. The results showed that the techniques aggregate some advantages, such as reduction in time and relative simplicity of implementation, completely eliminating the use of toxic reagents, such as the ethidium bromide. The use of multiplex facilitates amplification of multiple targets in a single reaction, reducing the time and cost of the analyzes.

**Keywords:** diagnosis, multiplex test, fanleaf degeneration, leafroll and rugose wood complex diseases.

## **CAPÍTULO I**

### **Introdução Geral**

# DETECÇÃO DE VÍRUS DA VIDEIRA POR RT-PCR EM TEMPO REAL E PELA EXTENSÃO DE PRIMERS ALELO-ESPECÍFICOS E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DO NORDESTE BRASILEIRO

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1. A cultura da videira

A videira é uma planta que vem sendo cultivada há milênios em algumas partes do mundo. Pertence ao gênero *Vitis* e à família Vitaceae, incluindo as espécies botânicas *V. vinifera* L. e *V. labrusca* L., relevantes tanto por seus frutos, quanto pelos sucos e vinhos provindo deles. Dentro da espécie *V. vinifera*, a variedade selvagem classificada na subespécie *sylvestris*, deu origem à uva cultivada pertencente à subespécie *sativa*. A partir da espécie *V. labrusca*, originou-se, por hibridização, as cultivares utilizadas como porta-enxerto ou como copa, podendo distinguir-se neste último caso, os híbridos americanos dos denominados franceses (FAILLA, 2007).

É uma cultura perene, lenhosa, decídua, de clima temperado, com um ciclo vital potencialmente plurissecular, graças à sua capacidade de regenerar-se. Seu ciclo anual necessita de um adequado período invernal, no qual prepara-se para entrar em quiescência. Em regiões tropicais e equatoriais é possível cultivar a videira utilizando-se técnicas específicas de poda e tratamento químico capaz de quebrar o estado de dormência da gema (FAILLA, 2007).

Dentre os países que produzem uva em nível mundial, destacaram-se no ano de 2012, a China, com a maior produção (9.699.267 t), os Estados Unidos da América, segundo maior produtor (6.661.820 t), seguidos da Itália (5.819.010 t), França (5.338.512 t), Espanha (5.238.300 t) e Turquia (4.275.659 t). O Brasil ocupa o 13º lugar, com um registro de produção de 1.514.768 t (FAO, 2014).

O cultivo da videira no Brasil teve início em 1532, na capitania de São Vicente, hoje estado de São Paulo (MIELE, 2003; POMMER, 2003). Entretanto, a cultura passou a ter importância social e econômica apenas a partir do século XIX (TAVARES; SILVA, 2006), com a chegada da imigração italiana e o ressurgimento da viticultura no Estado de São Paulo (MIELE, 2003; POMMER, 2003) e expansão no Rio Grande do Sul (POMMER, 2003). Atualmente, este estado se destaca por contribuir, em média, com 777.000 t uva por ano, em sua maioria utilizada na produção de vinhos (MAPA, 2012).

No Nordeste brasileiro, a introdução foi realizada no século XVI nos Estados da Bahia e Pernambuco nas Ilhas de Itaparica e Itamaracá, respectivamente, onde ocorreu uma significativa exploração de vinhedo até ser dominada pelos holandeses. O cultivo expandiu-se do litoral do Nordeste para o interior, até as fronteiras do Agreste e Sertão (Semi-Árido), estabelecendo-se em Petrolina/Juazeiro, onde é explorado comercialmente desde a década de 1950. A uva de mesa produzida na Bahia e Pernambuco passou a ser exportada no início da década de 90, quando a área cultivada aumentou e houve maior suporte tecnológico (TAVARES; LIMA; MELO, 2000; TAVARES; SILVA, 2006).

O Estado de Pernambuco possui hoje dois polos de produção de uva, o do Vale do São Francisco e o da Zona da Mata. Ambos possuem grande potencial de expansão da produção. A região produtora na Zona da Mata, apesar de pequena e restringir-se ao plantio da cultivar Isabel, utilizada no Nordeste como uva de mesa e de suco, desempenha um importante papel sócio econômico, proporcionando renda e fixando o homem na atividade agrícola.

Dados recentes do IBGE (2014) revelam que o Brasil produziu cerca de 1.417.677 t de uva em uma área plantada de 81.438 ha na safra de 2013. O Nordeste responde por cerca de 19,90% (282.199 t) do total e o Estado de Pernambuco deteve a maior produção da região com 228.727 t, continuando na liderança. A Bahia ocupa o segundo lugar com 52.808 t, e os dois estados somam juntos praticamente o total produzido no Nordeste do Brasil. A região Sul é a maior produtora, respondendo por aproximadamente 66,67% (945.304 t) da produção, tendo como representantes os estados do Rio Grande do Sul (808.267 t), Paraná (79.072 t) e Santa Catarina (57.985 t).

A cultura da videira apresenta aproximadamente 10.000 variedades, além de propiciar infinitos perfis sensoriais de vinhos, uma diversificação produtiva ou qualitativa incomparável a de outras espécies de planta (SCIENZA, 2007). Este cenário favorável, porém, pode ser alterado devido à incidência de doenças, que ocasionam desde pequenas a grandes perdas, acarretando efeito na produção e qualidade do produto, dentre as quais, as viroses, que estão entre as doenças que causam maior dano para a viticultura mundial (BORGIO, 2007).

Apesar da incidência e os efeitos das viroses serem pouco conhecidos nos plantios de videira da Zona da Mata e Semi-Árido de Pernambuco, sabe-se que patógenos deste grupo são comumente encontrados em videiras e apresentam grande importância, devido aos danos que causam, como o definhamento das plantas ao longo dos anos, a redução na produção, inviabilizando economicamente os parreirais.

As condições peculiares da viticultura pernambucana exigem uma avaliação específica em relação aos efeitos dos vírus, uma vez que, todas as informações existentes sobre este

assunto, nas diversas partes do mundo, foram obtidas de plantios conduzidos em condições de manejo significativamente diferentes.

## 2. Importância econômica dos vírus para a cultura da videira

Os fitovírus são parasitas intracelulares obrigatórios e, uma vez que a compatibilidade com a planta é estabelecida, se replicam somente através da utilização dos constituintes químicos da hospedeira, infectando as células que compõem os diferentes tecidos, comprometendo a integridade do organismo infectado em todos os níveis. Em virtude disto, provocam várias alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas, através da ativação e/ou bloqueio de determinadas atividades celulares nas plantas infectadas (BASSO et al., 2010a).

Muitos fitovírus possuem uma ampla gama de hospedeiros e podem ser capazes de causar doenças em diversas plantas de famílias botânicas não relacionadas. É relativamente comum nestes casos, que os sintomas variem de acordo com o patossistema (SILVA; LIMA; ZERBINI JÚNIOR, 2012).

Muitas espécies virais detectadas em videiras não possuem relevância econômica comprovada nesta cultura e ocorrem de forma ocasional, em áreas restritas ou associadas a infecções latentes. Todas elas são disseminadas por meio de propagação vegetativa (BASSO et al., 2014) e os sintomas, normalmente, não despertam a atenção dos viticultores, sendo visualmente confundidos com deficiência nutricional ou alterações resultantes de infecções por outros patógenos (GARRIDO et al., 2008), podendo variar em função das condições ambientais, do estágio fenológico da planta, da fertilidade do solo e, principalmente, em função da combinação: cultivar e/ou espécie da hospedeira e a estirpe e/ou espécie viral (FAJARDO et al., 2007).

Cerca de 65 espécies virais já foram relatadas em videiras. Isto representa o maior número de patógenos intracelular encontrados em uma única cultura (MARTELLI, 2014), com destaque para as seguintes famílias e seus gêneros: *Alfalexiviridae* (*Potexvirus*, *Foveavirus* e *Trichovirus*); *Betaflexiviridae* (*Vitivirus*); *Bromoviridae* (*Alfamovirus*, *Cucumovirus* e *Irlavirus*); *Bunyaviridae* (*Tospovirus*); *Closteroviridae* (*Closterovirus*, *Ampelovirus* - subgrupos I e II e *Velarivirus*); *Caulimoviridae* (*Badnavirus*); *Geminiviridae* (gênero não determinado); *Potyviridae* (*Potyvirus*); *Secoviridae* (*Fabavirus*, *Nepovirus* – subgrupos A, B, C e não classificado); *Tombusviridae* (*Carmovirus*, *Necrovirus*, *Tombusvirus*); *Tymoviridae* (*Maculavirus*, *Marafivirus*); *Virgaviridae* (*Tobamovirus*); *Pospiviroidae* (*Apscaviroid*, *Hostuviroid* e *Pospiviroid*) e algumas com a classificação

taxonômica não determinada (n.d) pelo ICTV (*Idaeovirus*, *Sobemovirus*, RNA satélite – subgrupo I e n.d.) (BASSO et al., 2014).

De um modo geral, as viroses que mais ocasionam perdas em todo o mundo são: o enrolamento da folha da videira, o lenho rugoso, resultante do complexo formado pelo intumescimento dos ramos (*Grapevine virus B* - GVB), a canelura do lenho de Kober (*Grapevine virus A* - GVB), as caneluras do tronco de Rupestris (*Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* - GRSPaV), a degenerescência da videira (*Grapevine fanleaf virus* - GFLV) e a mancha das nervuras (*Grapevine fleck virus* - GFkV) (BASSO et al., 2010b; RADAELLI et al., 2009).

Em relação aos agentes causais do enrolamento da folha da videira no Brasil, até recentemente se conheciam somente as espécies GLRaV-1, -2, -3, -5 e -6. Hoje, sabe-se que a espécie GLRaV-4 está associada a essa doença. Catarino et al. 2013a, 2013b e 2013c, realizaram coletas de amostras de videira nos estados de Pernambuco, Bahia e Paraíba e por meio de RT-PCR em tempo real detectaram o vírus GLRaV-4 em 75% das amostras. A caracterização molecular parcial de isolados desse vírus confirmou a sua presença no Brasil.

A introdução de novos materiais de viníferas tem aumentado a diversidade e a qualidade da uva, porém, estes normalmente apresentam maior suscetibilidade a diversos patógenos (BASSO et al., 2014). Com os avanços nos métodos de detecção dos vírus e agentes subvirais, verificou-se que a maioria das ocorrências desses patógenos em videira ocorre na forma de infecções mistas, sendo este mais um desafio para o diagnóstico e o controle das doenças resultantes. Estas viroses causam grande impacto econômico pela redução no rendimento, na qualidade e longevidade dos vinhedos (BASSO et al., 2010a).

O controle de vírus em videira deve ser preventivo, pois não existem medidas que possam ser usadas durante o cultivo, como há para outros tipos de fitopatógenos. No caso das viroses, para a recomendação correta de medidas de controle é imprescindível a identificação precisa do agente causal por meio de um ou mais testes.

### **3. Principais espécies de vírus que infectam videira**

A maioria dos vírus que causa infecção em videira apresenta genoma constituído de RNA de fita simples, senso positivo, revestido por um capsídeo e formam partículas virais não envelopadas, com exceção da espécie *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), gênero *Tospovirus*, família *Bunyaviridae*, que é envelopado e possui genoma constituído de três segmentos de RNA (um negativo e dois com estratégia de expressão ambi-senso), e de quatro

vírus com genoma constituído de DNA, possíveis membros das famílias *Caulimoviridae* e *Gemiviridae* (BASSO et al., 2014).

O GFkV é membro da família *Tymoviridae* (BASSO et al., 2014; GIAMPETRUZZI et al., 2012) do gênero *Maculavirus*, causador da mancha das nervuras em videira. Os sintomas dessa doença incluem clareamento das nervuras nas folhas jovens, assemelhando-se a um mosaico nas folhas mais velhas, podendo também tornar-se distorcidas e enrolar para cima (BASSO et al., 2014). Este vírus possui partículas isométricas de aproximadamente 30 nm de diâmetro. O RNA genômico constitui cerca de 35% do peso da partícula. Apresenta 7564 nt e contém quatro open reading frames (ORF) que codificam um polipeptídeo de 215,4 kDa com uma motif conservada de proteínas associadas à replicação (ORF 1), à capa proteica (CP) (ORF 2), e a duas poliproteínas de 31.4 kDa (ORF 3) e 15.9 kDa (ORF 4), ricas em prolinas e com função desconhecida (MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006).

O GFLV é um dos mais importantes e disseminados vírus da videira, causando a doença conhecida como degenerescência. Foi o primeiro agente viral da videira a ser recuperado pela inoculação mecânica e completamente caracterizado físico-química e molecularmente (MARTELLI, 2014). As videiras infectadas apresentam uma degeneração progressiva ou declínio, encurtamento da vida útil produtiva dos vinhedos afetados, rendimento reduzido em até 80%, baixa qualidade e muitas vezes a doença causa a morte da videira (OLIVER; FUNCHS, 2011). Este vírus pertence ao gênero *Nepovirus* e à família *Comoviridae*, com partículas poliédricas de cerca de 30 nm de diâmetro. Possui genoma composto de RNA fita simples positivo, constituído de duas moléculas funcionais de tamanhos de 7342 nt (RNA-1) e 3774 nt (RNA-2). Alguns isolados apresentam um RNA satélite de 1114 nt (MARTELLI, 2014).

O enrolamento da folha da videira é uma doença causada por um complexo viral que envolve 11 espécies (GLRaV-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -9, -Pr, -De, -Car), podendo causar sintomas como: alterações na anatomia dos tecidos do floema, incompatibilidade da enxertia, avermelhamento das folhas, as quais adquirem uma textura semelhante a couro e o enrolamento dos bordos para baixo. Em cultivares viníferas tintas, o limbo apresenta uma coloração vermelho violácea e o tecido ao longo das nervuras principais permanece verde. Em cultivares brancas, o limbo e as nervuras tornam-se levemente amarelo-pálidos (LIMA; FAJARDO, 2012). Todos os GLRaVs pertencem à família *Closteroviridae*: GLRaV-2 está incluído no gênero *Closterovirus*; GLRaV-1, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-5, GLRaV-6, GLRaV-8 e GLRaV-9 no gênero *Ampelovirus* e GLRaV-7 no gênero *Velarivirus*. As partículas destes vírus são filamentosas e muito flexuosas com cerca de 12 nm de largura. O

comprimento varia de 1400 a 2200 nm. A CP do GLRaV-2 apresenta uma massa de 24 kDa, enquanto as massas dos outros vírus alcançam entre 35 e 44 kDa. O genoma é de RNA de fita simples positivo, monopartido (MARTELLI, 2014).

O complexo ou lenho rugoso é um termo que compreende quatro doenças transmitidas por enxertia e caracterizadas por anomalias causadas no lenho da videira. São diferenciadas, segundo a expressão de sintomas em cultivares indicadoras de porta-enxerto. O intumescimento dos ramos (“Corky bark”) está associado ao vírus GVB; a caneluras do tronco do Rupestris (“Rupestris stem pitting”) associada ao GRSPaV; a acanaladura do lenho de Kober (“Kober stem grooving”), associada ao GVA e a acanaladura do lenho do LN33 (“LN33 stem grooving”), que não apresenta um agente causal conhecido. Essas doenças podem ocorrer em infecção mista numa mesma videira, acarretando severos prejuízos (LIMA, 2009). Videiras afetadas podem apresentar-se menos vigorosas, mostrar atraso na abertura de gemas durante a primavera e em alguns anos de plantio pode ocorrer declínio e morte da planta. A severidade dos sintomas no lenho varia de acordo com as combinações de copa/enxerto. Os cachos podem ser menores do que o normal e a colheita reduzida em 20-30% (MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006). Estes vírus são membros dos gêneros *Vitivirus* e *Foveavirus*, família *Betaflexiviridae*. Apresentam partículas filamentosas e flexuosas de cerca de 730-800 x 12 nm, restritos ao floema em videiras. O genoma de todos eles consiste de RNA de fita simples positiva. As subunidades da CP possuem um único tamanho e massa de 22 a 28 kDa (MARTELLI; BOUDON-PADIEU, 2006).

As partículas virais do GVA são filamentosas e flexuosas com cerca de 800 nm de comprimento. O RNA viral possui um peso molecular de cerca de 26 kDa e um tamanho de 7349 nt. O genoma viral consiste de 5 ORFs codificando as proteínas associadas à replicação (195 kDa), uma proteína com função não conhecida (20 kDa), a proteína de movimento (31 kDa), a CP (22 kDa) e um produto de 10 kDa que possui propriedades ligantes ao nucleotídeo, sendo um fator de patogenicidade e um gene supressor de silenciamento (MARTELLI, 2014).

O RNA do GVB é totalmente sequenciado, possui um peso molecular de cerca de 27 kDa, um tamanho de 7599 nt e a mesma sequência de gene e organização estrutural apresentada pelo GVA (MARTELLI, 2014).

O RNA viral do GRSPaV apresenta um peso molecular de cerca de 30,5 kDa e um tamanho de 8726 nt. O genoma viral compreende de 5 a 6 ORFs codificando, nessa ordem, as proteínas associadas à replicação (244 kDa), proteínas de movimento (triple gene block, 25,



13 e 8 kDa) e a CP (28 kDa). A sexta ORF, quando presente, codifica uma proteína de 14 kDa com função não conhecida (MARTELLI, 2014).

#### **4. Ferramentas moleculares na diagnose de viroses**

##### **4.1 PCR e PCR em Tempo Real**

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi inventada no ano de 1983 por Kary Mullis. Essa técnica possibilita a síntese de fragmentos de DNA, usando a enzima DNA polimerase. Durante os ciclos da PCR, três eventos são observados: a desnaturação do DNA quando a reação é aquecida, a hibridização dos primers com a sequência-alvo da fita simples de DNA, quando do esfriamento da temperatura e a extensão dos primers para adicionar nucleotídeos a ele (MULLIS, 1990).

Entretanto, se o ácido nucléico do vírus que se deseja amplificar é o RNA, faz-se necessário transcrever a fita para DNA (RT-PCR). A etapa de transcrição reversa (RNA para DNA) é realizada com a enzima transcriptase reversa. A fita de DNA complementar (cDNA) é então submetida à reação de PCR cujo produto final será visualizado em gel de agarose (REZENDE; KITAJIMA, 2012).

A PCR tornou-se uma importante ferramenta em laboratórios de pesquisa para a detecção de patógenos. Porém, não possui uma alta sensibilidade e os resultados fornecidos são apenas de presença ou ausência de um gene em particular (SUE et al., 2014).

A técnica de PCR em Tempo Real foi desenvolvida em meados dos anos 90 para detecção e quantificação de ácidos nucléicos (WALKER, 2002). Nesta década, existiu um súbito interesse por estudar a molécula de DNA (SUE et al., 2014). Hoje, essa tecnologia, uma criação resultante de adaptações na técnica da PCR, é uma das mais largamente utilizadas e inovadoras na área de biologia molecular.

A quantificação por esse método pode ser realizada de duas maneiras: através da quantificação absoluta, onde são usadas diluições padrões em série de concentrações conhecidas para gerar curvas padrões (WONG; MEDRANO, 2005) e pela quantificação relativa, nesse caso, alterações na expressão do gene na amostra são quantificadas, baseando-se num padrão externo ou numa amostra de referência (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Os ensaios baseiam-se em uma reação em cadeia da polimerase, utilizando-se fluoróforos, moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico, para proporcionar o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004), a exemplo da sonda TaqMan (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; OSMAN et al., 2008), SYBR green e molecular beacons (MBs) (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

A primeira descrição do uso da sonda TaqMan ocorreu em 1989 (GELFAND, 1989). Essa sonda pode ser usada para detecção de DNA e cDNA por PCR em tempo real, contendo em uma extremidade um fluoróforo e na outra um quencher. Durante a reação, a clivagem ou digestão enzimática da sonda separa as duas moléculas, resultando no aumento da fluorescência (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Para isso, utiliza a atividade exonucleásica 5'->3' da Taq DNA polymerase que realiza a sua digestão (PROUDNIKOV et al., 2003).

O SYBR green é o marcador fluorescente mais utilizado em RT-PCR em Tempo Real. Este se liga entre a fita dupla de DNA, emitindo uma fluorescência verde quando da excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador. Porém, possui a desvantagem de se ligar em todo DNA de fita dupla que surge na reação (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004), geralmente aumentando a não especificidade durante os ciclos (MACKAY; ARDEM, 2002).

Os MBs foram primeiramente descritos em 1996 por Tyagi and Kramer (TYAGI; KRAMER, 1996) e são estruturas amplamente usadas como sondas. O mecanismo de transdução de sinal inerente dos MBs permite a análise de oligonucleotídeos alvos sem a separação de sondas não ligadas (WANG et al., 2009). Os MBs formam uma haste-e-loop, estrutura secundária, na extremidade 5' e 3'. O loop possui complementaridade à sequência alvo e a haste é constituída pelo anelamento das sequências complementares localizadas na extremidade. Um fluoróforo é ligado covalentemente a uma das extremidades e um quencher na outra e, quando hibridizam com a fita de DNA contendo a sequência alvo, emitem a fluorescência (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

A PCR em tempo real tornou-se uma ferramenta indispensável para o estudo de vírus em plantas, sendo rotina em muitos laboratórios de pesquisa (DUBIELA et al., 2013; GAMBINO; GRIBAUDO, 2006; LÓPEZ – FABUEL et al., 2013; OSMAN et al., 2007; QUITO-AVILA; MARTIN, 2012; ZHANG et al., 2013), auxiliando claramente nos estudos dos processos infecciosos (MACKAY; ARDEM, 2002). Esse sistema possui vantagens como a especificidade de ligação da sonda nucleotídica somente a amplicons específicos (OSMAN et al., 2008), fornecendo rapidez nos testes, precisão e uma alta reprodutibilidade.

#### **4.2 Extensão de primers alelo-específicos**

A extensão de primers alelo específicos (Allele Specific Primer Extensio – ASPE) é um método de detecção de polimorfismos em um único nucleotídeo (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) que utiliza dois primers: um para o alelo tipo selvagem e outro para o alelo variante. Cada primer ASPE é composto de duas regiões distintas: o terminal 5' contendo a sequência de captura, usado nas reações de hibridização e o terminal 3', região

genômica contendo o SNP de interesse na sua extremidade (BORTOLIN et al., 2004; JOHNSON et al., 2004).

O desenvolvimento da técnica ocorre de duas maneiras: primeiramente, um primer hibridiza com o SNP e uma DNA polimerase incorpora um dideoxinucleotídeo marcado fluorescentemente (ddNTP), o qual é complementar ao SNP variante. No segundo passo, ocorre a extensão do primer alelo específico, onde um primer perfeitamente compatível ao SNP variante e seu terminal 3' é hibridizado e estendido por PCR (STUDER; KOLLIKER, 2013).

O método VeraCode-ASPE foi desenvolvido a princípio somente para a detecção de SNP em genoma humano (LIN et al., 2009). Atualmente a técnica ASPE, tem sido largamente empregada para análises em plantas e animais, visando à detecção de patógenos (GAMBLE; MURIANA, 2007; LAPÉGUE et al., 2014; TONOSAKI et al., 2013) e buscando uma forma de melhor controlar as doenças, utilizando além do sistema VeraCode beads (KITAMURA - MURAMATSU et al., 2012; MERKER et al., 2013), os sistemas ASPE-ELISA (LIU et al., 2011; SHI et al., 2011), ASPE-RT-PCR em tempo real (BILODEAU et al., 2007; BRUNSCHOT et al., 2014), entre outros.

O princípio para a realização dos ensaios em todos esses sistemas é parecido. A diferença está nas leituras que são realizadas em leitores apropriados para cada método. Por exemplo: o leitor Illumina BeadXpress é adequado para o método VeraCode-ASPE, o leitor de placas ELISA para a técnica ASPE-ELISA e o termociclador com sistema ótico para a excitação da fluorescência é usado no caso ASPE-RT-PCR em Tempo Real.

Essa técnica permite a análise qualitativa e quantitativa de uma dada amostra, além de ser sensível, eficaz, confiável e possuir um alto rendimento, possibilitando a análise de um grande número de amostras cada vez que se realiza o teste.

Os objetivos deste trabalho foram verificar a incidência de vírus presentes em vinhedos comerciais de duas áreas produtoras do Nordeste do Brasil, realizar a caracterização molecular de isolados de GVA, GVB e GLRaV-3 obtidos nestas áreas e avaliar a eficácia das técnicas de RT-PCR em Tempo Real e de extensão de primers alelo-específicos (ASPE) para detecção de vírus largamente disseminados e economicamente relevantes para a cultura da videira.

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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, 2010b.
- BASSO, M. F.; FAJARDO, T. V. M.; PIO-RIBEIRO, G.; EIRAS, M.; ZERBINI, F. M. Avanços e perspectivas no estudo das doenças virais e subvirais em videira com ênfase na realidade brasileira. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 22, p. 160-207, 2014.
- 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**, Brasília, v. 35, n. 6, p. 321-329, 2010a.
- BILODEAU, G. J.; LÉVESQUE, C. A.; DE COCK, A. W. A. M.; BRIÈRE, S. C.; HAMELIN, R. C. Differentiation of European and North American genotypes of *Phytophthora ramorum* by real-time polymerase chain reaction primer extension. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontário, v. 29, n. 4, p. 408-420, 2007.
- BORGO, M. Coltivazione: virosi e fitoplasmosi. In: ANGELINE, R.; SCIENZA, A.; PONTI, I. **La vite e il vino**. Bologna: ART Servizi Editoriali S.r.l. 2007. cap.5, p. 383-403.
- BORTOLIN, S.; MODI, M. B. H.; BOSZKO, I.; KOBLER, D.; FIELDHOUSE, D.; LOPES, E.; LACROIX, J.; GRIMWOOD, R.; WELLS, P.; JANECZKO, R.; ZASTAWNY, R. Validation of the tag-it high-throughput microsphere-based universal array genotyping platform: application to the multiplex detection of a panel of thrombophilia-associated Single-Nucleotide Polymorphisms. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 50, n. 11, p. 2028-2036, 2004.
- BRUNSCHOT, S. L. V.; BERGERVOET, J. H. W.; PAGENDAM, D. E.; WEERDT, M.; GEERING, A. D. W.; DRENTH, A.; VLUGT, R. A. A. van der. Development of a multiplexed bead-based suspension array for the detection and discrimination of *Pospiviroid* plant pathogens. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2014.
- CATARINO, A. M.; FAJARDO, T. V. M.; EIRAS, M.; PIO-RIBEIRO, G.; NICKEL, O. Detection and partial molecular characterization of isolates of *Grapevine leafroll-associated virus 4* and *Grapevine rupestris vein feathering virus*. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 46. 2013, Ouro Preto. **Resumos...** Ouro Preto: Sociedade Brasileira de Fitopatologia. 2013a. p. 1.
- CATARINO, A. M.; FAJARDO, T. V. M.; PIO-RIBEIRO, G.; NICKEL, O.; REVERS, L. F. Absolute quantification of *Grapevine leafroll-associated virus 4* by TaqMan real time RT-PCR in infected grapevines. In: Brazilian Congress of Virology, 24. 2013, Porto Seguro. **Annals...** Porto Seguro: Journal of the Brazilian Society for Virology. 2013b. p. 184-185.
- CATARINO, A. M.; FAJARDO, T. V. M.; RIBEIRO, G. P.; NICKEL, O. Grapevine viruses survey in Pernambuco, Paraíba and Bahia states, Brazil. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 46. 2013, Ouro Preto. **Resumos...** Ouro Preto: Sociedade Brasileira de Fitopatologia. 2013c. p. 1.

DUBIELA, C. R.; FAJARDO, T. V. M.; SOUTO, E. R.; NICKEL, O.; EIRAS, M.; REVERS, L. F. Simultaneous detection of Brazilian isolates of grapevine viruses by TaqMan real-time RT-PCR. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, n. 2, p. 158-165, 2013.

FAILLA, O. Botânica: morfologia e fisiologia. In: ANGELINE, R.; SCIENZA, A.; PONTI, I. **La vite e il vino**. Bologna: ART Servizi Editoriali S.r.l. 2007. cap.1, p. 1-46.

FAJARDO, T. M. V.; BARROS, D. R.; NICKEL, O.; KUHN, G. B.; ZERBINI, F. M. Expression of *Grapevine leafroll-associated virus 3* coat protein gene in *Escherichia coli* and production of polyclonal antibodies. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 496-500, 2007.

FAO - Fao-Food and Agriculture Organization. Faostat. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>> . Acesso em: 06 ago. 2014.

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**, Saint Paul, v. 96, n. 11, p. 1223-1229, 2006.

GAMBLE, R.; MURIANA, P. M. Microplate fluorescence assay for measurement of the ability of strains of *Listeria monocytogenes* from meat and meat-processing plants to adhere to abiotic surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 16, p. 5235-5244, 2007.

GARRIDO, L. R.; BOTTON, M.; MELO, G. W. B.; FAJARDO, T. M. V.; NAVES, R. L. **Manual de identificação e controle de doenças, pragas e deficiências nutricionais da videira**. 1. ed. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008. 78 p.

GELFAND, D. H. Taq DNA Polimerase. In: ERLICH, H. A. **PCR Technology: Principles and applications for DNA amplification**. New York: Stockton Press, 1989. p. 17-22.

GIAMPETRUZZI, A.; ROUMI, V.; ROBERTO, R.; MALOSSINI, U.; YOSHIKAWA, N.; LA NOTTE, P.; TERLIZZI, F.; CREDI, R.; SALDARELLI, P. A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus-and-viroid-derived small RNAs in cv. Pinot gris. **Virus Research**, Amsterdam, v. 163, n. 1, p. 262-268, 2012.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. SIDRA 2014: Sistema IBGE de recuperação automática [on line]. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2013. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp>> Acesso em: 27 jul. 2014.

JOHNSON, S.; MARSHALL, D.; HARMS, G.; MILLER, C.; SHERRILL, C.; BEATY, E.; LEDERED, S.; ROESCH, E.; MADSEN, G.; HOFFMAN, G.; HAESSIG, R.; KIPISH, G.; BAKER, M.; BENNER, S.; MARRELL, P.; PRUDENT, J. Multiplexed Genetic analysis using an expanded genetic alphabet. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 50, n. 11, p. 2019-2027, 2004.

KITAMURA-MURAMATSU, Y.; KUSUMOTO-MATSUO, R.; KONDO, K.; MORI, S.; SAITO, S.; TSUKAHARA, Y.; KUKIMOTO, I. Novel multiplexed genotyping of *Human papillomavirus* using a VeraCode-allele-specific primer extension method. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 56, n. 2, p. 128-133, 2012.

LAPÈGUE, S.; HARRANG, E.; HEURTEBISE, S.; FLAHAUW, E.; DONNADIEU, C.; GAYRAL, P.; BALLENGHIEN, M.; GENESTOUT, L.; BARBOTTE, L.; MAHLA, R.; HAFFRAY, P.; KLOPP, C. Development of SNP genotyping arrays in two shellfish species. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 820-830, 2014.

LIMA, M. F. **Detecção e controle de viroses em videira**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2009. 9 p. (Circular técnica, 90).

LIMA, M. F.; FAJARDO, T. V. M. Doenças causadas por vírus. In: LIMA, M. F.; MOREIRA, F. R. B. **Uva de Mesa: Fitossanidade**. 2 ed. Brasília: Embrapa, 2012. p. 43-58 (Frutas do Brasil, 14).

LIN, C. H.; YEAKLEY, J. M.; McDANIEL, T. K.; SHEN, R. Medium- to high-throughput SNP genotyping using VeraCode microbeads. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 496, p. 129-42, 2009.

LIU, G.; CHENG, Y.; ZHAO, W.; JIN, Z.; SHAN, H.; XU, G. Single-Base Extension and ELISA-Based approach for Single-Nucleotide Polymorphisms Genotyping. **Applied Biochemistry Biotechnology**, Clifton, v. 163, n. 5, p. 573-576, 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

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**, Amsterdam, v. 188, n. 1-2, p. 21-24, 2013.

MACKAY, I. M.; ARDEM, K. E. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, London, v. 30, n. 6, p. 1292-1305, 2002.

MARTELLI, G. P. Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. **Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 96, n. 1, p. 1-136, 2014.

MARTELLI, G. P.; BOUDON-PADIEU, E. **Directory of infectious diseases of grapevines and viroses and virus-like diseases of the grapevine: bibliographic report 1998-2004**. Bari: CIHEAM, 2006. 279 p.

MERKER, J. D.; O' GRADY, N.; GOJENOLA, L.; DAO, M.; LENTA, R.; YEAKLEY, J. M.; SCHRIJVER, I. Feasibility of using microbeads with holographic barcodes to track DNA specimens in the clinical molecular laboratory. **PeerJ**, Corte Madera, v. 1, n. 91, p. 1-10, 2013.

MIELE, A.; MIOLO, A. **O sabor do vinho**. Bento Gonçalves: Miolo: Embrapa Uva e Vinho, 2003. 133 p.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2012. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/uva>>. Acesso em: 11 jan. 2013.

MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, New York, v. 262, n. 4, p. 56-65, 1990.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em Tempo Real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Lago Norte, n. 33, p. 10-13, 2004.

OLIVER, J. E.; FUNCHS, M. F. **Fanleaf degeneration/decline disease of grapevines**.

Integrated Pest Management Program, 2011. Disponível em:

<[www.nysipm.cornell.edu/factsheets/grapes/diseases/fanleaf.pdf](http://www.nysipm.cornell.edu/factsheets/grapes/diseases/fanleaf.pdf)> Acesso em: 14 nov. 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**, Amsterdam, v. 141, n. 1, p. 22-29, 2007.

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**, Amsterdam, v. 149, p. 292-299, 2008.

POMMER, C. V. **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita**, Mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003. 777 p.

PROUDNIKOV, D.; YUFEROV, V.; ZHOU, Y.; LAFORGE, K. S.; HO, A.; KREEK, M. J.

Optimizing primer-probe design for fluorescent PCR. **Journal of Neuroscience Methods**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 31-45, 2003.

QUITO-AVILA, D. F.; MARTIN, R. R. Real-time RT-PCR for detection of Raspberry bushy dwarf virus, Raspberry leaf mottle virus and characterizing synergistic interactions in mixed infections. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 179, n. 1, p. 38-44, 2012.

RADAELLI, P.; FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O.; EIRAS, M.; PIO-RIBEIRO, G.

Variabilidade do gene da proteína capsidial de três espécies virais que infectam videiras no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 5, p. 297-305, 2009.

REZENDE, J. A. M.; KITAJIMA, E. W. Vírus e viroides. In: ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W. C.; PEREIRA, O. L. **O essencial da fitopatologia: agentes causais**. Viçosa: UFV, 2012. v. 1, cap. 12, p. 309-361.

SCIENZA, A. Storia e Arte: origine e storia. In: ANGELINE, R.; SCIENZA, A.; PONTI, I. **La vite e il vino**. Bologna: ART Servizi Editoriali S.r.l. 2007. cap. 2, p. 47-87.

SHI, A.; CHEN, P.; VIERLING, R.; ZHENG, C.; LI, D.; DONG, D.; SHAKIBA, E.;

CERVANTEZ, I. Multiplex single nucleotide polymorphism (SNP) assay for detection of soybean mosaic virus resistance genes in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 122, n. 2, p. 445-457, 2011.

SILVA, F. N.; LIMA, A. T. M.; ZERBINI JÚNIOR, F. M. Sintomas induzidos por vírus, viroides, fitoplasmas e espiroplasmas em plantas. In: ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W. C.; PEREIRA, O. L. **O essencial da fitopatologia: agentes causais**. Viçosa: UFV, 2012. v. 1, cap. 8, p. 159-176.

- STUDER, B.; KOLLIKER, R. **Conversion of QTPs into functional markers: SNP genotyping technologies.** In: LUBBERSTEDT, T.; VARSHNEY, R. K. **Diagnostic in Plant Breeding.** Dordrecht: Springer, cap. 9, p. 187-210, 2013.
- SUE, M. J.; YEAP, S. K.; OMAR, A. R.; TAN, S. W. Application of PCR-ELISA in Molecular Diagnosis. **BioMed Research International**, New York, v. 2014, p. 1-6, 2014.
- TAVARES, S. C. C. H.; LIMA, M. F.; MELO, N. F. Principais doenças da videira e alternativas de controle. In: LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M. A. **Viticultura no Semi-Árido Brasileiro.** Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2000. p. 293-346.
- TAVARES, S. C. C. H.; SILVA, I. L. S. S. Doenças da Uva. In: OLIVEIRA, S. M. A.; TERAPO, D.; DANTAS, S. A. F.; TAVARES, S. C. C. H. **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais.** Brasília: Embrapa, 2006. p. 821-855.
- TONOSAKI, K.; KUDO, J.; KITASHIBA, H.; NISHIO, T. Allele-specific hybridization using streptavidin-coated magnetic beads for species identification, *S* genotyping, and SNP analysis in plants. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 31, n. 2, p. 419–428, 2013.
- TYAGI, S.; KRAMER, F. R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. **Nature Biotechnology**, New York, v. 14, n. 3, p. 303–308, 1996.
- WALKER, N. J. A technique whose time has come. **Science**, New York, v. 296, n. 5567, p. 557-559, 2002.
- WANG, K.; TANG, Z.; YANG, C. J.; YOUNGMI, K.; FANG, X.; LI, W.; YANRONG, W.; MEDLEY, C. D.; CAO, Z.; LI, J.; COLON, P.; LIN, H.; TAN, W. Molecular Engineering of DNA: Molecular Beacons. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 48, n. 5, p. 856–870, 2009.
- WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. **Real-time PCR for mRNA quantitation.** *Biotechniques*, Natick, v. 39, n. 1, p. 75-85, 2005.
- ZHANG, G.; CAI, F.; ZHOU, Z.; DEVOS, J.; WAGAR, N.; DIALLO, K.; ZULU, I.; WADONDA-KABONDO, N.; STRINGER, J. S.; WEIDLE, P. J.; NDONGMO, C. B.; SIKAZWE, I.; SARR, A.; KAGOLI, M.; NKENGASONG, J.; GAO, F.; YANG, C. Simultaneous detection of major drug resistance mutations in the protease and reverse transcriptase genes for HIV-1 subtype C by use of a multiplex allele-specific assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 51, n. 11, p. 3666-3674, 2013.



## **CAPÍTULO II**

---

---

### **Incidência de vírus em videiras no Nordeste brasileiro e caracterização molecular parcial de isolados virais locais**

1 **Incidência de vírus em videiras no Nordeste brasileiro e caracterização molecular parcial de**  
2 **isolados virais locais**

3 **Incidence of viruses in grapevines in the Brazilian Northeast and partial molecular**  
4 **characterization of local virus isolates**

5 **Aricléia de Moraes Catarino<sup>I</sup> Thor Vinícius Martins Fajardo<sup>II\*</sup> Gilvan Pio-Ribeiro<sup>I</sup> Marcelo**  
6 **Eiras<sup>III</sup> Osmar Nickel<sup>II</sup>**

7 **RESUMO**

8 Os objetivos deste trabalho foram identificar as espécies virais presentes em vinhedos  
9 comerciais de duas regiões do Nordeste do Brasil e realizar a caracterização molecular parcial de  
10 isolados de três espécies virais. A diagnose foi realizada por meio de RT-PCR em tempo real para a  
11 detecção de *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *Grapevine virus A*  
12 (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine leafroll-associated virus 2, 3 e 4* (GLRaV-2, -3 e -4),  
13 *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine rupestris vein feathering virus* (GRVfV) e *Grapevine*  
14 *fanleaf virus* (GFLV). Exceto para GFLV, os vírus avaliados estão amplamente disseminados nas  
15 áreas amostradas, frequentemente em altas incidências e em infecções múltiplas, de até 98% e  
16 76,4%, na Zona da Mata e no Vale do São Francisco, respectivamente. Isolados locais de GVA,  
17 GVB e GLRaV-3 foram parcialmente caracterizados com base na sequência completa de  
18 nucleotídeos do gene da proteína capsidial e apresentaram alta porcentagem de identidade de  
19 nucleotídeos com outros isolados brasileiros: 91,2% (GVA), 99,8% (GVB) e 99,7% (GLRaV-3).

20 **Palavras-chave:** proteína capsidial, levantamento, detecção, variabilidade, *Vitis*.

21 **ABSTRACT**

22 The objectives of this study were to identify viral species infecting commercial vineyards in  
23 two regions of Northeastern Brazil and perform molecular characterization of isolates of three virus  
24 species. The diagnosis was performed by real time RT-PCR for detection of GRSPaV, GVA, GVB,  
25 GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GFkV, GRVfV and GFLV. Except for GFLV, the evaluated  
26 viruses are widespread in the sampled areas, often in high incidences and in multiple infections, up

1 to 98% and 76.4%, in the Zona da Mata and in the Vale do São Francisco regions, respectively.  
2 Local isolates of GVA, GVB and GLRaV-3, characterized by complete coat protein gene  
3 nucleotide sequencing, showed high percentage of nucleotide identities with other Brazilian  
4 isolates of these viruses: 91.2% (GVA), 99.8% (GVB) and 99.7% (GLRaV-3).

5 **Key words:** coat protein, survey, detection, variability, *Vitis*.

6  
7 <sup>I</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE,  
8 Brasil.

9 <sup>II</sup>Embrapa Uva e Vinho, Cx. Postal 130, 95700-000, Bento Gonçalves, RS, Brasil. E-mail:  
10 thor.fajardo@embrapa.br.

11 <sup>III</sup>Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, 04014-002, São Paulo,  
12 SP, Brasil.

13 \*Autor para correspondência.

## 14 INTRODUÇÃO

15 O processo infeccioso causado pelos vírus em videiras (*Vitis* spp.) resulta em quedas de  
16 rendimento e da qualidade da produção e redução da vida útil do vinhedo, refletindo na  
17 rentabilidade da cultura. Já foram relatadas, no mundo, cerca de 70 espécies virais na cultura da  
18 videira; algumas apresentam relevância e induzem expressivo impacto econômico em muitas  
19 regiões e países, outras não se destacam (MARTELLI, 2012). No Brasil, *Grapevine leafroll-*  
20 *associated virus* (GLRaV-1, -2, -3, -5 e -6), *Grapevine virus A, B e D* (GVA, GVB e GVD),  
21 *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *Grapevine fleck virus* (GFkV) e  
22 *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) já foram detectados em videira (LIMA & FAJARDO, 2012).  
23 Recentemente, CATARINO et al. (2013) identificaram GLRaV-4 e *Grapevine rupestris vein*  
24 *feathering virus* (GRVfV) em amostras de videiras comercialmente introduzidas no Brasil e  
25 BASSO et al. (2013) identificaram um vírus de DNA, fita simples, semelhante a *Nanovirus*.

26 A propagação vegetativa da videira facilita a disseminação e favorece a ocorrência de  
27 doenças complexas pelo acúmulo de diferentes espécies e estirpes virais em uma mesma planta  
28 (MARTELLI, 2012). No Nordeste brasileiro encontram-se áreas produtoras de uva, destacando-se  
29 dois polos: o do Vale do São Francisco, com cerca de 10.000 ha, que inclui vinhedos situados nos  
30 Estados de Pernambuco e Bahia e o da Zona da Mata, com cerca de 600 ha, que abrange

1 municípios de Pernambuco e da Paraíba, ambos com grande potencial de expansão da produção  
2 (PROTAS & CAMARGO, 2011).

3 Em áreas tropicais, a exemplo do Nordeste do Brasil, onde a videira é cultivada com pequeno  
4 período de repouso para permitir mais de uma safra por ano, a temperatura normalmente é elevada  
5 e os sintomas característicos das viroses tendem a estar ausentes ou são pouco evidentes. Estes  
6 fatos dificultam a avaliação visual de campo da ocorrência e da influência dessas doenças nos  
7 parreirais, indicando maior necessidade de se aplicar testes diagnósticos com elevada sensibilidade  
8 e especificidade para se conhecer a sanidade do material. Além das condições ambientais, os  
9 sintomas de infecção viral em videira podem variar em função do estágio fenológico e da condição  
10 nutricional da planta e, também, da combinação envolvendo a cultivar e/ou espécie da hospedeira  
11 com a estirpe e/ou espécie viral (LIMA & FAJARDO, 2012). Assim, muitos vírus podem passar  
12 despercebidos por não induzirem sintomas visualmente perceptíveis ou facilmente distinguíveis.

13 A disponibilidade de informação sobre a incidência de vírus em vinhedos no Brasil ainda é  
14 escassa, sobretudo em regiões vitícolas do Nordeste do País. KUHN et al. (2000) identificaram  
15 algumas viroses em amostras de vinhedos comerciais do Vale do São Francisco, porém, em alguns  
16 casos, sem identificar as espécies virais envolvidas na infecção. Em relação à ocorrência de viroses  
17 em videiras na Zona da Mata de Pernambuco e da Paraíba, não há nenhuma informação disponível.  
18 Os objetivos deste trabalho foram determinar a incidência de viroses em duas regiões vitícolas  
19 localizadas no Nordeste brasileiro, além de caracterizar alguns isolados virais dessas regiões.

## 20 MATERIAL E MÉTODOS

21 O levantamento de vírus foi realizado em vinhedos comerciais de duas regiões vitícolas, Zona  
22 da Mata (municípios de São Vicente Férrer-PE e Natuba-PB) e Vale do São Francisco (municípios  
23 de Petrolina-PE, Lagoa Grande-PE e Casa Nova-BA), entre setembro de 2012 e março de 2013. Na  
24 Zona da Mata foram coletadas 50 amostras de videiras com 4 a 40 anos, da cv. Isabel (*V.*  
25 *labrusca*), plantadas em pé franco ou sobre os porta-enxertos IAC (313, 572), em seis  
26 propriedades. No Vale do São Francisco foram coletadas 51 amostras de videiras (*V. vinifera*) com

1 2 a 11 anos, das cvs. Christmas Rose, Sagraone, Crimson Seedless, Red Globe, Sable, Italia,  
2 Thompson Seedless, Midnight Beauty, Shiraz, Tempranillo, Barbera, Cabernet Sauvignon, Petite  
3 Shiraz e Ruby Cabernet, enxertadas sobre os porta-enxertos IAC (313, 572, 766), Harmony, P1103,  
4 SO4 e Richter, em dez propriedades. As amostras foram avaliadas quanto à presença de  
5 *Foveavirus*: GRSPaV; *Vitivirus*: GVA, GVB; *Closterovirus*: GLRaV-2; *Ampelovirus*: GLRaV-3,  
6 GLRaV-4; *Maculavirus*: GFkV; *Marafivirus*: GRVFV e *Nepovirus*: GFLV por RT-PCR em  
7 tempo real (TaqMan).

8 A extração de RNA total, a partir de 100 mg de fragmentos do lenho de ramos maduros de  
9 videiras, foi realizada triturando-se o tecido vegetal em nitrogênio líquido, e seguindo o protocolo  
10 definido no método de adsorção em sílica (ROTT & JELKMANN, 2001). Videira  
11 comprovadamente sadia foi utilizada como controle negativo e, como controle positivo das reações,  
12 foi utilizado RNA extraído de videiras, mantidas em casa de vegetação, infectadas com isolados  
13 das espécies virais avaliadas.

14 Os oligonucleotídeos e as sondas utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real foram  
15 desenhados com base em trabalhos publicados: GRSPaV, GVA, GVB (OSMAN & ROWHANI,  
16 2008); GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4 (OSMAN et al., 2007); GFkV e GFLV (DUBIELA et al.,  
17 2013). Para o GRVFV, estes reagentes foram definidos neste trabalho para a amplificação de  
18 fragmentos de 104 pb, referentes à porção genômica correspondente à proteína capsidial (CP) do  
19 GRVFV: oligonucleotídeos 104F (5'AAGAAGCTGACGGATCCTTTCCGC3'), 104R  
20 (5'ACGCAGTGGAGGGTGACAGGATTG3') e sonda 104P  
21 (5'CGAAATCACCCAGCTGGAGGTGGTTCTCATGCC3').

22 Todas as sondas foram marcadas na extremidade 5' com os fluoróforos 6-FAM ou VIC para  
23 permitir a detecção simultânea de dois vírus na mesma amostra e com TAMRA, fluoróforo que  
24 funciona como bloqueador, na extremidade 3'. As condições das reações de RT-PCR em tempo real  
25 foram descritas previamente (DUBIELA et al., 2013), consistindo em ensaios do tipo  
26 presença/ausência, utilizando-se o kit *TaqMan Master Mix One-Step RT-PCR* e o termociclador

1 *StepOnePlus Real-time PCR System* (Applied Biosystems). Os dados das reações foram analisados  
2 quantitativamente e graficamente, utilizando-se o *StepOne Software v2.2.2* (Applied Biosystems),  
3 pela determinação do Cq (ciclo quantitativo). Valores de Cq abaixo de 35 representam resultados  
4 positivos, sendo que quanto maior a concentração viral na amostra, menor será o valor do Cq.

5 A caracterização molecular parcial foi desenvolvida por meio da análise da sequência de  
6 nucleotídeos de três importantes espécies virais (GVA, GVB e GLRaV-3), cujos isolados foram  
7 detectados no levantamento. Os oligonucleotídeos para a amplificação por RT-PCR convencional  
8 foram definidos com base em trabalhos anteriores ou definidos neste trabalho: GVA-v1 (F)  
9 (5'ATGGCACAACACTACGCCAAGAGGG3') e C1197 (R) para GVA (FAJARDO et al., 2003);  
10 GVB-6445 (F) e GVB-7038 (R) para GVB (NICKEL et al., 2002) e LR3-8504 (F) e LR3-9445 (R)  
11 para GLRaV-3 (FAJARDO et al., 2007). A síntese do cDNA e as reações de PCR foram  
12 conduzidas conforme metodologia descrita por FAJARDO et al. (2003). Os produtos da RT-PCR  
13 foram analisados em géis de agarose 1,2%, preparados em tampão TBE pH 8,0, corados com  
14 brometo de etídeo e visualizados em transiluminador de luz UV. As bandas observadas,  
15 correspondentes a fragmentos de tamanhos esperados, foram recortadas dos géis e eluídas com a  
16 utilização do kit *PureLink Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen).

17 Os fragmentos de DNA eluídos foram ligados aos vetores pGEM-T Easy (Promega) ou  
18 pCR2.1 (Invitrogen). A seguir, as ligações foram utilizadas na transformação de células  
19 competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  por meio de choque térmico. O DNA plasmidial das  
20 colônias bacterianas transformadas foi extraído utilizando-se o kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA*  
21 *Purification System* (Promega). A confirmação da presença dos fragmentos virais clonados nos  
22 plasmídeos recombinantes foi realizada por digestão com a enzima de restrição *EcoRI*  
23 (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Procedeu-se ao sequenciamento automático de nucleotídeos de  
24 dois clones por isolado viral caracterizado. As comparações entre as sequências de nucleotídeos  
25 (nt) obtidas e de aminoácidos deduzidos (aad), com outros isolados disponíveis em banco de dados  
26 (GenBank), foram realizadas utilizando-se os programas BLASTn e BLASTp do NCBI

1 (www.ncbi.nlm.nih.gov), respectivamente. As sequências de nucleotídeos obtidas foram traduzidas  
2 com auxílio de recurso disponibilizado pelo ExPASy Bioinformatics Resource Portal  
3 (<http://web.expasy.org/translate/>). Nas análises foram incluídas as sequências completas da proteína  
4 capsidial (CP) do isolado caracterizado e outros isolados, da mesma espécie viral (GVA, GVB ou  
5 GLRaV-3) caracterizados no Brasil, além das sequências do gene CP do isolado-tipo de cada  
6 espécie viral.

## 7 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

8 Foram realizadas análises de RT-PCR em tempo real em 101 amostras de videiras. Os  
9 resultados indicam a frequente ocorrência de infecções múltiplas na Zona da Mata (ZM) e no Vale  
10 do São Francisco (VSF), com incidências de 0%, 2% e 98% (ZM) e 3,9%, 19,7% e 76,4% (VSF)  
11 nas amostras, respectivamente, sadias, infectadas com um vírus e infectadas com mais de um vírus.  
12 Em geral, os vírus avaliados encontravam-se amplamente disseminados nas duas regiões  
13 amostradas, ZM e VSF, respectivamente, GRSPaV, 80% e 35%; GVA, 100% e 61%; GVB, 2% e  
14 4%; GLRaV-2, 12% e 2%; GLRaV-3, 62% e 37%; GLRaV-4, 90% e 61%; GFkV, 32% e 59%;  
15 GRVfV, 0% e 47% e GFLV, 0% em ambas regiões. Estes resultados expandem o conhecimento  
16 sobre a incidência e a distribuição de vírus em videiras no Brasil, fornecendo relevante informação  
17 para o desenvolvimento de estratégias de controle e manejo destas doenças com ênfase na  
18 importância da utilização de material propagativo de videira livre de vírus na implantação de novos  
19 vinhedos.

20 Em diversos países vitícolas já foram realizados levantamentos de vírus em videiras, por  
21 exemplo, na Argentina (VOLPE et al., 2010), no Chile (FIORE et al., 2011), na China (LIU et al.,  
22 2013) e nos Estados Unidos (SHARMA et al., 2011). Nestes levantamentos, e em outros, a  
23 incidência de vírus é bastante variável dependendo da espécie viral, da cultivar de videira e da  
24 região amostrada, entretanto, invariavelmente, atingem expressivos índices, situação semelhante à  
25 verificada no levantamento conduzido neste trabalho.

26 Os sintomas normalmente associados à infecção viral em videira são: perda contínua e

1 gradual do vigor da planta, produção reduzida, coloração (avermelhamento ou amarelecimento)  
2 anormal das folhas, folhas com aparência atípica (bordos enrolados, textura rugosa e bolhas na  
3 superfície do limbo foliar), brotação, engrossamento e amadurecimento irregulares dos ramos,  
4 presença de caneluras no lenho (ranhuras sob a casca do tronco) e casca do tronco com aparência  
5 alterada (espessa e com rachaduras), além do amadurecimento irregular da uva, que possui menor  
6 teor de açúcares. Sintomas como os relatados foram verificados em muitas das videiras amostradas,  
7 indicativos da presença de três importantes viroses, o enrolamento da folha (GLRaV-2, GLRaV-3,  
8 GLRaV-4), o lenho rugoso da videira (GVA, GVB, GRSPaV) e a mancha das nervuras (GFkV) e  
9 outros vírus associados a essa virose (GRVfV). O único vírus não detectado no levantamento foi o  
10 GFLV, que, normalmente, apresenta baixa incidência no Brasil (LIMA & FAJARDO, 2012).

11 Nem sempre a videira infectada por vírus exibirá sintomas perceptíveis, pois a infecção pode  
12 ser latente em algumas cultivares comerciais; entretanto, mesmo nestes casos, a presença do vírus  
13 poderá causar prejuízos. Embora os danos provocados por vírus não tenham sido avaliados nos  
14 vinhedos amostrados, provavelmente, eles existissem, conforme determinado por outros autores.  
15 BASSO et al. (2010) observaram que uvas colhidas de videiras infectadas por vírus apresentaram  
16 redução de sólidos solúveis totais de cerca de 3,0 graus Brix, quando comparadas às uvas colhidas  
17 de plantas sadias.

18 GLRaV-3, GLRaV-4, GVA e GVB são transmitidos de maneira semipersistente por  
19 cochonilhas, enquanto o GFLV é transmitido por nematóides e GRSPaV, GLRaV-2, GFkV e  
20 GRVfV ainda não têm vetores conhecidos. Todos estes vírus são transmitidos por meio da enxertia  
21 de material propagativo infectado (MARTELLI, 2012). Em determinados casos, os meios de  
22 transmissão podem explicar as incidências obtidas, em outros casos, não há correlação. Por  
23 exemplo, foi constatada alta incidência do GRSPaV, entretanto, este vírus não possui vetor  
24 conhecido, assim, é provável que sua disseminação tenha-se dado pelo uso de material propagativo  
25 infectado na formação dos vinhedos amostrados.

26 A técnica de diagnose, RT-PCR em tempo real, empregada neste trabalho é extremamente



1 sensível e capaz de superar limitações apresentadas por outras técnicas convencionais de detecção  
2 viral. Tais limitações, comumente observadas em videiras, decorrem da distribuição desuniforme  
3 do vírus na hospedeira e das expressivas variações do título viral, tanto ao longo do ciclo da planta,  
4 quanto nos diferentes tipos de tecidos vegetais (DUBIELA et al., 2013).

5 O emprego dos oligonucleotídeos GVA-v1/C1197 permitiu a amplificação de fragmentos de  
6 DNA com 625 bp contendo o gene da CP do GVA. O gene completo da proteína capsidial do  
7 GVA, isolado IT-BA, com 597 nucleotídeos (198 aminoácidos deduzidos, aad), foi amplificado por  
8 RT-PCR a partir da amostra nº 91 da cv. Italia de Casa Nova-BA. A sequência de nucleotídeos  
9 deste isolado (acesso GenBank KF667501) apresentou identidade entre 89,6-91,2% quando  
10 comparada a outros isolados brasileiros do mesmo vírus (AF494187 do RS e AY340581 de SP) e  
11 com o isolado-tipo do GVA (NC\_003604). A identidade de aad entre os isolados de GVA  
12 analisados foi de 94,9% a 98,9% (Tabela 1).

13 O gene completo da proteína capsidial do GVB, isolado IS-SVF, com 594 nucleotídeos (197  
14 aad), foi amplificado por RT-PCR a partir da amostra nº 15 da cv. Isabel de São Vicente Férrer-PE.  
15 A sequência de nucleotídeos deste isolado (acesso GenBank KF040332) apresentou identidade  
16 entre 92,7-99,8% com os isolados brasileiros do mesmo vírus (KF040331 e AY340583 de SP,  
17 KF040333 e AF438410 do RS) e de 81,3-82,7% quando comparado com os isolados AY340582,  
18 de SP, e com o isolado-tipo do GVB (NC\_003602). A identidade de aad entre todos os isolados de  
19 GVB analisados variou de 95,4% a 100% (Tabela 2). Variabilidade entre isolados de GVA e GVB  
20 já havia sido verificada (MOREIRA et al., 2004a; MOREIRA et al., 2004b; NICKEL et al., 2002;  
21 FAJARDO et al., 2003), entretanto sem considerar isolados provenientes do Nordeste brasileiro,  
22 identificados posteriormente.

23 O gene completo da proteína capsidial do GLRaV-3, isolado RC-PE, com 942 nucleotídeos e  
24 313 aminoácidos deduzidos, foi amplificado por RT-PCR a partir da amostra nº 101 da cv. Ruby  
25 Cabernet de Petrolina-PE. A sequência de nucleotídeos deste isolado (acesso GenBank KJ704369)  
26 apresentou identidade entre 99,2-99,7% com os isolados brasileiros do mesmo vírus (DQ680141,

1 DQ680142, DQ062152 de PE) e com o isolado-tipo do GLRaV-3 (NC\_004667) e 92,9-93,4%  
2 quando comparado com os outros isolados brasileiros Pet-4 (AY753208 de PE) e IS2 (HM059034  
3 do RS). A identidade de aad entre todos os isolados de GLRaV-3 analisados foi de 94,9% a 100%  
4 (Tabela 3). Variabilidade entre isolados de GLRaV-3 já havia sido verificada (FAJARDO et al.,  
5 2007), inclusive considerando alguns isolados provenientes do Nordeste brasileiro.

6 Apesar das variações mais acentuadas terem sido verificadas nas sequências de nucleotídeos,  
7 as sequências de aminoácidos deduzidos das proteínas capsidiais tendem a apresentar menor  
8 variação entre os isolados de regiões geográficas distintas (Tabelas 1, 2 e 3). A proteína capsidial é  
9 uma proteína estrutural, assim, fatores evolutivos poderiam restringir as variações que seriam  
10 deletérias para as três espécies virais. Alterações nas proteínas capsidiais poderiam, por exemplo,  
11 resultar na perda da capacidade de interação com vetores ou fatores da planta hospedeira e o fato do  
12 GVA, GVB e GLRaV-3 terem como única hospedeira natural a videira, poderia restringir ainda  
13 mais essas alterações (MOREIRA et al., 2004b).

14 A videira é uma planta exótica no Brasil. Assim, as espécies virais encontradas infectando,  
15 localmente, esta hospedeira, foram originalmente introduzidas com a planta, em um passado  
16 distante, ou introduzidas, via importação de mudas, em processo mais recente. A viticultura  
17 brasileira é resultado da introdução de cultivares de copa e de porta-enxerto oriundas dos Estados  
18 Unidos (cultivares e híbridos de *Vitis labrusca*, por ex., cv. Isabel) e de países europeus como  
19 França e Itália (principalmente cultivares de *V. vinifera*). Também, ao longo do tempo, ocorreu  
20 grande redistribuição de material propagativo e mudas de videiras entre regiões geográficas do  
21 Brasil, podendo isto ter contribuído para a redistribuição dos patógenos virais incidentes. Assim  
22 sendo, os vírus constatados nas duas regiões amostradas no Nordeste brasileiro chegaram até estas  
23 regiões pelas vias mencionadas. Em relação à variabilidade genética dos três vírus estudados, foi  
24 possível verificar elevados níveis de identidade de nucleotídeos com outros isolados, previamente  
25 caracterizados no Brasil, enfatizando a validade das informações sobre possíveis origens comuns  
26 dos materiais propagativos infectados de videira.

1 A compreensão da diversidade genética da população viral e a determinação da incidência  
2 das espécies virais em uma região podem viabilizar a diagnose focada em testes diagnósticos  
3 “universais” capazes de detectar um maior número de isolados e estirpes de uma espécie viral e  
4 favorecer a implementação de determinadas práticas de manejo e controle de viroses, além de  
5 possibilitarem a realização de estudos epidemiológicos.

## 6 **CONCLUSÃO**

7 A determinação da incidência de vírus em duas regiões vitícolas situadas no Nordeste  
8 brasileiro; a identificação, caracterização e estudo da variabilidade genética de três isolados virais  
9 locais e a robustez demonstrada pelo teste RT-PCR em tempo real para a detecção dos isolados  
10 locais, em conjunto, aprofundam o conhecimento de viroses nas regiões estudadas e contribuem  
11 para o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico viral mais específicas e sensíveis.

## 12 **AGRADECIMENTOS**

13 A Marcos F. Vanni (Embrapa Uva e Vinho), Maria Angélica G. Barbosa (Embrapa  
14 Semiárido), Selma C. C. H. Tavares (Embrapa Solos) e Genira P. Andrade (UFRPE) pela  
15 colaboração em diferentes etapas deste trabalho.

## 16 **REFERÊNCIAS**

- 17 BASSO, M.F. et al. Fisiologia foliar e qualidade enológica da uva em videiras infectadas por vírus.  
18 **Tropical Plant Pathology**, v.35, p.351-359, 2010.
- 19 BASSO, M.F. et al. Association of a novel highly divergent monopartite circular ssDNA virus with  
20 chlorotic dwarf and dry branches in apple and pear and potential association with symptoms in  
21 grapevine. In: INTERNATIONAL ssDNA COMPARATIVE VIROLOGY WORKSHOP, 5<sup>th</sup>,  
22 2013, Hangzhou. **Program and Abstracts...** Hangzhou, China, 2013. p.56.
- 23 CATARINO, A.M. et al. Detection and partial molecular characterization of isolates of *Grapevine*  
24 *leafroll-associated virus 4* and *Grapevine rupestris vein feathering virus*. In: CONGRESSO  
25 BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 46., 2013. **Resumos...** Ouro Preto:UFV:SBF, 2013.
- 26 DUBIELA, C.R. et al. Simultaneous detection of Brazilian isolates of grapevine viruses by TaqMan

- 1 real-time RT-PCR. **Tropical Plant Pathology**, v.38, p.158-165, 2013.
- 2 FAJARDO, T.V.M. et al. Detecção de um isolado de *Grapevine virus A* e caracterização do gene da  
3 proteína capsidial. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.521-527, 2003.
- 4 FAJARDO, T.V.M. et al. Variability of the coat protein gene of *Grapevine leafroll-associated*  
5 *virus 3* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.335-340, 2007.
- 6 FIORE, N. et al. Grapevine viruses in the Atacama region of Chile. **Journal of Phytopathology**,  
7 v.159, p.743-750, 2011.
- 8 KUHN, G.B. et al. Viroses da videira identificadas na Região do Submédio São Francisco no polo  
9 vitícola Petrolina/Juazeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.25(supl.), p.442, 2000.
- 10 LIMA, M.F.; FAJARDO, T.V.M. Doenças causadas por vírus. In: LIMA, M.F.; MOREIRA, F.R.B.  
11 **Uva de Mesa - Fitossanidade. Série Frutas do Brasil 14**. 2ª ed. Brasília:Embrapa, 2012. p.43-58.
- 12 LIU, M.H. et al. Occurrence of grapevine leafroll-associated viruses in China. **Plant Disease**, v.97,  
13 p.1339-1345, 2013.
- 14 MARTELLI, G.P. Grapevine virology highlights 2010-2012. In: CONGRESS OF THE  
15 INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUS AND VIRUS-LIKE DISEASES  
16 OF THE GRAPEVINE, 17., 2012, Davis, USA. **Proceedings...** Davis:ICVG, 2012. p.13-31.
- 17 MOREIRA, A.E. et al. Caracterização do gene da proteína capsidial de dois isolados,  
18 patologicamente distintos e sorologicamente semelhantes, do *Grapevine virus B* em videiras no  
19 Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.75-80, 2004a.
- 20 MOREIRA, A.E. et al. Caracterização do gene da proteína capsidial do *Grapevine virus A* em  
21 videiras afetadas pela acanaladura do lenho de Kober no Estado de São Paulo. **Fitopatologia**  
22 **Brasileira**, v.29, p.205-208, 2004b.
- 23 NICKEL, O. et al. Detection and coat protein gene characterization of an isolate of *Grapevine virus B*  
24 from corky bark-affected grapevines in Southern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.279-284,  
25 2002.
- 26 OSMAN, F. et al. Real-time RT-PCR (TaqMan) assays for the detection of *Grapevine leafroll*

- 1 *associated viruses* 1-5 and 9. **Journal Virological Methods**, v.141, p.22-29, 2007.
- 2 OSMAN, F.; ROWHANI, A. Real-time RT-PCR (TaqMan) assays for the detection of viruses  
3 associated with Rugose wood complex of grapevine. **Journal of Virological Methods**, v.154,  
4 p.69-75, 2008.
- 5 PROTAS, J.F.S.; CAMARGO, U.A. **Vitivinicultura Brasileira: Panorama Setorial de 2010**.  
6 Brasília: SEBRAE; Bento Gonçalves: IBRAVIN; Embrapa Uva e Vinho, 2011. 110p.
- 7 ROTT, M.E.; JELKMANN, W. Characterization and detection of several filamentous viruses of  
8 cherry: Adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR) and modification of an RNA  
9 extraction protocol. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p.411-420, 2001.
- 10 SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3<sup>rd</sup> ed. New York:  
11 CSHL Press, 2001. 999p.
- 12 SHARMA, A.M. et al. Occurrence of grapevine leafroll-associated virus complex in Napa Valley.  
13 **PLoS One**, v.6, p.e26227, 2011.
- 14 VOLPE, M.L. et al. Incidence of *Grapevine leafroll associated viruses* -1, -2, and -3 in Mendoza  
15 vineyards. **Tropical Plant Pathology**, v.35, p.377-380, 2010.

16

17 Tabela 1 - Identidade (%) das sequências de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos  
18 deduzidos (acima da diagonal) do gene completo (597 pb, 198 aad) da proteína capsidial entre  
19 diferentes isolados brasileiros de *Grapevine virus A*.

20

aminoácidos / nucleotídeos	IT-BA	“GVA-RS”	“GVA-SP”	Is 151
<b>IT-BA</b>	---	<b>95,4</b>	<b>98,9</b>	<b>96,9</b>
“GVA-RS”	<b>89,6</b>	---	94,9	95,4
“GVA-SP”	<b>91,2</b>	89,3	---	96,4
Is151	<b>89,7</b>	90,8	91,9	---

21

22

23 Nome do isolado (código de nucleotídeos / código de aad do isolado no GenBank, País, Estado): IT-  
24 BA (KF667501 / AGX27424, Brasil, BA), “GVA-RS” (AF494187 / AAM14605, Brasil, RS),

- 1 “GVA-SP” (AY340581/ AAQ19964, Brasil, SP), isolado-tipo do GVA: Is151 (NC\_003604 /
- 2 NP\_619665, Itália). Em **negrito**, informação do isolado caracterizado neste trabalho.
- 3

1 Tabela 2 - Identidade (%) das sequências de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos  
 2 deduzidos (acima da diagonal) do gene completo (594 pb, 197 aad) da proteína capsidial entre  
 3 diferentes isolados brasileiros de *Grapevine virus B*.

4  
 5

aminoácidos / nucleotídeos	<b>IS-SVF</b>	CO	CS	BR1	Common	Italia	“GVB-italiano”
<b>IS-SVF</b>	---	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>97,5</b>	<b>96,4</b>	<b>97,5</b>
CO	<b>99,8</b>	---	100	100	97,5	96,4	97,5
CS	<b>99,8</b>	100	---	100	97,5	96,4	97,5
BR1	<b>99,8</b>	100	100	---	97,5	96,4	97,5
Common	<b>82,7</b>	82,5	82,5	82,5	---	95,4	98,9
Italia	<b>92,7</b>	92,6	92,6	92,6	83,7	---	95,4
“GVB-italiano”	<b>81,3</b>	81,2	81,3	81,3	98,6	82,5	---

6

7

8 Nome do isolado (código de nucleotídeos / código de aad do isolado no GenBank, País, Estado): IS-  
 9 SVF (KF040332 / AGO86377, Brasil, PE), CO (KF040331 / AGO86376, Brasil, SP), CS  
 10 (KF040333 / AGO86378, Brasil, RS), BR1 (AF438410 / AAL40797, Brasil, RS), Common  
 11 (AY340582/ AAQ19965, Brasil, SP), Italia (AY340583/ AAQ19966, Brasil, SP), isolado-tipo do  
 12 GVB: “GVB-italiano” (NC\_003602 / NP\_619657, Itália). Em negrito, informação do isolado  
 13 caracterizado neste trabalho.

14

1 Tabela 3 - Identidade (%) das sequências de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos  
 2 deduzidos (acima da diagonal) do gene completo (942 pb, 313 aad) da proteína capsidial entre  
 3 diferentes isolados brasileiros de *Grapevine leafroll-associated virus 3*.

4

aminoácidos / nucleotídeos	<b>RC-PE</b>	Pet-1	Pet-2	Pet-3	Pet-4	IS2	NY1
<b>RC-PE</b>	---	<b>100</b>	<b>99,6</b>	<b>99,6</b>	<b>95,8</b>	<b>94,9</b>	<b>99,0</b>
Pet-1	<b>99,7</b>	---	99,6	99,6	95,8	94,8	99,0
Pet-2	<b>99,6</b>	99,8	---	99,3	95,5	94,5	98,7
Pet-3	<b>99,5</b>	99,7	99,6	---	95,5	94,5	98,7
Pet-4	<b>93,4</b>	93,4	93,3	93,2	---	96,4	94,8
IS2	<b>92,9</b>	92,8	92,7	92,6	97,7	---	93,9
NY1	<b>99,2</b>	99,4	99,3	99,2	92,8	92,3	---

5  
 6  
 7 Nome do isolado (código de nucleotídeos / código de aad do isolado no GenBank, País, Estado):  
 8 RC-PE (KJ704369 / ..., Brasil, PE), Pet-1 (DQ680141 / ABG76780, Brasil, PE), Pet-2 (DQ680142 /  
 9 ABG76781, Brasil, PE), Pet-3 (DQ062152 / AAY62364, Brasil, PE), Pet-4 (AY753208 /  
 10 AAV27299, Brasil, PE), IS2 (HM059034 / ADG57581, Brasil, RS), isolado-tipo do GLRaV-3:  
 11 NY1 (NC\_004667 / NP\_813801, EUA). Em negrito, informação do isolado caracterizado neste  
 12 trabalho.

13  
 14  
 15  
 16  
 17  
 18  
 19  
 20  
 21  
 22  
 23  
 24  
 25  
 26  
 27  
 28  
 29  
 30



## **CAPÍTULO III**

---

**Multiple detection of grapevine viruses by hybridization of Allele-Specific Primer**

**Extension from cDNA amplicons**

1 **MULTIPLE DETECTION OF GRAPEVINE VIRUSES BY HYBRIDIZATION OF**  
2 **ALLELE-SPECIFIC PRIMER EXTENSION FROM cDNA AMPLICONS**

3 **Aricléia de Moraes Catarino<sup>1</sup>, Angelantonio Minafra<sup>2</sup>, Giovanni P. Martelli<sup>3</sup>, Gilvan**  
4 **Pio-Ribeiro<sup>1</sup>**

5 *<sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil*

6 *<sup>2</sup>Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (CNR-IPSP) UOS Bari, Italy*

7 *<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università degli Studi*

8 *“Aldo Moro”, Bari, Italy*

9 *Corresponding author: Aricléia de Moraes Catarino*

10 *Fax number:*

11 *E-mail adress: aricleiamc@yahoo.com.br*

12 **SUMMARY**

13 Generally, DNA polymerase-based extension has a high sequence specificity and good  
14 fidelity of DNA synthesis and allows a high-throughput processivity. The objective of this  
15 paper was the application of allele-specific primer extension (ASPE) techniques aiming to  
16 detect the most widespread and economically relevant grapevine viruses. The analyses were  
17 performed by the following ASPE detection methods: on microbeads (VeraCode-ASPE), end  
18 point fluorimetric (Real Time RT-PCR-ASPE) and colorimetric (ASPE-ELISA). For this, we  
19 tested different grapevine samples for GVA, GVB, GLRaV-1, -2 and -3, GFLV, GFkV and  
20 GRSPaV by simplex and multiplex. The reading were performed on the BeadXpress Reader  
21 (Bx) (Illumina) at 635 nm for the glass beads, ELISA plate reader at 405 nm for microplate  
22 wells, and on the thermocycler CFX96 Real-time PCR System (BioRad) for end-point  
23 detection in microtubes. The results of reading performed at BX reader showed to be the most  
24 sensitive, followed by readings in thermocycler real-time PCR and ELISA plate reader. The  
25 application of these tools will greatly improve grapevine virus detection and therefore their

26 elimination or containment, will further increase yields and quality of production for table and  
27 wine grape. In general, the three methods may be recommended due the sensitivity observed.

28 **Keywords:** VeraCode beads, biotin, multiplex, ELISA and Real Time RT-PCR.

## 29 **RESUMO**

30 Em geral, a extensão tendo como base a DNA polimerase possui uma elevada especificidade e  
31 fidelidade de síntese de DNA, além de um alto rendimento. O objetivo deste trabalho foi a  
32 aplicação de técnicas de extensão de primers alelo-específicos (ASPE) visando detectar os  
33 vírus da videira mais disseminados e economicamente relevantes. As análises foram  
34 realizadas pelos seguintes métodos de detecção com base no ASPE: em microesferas  
35 (VeraCode-ASPE), por um ponto de extremidade fluorimétrico (RT-PCR em Tempo Real-  
36 ASPE) e colorimétrico (ELISA-ASPE). Foram testadas diferentes amostras de videira para os  
37 vírus GVA, GVB, GLRaV-1, -2 e -3, GFLV, GFkV e GRSPaV por simplex e multiplex. As  
38 leituras para microesferas foram realizadas no leitor BeadXpress (Illumina) a 635 nm, leitor  
39 de placas ELISA a 405 nm, para microplacas ELISA e em microtubos para análise em  
40 termociclador CFX96 Real-time PCR System (BioRad). Os resultados das leituras obtidos  
41 através do leitor BX mostraram-se mais sensíveis, seguido das leituras em termociclador para  
42 PCR em tempo real e leitor de placas ELISA. A aplicação destas ferramentas ajudará na  
43 melhoria da detecção de vírus em videira e, conseqüentemente, a eliminação ou contenção dos  
44 mesmos contribuirá para aumentar ainda mais a produtividade e a qualidade da produção de  
45 uva de mesa e de vinho. Em geral, os três métodos podem ser recomendados, devido à  
46 sensibilidade observada.

47 **Palavras-chave:** VeraCode beads, biotina, multiplex, ELISA e RT-PCR em Tempo Real.

## 48 **INTRODUCTION**

49 Several virus diseases affect grapevines, reducing yield and berry quality for table and  
50 wine production, as well as nursery performance (Martelli and Boudon-Padieu, 2006).

51 Multiplex, end point-detection molecular analysis reduces manipulation and working  
52 time per sample and is even able to quantify targets. Moreover, the use of universal primers  
53 designed in conserved regions of *Closteroviridae* or *Flexiviridae* (Saldarelli *et al.*, 1998), with  
54 a further screening by specific fluorescent probes, is usefully envisaged in grapevine virus  
55 detection.

56 In the 1980s there was a growing interest in studying immunodetection of DNA.  
57 Several methods were published using biotinylated RNA probes, or enzyme linked  
58 immunosorbent assay techniques, which led to the introduction of polymerase chain reaction-  
59 enzyme linked immunosorbent assay (PCR-ELISA) (Sue *et al.*, 2014).

60 Multiplex immunoanalysis have great potential for diagnostics (Vostrý, 2009; Jun *et*  
61 *al.*, 2012; Gruber, 2013). Recently various simplex and multiplex allele specific assays have  
62 been developed for disease diagnosis (Pastinen *et al.*, 2000; Shapero *et al.*, 2004; Zhang *et al.*,  
63 2013a) using microplate Luminometer/Photometer (Konstatou *et al.*, 2007), based in Single-  
64 base extension (SBE) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Liu *et al.*, 2011),  
65 detected by an Illumina BeadXpress® reader, employing VeraCode beads (Kitamura-  
66 Muramatsu *et al.*, 2012; Merker *et al.*, 2013), examined by streptavidin-coated magnetic  
67 hybridization (Tonosaki *et al.*, 2013) and visualized by Real Time RT-PCR (Bilodeau *et al.*,  
68 2007).

69 In general, DNA polymerase-based extension has a high sequence specificity and  
70 fidelity, whereas the 3'→5' proof-reading activity is conserved. Furthermore, this enzymatic  
71 reaction provides a high level of flexibility, allowing the accomplishment of a multiplexing as  
72 PCR for primer extension under equal reaction conditions and a high-throughput by such  
73 methods can be generated (Syvanen 2001, 2005).

74 The objective of this paper was the application of ASPE techniques on cDNAs  
75 synthesized from grapevine plant extracts, aiming to multiplex detection of the most relevant

76 grapevine viruses involved in the aetiology of fanleaf degeneration, leafroll and rugose wood  
77 complex diseases.

## 78 **MATERIALS AND METHODS**

### 79 **Extraction of total RNA and cDNA synthesis**

80 The samples used as positive controls in this experiment were obtained from plants  
81 collected in the field, at Centro Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura (Locorotondo),  
82 located in the province of Bari, in Puglia, Italy, previously analyzed by RT-PCR (Gambino  
83 and Gribaudo, 2006) for the viruses GLRaV-1, -2, -3, GVA, GVB, GFLV, GFkV and  
84 GRSPaV (Table 1). The negative control was collected from healthy grapevine seedlings  
85 grown in a greenhouse.

86 The extraction of total RNA from fragments of vine wood samples followed two  
87 distinct protocols: adsorption on silica (Boom, 1990; Foissac et al., 2001) and the Cetyl  
88 Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) extraction (Gambino et al., 2008).

89 After obtaining the total RNA, the average concentrations of RNA present in the  
90 extracts, as well as its purity, was determined by a spectrophotometer reading. The  
91 absorbance was at 260 and 280 nm and their ratio thereafter calculated ( $A_{260/280}$ ). In average,  
92 the equivalent amount (7-10  $\mu$ L) of 500 ng of total RNA was applied for the synthesis. The  
93 cDNA was obtained using the Super Script II reverse transcriptase (Invitrogen) with random  
94 hexamers as primers.

### 95 **Design of PCR/ASPE Primers and Probes**

96 The PCR/ASPE primers and probes were designed for GVA, GVB, GLRaV-1, -2 and  
97 -3, GFLV, GFkV and GRSPaV (Table 2). The design was based on VeraCode Assays Guide  
98 by the VeraCode Designer software (Illumina website, San Diego, CA, USA); as a software  
99 input, a sequence portion (250 - 200 bp), was selected in the CP gene from a consensus  
100 sequence retrieved by a multiple alignment obtained by Clustal X (Thompson *et al.*, 1997).

101 Four primers were required for the ASPE method of detection. The first couple of  
102 primers consisted of forward and reverse primers to amplify each virus-specific genomic  
103 region containing SNPs of interest in the multiplexed PCR reaction. The third primer  
104 consisted in an internal, complementary annealing oligonucleotide which defined each SNP.  
105 This was used in the multiplexed primer extension reaction. The primer having an indexing  
106 sequence, antiparallel to the virus-specific extension primer termination, was used when  
107 immobilized on a matrix as the hybridization capture primer.

### 108 **Synthesis of PCR products and Primer Extension**

109 The ASPE and PCR reactions were performed in separate tubes. For the PCR reaction,  
110 Taq buffer 10X [1.5  $\mu$ L/reaction (1x)]; MgCl 50 mM [0.5  $\mu$ L/reaction (1.67 mM)]; dNTPs 5  
111 mM [0.6  $\mu$ L/reaction (200  $\mu$ M)]; PCR primer mix 10  $\mu$ M [1  $\mu$ L/reaction (10 pmol)]; water  
112 N/A [10.25 (N/A)] and Platinum Taq 5 units/ $\mu$ L [0.15  $\mu$ L/ reaction (0.75 units)] were used. A  
113 total the tubes containing 14  $\mu$ L of the master mix was transferred to each PCR tube and 1  $\mu$ L  
114 DNA (10–100 ng) added. The PCR reactions in the thermocycler and run the PCR program as  
115 follows: 95  $^{\circ}$ C/5 min; 30 cycles (95  $^{\circ}$ C/30 sec; 58  $^{\circ}$ C/30 sec; 72  $^{\circ}$ C/30 sec); 4  $^{\circ}$ C/indefinitely.

116 The mixture of Shrimp Alkaline Phosphatase and Exonuclease I (SAP/EXO) were  
117 used, in concentration SAP 1 unit/ $\mu$ L [2  $\mu$ L/ reaction (2 units)] and EXO I 10 units/ $\mu$ L [0.5  
118  $\mu$ L/ reaction (5 units)] to inactivate any remaining nucleotides and primers respectively from  
119 the PCR reaction. The program for the thermocycler was as follows: 37  $^{\circ}$ C/45 min; 99  $^{\circ}$ C/15  
120 min; 4  $^{\circ}$ C/ indefinitely. After centrifugation of the PCR reactions for one minute, 2.5  $\mu$ L of  
121 the SAP/EXO master mix were added to each PCR reaction and ran the SAP/EXO program.

122 During the ASPE reaction, multiple rounds of primer extension were performed,  
123 where biotinylated-dCTP was incorporated into single stranded extension products. Primers  
124 with a match at the 3' terminus (where the SNP was supposed to be found by the software or  
125 artificially imposed) were preferentially extended. The reagents used were TAQ buffer 10X  
126 [2.0  $\mu$ L/reaction (1X)]; MgCl 50 mM [0.5  $\mu$ L/reaction (1,58 mM)]; dAGTTPs 100  $\mu$ M [1.0

127  $\mu\text{L}/\text{reaction}$  (5  $\mu\text{M}$ ); Biotin 14-dCTP 400  $\mu\text{M}$  [0.25  $\mu\text{L}/\text{reaction}$  (5  $\mu\text{M}$ ); ASPE primer mix 5  
128  $\mu\text{M}$  [1  $\mu\text{L}/\text{reaction}$  (5 pmol)]; water N/A [9.25 (N/A)] and Platinum TAQ 5 units/ $\mu\text{L}$  [0.2  $\mu\text{L}/$   
129 reaction (1 unit)]

130 A total of 14  $\mu\text{L}$  ASPE premix was put into each PCR tube, the PCR/SAP/EXO  
131 reactions centrifuged for one minute and 6  $\mu\text{L}$  of her to the ASPE premix. The ASPE program  
132 runs as follows: 96  $^{\circ}\text{C}/120$  sec; 40 cycles (94  $^{\circ}\text{C}/30$  sec; 54  $^{\circ}\text{C}/30$  sec; 74  $^{\circ}\text{C}/60$  sec); 4  
133  $^{\circ}\text{C}/\text{indefinitely}$ .

#### 134 **VeraCode-ASPE hybridization using Streptavidin-Alexafluor**

135 The ASPE primer extension products were hybridized to the VeraCode mixture of  
136 different holographic and barcoded beads (Illumina) (stored in 70% EtOH, removed from the  
137 freezer and kept at room temperature) that had been displaced into a subset stripwell plate.

138 The first step was to exchange the EtOH in the wells with hybridization buffer, made  
139 by 3X Saline Sodium Citrate-Tween 0.1% (3X SSC-T 0.1%). Added 150  $\mu\text{L}$  of the  
140 hybridization buffer to the kitted VeraCode beads and mix briefly at  $\pm 23$   $^{\circ}\text{C}$  for three minute  
141 at 100 rpm by shaking, then left on plate for  $\pm 30$  minutes to allow the beads to settle. Using  
142 the 8-channel aspiration manifold, the buffer/EtOH mix was carefully and thoroughly  
143 aspirated.

144 The ASPE reaction was centrifuged for one minute, then 5  $\mu\text{L}$  were added to a well of  
145 pooled beads and hybridized for one hour at 45  $^{\circ}\text{C}$  with agitation (1000 rpm/setting of 100) in  
146 a thermal shaker.

147 The hybridization reaction was fluorescently labeled, using streptavidin coupled to a  
148 fluorescent label (AlexaFluor) that excites at 532 nm or 635 nm and emits between 670 nm–  
149 770 nm (Figure 1). Assumed 50  $\mu\text{L}$  per well, from the solution of 3.75  $\mu\text{L}$  Streptavidin-Alexa-  
150 647/1000  $\mu\text{L}$  Hybridization buffer.

151 The plate of hybridized beads was centrifuged for two minutes at 2000 rpm and  
152 incubated for 15 minutes at room temperature covered with foil, to minimize exposure to light

153 while shaking. Further, uncovered and scanned the VeraCode bead plate on the BeadXpress  
154 Reader®.

155 The BX Reader® contains a red laser and a green laser. The reading was performed in  
156 red laser specified at a maximum 10 mW. The results for each well/sample were obtained in  
157 Relative Fluorescence Units (RFU).

158 **Hybridization based ASPE–ELISA (System streptavidin-AP on single specific**  
159 **digoxigenin-oligonucleotide captured on anti-Dig coated plates)**

160 In the first step, wells of a microtiter plate were coated with 25 µL of Anti-  
161 Digoxigenin antibody (Roche) diluted in 1X PBS-T 0.1% or Carbonate buffer (pH 9.6), in  
162 concentration 1:50 and maintained for four hours at room temperature or O/N at 4 °C. The  
163 plate was washed twice for three minutes with 60 µL 1X PBS + 0.1 % Tween-20 to eliminate  
164 the antibody.

165 Afterwards, nonspecific adsorption sites were blocked with blocking solution, using  
166 50 µL of blocking: PBS + BSA/NFDM [blockers of non-specific protein-surface binding]  
167 (150 mg + 150 mg in 10 mL), and kept under the same conditions mentioned above. Then,  
168 washed twice for three minutes with Hybridization buffer. The next washes and other  
169 procedures were performed with this same buffer.

170 Subsequently in each single well were added 25 µL of each 3'end digoxigenin-labeled  
171 specific oligonucleotides (reverse complementary to the indexing tag sequence on the  
172 extension primer and extended at 3' end by Terminal deoxynucleotide Transferase and Dig-  
173 dUTP) for the viruses GVA, GLRaV-2, -3, GFLV and GRSPaV diluted in buffer in the ratio  
174 1:100 [25 µL/well], leaving O/N at 4 °C. Completing this time, washed twice and 5 µL of  
175 biotinylated ASPE products were added for tube containing Hybridization buffer. The  
176 hybridization occurred for 1h at 45 °C while shaking. After the hybridization of ASPE and a  
177 washing with 100 µL of buffer during three times for three minutes, Streptavidin – alkaline



178 phosphatase conjugated [25  $\mu$ L/well] was added in the dilution 1:200, with a final extensive  
179 washing (4 x 3 times) (Figure 2).

180 The complexed enzyme was visualized with a soluble p-Nitrophenyl Phosphate  
181 (pNPP) substrate (1 mg/1 mL in substrate buffer pH 9.6), occurring subsequent colorimetric  
182 reaction. The reading was performed in ELISA plate reader at 405 nm or on the thermocycler  
183 CFX96 Real-time PCR System (BioRad) at 635 nm. The results were obtained in Optical  
184 Density (OD) and Relative Fluorescence Units (RFU).

### 185 **Hybridization based ASPE-ELISA (System NeutrAvidin<sup>TM</sup> Agarose Resins coated** 186 **plates ELISA)**

187 The assay began with the purification of biotinylated ASPE products using  $\mu$ spin  
188 Sephadex G25 in TE buffer to remove the unincorporated biotin-dCTP. For this, assumed 750  
189  $\mu$ L of Sephadex G25 in tubes of 1.5 mL containing filter, centrifuged for 15 seconds at 3000  
190 rpm or until completely dry, always in the same orientation.

191 In the centre of tubes were added 20  $\mu$ L ASPE products, 35  $\mu$ L water and 6  $\mu$ L 10X  
192 PBS-T 0.1% buffer, centrifuged for one minute at 3000 rpm. Six tubes of 1.5 mL were  
193 prepared with 50  $\mu$ L agarose beads Neutravidin-conjugated (Pierce® NeutrAvidin®),  
194 centrifuged at 1.2k rpm for one minute and its supernatant was removed.

195 The purified biotinylated ASPE products were added (25  $\mu$ L ASPE product + 75  $\mu$ L  
196 1X PBS-T 0.1% buffer), shaking for two hours at room temperature. Centrifuged at 2500 rpm  
197 for two minutes and washed with 200  $\mu$ L 1X PBS-T 0.1% buffer three times for three  
198 minutes.

199 The hybridization with specific complementary oligonucleotides (always extended  
200 with Dig-dUTP at 3' end) occurred in incubator for bacteria at 25 °C/250 rpm O/N. After  
201 added 200  $\mu$ L of oligonucleotides for GVA, GLRaV-3 and GFLV and the mixture of all  
202 diluted in Hybridization buffer at 1:50, centrifuged at 2500 rpm for one minute, washing with  
203 this buffer three times for three minutes.

204 Finally, the antibody Anti-Digoxigenin-AP conjugate diluted at 1:250 in 1X PBS-T  
205 0.1% was placed in plate and held for one hour at room temperature, washed twice for three  
206 minutes and added pNPP in substrate buffer. The samples were read in ELISA plate reader at  
207 405 nm (Figure 3).

## 208 **RESULTS**

### 209 **Detection of Single Nucleotide Polimorphisms by ASPE methods**

#### 210 **Analysis performed in BeadXpress (Bx) Reader**

211 The samples tested in this experiment have been previously analyzed by RT-PCR  
212 (same primers for this test or Gambino and Gribaudo, 2006), to GLRaV-1, -2, -3, GVA, GVB,  
213 GFLV, GFkV and GRSPaV. For these viruses, we selected the positive and negative controls  
214 in this experiment. An analysis was done for the same mentioned viruses using six trials: three  
215 source plants (Aleatico I, Bianco di Alessano and Italia) were analyzed (i) each separately, (ii)  
216 mixing them all, (iii) one ASPE reaction from the PCR mix without the addition of cDNA  
217 (PCR negative sample) and (iv) wells containing only buffer 1X PBS-T 0.1%.

218 This test showed a high sensitivity and reliability. Considering a minimum of 150  
219 RFU recommended by the BioRad analysis software, for the samples to be considered  
220 positive, we observed the presence of viruses in all samples when analyzed by this test. Some  
221 presented a lower value such as GLRaV-1, GVB and GFLV, for all samples. GVA showed a  
222 higher value for sample Italia. Moreover, we obtained very high values of RFU analyzed for  
223 the other viruses (Figure 4).

224 In wells where there were negative controls (no DNA and 1X PBS buffer) the RFU  
225 was below the recommended minimum, confirming the absence of viral template and in the  
226 treatments used as negatives control. The minimum observed RFU value was approximately  
227 33 (no DNA) and a maximum of 8600 RFU (mixing samples) (Figure 4).

#### 228 **Analysis performed in the thermocycler Real-time PCR System (BioRad)**

229           When reading was performed on the thermocycler CFX96 Real-time PCR System  
230 (BioRad), we obtained a different answer. This time, a higher number of varieties were tested  
231 Aleatico I, Aleatico II, Bianco di Alessano, Gaglioppo, Greco di Tufo, Moscato Saraceno and  
232 Verdeca (Table 1) and a healthy grapevine control, for GVA, GLRaV-2, -3, GFLV and  
233 GRSPaV.

234           In the present analysis, all of them showed a high RFU, including the sample used as a  
235 negative control, ranging from 1300 (minimum value) to 3336 (maximum value) (Figures 5,  
236 6, 7, 8 and 9.

### 237 **Analysis performed in an ELISA plate reader**

238           We did four tests using the Streptavidin-AP coated ELISA plates and NeutrAvidin  
239 Agarose Resins in ELISA plates Systems and obtained positive results. In the tests, the  
240 samples Aleatico I, Aleatico II, Greco di Tufo and Moscato Saraceno were included. The  
241 viruses studied were GVA, GLRaV-3 and GFLV.

242           The Optical Density (OD) in the tests varied from approximately 0.140 to 0.350  
243 (Figure 10) for the first system (Streptavidin-AP coated ELISA plates) and 0.122 (1X PBS  
244 1:10) to approximately 2.5 in the second system (NeutrAvidin Agarose Resins in ELISA  
245 plates) (Figure 11, 12 and 13). Comparing the sensitivity of both systems, we observed that  
246 NeutrAvidin was more efficient.

### 247 **DISCUSSION**

248           The results obtained showed the sensitivity of the three systems used focusing on the  
249 detection of virus RNA through an ASPE cDNA system. The reading performed at BX reader  
250 (VeraCode beads) showed to be the most sensitive, followed by readings of end point  
251 fluorescence bound to ASPE reaction mix in thermocycler and, finally, ELISA plate reader  
252 when NeutrAvidin conjugation of biotinylated ASPE reactions was used.

253           The sensitivity of the test or system adopted may be influenced by several factors. The  
254 intensity of fluorescence signal depends on the conditions to which the components used

255 during the development of the technique are submitted, ranging from sample collection to the  
256 type of instrument on which analyses are performed.

257 For instance, the sensitivity and efficiency of hybridization depend on the probe  
258 construction and hybridization conditions; the type and efficiency of probe labeling; the tissue  
259 preparation (fixation, embedding), which must allow the retention of the hybridization target  
260 and/or the hybridized products; and the method used for signal detection (Chevalier et al.,  
261 1997).

262 Likewise, in an assay seeking a fluorescence-based microplate method for screening  
263 isolates of *Listeria monocytogenes* for the ability to adhere to abiotic surfaces, the highest  
264 fluorescence levels were obtained in 15 min at each of the substrate incubation temperatures  
265 examined, with all decreasing significantly after this time (Gamble and Muriana, 2007)

266 Often failures may occur during the extraction of nucleic acid desired. Furthermore,  
267 the choice of reactants and the amounts to be utilized, the cycle used for the reactions can  
268 positively or negatively influence the response of the analysis. Therefore, it is not always  
269 possible to meet all the criteria that lead to a good conduct of stages of viral detection at a  
270 single time.

271 There are no established minimum RFU threshold value for laboratories in general, in  
272 other words, each laboratory establishes its own threshold levels in a particular way.  
273 Considering that the a positive sample reading is at least twice as large as that of the negative  
274 control, all samples used as positive control showed to be positive, however, we can also get a  
275 false positive, as observed for the healthy samples, used as a negative control in the tests  
276 performed on the thermocycler CFX96 Real-time PCR System (BioRad). In this case, this  
277 could be due to high background from the reagents used.

278 During the tests, we performed a multiplex with the most important viruses that cause  
279 fanleaf degeneration, leafroll and rugose wood complex diseases. We simulated *in vitro* by  
280 preparing PCR and ASPE reactions, for each virus separately and more than one virus

281 simultaneously, aiming at the detection of the same in individual and mixed samples. When  
282 we tested more than one virus in a sample or mixing samples, we used more than one  
283 oligonucleotide per reaction. The amount of them separately was distributed equally to reach  
284 the final recommended oligonucleotide concentration, achieving the final volume for each  
285 reaction such as a reaction containing a single oligonucleotide. In both cases sought to  
286 specific detection of virus studied. In reactions containing more than one oligonucleotide, the  
287 antibody was used for specific detection of each labeled oligonucleotide present in the  
288 reaction, so a single well was used to discriminate the coupled hybridization.

289         The viruses in grapes may occur alone or in combination with other viruses causing  
290 mixed infections. In the analyzes we confirmed the presence of more than one virus in all  
291 analyzed (known) grapevine samples. It was possible to observe that in both simplex analysis  
292 as well in multiplex.

293         The DNA and RNA fragments of variable length (“Probes”) are highly specific  
294 duplexes with a complementary nucleic acid strand (termed hybridization). When a label is  
295 attached to such a hybridization probe it can thus efficiently serve for detection of a defined  
296 DNA or RNA target sequence.

297         The use of multiplex amplification facilitates multiple targets in a single reaction,  
298 reducing the time and cost of the experiment and the multiprobe is a new tool for rapid  
299 detection and identification of pathogens in the family, genera and species.

300         Multiplex arrays using both specific and degenerate primers and the systems–Real  
301 Time RT-PCR and a highly specific multiplexed target specific primer extension showed that  
302 100% specificity, sensibility and reproducibility for species in the genus *Pospiviroid* indexing  
303 (Brunschot et al., 2014).

304         Specific or degenerate primers have been used in grapevine virus detection by real  
305 time RT-PCR (Saldarelli et al, 1998; Dovas and Katis, 2003) or in end point detection systems  
306 (like that using nanobeads as the BeadXpress system from Illumina; Lin et al., 2009;

307 Kitamura-Maramatsu et al., 2012) in a multiplex assay format for the analysis of viruses in the  
308 same test.

309 Recent applications of real time RT-PCR (Osman et al., 2008; Pacifico et al., 2011; Al  
310 Rwahnih et al., 2012; Osman et al., 2012; Zhang et al., 2013b) or oligonucleotide array (Engel  
311 et al., 2010; Thompson et al., 2012) to grapevine virus detection disclose the perspectives of  
312 either multiplex and quantitative analysis.

313 Here we obtained the most effective results when used NeutrAvidin compared to  
314 streptavidin. This may be due to the fact that it is ideal for capturing biotin-labeled molecules  
315 without interference from nonspecific binding. It is deglycosylated avidin, which reduces  
316 lectin binding to undetectable levels while retaining stability and biotin-binding affinity  
317 (Hiller et al., 1987; Holmstrom et al., 1993; Ferre-Aubineau et al., 1995; Denlinger et al.,  
318 2001; Simon et al., 2004).

319 It was presented in a study new methodologies for the immobilization of the avidin  
320 class protein NeutrAvidin onto solid supports, by techniques that are capable of allowing the  
321 protein to retain its biological activity. The authors used two different approaches to  
322 immobilize NeutrAvidin onto polymer surfaces. This may be advantageous for cases such as  
323 biosensors where a low background signal is required (Vermette et al., 2003).

324 The Streptavidin - AP coated plates ELISA System, although less sensitive in this  
325 experiment, was anyway efficient. Streptavidin has a very high binding affinity for biotin, and  
326 a conjugate of streptavidin is commonly used together with a conjugate of biotin for specific  
327 detection of a variety of proteins, protein motifs, nucleic acids, and other molecules (Liu et  
328 al., 2008; Richens et al., 2009; Salaita et al., 2010; Zhu et al., 2010; Kodama et al., 2012).

329 An analysis of DNA samples from 68 individuals by Single Base Extension-ELISA  
330 method using streptavidin-coated nanoparticles was performed and the results demonstrated  
331 that the method was 100% in accordance with DNA sequencing (Liu et al., 2011).

332 The principle underlying magnetic bead hybridization tests is equal as that of PCR-  
 333 ELISA tests, but the streptavidin-coated magnetic beads is less costly, can be reused by  
 334 washing with an alkaline solution (Tonosaki et al., 2013).

335 The application of sensitive and fast detection tools as the ASPE methods will help  
 336 greatly the improvement of yields and quality of production for table and wine grape. Our  
 337 work shows the preliminary efficiency of three systems that can provide, when applied on a  
 338 larger scale, fast and satisfactory results, mainly working on a large number of samples that  
 339 can be analyzed for several viruses at once.

340 It is necessary to have a clear control of virus sanitary status, mainly in grapevine  
 341 propagation materials distributed to growers by nurseries and, according national and  
 342 international mandatory regulations (like in European Union) more than a single virus should  
 343 be checked. In the paper presented, we managed to overcome the difficulties found and had  
 344 the confirmation that the tests were positively sensitive and can be routinely used for  
 345 analytical detection of grapevine viruses.

#### 346 ACKNOWLEDGEMENTS

347 To CAPES by the granting of scholarship for a PhD abroad sandwich and to the laboratory  
 348 staff for their assistance provided.

349 **Table 1.** Mixed-infected grapevine accessions used as positive controls in the ASPE assays

Order	Varieties	FL	GVA	GVB	Fk	LR-1	LR2	LR-3	RSP
1	Aleatico I	v	v		v	v	v	v	v
2	Aleatico II	v			v	v		v	v
3	Bianco di Alessano	v	v	v	v			v	v
4	Gaglioppo		v		v		v	v	v
5	Greco di Tufo	v				v		v	v
6	Moscato Saraceno	v	v				v		v
7	Verdeca		v			v			v
8	Italia M10L	v			v	v		v	v

350

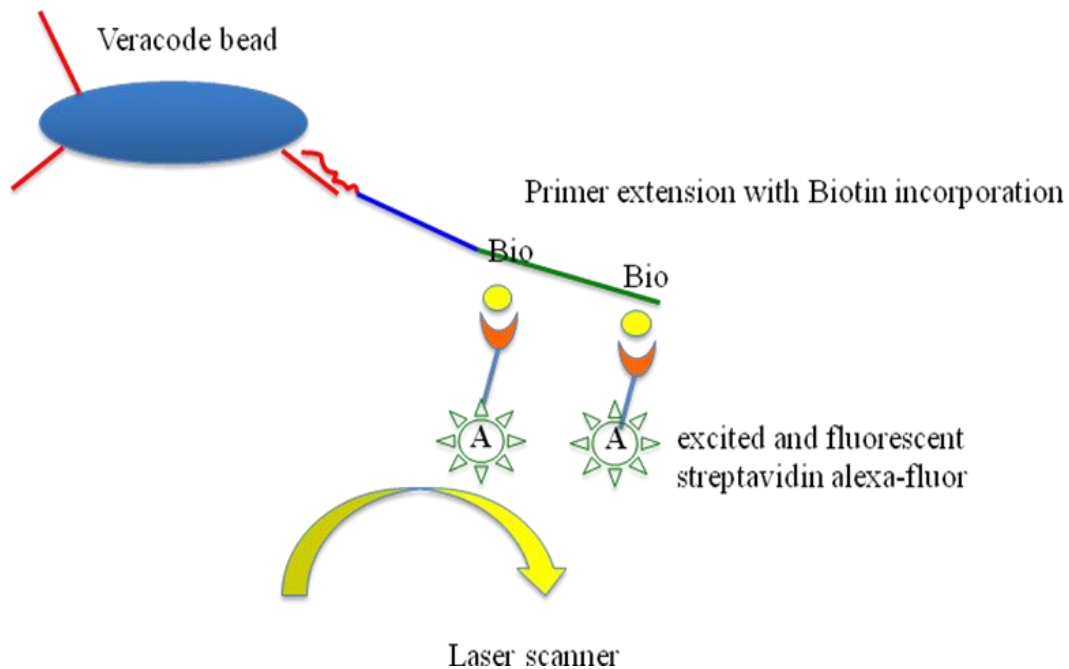
351 **Table 2.** Primers and probes used in the Allele Specific Primer Extension (ASPE) genotyping  
 352 assays

<b>GVA</b>	
<b>Primer set</b>	GVA s: CGACCGAAATATGTACCTGAA GVA as: tCTCCATAATGAACCGCCTT
<b>Amplicon</b>	82 bp
<b>Probe seq (code)</b>	GVA pe 3518: GCATCGGAATCTCCCAGTCAGAcGGGTACATCGCCTT
<b>Veracode bead</b>	VeraCode: 301-6402/IllumiCode: 3518
<b>Complement</b>	TCTGACTGGGAGATTCCGATGC
<b>annealing/hybr seq</b>	
<b>GVB</b>	
<b>Primer set</b>	GVB s: AGAACGTCTTCACAGCACAA GVB as: CCTAGACTCACCCATATACTTAG
<b>Amplicon</b>	121 bp
<b>Probe seq (code)</b>	GVB pe 3155: AGAGCAGCATTACGTTCCCTCAGGTGGTAACTCATAG
<b>Veracode bead</b>	VeraCode: 301-6273/IllumiCode: 3155
<b>Complement</b>	GAGGGAACGTGAATGCTGCTCT
<b>annealing/hybr seq</b>	
<b>GLRaV-1</b>	
<b>Primer set</b>	GLRaV-1 s: GTGGCAACTGCTATTTCCAC GLRaV-1 as: GCCAAGAAGAAGTCCGTAAG
<b>Amplicon</b>	92 bp
<b>Probe seq (code)</b>	GLRaV-1 pe 42: GGCACTTCGCACGGGTTACGAAtgTGCTGAAGTGATG
<b>Veracode bead</b>	VeraCode: 301-5440/IllumiCode: 42
<b>Complement</b>	TTCGTAACCCGTGCGAAGTGCC
<b>annealing/hybr seq</b>	
<b>GLRaV-2</b>	
<b>Primer set</b>	GLRaV-2 s: CAAATAGTTTCGGAGAGAGGAATG GLRaV-2 as: GCGATACAAAAGTCAACGTAAGc
<b>Amplicon</b>	148 bp
<b>Probe seq (code)</b>	GLRaV-2 pe 2296: GGGCGTATCAAGCTGGTTGAC <u>CT</u> CTCACTAGGTTCCAC
<b>Veracode bead</b>	VeraCode: 301-6208/IllumiCode: 2296
<b>Complement</b>	GGTCAACCAGCTTGATACGCCC
<b>annealing/hybr seq</b>	
<b>GLRaV-3</b>	
<b>Primer set</b>	GLRaV-3 s: GCGTCGTTGTTGAACAGAT GLRaV-3 as: GTACTTCACACCAACCTTCATC
<b>Amplicon</b>	150 bp
<b>Probe seq (code)</b>	GLRaV-3 pe 648: ACGTAACGCCGGTAACTCAGGtCGGTGGTACTCCAT
<b>Veracode bead</b>	VeraCode: 301-5664/IllumiCode: 648
<b>Complement</b>	ACCTGAGTTACCGGCGTTACGT
<b>annealing/hybr seq</b>	
<b>GFLV</b>	



<b>Primer set</b>	GFLV s: AAATTCGGTGTTCAGACTCCA GFLV as: TGAGTTCACTCTTGACAAAGAAG
<b>Amplicon</b>	176 bp
<b>Probe seq (code)</b>	GFLV pe 4068: GGTTGCGAGAAAGTTGTCGTCTCgCAAACGGGTTTTCTC
<b>Veracode bead</b>	VeraCode: 301-6657//IllumiCode: 4068
<b>Complement</b>	GAGACGACAACCTTTCTCGCAACC
<b>annealing/hybr seq</b>	
<b>GFkV</b>	
<b>Primer set</b>	GFkV s: CTAGCTCTCGCTCTGACTCT GFkV as: TCATACCACAGGAACTGGAA
<b>Amplicon</b>	124 bp
<b>Probe seq (code)</b>	GFkV pe 6136: GCATACGGAACCAGGGATTGTAACACGAGGGTTGCG
<b>Veracode bead</b>	VeraCode: 301-7680//IllumiCode: 6236
<b>Complement</b>	GTTACAATCCCTGGTTCCGTATGC
<b>annealing/hybr seq</b>	
<b>GRSPaV</b>	
<b>Primer set</b>	GRSPaV s: CAGCTAATTGGGCCAAGAAaG GRSPaV as: CTCTCTTAACTCCACCCTTTg
<b>Amplicon</b>	114 bp
<b>Probe seq (code)</b>	GRSPaV 1432: TGATGGTAGGGTCCAACGCCTAGAATGAAAAGTTTGCAG
<b>Veracode bead</b>	VeraCode: 301-6168//IllumiCode: 1432
<b>Complement</b>	TAGGCGTTGGACCCTACCATCA
<b>annealing/hybr seq</b>	

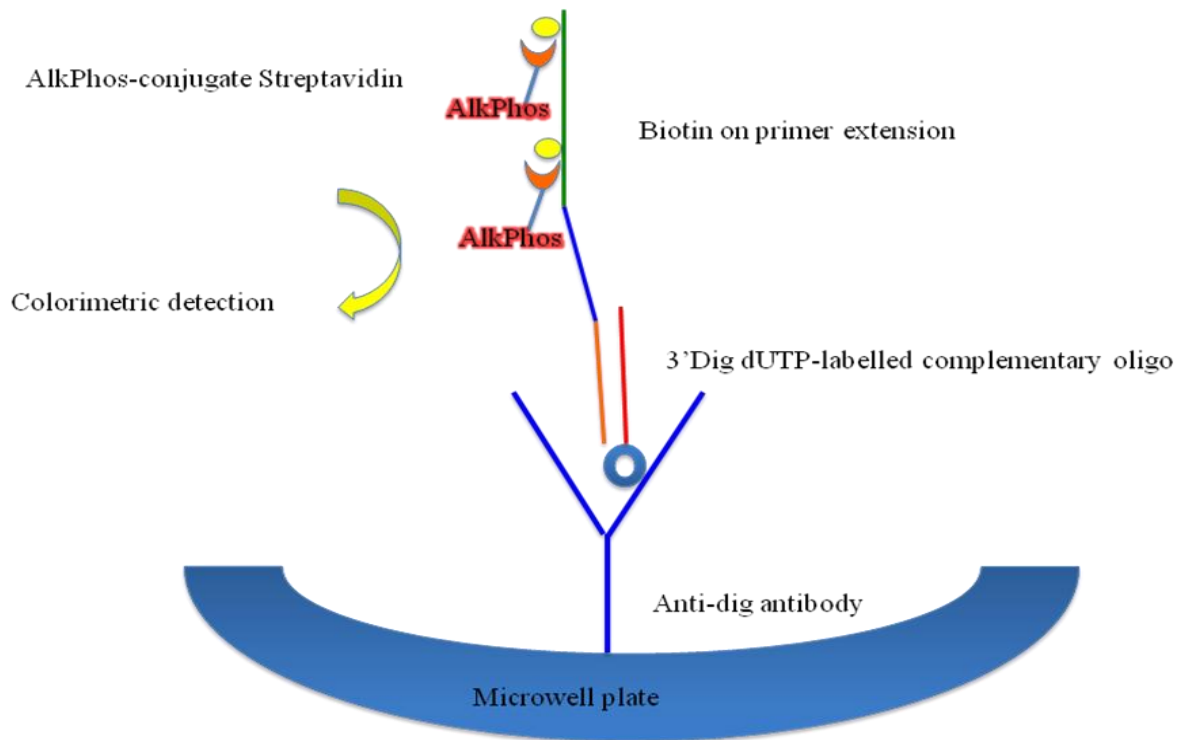
353



354

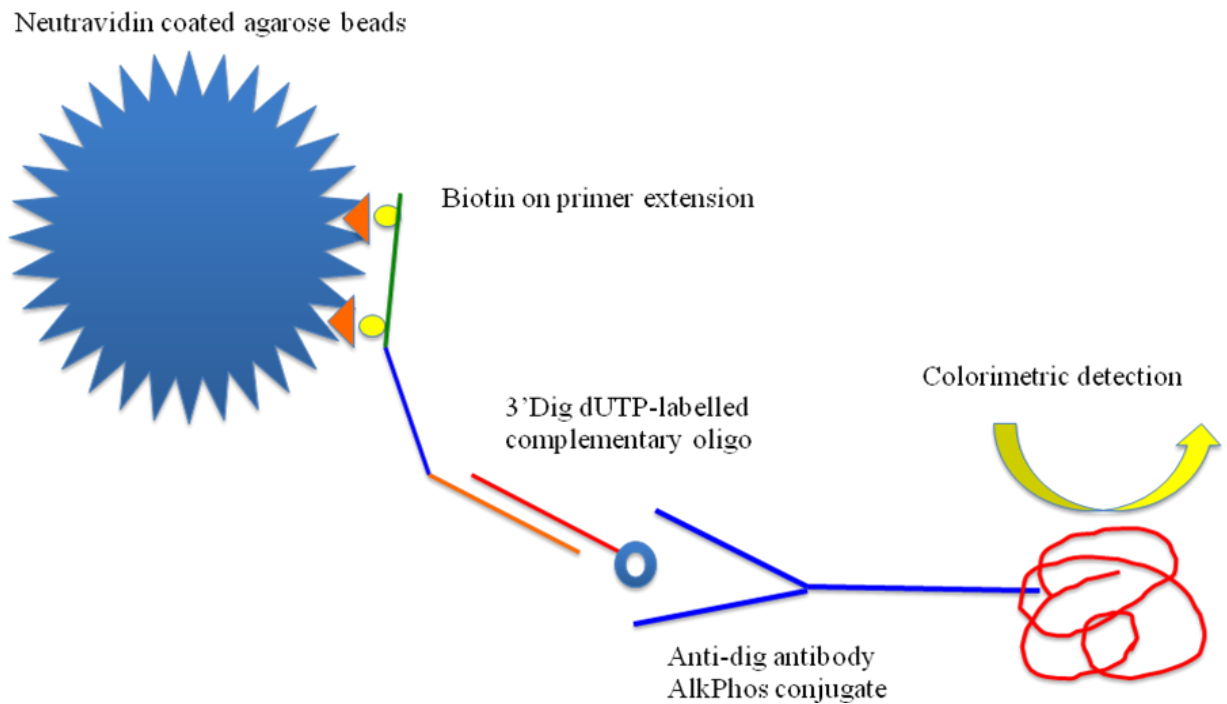
355 **Figure 1.** System oligonucleotide hybridization on VeraCode beads

356



357

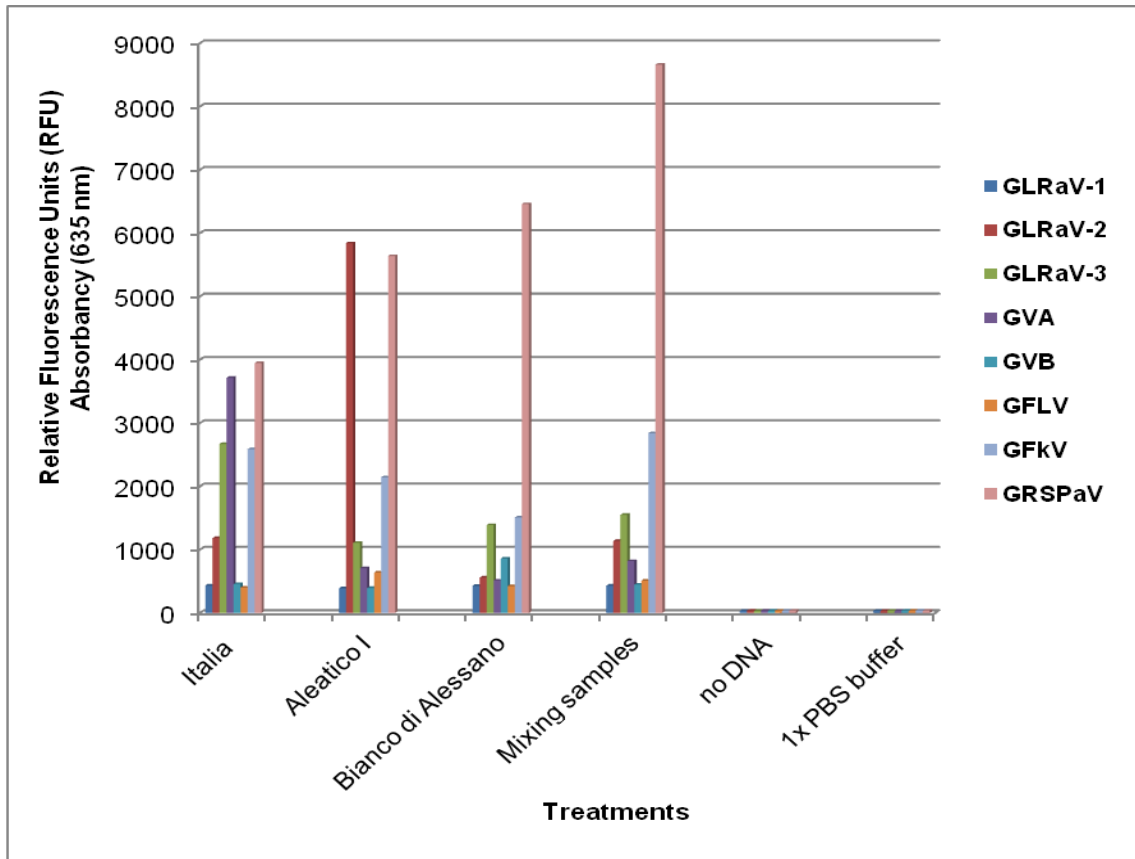
358 **Figure 2.** System Streptavidin-AP on anti-Dig-coated ELISA plates.



359

360 **Figure 3.** System liquid hybridization on NeutrAvidin Agarose resin and colorimetric  
361 reaction, detected in ELISA plates.

362



363

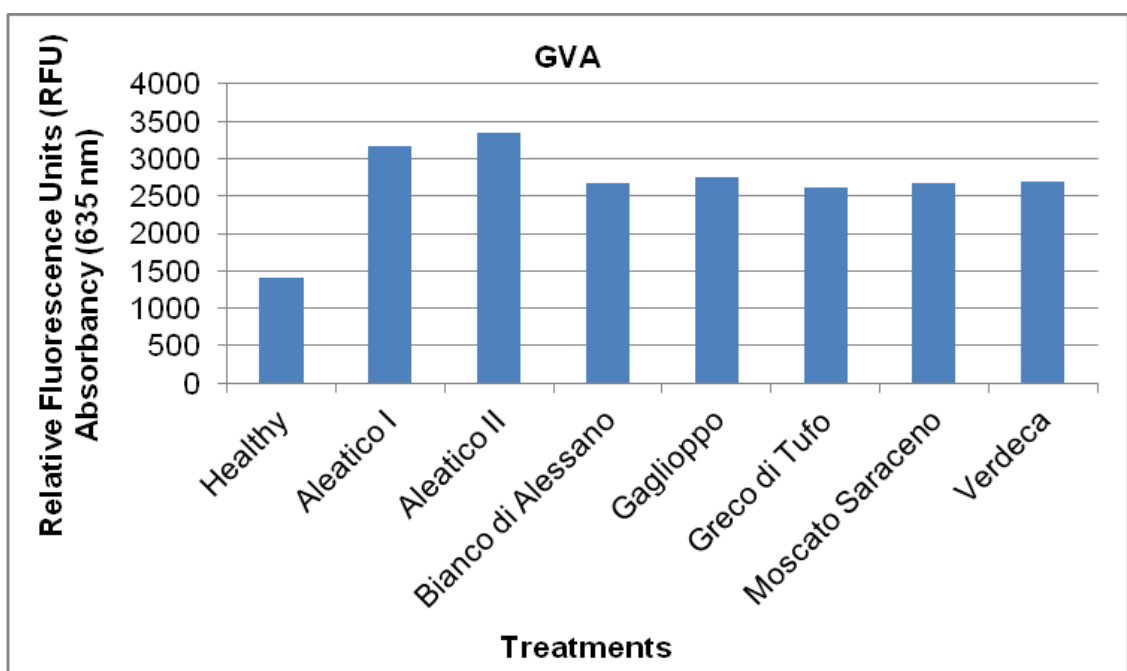
364

365

366

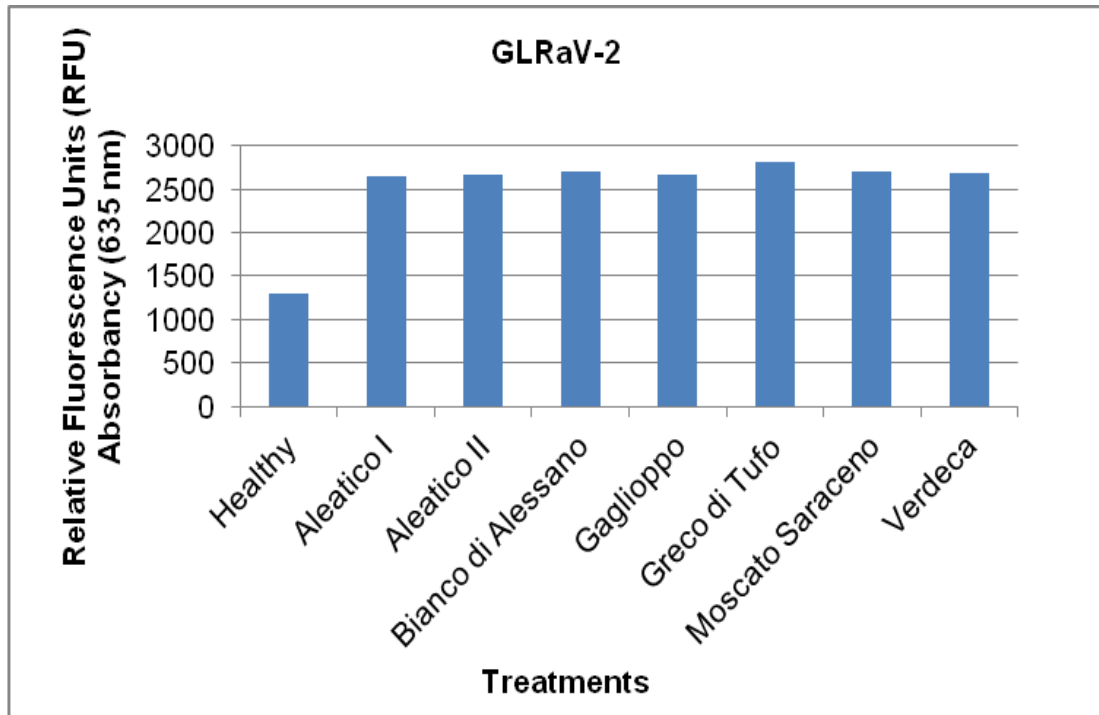
367

**Figure 4.** Values of RFU for analysis of the samples Italia, Aleatico I, Bianco di Alessano, mixing samples, no DNA and 1x PBS buffer obtained by Illumina beadexpress equipment at 635 nm, aiming to detect in simplex and multiplex the viruses GLRaV-1, -2, -3, GVA, GVB, GFLV, GFkV and GRSPaV.

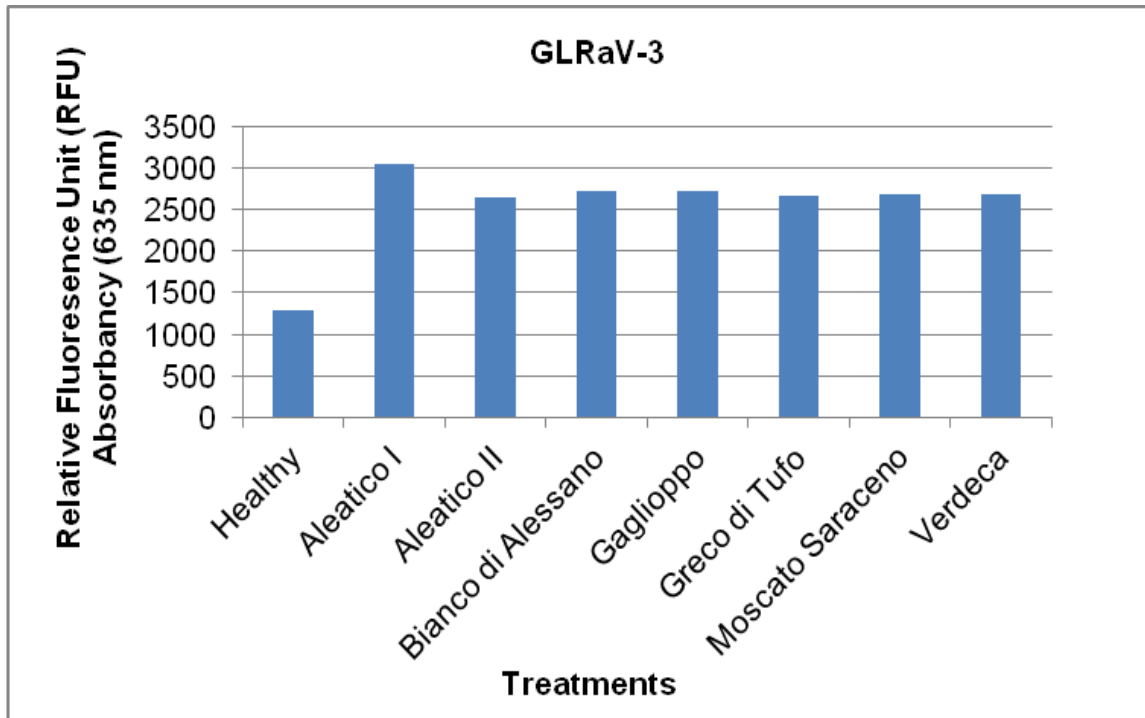


368

369 **Figure 5.** Values of RFU for analysis of the samples healthy, Aleatico I, Aleatico II,  
370 Bianco di Alessano, Gaglioppo, Greco di Tufo, Moscato Saraceno and Verdeca  
371 obtained by thermocycler Real-time PCR System (BioRad) equipment at 635 nm,  
372 aiming to detect the virus GVA.



373  
374 **Figure 6.** Values of RFU for analysis of the samples Healthy, Aleatico I, Aleatico II,  
375 Bianco di Alessano, Gaglioppo, Greco di Tufo, Moscato Saraceno and Verdeca  
376 obtained by thermocycler Real-time PCR System (BioRad) equipment at 635 nm,  
377 aiming to detect the virus GLRaV-2.



378

379

**Figure 7.** Values of RFU for analysis of the samples Healthy, Aleatico I, Aleatico II,

380

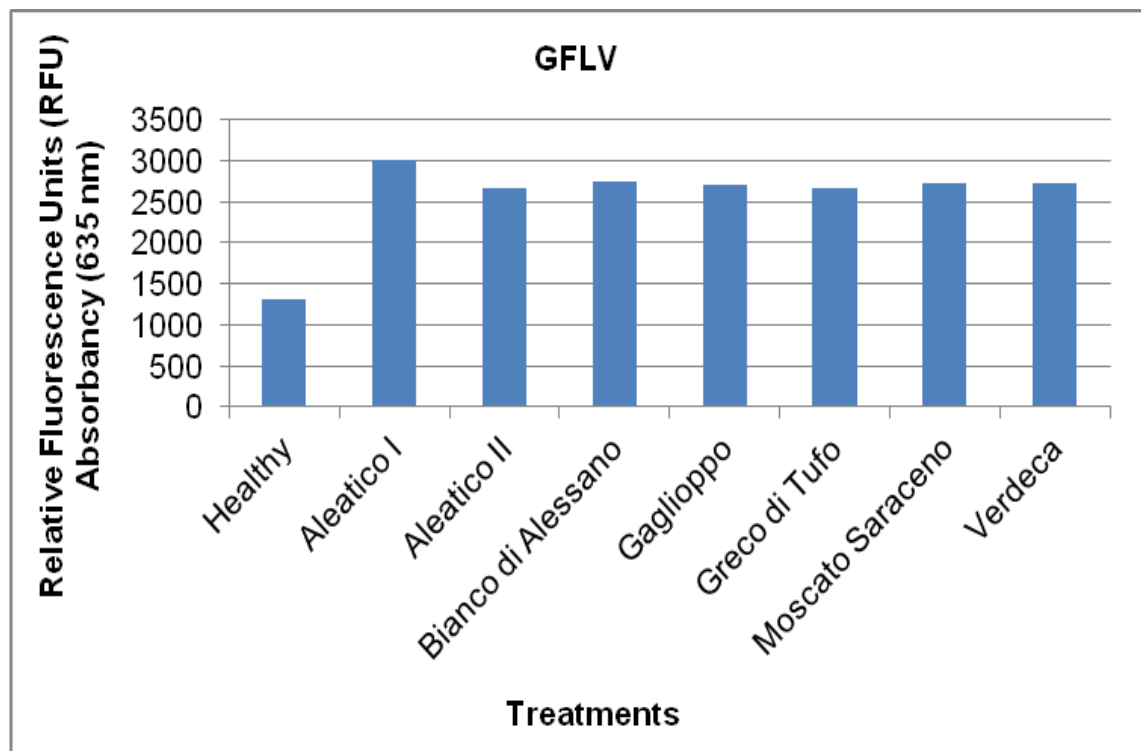
Bianco di Alessano, Gaglioppo, Greco di Tufo, Moscato Saraceno and Verdeca obtained

381

by thermocycler Real-time PCR System (BioRad) equipment at 635 nm, aiming to detect

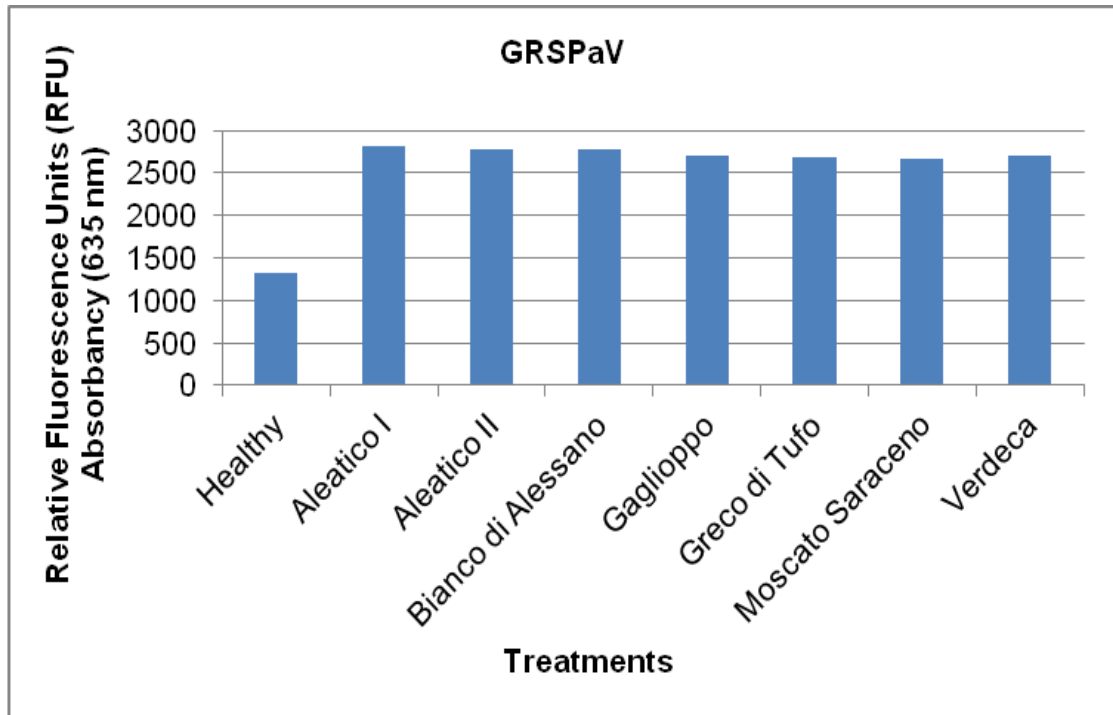
382

the virus GLRaV-3.

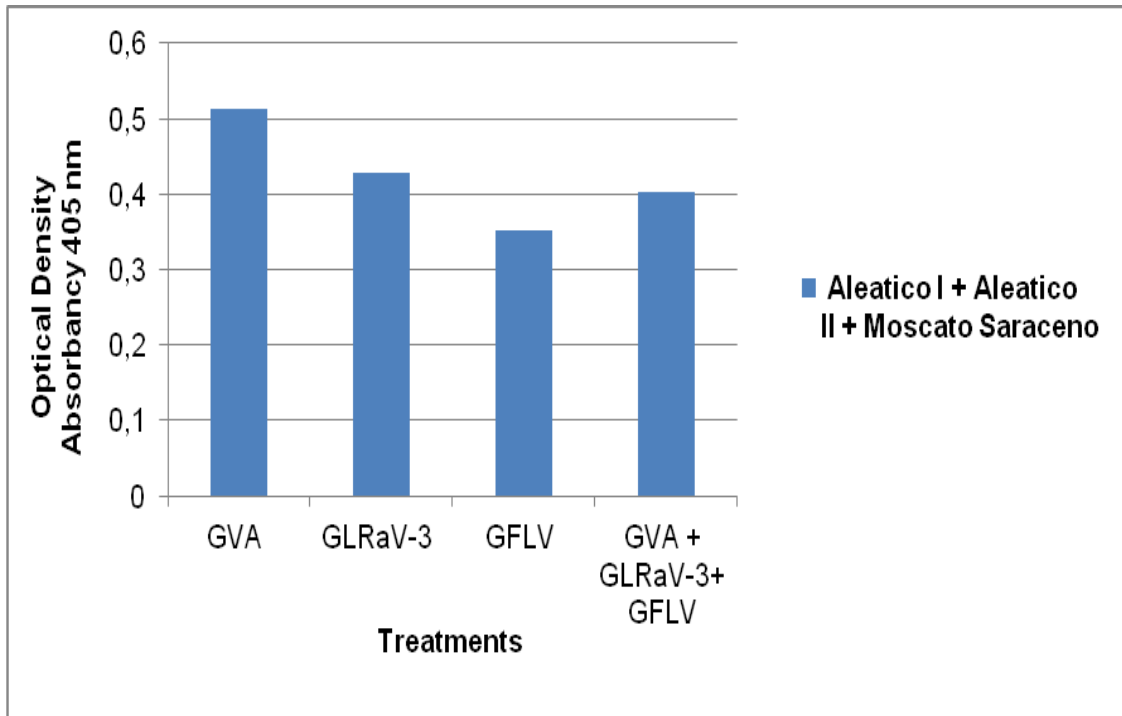


383

384 **Figure 8.** Values of RFU for analysis of the samples Healthy, Aleatico I, Aleatico II,  
385 Bianco di Alessano, Gaglioppo, Greco di Tufo, Moscato Saraceno and Verdeca  
386 obtained by thermocycler Real-time PCR System (BioRad) equipment at 635 nm,  
387 aiming to detect the virus GFLV.



388  
389 **Figure 9.** Values of RFU for analysis of the samples Healthy, Aleatico I, Aleatico II,  
390 Bianco di Alessano, Gaglioppo, Greco di Tufo, Moscato Saraceno and Verdeca  
391 obtained by thermocycler Real-time PCR System (BioRad) equipment at 635 nm,  
392 aiming to detect the virus GRSPaV.



393

394

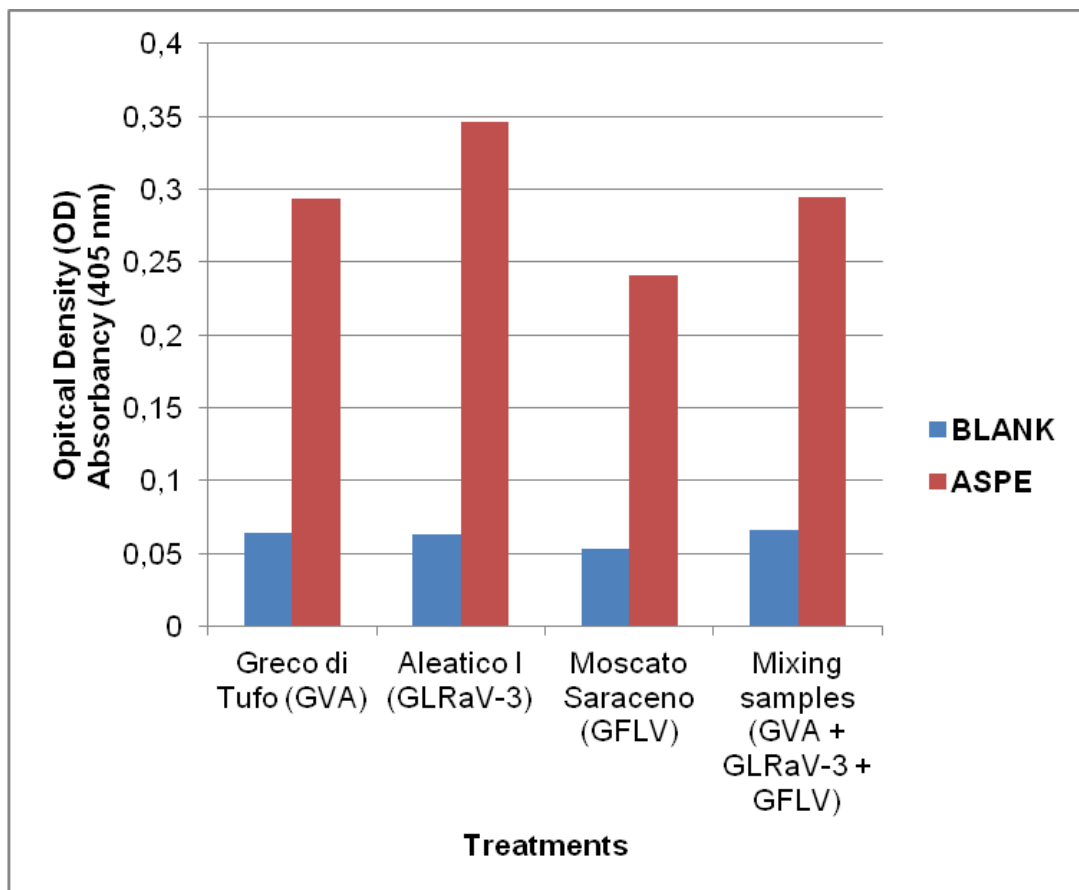
**Figure 10.** Values of OD for analysis in simplex and multiplex of the mixing samples

395

Aleatico I + Aleatico II + Moscato Saraceno obtained by ELISA plate reader equipment

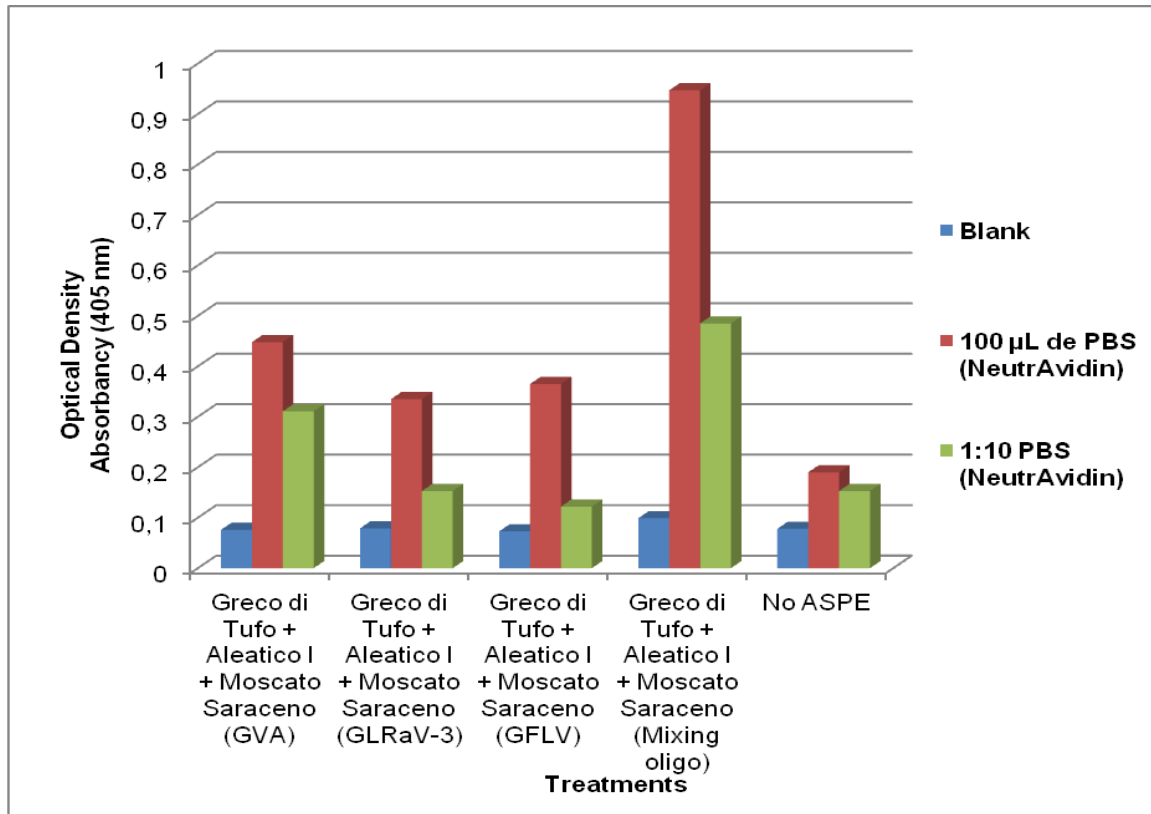
396

at 405 nm, aiming the detection of the virus GVA, GLRaV-3 and GFLV.



397

398 **Figure 11.** Values of OD for analysis in simplex and multiplex of the samples Greco  
 399 di Tufo, Aleatico I, Moscato Saraceno and mixing samples (Greco di Tufo + Aleatico  
 400 I + Moscato Saraceno) obtained by ELISA plate reader equipment at 405 nm, aiming  
 401 the detection of the virus GVA, GLRaV-3, GFLV.

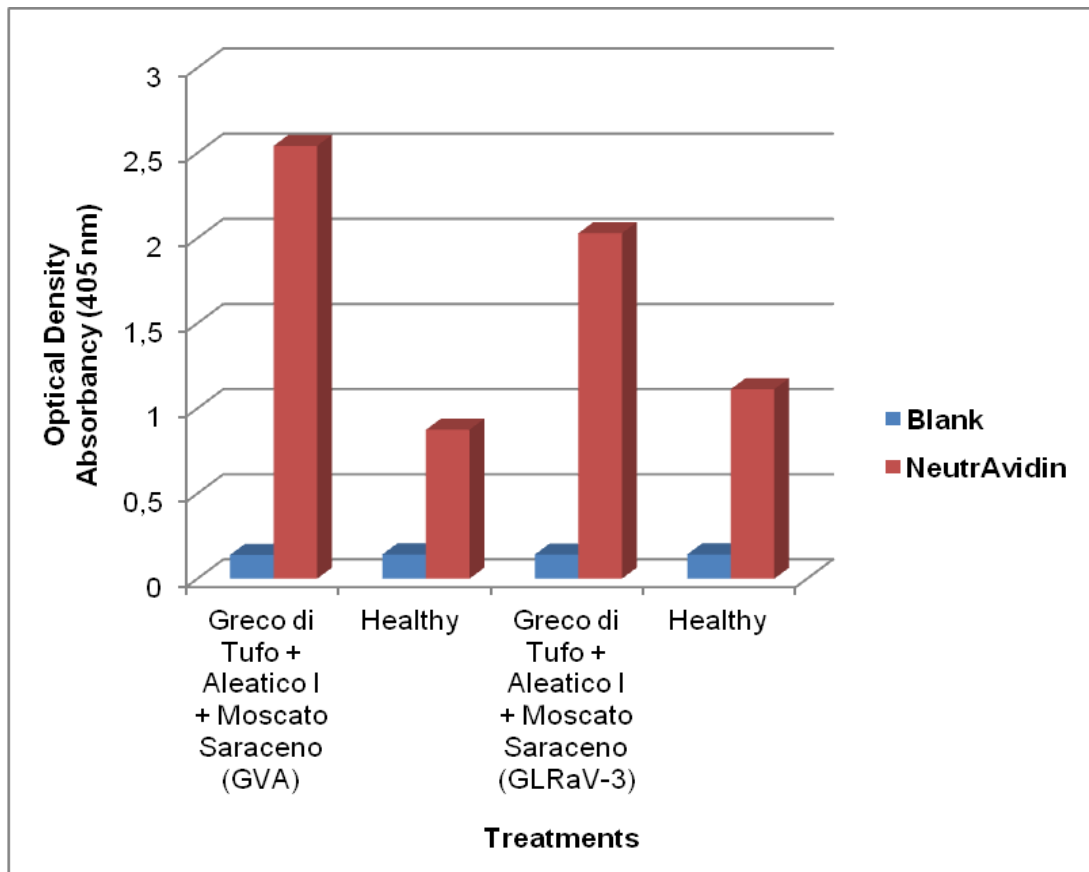


402

403 **Figure 12.** Values of OD for analysis in simplex and multiplex of the samples Greco di  
 404 Tufo, Aleatico I, Moscato Saraceno, mixing samples (Greco di Tufo + Aleatico I +  
 405 Moscato Saraceno) and no ASPE obtained by ELISA plate reader equipment at 405 nm,  
 406 aiming the detection of the virus GVA, GLRaV-3, GFLV.

407





408

409 **Figure 13.** Values of OD for analysis of the mixing samples (Greco di Tufo +  
 410 Aleatico I + Moscato Saraceno) and healthy sample obtained by ELISA plate reader  
 411 equipment at 405 nm, aiming the detection of the virus GVA and GLRaV-3.

## 412 REFERENCES

- 413 Al Rwahnih M., Osman F., Sudarshana M., Uyemoto J., Minafra A., Saldarelli P., Martelli G.,  
 414 Rowhani A., 2012. Detection of *Grapevine leafroll-associated virus 7* using real time qRT-  
 415 PCR and conventional RT-PCR. *Journal of Virological Methods* **179**: 383–389.
- 416 Bilodeau G.J., Lévesque C.A., de Cock A.W.A.M., Brière S.C., Hamelin R.C., 2007.  
 417 Differentiation of European and North American genotypes of *Phytophthora ramorum* by  
 418 real-time polymerase chain reaction primer extension. *Canadian Journal of Plant Pathology*  
 419 **29**: 408-420.
- 420 Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim-van P.M.D., Van der J.N., 1990.  
 421 Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*  
 422 **28**: 495-503.

- 423 Brunschot S.L.V., Bergervoet J.H.W., Pagendam D.E., Weerdt M. de, Andrew D.W. G.,  
424 Drenth A., Vlucht R.A.A.van der., 2014. Development of a multiplexed bead-based suspension  
425 array for the detection and discrimination of *Pospiviroid* plant pathogens. *Plos One* **9**: 1-12.
- 426 Chevalier J., Yi J., Michel O., Tang X.M., 1997. Biotin and digoxigenin as labels for light and  
427 electron microscopy in situ hybridization probes: Where Do We Stand? *Journal of*  
428 *Histochemistry & Cytochemistry* **45**: 481–491.
- 429 Denlinger L.C., Fisette P.L., Sommer J.A., Watters J.J., Prabhu U., Dubyak G.R., Proctor  
430 R.A., Bertics P.J., 2001. Cutting Edge: The nucleotide receptor P2X7 contains multiple  
431 protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial  
432 lipopolysaccharide. *Journal of Immunology* **167**:1871-1876.
- 433 Dovas C.I., Katis N.I., 2003. A spot nested RT-PCR method for the simultaneous detection of  
434 members of the *Vitivirus* and *Foveavirus* genera in grapevine. *Journal of Virological Methods*  
435 **107**: 99-106.
- 436 Engel E.A., Escobar P.F., Rojas L.A., Rivera P.A., Fiore N., Valenzuela P.D.T., 2010. A  
437 diagnostic oligonucleotide microarray for simultaneous detection of grapevine viruses.  
438 *Journal of Virological Methods* **163**: 445–451.
- 439 Ferre-Aubineau V., Imbert-Marcille B.M., Raffi F., Besse B., Loirat R., Billaudel S., 1995.  
440 Colorimetric microtiter plate hybridization assay using monoclonal antibody for detection of  
441 an amplified human immunodeficiency virus target. *Journal of Virology Methods* **55**: 145-  
442 151.
- 443 Foissac X., Svanella-Dumas L., Dulucq M.J., Gentit P., Candresse T., 2001. Polyvalent  
444 detection of fruit tree tricho, capillo and foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated  
445 and inosine containing primers (PDO RT-PCR). *Acta Horticulturae* **550**: 37-43.
- 446 Gambino G., Gribaudo I., 2006. Simultaneous detection of nine grapevine viruses by  
447 multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification of a plant  
448 RNA as internal control. *Phytopathology* **96**: 1223-1229.

- 449 Gambino G., Perrone I., Gribaudo I., 2008. A rapid and effective method for RNA extraction  
450 from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical analysis* **19**: 520-  
451 525.
- 452 Gamble R., Muriana P.M., 2007. Microplate fluorescence assay for measurement of the  
453 ability of strains of *Listeria monocytogenes* from meat and meat-processing plants to adhere  
454 to abiotic surfaces. *Applied and environmental microbiology* **73**: 5235–5244.
- 455 Gruber R., 2013. Multiplex bead based immunoassays for the serodiagnosis of *Lyme*  
456 *Borreliosis*. *Journal of Bacteriology and Parasitology* **5**: 1-4.
- 457 Hiller Y., Gershoni J.M., Bayer E.A., Wilchek M., 1987. Biotin binding to avidin.  
458 Oligosaccharide side chain not required for ligand association. *Biochemical Journal* **248**: 167-  
459 71.
- 460 Holmstrom K., Rossen L., Rasmussen O.F., 1993. A highly sensitive and fast non-radioactive  
461 method for detection of polymerase chain reaction products. *Analytical Biochemistry* **209**:  
462 278-83.
- 463 Jun B.H., Kang H., Lee Y.S., Jeong D.H., 2012. Fluorescence-based multiplex protein  
464 detection using optically encoded microbeads. *Molecules* **17**: 2474-2490.
- 465 Kitamura-Muramatsu Y., Kusumoto-Matsuo R., Kondo K., Mori S., Saito S., Tsukahara Y.,  
466 Kukimoto I., 2012. Novel multiplexed genotyping of *Human papillomavirus* using a  
467 VeraCode-allele-specific primer extension method. *Microbiology and Immunology* **56**: 128-  
468 133.
- 469 Kodama T., Guerrero S., Shin M., Moghadam S., Faulstich M., du Lac S., 2012. Neuronal  
470 classification and marker gene identification via single-cell expression profiling of brainstem  
471 vestibular neurons subserving cerebellar learning. *Journal of Neuroscience* **32**: 7819-7831.
- 472 Konstantou J., Ioannou P.C., Christopoulos T.K., 2007. Genotyping of single nucleotide  
473 polymorphisms by primer extension reaction and a dual-analyte bio/chemiluminometric  
474 assay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **388**: 1747–1754.

- 475 Lin C.H., Yeakley J.M., Mcdaniel T.K., Shen R., 2009. Medium- to high-throughput SNP  
476 genotyping using VeraCode microbeads. *Methods Molecular Biology* **496**: 129-142.
- 477 Liu C.G., Calin G.A., Volinia S., Croce C.M., 2008. MicroRNA expression profiling using  
478 microarrays. *Nature Protocols* **3**: 563-578.
- 479 Liu G., Cheng Y., Zhao W., Jin Z., Shan H., Xu G., 2011. Single-base extension and ELISA-  
480 based approach for single-nucleotide polymorphisms genotyping. *Applied Biochemistry*  
481 *Biotechnology* **163**: 573–576.
- 482 Martelli G.P., Boudon-Padieu E., 2006. Directory of infectious diseases of grapevines and  
483 viroses and virus-like diseases of the grapevine: bibliographic report 1998-2004. Ciheam,  
484 Bari, Italy.
- 485 Merker J.D., O' Grady N., Gojenola L., Dao M., Lenta R., Yeakley J.M., Schrijver I., 2013.  
486 Feasibility of using microbeads with holographic barcodes to track DNA specimens in the  
487 clinical molecular laboratory. *PeerJ* **91**: 1-10.
- 488 Osman F., Leutenegger C., Golino D., Rowhani A., 2008. Comparison of low-density arrays,  
489 RT-PCR and real-time TaqMan® RT-PCR in detection of grapevine viruses. *Journal of*  
490 *Virological Methods* **149**: 292–299.
- 491 Osman F., Olineka T., Hodzic E., Golino D., Rowhani A., 2012. Comparative procedures for  
492 sample processing and quantitative PCR detection of grapevine viruses. *Journal of*  
493 *Virological Methods* **179**: 303–310.
- 494 Pacifico D., Caciagli P., Palmano S., Mannini F., Marzachì C., 2011. Quantitation of  
495 *Grapevine leafroll associated virus-1* and *-3*, *Grapevine virus A*, *Grapevine fanleaf virus* and  
496 *Grapevine fleck virus* in field-collected *Vitis vinifera* L. 'Nebbiolo' by real-time reverse  
497 transcription-PCR. *Journal Virological Methods* **172**: 1-7.
- 498 Pastinen T., Raitio M., Lindroos K., Tainola P., Peltonen L., Syvänen A.C., 2000. A system  
499 for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays.  
500 *Genome Research* **10**: 1031-1042.

- 501 Richens J.L., Lunt E.A., Sanger D., McKenzie G., O'Shea P., 2009. Avoiding nonspecific  
502 interactions in studies of the plasma proteome: practical solutions to prevention of nonspecific  
503 interactions for label-free detection of low-abundance plasma proteins. *Journal of Proteome*  
504 *Research* **8**: 5103-5110.
- 505 Salaita K., Nair P.M., Petit R.S., Neve R.M., Das D., Gray J.W., Groves J.T., 2010.  
506 Restriction of receptor movement alters cellular response: physical force sensing by EphA2.  
507 *Science* **327**: 1380-1385.
- 508 Saldarelli P., Rowhani A., Routh G., Minafra A., Digiario M., 1998. Use of degenerate primers  
509 in a RT-PCR assay for the identification and analysis of some filamentous viruses, with  
510 special reference to clostero- and vitiviruses of the grapevine. *European Journal of Plant*  
511 *Pathology* **104**: 945–950.
- 512 Shapero M.H., Zhang J., Loraine A., Liu W., Di X., Liu G., Jones K.W., 2004. MARA: a  
513 novel approach for highly multiplexed locus-specific SNP genotyping using high-density  
514 DNA oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Research* **32**: 1-9.
- 515 Simon M.D., Sato K., Weiss G.A., Shokat K.M., 2004. A phage display selection of engrailed  
516 homeodomain mutants and the importance of residue Q50. *Nucleic Acids Research* **32**: 3623-  
517 3631.
- 518 Sue M.J., Yeap S.K., Omar A.R., Tan S.W., 2014. Application of PCR-ELISA in molecular  
519 diagnosis. *BioMed Research International* **2014**: 1-6.
- 520 Syvänen A.C., 2001. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide  
521 polymorphisms. *Nature Reviews Genetics* **2**: 930-942.
- 522 Syvänen A.C., 2005. Toward genome-wide SNP genotyping. *Nature Genetics* **37**: 5-10.
- 523 Thompson, J.R., Fuchs, M., Fischer, K.F., Perry, K.L., 2012. Macroarray detection of  
524 grapevine leafroll-associated viruses. *Journal Virological Methods* **183**: 161–169.
- 525 Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G., 1997. The ClustalX  
526 windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality

- 527 analysis tools. *Nucleic Acids Research* **24**: 4876-4882.
- 528 Tonosaki K., Kudo J., Kitashiba H., Nishio T., 2013. Allele-specific hybridization using  
529 streptavidin-coated magnetic beads for species identification, *S* genotyping, and SNP analysis  
530 in plants. *Molecular Breeding* **31**: 419–428.
- 531 Vermette P., Gengenbach T., Divisekera U., Kambouris P.A., Griesser H.J., Meagher L.J.,  
532 2003. Immobilization and surface characterization of NeutrAvidin biotin-binding protein on  
533 different hydrogel interlayers. *Journal of Colloid and Interface Science* **259**: 13-26.
- 534 Vostrý M., 2009. Multiplex immunoassays: chips and beads. *The journal of the international*  
535 *federation of clinical chemistry and laboratory medicine* **20**: 1-4.
- 536 Zhang G., Cai F., Zhou Z., Devos J., Wagar N., Diallo K., Zulu I., Wadonda-Kabondo N.,  
537 Stringer J.S., Weidle P.J., Ndongmo C.B., Sikazwe I., Sarr A., Kagoli M., Nkengasong J.,  
538 Gao F., Yang C., 2013a. Simultaneous detection of major drug resistance mutations in the  
539 protease and reverse transcriptase genes for HIV-1 subtype C by use of a multiplex allele-  
540 specific assay. *Journal of Clinical Microbiology* **51**: 3666-3674.
- 541 Zhang J., Wang R., Song J., Luo Z., Yangand J., Lin F., 2013b. One-step multiplex RT-PCR  
542 for simultaneous detection of four viruses in Tobacco. *Journal of Phytopathology* **161**: 92–97.
- 543 Zhu X., Bidlingmaier S., Hashizume R., James C.D., Berger M.S., Liu B., 2010. Identification  
544 of internalizing human single-chain antibodies targeting brain tumor sphere cells. *Molecular*  
545 *Cancer Therapeutics* **9**: 2131-2141.
- 546

**CONCLUSÕES GERAIS**

---

---

### Conclusões Gerais

1. As espécies *Grapevine leafroll associated virus-4* (GLRaV-4) e *Grapevine rupestris vein feathering virus* (GRVFV) foram pioneiramente detectadas no Brasil no presente trabalho. A confirmação foi obtida por meio do sequenciamento de isolados;
2. Tanto a RT-PCR em Tempo Real, como os três métodos de detecção baseados na Allele - Specific Primer Extension (ASPE) [em microesferas (VeraCode-ASPE), por um ponto de extremidade fluorimétrico (RT-PCR em Tempo Real-ASPE) e colorimétrico (ELISA- ASPE)] mostraram alta sensibilidade, podendo ser recomendados para estudos de vírus da videira;
3. A aplicação destas ferramentas contribuirá para a melhoria da detecção de vírus em videira e, conseqüente eliminação ou contenção dos mesmos, podendo aumentar ainda mais a produtividade e a qualidade da produção de uva de mesa e de vinho