

# **Estudo de expressão génica em *Vitis vinifera* em presença do fitoplasma Flavescência Dourada**

**Inês Medina Monteiro de Sousa Teixeira**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em  
**Viticultura e Enologia**

Orientadores: Doutora Eugénia Maria Antunes de Andrade  
Doutor António Maria Marques Mexia

Jurí:

Presidente: Doutor, Jorge Rodrigues Ricardo da Silva, Professor Catedrático no Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa  
Vogais: Doutora, Maria Helena Mendes da Costa Ferreira Correia Oliveira, Professora Associada no Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa  
Doutora, Eugénia Maria Antunes de Andrade, Investigadora Auxiliar no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

## **Agradecimentos**

Ao meu Pai que sempre acreditou em mim e que permitiu que este projeto se realizasse, sendo mesmo o meu pilar em todo este processo;

À minha Mãe que me deu a conhecer o mundo dos vinhos e que acabou por ser a grande motivadora deste enorme desafio;

À Doutora Eugénia de Andrade pelo conhecimento que me transmitiu, pelo empenho que dedicou a este trabalho e pelas excelentes condições de trabalho que me proporcionou;

À Doutora Esmeraldina de Sousa pela orientação e disponibilidade que sempre demonstrou em transmitir o seu conhecimento;

Ao Professor Jorge Ricardo e ao Professor António Mexia pelas excelentes aulas que me deram, motivação pelo tema desta dissertação e apoio e simpatia que sempre revelaram;

À Eng<sup>a</sup> Isabel Rodrigues, um agradecimento muito especial pelo apoio e orientação constantes, estímulo e amizade que sempre expressou.

À Eng<sup>a</sup> Clara Fernandes, Eng<sup>a</sup> Céu Minoso e Margarida Barreto pela simpatia e disponibilidade, sempre presente, em me ajudarem;

À Eng<sup>a</sup> Maria João Barrento pela companhia, simpatia, apoio e amizade que sempre me deu;

Aos meus amigos Paula Pato e Ricardo Vilhena Roque pelo seu precioso apoio nas mais variadas formas;

Ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I. P por me ter recebido prontamente nas suas instalações;

Dedico ainda uma palavra especial de agradecimento ao resto da família e amigos, que tem sido, sem dúvida, um grande apoio na minha vida.

## Resumo

Entre os agentes fitopatogénicos que podem afetar as plantas, os fitoplasmas são uma séria ameaça. Os fitoplasmas são bactérias desprovidos de parede celular, pertencentes à classe *Mollicutes* e são parasitas obrigatórios de plantas e insetos vetores.

A Flavescência Dourada (FD) é uma doença devastadora, difundida por vários países da União Europeia e, provavelmente, a mais séria ameaça em videira provocada por fitoplasmas; é transmitida de forma epidémica na vinha pelo inseto vetor cicadelídeo *Scaphoideus titanus* Ball (Schvester, 1961) durante o seu processo de alimentação.

As interações moleculares entre a videira e o fitoplasma FD são ainda insuficientemente conhecidas devido, em grande parte, à dificuldade de se multiplicar os fitoplasmas “*in vitro*”.

Neste estudo preliminar propôs-se analisar os perfis de expressão dos genes *EDS1*, *EDL1*, *EDL2*, *EDL5*, *NPR1* e *SAG12*, relacionados com mecanismos de defesa das plantas, numa casta branca, “Arinto”, e numa casta tinta, “Padeiro de Basto”, castas típicas da região dos vinhos verdes.

Primeiramente, realizou-se o diagnóstico de várias patologias que pudessem influenciar os resultados de expressão génica para além da FD. Neste contexto, efetuou-se o rastreio de sete vírus, através de testes ELISA, cujos resultados foram negativos. Foi também efetuada a deteção dos fitoplasmas BN e FD, por rt-PCR triplex, com resultados positivos para a FD em várias sub-amostras.

Posteriormente, foi efetuada a extração de RNA e a síntese de cDNA seguida de rt-PCR. Foi selecionado o gene *GPDH* como normalizador no método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , para cálculo da expressão dos referidos genes ligados ao processo infeccioso. Observou-se a sobre-expressão dos genes *EDL1* e *EDL5* na casta branca e o último também na tinta assim como a sub-expressão dos genes *EDS1* e *EDL2* na casta branca, concluindo-se que, em plantas com FD, estes genes aparecem com perfis alterados.

Palavras-chave: *Vitis vinifera*; Flavescência Dourada; genes de resistência, expressão génica; PCR em tempo real.

## Abstract

Among the pathogenic agents that can affect plants, phytoplasmas are a serious threat. They belong to *Mollicutes* class and are obligate parasites of plants and insect vectors. They are similar to bacteria but without cell wall.

Flavescence Doree (FD) is a devastating disease typical on vineyards culture present in several countries of the European Union and probably the most serious disease caused by phytoplasma. It is transmitted in epidemic form in the vineyard by the cicadellidae insect vector *Scaphoideus titanus* Ball (Schvester, 1961) during its feeding process.

The molecular interactions between vineyard and phytoplasma are still poorly understood due in large part to the difficulty of multiplying the phytoplasma "in vitro".

In this preliminary study, we propose to analyze the expression profiles of *EDS1*, *EDL1*, *EDL2*, *EDL5*, *NPR1* and *SAG12* genes related to plant defense mechanisms, a white variety (Arinto) and a red variety (Padeiro de Basto).

We first made a diagnosis of several diseases which could influence the results of gene expression in addition to the FD presence. In this context, we performed seven virus screening, via ELISA's tests and the results were negative. It was also performed the detection of phytoplasmas BN and FD, by rt-PCR triplex, with positive results for the FD in the samples.

Thereafter, RNA extraction and the cDNA synthesis followed by rT-PCR. We selected the *GPDH* gene as a housekeeping gene in  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method for calculating the expression of such genes linked to the infection. We observed the overexpression of *EDL1* and *EDL5* in the white variety and the last also in red variety, as well as sub expression of *EDS1* and *EDL2* in the white variety, concluding that in plants affected by the FD, these genes appear changed.

Key-words: *Vitis vinifera*; Flavescence Dorée, resistance genes; gene expression; rT-PCR.

## Índice

Preâmbulo	11
I. Introdução	13
1.1 Situação atual em Portugal	13
1.2 Os fitoplasmas	14
1.2.1 Classificação e características dos fitoplasmas	14
1.2.2 Biologia dos fitoplasmas	15
1.2.3 Características dos insetos vetores	16
1.2.4 Sintomas das infeções por fitoplasmas	18
1.2.5 O fitoplasma da FD: características e sintomas	19
1.2.6 O fitoplasma da FD: deteção	20
1.2.7 O inseto vetor da FD	20
1.2.8 Controlo do fitoplasma FD	21
1.3 Defesa das plantas face à doença pelo fitoplasma FD e genes associados	22
1.3.1 Família de genes <i>EDL</i> em videira	28
1.4 Expressão génica	30
1.5 Objectivos deste estudo	32
II. Material e Métodos	33
2.1 Castas utilizadas neste estudo	33
2.2 Material vegetal e condições de armazenamento	33
2.3 Deteção de vírus pela técnica do Teste DAS ELISA (“Double Antibody Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay”)	35
2.4 Deteção de fitoplasmas	37
2.4.1 Extração do ácido desoxirribonucleico (DNA)	37
2.4.2 Deteção de FD e BN por rt-PCR triplex	38
2.5 Análise da expressão génica	39
2.5.1 Extração do ácido ribonucleico (RNA)	39
2.5.2 Eletroforese em gel de agarose a 1,5%	40
2.5.3 Síntese de cDNA por transcrição reversa (RT-PCR)	40
2.5.4 Seleção de genes de interesse envolvidos em mecanismos de defesa	41
2.5.5. Seleção do gene de referência	41
2.5.6 Otimização das condições do rt-PCR	42
2.5.6.1 Identidade dos produtos de PCR	42
2.5.6.2 Eficiência (E) da reação de rt-PCR	43
2.5.7. Análise da expressão dos genes de interesse pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$	43

III. Resultados e Discussão	44
3.1 Detecção de vírus nas duas castas	44
3.2 Detecção de fitoplasmas nas duas castas e relação com sintomas	46
3.3 Perfis de expressão gênica por rt-PCR	49
3.3.1 Extração do ácido ribonucleico (RNA) e síntese de cDNA	49
3.3.2 Otimização das condições de reação e seleção do gene referência para rt-PCR	53
3.3.2.1 “Primers” e produtos de PCR	53
3.3.2.2 Eficiência da reação de rt-PCR	55
3.3.2.3 Seleção do gene de referência	56
3.4 Padrões de expressão dos genes de interesse	60
3.4.1 Estudo do gene <i>NPR1</i> e do gene <i>SAG12</i>	60
3.4.2 Estudo dos genes da família <i>EDS1 (EDL)</i>	62
3.4.2.1 Estudo dos genes <i>EDS1</i> e <i>EDL2</i>	62
3.4.2.1 Estudo dos genes <i>EDL1</i> e <i>EDL5</i>	64
IV Conclusão	66
Referências Bibliográficas	67
Anexos	86
Anexo 1 - Tampões usados nos Testes ELISA.	87
Anexo 2 - Tampões usados no gel de agarose 1,5%.	88
Anexo 3 – Resultados dos Testes ELISA.	89
Anexo 4 - Eficiência das reações de rt-PCR do <i>GPDH</i> e <i>Actina</i> .	90
Anexo 5 - Eficiência das reações de rt-PCR do <i>GPDH</i> .	93
Anexo 6 - Curvas de amplificação.	95
Anexo 7 - Padrões de expressão dos genes de interesse.	98

## Lista de quadros:

Quadro I – Características das amostras colhidas, do material vegetal.	35
Quadro II – Descrição das condições utilizadas no rt-PCR.	39
Quadro III – Cálculo dos volumes utilizados em rt-PCR.	41
Quadro IV – Sequências “forward” (F) and “reverse” (R) dos “primers” usados na amplificação dos genes estudados, composição nucleotídica dos “primers”, temperaturas de “annealing” utilizadas e tamanho dos produtos de PCR (amplicões).	42
Quadro V – Concentração e qualidade dos DNAs extraídos.	46
Quadro VI – Resultados do rt-PCR triplex, relativos à detecção dos fitoplasmas FD e BN.	48
Quadro VII – Concentração e qualidade das sub-amostras de RNA obtidas em três períodos independentes.	50
Quadro VIII – volume de cada RNA utilizado por síntese de cDNA (ng).	52
Quadro IX – Genes e respectivas temperaturas de “melting” ( $T_{\text{melting}}$ ) do produto de PCR.	54
Quadro X – Comparação da expressão relativa de GPDH e Actina e dos parâmetros de avaliação da qualidade das reações de rt-PCR.	57
Quadro XI – Comparação entre as eficiências e o $R^2$ obtido para o cDNA do gene de referência e de um gene de interesse a partir de RNA com qualidades distintas.	58
Quadro XII – Resultados do estudo do gene <i>NPR1</i> e do gene <i>SAG12</i> .	62
Quadro XIII - Resultados do estudo do gene <i>EDS1</i> e do gene <i>EDL2</i> .	64
Quadro XIV - Resultados do estudo do gene <i>EDL1</i> e do gene <i>EDL5</i> .	65
Quadro XV – Resultados da detecção dos sete virus através dos Testes ELISA.	89
Quadro XVI – Eficiência das reações de rt-PCR do <i>GPDH</i> e <i>Actina</i> .	90
Quadro XVII – Eficiência das reações de rt-PCR do <i>GPDH</i> .	93
Quadro XVIII – Curvas de amplificação dos genes de interesse e do gene de referência.	95
Quadro XIX – Padrões de expressão dos genes <i>EDS1</i> , <i>EDL1</i> , <i>NPR1</i> , <i>EDL2</i> , <i>SAG12</i> e <i>EDL5</i> .	98

## **Lista de figuras:**

Figura 1 - Videira de “Padeiro de Basto” sem sintomas do fitoplasma Flavescencia Dourada.	34
Figura 2 - Videira de Padeiro de Basto com sintomas do fitoplasma Flavescencia Dourada.	34
Figura 3 – Vinha de Arinto com alguns exemplares com sintomas do fitoplasma Flavescencia Dourada.	34
Figura 4 – As sub-amostras de material vegetal em azoto líquido.	35
Figura 5 - Sub-amostras de material vegetal, maceradas em tampão de extração.	36
Figura 6 – Placas de microtitulação, preenchidas com as sub-amostras de material vegetal.	37
Figura 7 – Resultados, com valores médios, dos Testes ELISA.	45
Figura 8 – Perfil eletroforético das sub-amostras de RNA extraídas no dia 26 de outubro.	51

## Abreviaturas:

ArMV - *Arabidopsis mosaic virus*

ATP - Adenosina trifosfato

BN - Bois Noir

DEPC - Dietilpirocarbonato

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DO – Densidade ótica

C<sup>-</sup> - Controlo negativo

C<sup>+</sup> - Controlo positivo

CE- Comissão Europeia

cDNA- DNA complementar

COX - Citocromo oxidase subunidade I

Cy5 – Cianina com 5 átomos de carbono entre grupos de indolina

C<sub>t</sub>- Cycle threshold

EDS1- Enhanced Disease Susceptibility 1

EDL1- Enhanced Disease Susceptibility-Like gene 1

EDL 2 - Enhanced Disease Susceptibility-Like gene 2

EDL 5 - Enhanced Disease Susceptibility-Like gene 5

EDTA – Ácido etienodiamino tetracético

ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay

FAM – Carboxifluoresceína

FD - Flavescence dorée

*g* – força gravitacional

GCMV - *Grapevine chrome mosaic virus*,

GFKV - *Grapevine fleck virus*,

GFLV - *Grapevine fanleaf virus*

GLRaV-1– *Grapevine leafroll virus 1*

GLRaV-2 – *Grapevine leafroll virus 2*

GLRaV-3e *Grapevine leafroll virus 3*

*GPDH* - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

h – hora

JA - Ácido jasmónico

Kb – Kilo-bases

LAMP - Loop-mediated Isothermal Amplification

LOD – Limite de deteção

LRR – Leucine Rich Repetition

Min – minuto

mL - mililitro

MP – Proteína do Movimento

mRNA - Ácido ribonucleíco mensageiro

nm – nano molar ou nanómetro

NPR1 – Gene não expressor de PR

NTC –Non-Template Control

OEPP- Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des  
Plantes

pb – Pares de bases

*PAD4 - Phytoalexin deficient 4*

PCR – Reacção em Cadeia da Polimerase

PR – Pathogenesis-related

PEG – Polietilenoglicol

PNC-FD – Plano Nacional de Controlo – Flavescência Dourada

PNPP – p-fosfato de nitrofenil

PVP – Polivinilpirrolidona

R<sup>2</sup> – Coeficiente de determinação

RNA - Ácido ribonucleíco

Rpm – Rotações por minuto

RSA - Resistência sistémica adquirida

RT – Transcrição reversa

SA- Ácido salicílico

*SAG12 – Senescence-associated gene 12*

seg - segundo

TAE – Tris-acetato-EDTA

TGA – Tripleto de nucleótidos Timina-Guanina-Adenina

TRIS - Tris(hidroximetil)aminometano

V - Volt

VIC - molécula fluorescente

µL - microlitro

UV – Ultravioleta

## Preâmbulo

As doenças associadas aos fitoplasmas estão dispersas por todo o mundo vitivinícola e, em muitos casos, associadas a epidemias graves e a grandes perdas económicas (Bertaccini, 2007). Entre estas doenças, as vulgarmente conhecidas como “Grapevine yellows”, têm sido relatadas em videira e, destacam-se a “Flavescência dourada” (FD) e o “Bois noir” (BN), que causam sintomas semelhantes (Margaria e Palmano, 2011).

A FD, também conhecida por “Grapevine flavescence dorée”, foi classificada como uma doença de quarentena e ainda se encontra incluída na Lista A2 da Organização Europeia e Mediterrânea da Proteção de Plantas (OEPP) e também do Anexo II A2 da Directiva nº 2000/29/CE, do Conselho de 8 de maio de 2000, relativa às medidas de protecção contra a introdução na Comunidade de organismos prejudiciais aos vegetais e produtos vegetais e contra a sua propagação no interior da Comunidade.

A FD perturba o funcionamento das plantas, provocando estragos na produção e muito frequentemente conduz à morte das videiras em castas mais sensíveis, assumindo-se atualmente como uma das mais temidas doenças da cultura da videira, já que pode causar grandes prejuízos na atividade vitivinícola nacional

Em Portugal, esta doença está presente desde 2006, na região do Minho, sendo essencial a sua contenção a fim de evitar o seu alastramento a outras regiões vitivinícolas nacionais (Sousa *et al.*, 2014), de grande importância económica e social como a região do Douro.

As plantas infetadas por fitoplasmas apresentam sintomas que se julgam ser perturbações profundas no equilíbrio normal dos reguladores de crescimento (Bertaccini e Duduk, 2011). Sintomatologia suspeita consiste no enrolamento, avermelhamento da folhagem e das nervuras principais e espessamento foliar em castas tintas e enrolamento e coloração amarelo dourado da folhagem e das nervuras em castas brancas. As plantas doentes podem ainda exibir atraso na rebentação, dessecação dos rebentos e do pedúnculo do cacho, originando uvas enrugadas e de polpa fibrosa, e mau atempamento das varas (Sousa *et al.*, 2014). O tempo de incubação do fitoplasma nas videiras é multifactorial, fatores como a casta, condições climáticas e a pressão do inseto vetor na vinha, condicionam o aparecimento dos sintomas que podem ocorrer no ano seguinte à ocorrência da infeção ou anos após infeção.

Neste contexto, os objectivos deste estudo preliminar e pioneiro são: 1) obter e analisar os perfis de expressão dos genes de interesse: *EDS1*, *EDL1*, *EDL2*, *EDL5*, *NPR1* e *SAG12*, relacionados com mecanismos de defesa das plantas, numa casta branca, “Arinto”,

e numa casta tinta, “Padeiro de Basto”, tipicamente utilizadas na região dos Vinho Verdes;

2) estabelecer uma correlação entre as variações observadas na expressão dos genes de interesse em plantas infetadas, a FD e a susceptibilidade das castas.

## I. Introdução

A videira (*Vitis vinifera* L.), cultivada em todo o mundo, desempenha um papel fundamental na economia de muitos países, tanto na produção de uva para consumo em fresco (uva de mesa) como na produção destinada à transformação (vinho) (Margaria *et al.*, 2014). Pode afirmar-se que, economicamente, é uma das culturas mais importantes, à escala mundial. As estatísticas de 2012, revelam que atinge uma área total de cerca de 7,57 milhões de hectares (FAOSTAT, 2012). Embora com grande capacidade adaptativa e, por isso, dispersa por todo o mundo, 50% desta área concentra-se em 5 países (Espanha, China, França, Itália e Turquia). Entre estes, Itália, França e Espanha são os principais produtores e exportadores de vinhos do mundo (Margaria e Palmano, 2011).

Entre os agentes bióticos que podem afetar significativamente o estado fitossanitário, o rendimento das videiras e a qualidade do seu produto final, os fitoplasmas são uma séria ameaça (Margaria e Palmano, 2011) à sobrevivência da vinha em diversas áreas vitivinícolas europeias, nomeadamente em Portugal (Margaria *et al.*, 2014; Sousa *et al.*, 2014).

Os fitoplasmas foram documentados em mais de 100 espécies de plantas, incluindo sementes de gimnospermas, monocotiledóneas e dicotiledóneas (Lee *et al.*, 2000 e Schneider *et al.*, 2005). Para além da *Vitis vinifera*, L. e também da *Vitis riparia*, L., os fitoplasmas causam doenças em centenas de espécies vegetais, herbáceas e lenhosas, não só nos países onde a agricultura não é muito desenvolvida, Índia e a África Central, mas também nos chamados países mais avançados, Estados Unidos e Europa (Sousa *et al.*, 2014; Bertaccini, 2007).

De entre os mais de cem fitoplasmas até hoje identificados (Bertaccini *et al.*, 2014), a Flavescência Dourada (FD) é considerada uma das doenças mais devastadoras da viticultura europeia.

### 1.1 Situação atual em Portugal

Em Portugal foi detetada, pela primeira vez, em 2001, a presença do inseto vetor da FD, *Scaphoideus titanus* Ball, na Região Norte (Quartau *et al.*, 2001) e o primeiro surto da FD surgiu em 2006 na região vitivinícola do Entre Douro e Minho (vinhos verdes) com a identificação do fitoplasmas da FD (Sousa *et al.*, 2014). Em 2008, perante uma conjuntura de agravamento, não só de dispersão da população do inseto vetor para a Região Centro/Interior mas também da progressão da doença, Portugal implementou medidas adicionais legislativas para o controlo da doença e do inseto vetor e em 2013 apresentou um Plano Nacional para o Controlo da FD (PNC-FD), com envolvimento de entidades privadas

do setor e de várias entidades oficiais (Teixeira, 2015). Com este plano foi possível no período 2008-2014, detetar o inseto vetor nos concelhos: Anadia, Cantanhede, Nelas, Guarda, Pinhel e Tondela.

Em 2015, 337 locais foram alvo de prospeção de *S. titanus* por técnicos da Direção Regional da Agricultura e das Pescas (DRAP) do Centro, tendo sido assinalada a presença do cicadelídeo em mais seis concelhos: Mealhada, Coimbra, S. Pedro do Sul, Vouzela, Mangualde e Viseu. Estes dados revelam que a presença do inseto vetor da FD tem alastrado na área geográfica da DRAP Centro, em particular, na Região Demarcada do Dão, sendo fundamental, em 2016, continuar o alargamento da prospeção novos locais numa maior extensão geográfica, no sentido da contenção da dispersão de *S. titanus* e da erradicação da FD (Andrade *et al.*, 2015), embora sem garantia de concretização.

Na verdade, as doenças provocadas por fitoplasmas não têm tratamentos curativos, tendo como soluções ações preventivas, a utilização de materiais isentos, o tratamento contra os vetores e a utilização de mecanismos endógenos das plantas que promovam a tolerância/resistência em programas de melhoramento.

Os custos económicos e os impactos negativos no ambiente, associados às aplicações de inseticidas contra o inseto vetor, em número extraordinariamente superior ao normalmente permitido (Plano de ação nacional para o controlo da FD na videira, 2013), levam à procura de estratégias alternativas, nomeadamente as que envolvam a ativação do sistema de defesa inato da planta, como se verifica para outras doenças (Le Henanff, *et al.*, 2009), também na FD, a fim de limitar eficientemente os seus prejuízos. Assim sendo, torna-se necessário aprofundar-se o conhecimento dos mecanismos de tolerância/resistência existentes nas diferentes castas da vinha. É neste contexto que se desenvolve esta dissertação.

## **1.2 Os fitoplasmas**

### **1.2.1 Classificação e características dos fitoplasmas**

Os fitoplasmas foram primeiramente identificados por Doi *et al.* em 1967.

Taxonomicamente, os fitoplasmas são organismos unicelulares, procariontes do Reino Eubacteria, Filo Tenericutes, classe Mollicutes e género '*Candidatus Phytoplasma*' (Woese, 1987; Weisburg *et al.*, 1989 e Woese *et al.*, 1990). Mais especificamente, são seres intracelulares patogénicos que infetam eucariontes, tais como animais e plantas (Oshima *et al.*, 2013), sem parede celular rígida, compostas por uma única membrana.

Inicialmente, devido às rudimentares técnicas biomoleculares, eram associados a vírus, sendo pouco conhecidas as suas características e referidos como "*Organisms-like*"

vírus e posteriormente como organismos semelhantes a microplasma (Mycoplasmas Like Organisms - MLOs). A incapacidade de obter com facilidade culturas puras “in vivo” e características fenotípicas, forçou a taxonomia a basear-se em características e filogenia molecular.

Atualmente, a classificação dos fitoplasmas é baseada na sequência do gene 16S rDNA. Vinte e seis espécies da ‘Ca. Phytoplasma’ foram nomeadas, com base nos critérios recomendados pelo International Research Program Comparative Mycoplasmaology - IRPCM - Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma Taxonomy Group (2004), e classificados em diversos grupos filogenéticos (Bertaccini *et al.*, 2014; Sousa *et al.*, 2014).

As suas características tão particulares foram usadas, por alguns autores, para se criar um novo táxon-fitoplasma (Bertaccini, 2007) Na verdade, a região correspondente ao 16S rDNA é praticamente indistinguível. Isto obriga a pesquisar marcadores moleculares mais eficazes, sendo os relacionados com a patogenicidade os preferidos. Assim, evita-se a identificação somente baseada nos sintomas (diferentes fitoplasmas podem induzir sintomas semelhantes na mesma planta ou em diferentes espécies) e no hospedeiro (Bertaccini *et al.*, 2014).

Os fitoplasmas são difíceis de controlar e afetam, de forma dramática, a fisiologia da videira (Margaria *et al.*, 2014). O agente patogénico espalha-se através dos tecidos vegetais, sem induzir uma resposta de resistência eficaz, estando a infeção associada a alterações de parâmetros fisiológicos e de diversas vias metabólicas (Bertamini e Nedunchezian, 2001; Bertamini *et al.*, 2002; Endeshaw *et al.*, 2012; Rusjan *et al.*, 2012a e 2012b).

### **1.2.2 Biologia dos fitoplasmas**

O conhecimento da biologia dos fitoplasmas é limitado, porque não crescem facilmente em meios artificiais, não sendo por isto, na sua maioria, cultiváveis (Nicolaisen, M., 2001) e só em 2012 apareceu a primeira referência à cultura de fitoplasmas, não sendo nenhum relativo à FD. Pouco se sabe também sobre os mecanismos moleculares subjacentes aos sintomas provocados nas plantas hospedeiras. Assim, ainda é desconhecida a forma como estes organismos usam a seiva rica em açúcar do floema em que vivem e a forma como interagem com o hospedeiro, o que torna mais difícil o desenvolvimento de meios de controlo de fitoplasmas (Christensen *et al.*, 2005). No entanto, sabe-se que depois de infetarem um inseto, atravessam a parede do trato intestinal, multiplicam-se na hemolinfa, passam através das glândulas salivares e multiplicam-se ainda mais. Quando o inseto infetado se alimenta de novo numa planta hospedeira, os fitoplasmas são introduzidos no tecido do floema, juntamente com fluidos salivares (Oshima *et al.*, 2013).

Foram desenvolvidas técnicas eficientes para sequenciar organismos, dificilmente cultiváveis (Liefting e Kirkpatrick, 2003; Melamed *et al.*, 2003 e Garcia-Chapa *et al.*, 2004), tendo sido sequenciados os genomas inteiros de duas estirpes de '*Candidatus Phytoplasma asteris*', duas estirpes de '*Ca. P. australiense*' e uma estirpe de '*Ca. P. mali*' (Andersen *et al.*, 2013), entre várias estirpes de fitoplasmas (Oshima *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2006; Tran-Nguyen *et al.*, 2008; Kube *et al.*, 2008), possibilitando um melhor entendimento do mecanismo molecular subjacente à malignidade e interação COM hospedeiro (Suzuki *et al.*, 2006; Oshima *et al.*, 2007; 2011; Hoshi *et al.*, 2009).

Os fitoplasmas contêm um genoma característico e não têm genes que codifiquem proteínas necessárias para determinados mecanismos e metabolismos celulares, não sendo por isso autónomos. O referido genoma é composto por 1 cromossoma muito pequeno, varia entre 530 Kb e 1600 Kb), com um total de genes que varia entre 671 e 754 (Christensen *et al.*, 2005, Bertaccini *et al.*, 2014), o que é muito reduzido em comparação com os de outros agentes patogénicos de plantas, mas semelhante ao dos micoplasmas (Oshima *et al.*, 2013). É um genoma que codifica ainda menos funções metabólicas do que outros genomas, possuindo poucas vias biossintéticas (Bertaccini *et al.*, 2014; Sousa *et al.*, 2014). Segundo Oshima, *et al.* (2013),

Por exemplo, não codificam para a síntese *de novo* de aminoácidos, ácidos gordos e nucleótidos. A ausência de síntese de ATP e de absorção e uso de açúcar, torna-os parasitas obrigatórios estritamente dependentes do hospedeiro (Christensen *et al.*, 2005). São considerados os mais pequenos procariotas com capacidade de auto multiplicação. A célula contém apenas o conjunto mínimo de estruturas essenciais para o seu crescimento e multiplicação e terá perdido genes metabólicos importantes como resultado da sua evolução reductiva e consequência da sua vida como um parasita intracelular, muito provavelmente por muitos dos metabolitos estarem disponíveis no ambiente da célula hospedeira.

A sequenciação genómica de alguns fitoplasmas leva a que se associe as suas estratégias e adaptações de sobrevivência ao parasitismo (Oshima *et al.*, 2013), apesar destes genomas serem muito diversos na sua estrutura e conteúdo (Kube *et al.*, 2012).

A absorção de hidratos de carbono a partir de células hospedeiras é uma característica importante dos fitoplasmas. A sacarose parece ser uma fonte de carbono ideal para bactérias no interior de uma planta (Oshima *et al.*, 2013).

### **1.2.3 Características dos insetos vetores**

Os fitoplasmas apresentam-se ainda na forma de corpos pleomórficos, localizam-se no sistema vascular das plantas e são transmitidos por insetos vetores que se alimentam no floema das plantas infetadas como cicadélídeos e psílídeos (Sousa *et al.*, 2014). Só podem

sobreviver e multiplicar-se em habitats hipotônicos, como o floema da planta ou na hemolinfa dos insetos, pelo que são estritamente dependentes de hospedeiros. Possivelmente podem infectar também os ovos destes insectos (Bertaccini, 2007; Bertaccini *et al.*, 2014).

Os insetos responsáveis pela transmissão de fitoplasmas são principalmente cigarrinhas sugadoras do floema (*Cicadellidae*), embora alguns psíldeos e afídeos também o possam fazer (Lee *et al.*, 2000). Cada estirpe pode transmitir-se por um ou vários vetores, dependendo do grau de especificidade. Um caso mais extremo de baixa especificidade dos insetos vectores é o fitoplasma *Candidatus Phytoplasma asteris* que é transmitido por, pelo menos, 24 espécies de cigarrinhas. No polo oposto, com elevada especificidade para o inseto vetor, está o *Candidatus* fitoplasma *pyri*, para a pereira que só é transmitido pela *Cacopsylla pyri* (L.) (Toth *et al.*, 1994, Seemüller *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003) e a FD.

Um parâmetro importante para a epidemiologia das doenças provocadas por fitoplasmas é a ampla gama de hospedeiros para alguns deles. A sobreposição de plantas hospedeiras e insetos vetores também dão extensas oportunidades para os fitoplasmas interagirem e trocarem informações genéticas (Christensen *et al.*, 2005).

A característica comum a todos os insectos classificados como vetores destes procariontes, é manterem a capacidade de se alimentarem no floema mesmo quando infectados.

Os fitoplasmas podem ser encontrados na maioria dos órgãos dos insetos infectados: o canal alimentar, a hemolinfa (podendo ou não multiplicar-se nela) e as glândulas salivares, sendo a presença nestes últimos que permite a transmissão às plantas saudáveis (Murrall *et al.*, 1996; Danielli *et al.*, 1996; Bosco *et al.*, 1997; Marzachi *et al.*, 1998; Carraro *et al.*, 1998a e 1998b; Sforza *et al.*, 1998; Maixner e Reinert, 1999; Gattineau *et al.*, 2001; Blomquist e Kirkpatrick, 2002; Palermo *et al.*, 2004).

A captação de fitoplasmas a partir dos elementos crivosos do floema ocorre através do estilete e a sua entrada no sistema circulatório da hemolinfa envolve a passagem pelo intestino (Christensen *et al.*, 2005). Para o inseto poder infectar uma nova planta, os fitoplasmas devem previamente colonizar as suas glândulas salivares e multiplicar-se na saliva. Devem atingir a concentração necessária a serem introduzidos numa dose infecciosa, em plantas saudáveis, durante o processo de ingestão do inseto (Webb *et al.*, 1999).

Parece que os insetos vetores precisam de um período de captação mínima para se tornarem infecciosos, tendo, por exemplo, sido relatado um período de 2-4 dias para um psílideo (Webb *et al.*, 1999). A sua colonização pode levar aproximadamente três semanas antes da concentração de fitoplasmas atingir um nível infeccioso. Este período é conhecido como o período de latência (Webb *et al.*, 1999; Carraro *et al.*, 2001) que pode variar entre

espécies de insetos.. Uma vez infetados, os insetos permanecem infeciosos para o resto de sua vida, incluindo a hibernação, não sendo do conhecimento generalizado a transmissão de fitoplasmas, via transovariana (transmissão para ovos e ninfas) (Tedeschi *et al.*, 2002). No entanto, já foram relatadas algumas exceções em que os fitoplasmas foram encontrados em ovos, ninfas e adultos após a primeira e a segunda geração de insetos desenvolvidos em plantas livres de fitoplasmas (Kawakita *et al.*, 2000; Hanboonsong *et al.*, 2002).

Os efeitos dos fitoplasmas em insetos não são conclusivos (Christensen *et al.*, 2005). Foram encontrados insetos infetados debilitados (Bressan *et al.*, 2005) mas também alguns que pareceram beneficiar da sua associação com fitoplasmas, tendo mostrado melhor capacidade de hibernação e aumento da fertilidade e longevidade (Beanland *et al.*, 2000). Não se sabe se os fitoplasmas têm um efeito direto sobre o inseto ou se induzem a alterações na composição da seiva do floema, que possam ser benéficas para o inseto (Christensen *et al.*, 2005).

Pensa-se que quanto mais eficaz for a relação entre o inseto e o fitoplasma, menos virulentas são as infecções nos seus hospedeiros (Elliot *et al.*, 2003). Uma razão para isso poderá ser o reduzido benefício do agente patogénico ao prejudicar o seu vetor, que constitui a sua única via de transmissão.

#### **1.2.4 Sintomas das infeções por fitoplasmas**

Após a infeção inicial e a expressão dos sintomas, a doença pode aparecer nos anos seguintes ou desaparecer completamente, denominando-se por fenómeno de recuperação ou remissão. Neste último caso, a planta recuperada pode permanecer assintomática se não exposta novamente a vetores infeciosos (Margarita *et al.*, 2014).

As plantas infetadas mostram uma grande variedade de sintomas, entre os quais nanismo, amarelecimento, desenvolvimento anormal do tecido meristemático ou abrolhamento em excesso com proliferação excessiva dos rebentos conhecida por “vassoura de bruxa”, proliferação de ramos “ladrões”, alterações das flores (filoidia - desenvolvimento dos órgãos florais em tecidos foliares e virescência - desenvolvimento anormal de flores verdes e perda do pigmento normal das flores) e um declínio geral (Hogenhout *et al.*, 2008),

Durante muito tempo estes sintomas foram tidos como efeitos indiretos da infeção (efeitos secundários), tais como por exemplo, devidos ao consumo de metabolitos. Esta ideia foi parcialmente suportada pela ausência de muitas vias metabólicas e metabolitos de síntese, bem como pela conservação de genes codificados de transportadores de metabolitos e nutrientes a partir do citoplasma do hospedeiro (Oshima *et al.*, 2004, 2007). No entanto, outros autores referem que o fitoplasma pode induzir sintomas de forma agressiva por secreção de proteínas produzidas depois da infeção (Hoshi *et al.*, 2009; Sugio

*et al.*, 2011a; Himeno *et al.*, 2011), com perturbação direta e indirecta no equilíbrio dos reguladores de crescimento (Bertaccini, 2007), e conseqüentemente, na regulação da expressão génica. Embora sem conhecer os mecanismos moleculares, algumas proteínas produzidas por fitoplasmas deverão certamente interferir com a função de genes envolvidos no desenvolvimento da flor (Sugio *et al.*, 2011b; Sugio e Hogenhout, 2012).

### **1.2.5 O fitoplasma da FD: características e sintomas**

A FD e o BN estão entre as diferentes doenças provocadas por fitoplasmas em vinha e genericamente conhecidas como “amarelos da vinha” (Daire *et al.*, 1997). São as mais relevantes e causam sintomas semelhantes, incluindo a lenhificação anormal dos sarmentos, entrenós curtos, enrolamento e descoloração da folha, amarelecimento das nervuras das folhas ou vermelhidão de acordo com a variedade e ainda flores abortadas (Margaria *et al.*, 2014).

Estes sintomas aparecem em manchas que se estendem radialmente. De um modo geral, considera-se que são necessários três sintomas em simultâneo, num só ramo, para se considerar a planta infetada: alteração da cor da folha, varas não atempadas e inflorescências ou cachos mortos.

As plantas seleccionadas como potencialmente infetadas com o fitoplasma da FD têm que ser laboratorialmente analisadas para confirmação. Podem apresentar alguma sobreposição com os sintomas de outras doenças como as provocadas pelo vírus do enrolamento (em contraste com a FD, as nervuras permanecem verdes e as varas lenhificam), pelos fungos da Esca e pelo fitoplasma Bois Noir ou com os sintomas devidos à desregulação das funções do floema, na maioria das vezes, devidos a incidentes mecânicos ou a picadas de insetos.

A FD é uma doença devastadora, particularmente perigosa devido ao facto de poder causar epifitias na videira e de forma generalizada em vários países da União Europeia, estando assim sujeita a restrições de quarentena. Diminuiu seriamente a qualidade e produtividade em França, na Catalunha (Espanha), norte da Itália, com surtos epidémicos também na Europa Oriental.

Estudos preliminares, a nível genético, indicam que pelo menos dois tipos de fitoplasmas estão envolvidos nas epidemias e que pertencem, respetivamente, aos subgrupos ribossomais 16SrV-C e 16SrV-D com distribuições geográficas definidas (Bertaccini, 2007).

Os fitoplasmas associados a estas doenças são molecularmente distinguíveis, na maioria dos casos, ao nível do gene 16SrDNA, uma vez que a sua sequência não apresenta variabilidade intraespecífica mas antes interespecífica. Este gene codifica o RNA ribossomal (rRNA) da subunidade pequena do ribossoma dos procariotas. Tem regiões hipervariáveis

devido à evolução das espécies. Estas regiões encontram-se flanqueadas por outras muitas conservadas. A utilização de “primers” complementares às zonas conservadas permite a multiplicação *in vitro* das regiões variáveis e a sua sequenciação. É este o processo de identificação de subgrupos de fitoplasmas (Lee *et al.*, 2000; 2003).

### **1.2.6 O fitoplasma da FD: deteção**

Estudos epidemiológicos podem ser realizados com o objetivo de eliminar as plantas infetadas e evitar a sua propagação epidémica (Bertaccini, 2007).

O desenvolvimento de ferramentas moleculares permitiu a identificação e classificação preliminar de fitoplasmas (Lee *et al.*, 2000; IRPCM - Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma Taxonomy Group *et al.*, 2004). Atualmente, os métodos moleculares são largamente utilizados para diagnóstico e/ou para explorar relações filogenéticas. No entanto, poucos estudos exploraram a base molecular das interações planta-fitoplasma (Margaria *et al.*, 2014), o que justifica o objetivo principal deste estudo.

Os estudos iniciais sobre as alterações induzidas pela infeção por fitoplasma em videira foram realizados utilizando técnicas bioquímicas, analisando as mudanças na atividade fotossintética em plantas infetadas pelo fitoplasma BN (Bertamini e Nedunchezian, 2001; Bertamini *et al.*, 2002).

A deteção começou a ser feita por recurso a Nested-PCR (Reacção em Cadeia da Polimerase) usando três pares de “primers” específicos para a região ribossómica conservada (16SrDNA) dos fitoplasmas (Bertaccini, 2007). Mais recentemente, e de forma a conseguir um método mais sensível, foram desenvolvidas e aplicadas ferramentas de deteção e identificação molecular do fitoplasma, tais como o PCR em tempo real (rt-PCR). Adicionalmente, esta tecnologia foi também utilizada para monitorizar a expressão diferencial de genes específicos de videiras, infetadas com o fitoplasma BN e recuperadas, comparativamente a um controlo não infetado (Hren *et al.*, 2009; Landi *et al.*, 2009). A análise da sequência desta região de DNA ribossómico, permitiu produzir um modelo detalhado da diversidade de fitoplasmas e das suas relações filogenéticas com outros procariontes. Numerosos estudos efetuados na mesma região em vários fitoplasmas levaram à conclusão de que são um grupo único, monofilético de *Mollicutes*, que pertencem ao subgrupo 16SrI-B (Bertaccini, 2007).

### **1.2.7 O inseto vetor da FD**

A FD é transmitida pela cigarrinha *S. titanus* Ball (Mori *et al.*, 2002), cujo ciclo de vida está estritamente ligado à vinha, resultando na disseminação do fitoplasma. No entanto, sabendo que a FD pode ser provocada por fitoplasmas de 2 sub-grupos, teve que se ter em

conta a existência de alguma variabilidade genética e portanto a possibilidade de encontrar vetores alternativos o *S. titanus*, bem como vetores ocasionais. Isto é fulcral no controle da doença (Bertaccini, 2007).

Durante o processo de transmissão, os insetos vetores podem adquirir o fitoplasma da FD quando se alimentam em plantas previamente infetadas (transmissão horizontal) tal como já referido para os fitoplasmas, em geral mas parece não ter grande probabilidade de ser transmitido, de geração em geração (transmissão vertical). Durante o processo de alimentação, o inseto vetor pode adquirir FD em todos os estádios de desenvolvimento do mesmo. Uma vez infetados, os insetos permanecem inoculadores para o resto da sua vida. Podem infetar uma planta em cada momento de alimentação desde o início de junho (ninfas muito jovens) até ao final de setembro (adultos no final do ciclo de vida). A severidade da doença não depende do momento da inoculação. A incubação do fitoplasma inicia-se imediatamente após a inoculação até ao momento de expressão dos sintomas os quais, normalmente, só aparecem no ano seguinte (Bressan *et al.*, 2005).

A transmissão da doença pode ainda acontecer por enxertia, a principal causa de transmissão a grande distância. Assim, a principal fonte de inóculo são as videiras infetadas. Por consequência, a melhoria e a manutenção de um bom estado fitossanitário do material vegetal para plantação são cruciais, procurando-se garantir este aspeto através dos esquemas oficiais de certificação e controlo dos viveiros de pés-mãe e dos viveiros em geral, através do Decreto-Lei n.º 194/2006 de 27 de Setembro, assim como da aplicação da legislação europeia para organismos de quarentena (Directiva 2002/11/CE do Conselho de 14 de Fevereiro de 2002).

### **1.2.8 Controlo do fitoplasma da FD**

Embora não existam meios de luta diretos para combater a doença da FD, estão disponíveis algumas opções profiláticas como:

1. Controlo do inseto vetor, que só é conseguido por aplicação de inseticidas, uma vez que ainda não existem agentes capazes de serem utilizados em protecção biológica.
2. Diminuição da fonte de inóculo, que pode ser alcançada por:
  - Eliminação das videiras infetadas. Em Portugal, sempre que o número de plantas doentes atinge 20%, a parcela é arrancada. Esta medida é utilizada como medida profilática. Pode, também, ser aplicada a vinhas abandonadas, a plantas de outras espécies do género *Vitis* ou de outros géneros que se comportem como hospedeiros alternativos.
  - Utilização de material de propagação vegetativa certificado (livre de fitoplasmas);

- Utilização de cultivares menos sensíveis ou mais tolerantes. Na verdade, todas as cultivares de *V. vinifera* são sensíveis, em diferentes graus.
- Aplicação de antibióticos. Em alguns casos, e noutros países, o agente patogénico pode ser eliminado de plantas infetadas pela aplicação de antibióticos (exemplo: tetraciclina que é aconselhado para organismos sem parede celular) (Dai *et al.*, 1995, 1997; Veronesi *et al.*, 2000, Chung e Choi, 2002).

Ambas as medidas de proteção com produtos fito farmacêuticos têm resultados pouco eficazes em condições de campo: o primeiro porque é impossível eliminar todos os vetores; particularmente agora no contexto do aquecimento global, vantajoso para estes insetos naturalmente sensíveis ao frio e o segundo, porque muito caro, não é permitido em vários países, nem sempre é eficaz a longo prazo e provavelmente não seria aplicado sobre as fontes de inóculo, uma vez que ainda não se conhecem todos os hospedeiros alternativos. Portanto, e como já foi referido, a única forma real de controlar a infeção do fitoplasma é impedindo os surtos através da produção e uso de material são ou melhorando as variedades para a resistência ou, pelo menos, para a tolerância ao fitoplasma (Loi *et al.*, 1995; Parani *et al.*, 1996; Sinclair *et al.*, 1997; Thomas e Mink, 1998; Carraro *et al.*, 1998a e 1998b; Seemüller *et al.*, 2002).

De um modo geral, prevê-se que as doenças relacionadas com fitoplasmas devam intensificar-se. A mudança do clima/aquecimento global para além de vantajosa para os insetos vetores dos fitoplasmas já conhecidos, promoverá a migração de novos insetos e fitoplasmas no sentido Norte. Deste modo, o desenvolvimento de métodos protetores do ambiente de controlo de pragas associadas a fitoplasmas irá tornar-se cada vez mais importante no futuro (Hogehout *et al.*, 2008).

No caso particular da proteção da vinha contra a FD, são precisas estratégias alternativas ao uso de produtos fitofarmacêuticos o que implica um conhecimento profundo dos mecanismos de defesa inatos da *Vitis vinifera* (Le Henanff *et al.*, 2009) e a sua correlação com a presença dos agentes patogénicos..

### **1.3 Defesa das plantas face à doença pelo fitoplasma FD e genes associados**

É do conhecimento geral que as castas revelam diferentes níveis de suscetibilidade/tolerância à presença do fitoplasma com doença da FD, o que é muitas vezes, avaliada pela intensidade da manifestação de sintomas.

Por exemplo, Bressan *et al.* (2005) referem que a cultivar Pinot Blanc é melhor fonte de inóculo do que Merlot, o que provavelmente se deve à presença de maior quantidade de fitoplasmas viáveis. Na verdade, a casta Merlot é considerada mais tolerante e com mais fraca manifestação de sintomas. Ao contrário, Pinot Blanc é considerada altamente sensível.

Estes autores, verificaram ainda que as populações naturais dos insetos vetores em vinhas de Merlot tinham uma baixa proporção de insetos infetados por FD.

A manifestação de sistomas nem sempre é o melhor parâmetro para avaliar a susceptibilidade. Por exemplo, os porta-enxertos híbridos de várias espécies americanas de *Vitis* não apresentam sintomas, ou têm-nos muitos fracos, quando infetados com FD. São considerados portadores latentes da doença. Assim, uma das grandes dificuldades na deteção desta doença é a variabilidade na exibição de sintomas: sem regularidade temporal (não aparecem todos os anos); heterogeneamente distribuídos na planta (podem aparecer em toda a planta ou somente numa vara) e oscilação na intensidade (podem mudar o grau de intensidade na mesma planta).

A maior ou menor intensidade de manifestação de sintomas observada em algumas variedades, não foi vista como tolerância ou resistência ao fitoplasma, devido às oscilações já detectadas. Reconhecida a existência de resistência ou de tolerância, sendo esta uma das razões pelas quais a FD foi classificada como doença de quarentena. Assim, a busca de resistência natural foi abandonada por alguns autores por ser um processo incerto e demorado. Neste caso, o recurso à biotecnologia para introdução de resistência transgénica foi considerado como o mais aconselhado (Laimer *et al.*, 2009).

Há cerca de 30 anos que a engenharia genética tem vindo a demonstrar grande sucesso na introdução de resistência a pragas (Schuler *et al.*, 1998) e doenças em diversas plantas (Prins *et al.*, 2008). Esta tecnologia é facilmente aplicável a plantas suscetíveis de serem transformadas *in vitro* e com capacidade de regeneração. Este é o caso da videira (Iocco *et al.*, 2001) e, por isso, são diversos os relatos de tentativas para transformá-la para aquisição de resistência a vírus (Spielmann *et al.*, 2000; Gölles *et al.*, 2000; Vigne *et al.*, 2004; Gambino *et al.*, 2005; Gribaudo *et al.*, 2005; Maghuly *et al.*, 2006; Valat *et al.*, 2006). Todas estas tentativas objetivaram a expressão de genes virais pela videira, como por exemplo o gene da capa proteica do *GFLV* ou do *ArMV* ou ainda o gene da proteína do movimento (MP). Contudo, a mesma estratégia não se aplicou relativamente à aquisição de resistência a fitoplasmas devido à particularidade destes não serem cultiváveis *in vitro* (Belbahri *et al.*, 2001).

A indústria do vinho, especialmente do vinho “premium” onde o nome da cultivar é usado para diferenciar o produto final, não aceita facilmente esta abordagem. De facto, no passado, a transgenia em videira só foi reportada para castas de uva de mesa e para cultivares para outros usos (Iocco *et al.*, 2001). Contudo, as estratégias mais recentes vão no sentido da transgenia. Pode ser usada para promover os mecanismos de defesa natural da planta. Por exemplo, desenvolver uma resposta de hipersensibilidade com a consequente morte das células no sítio da infeção (Belbahri *et al.*, 2001) ou, pela introdução de transgenes, originários de humanos, nemátodes ou baculovírus, codificadores de

proteínas anti-apoptose. Estas proteínas, uma vez expressas no sistema vegetal, bloqueiam a morte celular programada e assim evitam as necroses (Dickman *et al.*, 2001; Lincoln *et al.*, 2002).

Outra possibilidade é inibir o crescimento do patógeno pela expressão de transgenes codificando para péptidos anti-microbianos (Osusky *et al.*, 2000). Um caso de sucesso, em ensaios *in vitro*, foi o desenvolvimento de anticorpos recombinantes, policlonais e monoclonais contra a espiralina, uma proteína de membrana presente no Mollicute *Spiroplasma citri* (Malembic *et al.*, 2002) e a expressão por plantas do género *Paulownia* de cecropinas, péptidos originalmente secretados por *Hyalophora cecropia* (Lepidóptero) e com atividade antibacteriana, que assim apresentaram menores concentrações de fitoplasma e sintomas menos intensos.

A opção mais apoiada para a aquisição de resistência a fitoplasmas, por engenharia genética, é a sua inclusão nos porta-enxertos ou direcioná-la para as placas crivosas do floema, uma vez que no inverno, os fitoplasmas se deslocam e acumulam nas raízes (Constable *et al.*, 2003; Terlizzi e Credi, 2007 e na época de maior atividade vegetal, se alojam e multiplicam nos elementos crivosos do floema. Assim, a estratégia seria proporcionar-lhes condições adversas, pela presença de péptidos anti-apoptose ou anti-microbianos, nos locais de maior acumulação ou multiplicação diminuindo a recorrência da doença nos anos subsequentes (Laimer *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, tem-se dedicado especial atenção a um grupo de compostos genericamente designados por fito-hormonas. As fito-hormonas endógenas são responsáveis pela ativação de resistência sistémica adquirida (RSA) a qual é, por sua vez, uma resposta de defesa, de largo espectro (contra bactérias, fungos e vírus), a longa distância do local de infeção e de longa duração, ativada em resposta a agentes externos (Sticher *et al.*, 1997; Dong, 2004 e Vlot *et al.*, 2009). Exemplos de fito-hormonas envolvidas em RSA são os ácidos Jasmónico (JA) e Salicílico (SA). O aparecimento de RSA requer a acumulação de SA e a expressão coordenada de genes relacionados com patogenicidade ("pathogenesis-related" protein (PR)). Estes genes codificam pequenas proteínas de excreção ou proteínas de vacúolo com atividade antimicrobiana (Vijayan *et al.*, 1998 e Zhang *et al.*, 2005). O JA está envolvido em processos de desenvolvimento e em respostas a stresses bióticos e abióticos. O jasmonato de metilo, a forma volátil do JA, foi muito usado para entender os mecanismos de defesa das plantas. Este composto ativa genes codificadores de proteínas de membrana que atuam em cascata na passagem de sinais. Após a ativação, os níveis de expressão de genes de defesa, tais como inibidores de proteinase e PR, mudam de modo a regular a defesa da planta e a resposta imunológica (Vijayan *et al.*, 1998 e Zhang *et al.*, 2005).

Com os avanços recentes nas tecnologias associadas a estudos de genômica, verificou-se, por sequenciação do genoma total da variedade Cabernet Sauvignon, a existência de genes relacionados com a defesa, distribuídos por todos os cromossomas (Moroldo *et al.*, 2008). Foram, assim, identificados genes associados a defesa inata, ou seja, defesa resultante da sua expressão constitutiva. No entanto, verificou-se também que as espécies do género *Vitis* variam no nível de expressão e de ativação destes genes (Fung *et al.*, 2008 e Gao *et al.*, 2010).

Apesar de alguns conhecimentos básicos sobre epidemiologia e fisiopatologia de fitoplasmas associados a doenças já estarem disponíveis, ainda é escasso o conhecimento das da membrana dos fitoplasmas, bem como dos genes específicos das plantas possivelmente envolvidos na interação patogénicos/hospedeiro. O seu conhecimento poderá contribuir para encontrar métodos de eliminação destes agentes patogénicos perigosos (Bertaccini, 2007).

As vias de sinalização e os elementos reguladores que conduzem à indução de respostas de defesa têm ainda de ser caracterizados na videira. A sequenciação do genoma da videira, recentemente concluída, foi de extrema importância por caracterizar e identificar vários genes, nomeadamente o *NPR1*, considerado um gene chave na mediação do SA na resistência a patogéneos biotróficos (Le Henanff *et al.*, 2009).

As plantas desenvolveram um sistema imune inato, com dois níveis de defesa, contra agentes patogénicos (Wit, 2007): (Estas, ao contrário dos animais, não possuem células móveis de defesa e um sistema imune somático adaptativo):

1) - Imunidade inata primária - existe em cada célula e manifesta-se por num conjunto de sinais sistémicos que emanam dos sítios de infeção (Jones e Dangl, 2006). Assenta na funcionalidade de um conjunto de proteínas de resistência a doenças, ativadas indiretamente por compostos codificados pelo patogéneo. Estas proteínas avaliam a integridade dos diversos recetores celulares alvos da ação dos compostos do agente patogénico. Assim, reconhecem o microorganismo por associação ao seu padrão molecular (Jones e Dangl, 2006; Wit, 2007). Este nível de defesa usa recetores de reconhecimento de padrões transmembranares e responde aos padrões moleculares associados aos agentes externos;

2) - Resposta de defesa secundária - atua dentro da célula e é acionada pelo reconhecimento de um órgão ou célula, ou seja, age em resposta a estímulos específicos do microorganismo (Le Henanff *et al.*, 2009). A fim de se defender dos agentes patogénicos que podem suprimir os mecanismos de defesa primários, as proteínas de resistência monitorizam processadores de efeitos e, posteriormente, desencadeiam respostas de defesa secundários que muitas vezes culminam em morte celular localizada, respostas

adicionais de defesa induzidas localmente, que bloqueiam ainda mais o crescimento do agente patogénico (Wit, 2007).

Após o reconhecimento do microorganismo invasor, a resistência induzida por diferentes tipos de agentes patogénicos é conseguida através de uma rede de vias sinalizadoras em que as pequenas moléculas de SA, JA e etileno (ET) atuam como mensageiros secundários (Thomma *et al.*, 1998).

Estes compostos, em seguida, regulam a expressão de conjuntos de genes de defesa, a jusante, que codificam proteínas ou enzimas que catalisam a produção de metabolitos antimicrobianos de defesa. A resistência das plantas aos patogénios biotróficos julga-se ser mediada pela sinalização do SA (Loake *et al.*, 2007). A sua acumulação, bem como a expressão coordenada dos genes correlacionados com a patogénese (PR), são necessários para o aparecimento de RSA em plantas (Le Henanff *et al.*, 2009).

Vários genes-chave envolvidos na via de sinalização do SA, têm sido clonados e caracterizados (Dong, 2004). O gene *NPR1* foi isolado a partir de plantas que não conseguiram expressar o gene *PR2* após a indução da RSA (Cao *et al.*, 1994).

Este gene foi clonado em 1997, em *Arabidopsis*, e descobriu-se que codifica uma nova proteína contendo repetições de anquirina, péptido que contém uma sequência de 33 aminoácidos monómeros. Estes ligam-se e formam estruturas que medeiam o reconhecimento molecular via interações proteína-proteína (Cao *et al.*, 1997). Dois genes homólogos de *NPR1* foram isolados em *V. vinifera* onde têm uma expressão constitutiva. Estes genes são positivamente regulados pelo SA, passando a expressão para o dobro após a sua aplicação. No entanto, na presença de míldio verificou-se ainda que os níveis dos transcritos (mRNA) não foram afetados, sugerindo que é regulado ao nível da proteína (Cao *et al.*, 1998). Na verdade, a atividade do gene *NPR1* é regulada por sistemas *redox* que já estão identificados (Tada *et al.*, 2008) e sabe-se que a sua inativação leva à presença de bissulfito citosólico acoplado aos oligómeros, o que é verificado na ausência de ataques patogénicos (Le Henanff *et al.*, 2009). Após a indução por SA, os oligómeros de *NPR1* são reduzidos para monómeros ativos (Mou *et al.*, 2003). Os monómeros de *NPR1* são translocados para o núcleo, onde interagem com a classe TGA (Tripleto de nucleótidos Timina-Guanina-Adenina) de fatores de transcrição de fecho de leucina, que conduzem à expressão de genes dependentes do SA (Mou *et al.*, 2003 e Loake *et al.*, 2007), como o *PR1* e o *PR2* (Le Henanff *et al.*, 2009).

Foi demonstrado que o gene *NPR1* desempenha um papel na defesa de outras vias de sinalização envolvendo o ET e o JA (Pieterse *et al.*, 1998). Em *Arabidopsis*, para além do gene *NPR1*, há cinco genes relacionados, constituindo uma família. Todos estes genes estão envolvidos em mediar interações proteína-proteína relacionadas com outros processos como o desenvolvimento de folhas e flores.

Além disso, os genes homólogos de *NPR1* foram clonados e caracterizados em várias plantas como o arroz, maçã, banana e o algodão (Le Henanff *et al.*, 2009). No arroz, a sobre-expressão do gene *NPR1* confere resistência à bactéria *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae* (Yuan *et al.*, 2007).

Na vinha, muitos estudos descrevem a indução de proteínas PR e a produção de estilbenos após a infecção (Jeandet *et al.* 2002 e Chong *et al.*, 2008). No entanto, as vias de sinalização e os elementos reguladores que conduzem à indução dessas respostas permanecem por ser caracterizadas para esta espécie (Le Henanff *et al.*, 2009).

A conclusão da sequenciação do genoma de *V. vinifera* mostrou que esta espécie é altamente heterozigótica e permitiu a identificação de genes potencialmente envolvidos em mecanismos de resistência e elementos de sinalização de defesa (Jaillon *et al.*, 2007 e Velasco *et al.*, 2007).

O genoma da videira contém 341 genes com uma sequência do tipo “nucleotide-binding site (NBS)-Leucine-rich repeat (LRR)”, típica de genes de resistência. Além de putativos genes de resistência, o genoma da videira contém vários genes candidatos a codificarem componentes de sinalização como resposta à doença, com similaridade à *Arabidopsis*, tais como os genes *EDS1*, *PAD4*, *NDR1* e *NPR1* (Velasco *et al.*, 2007).

Chong *et al.* (2008) descreveram o possível papel de dois elementos reguladores na videira, que partilham similaridade de sequência com os componentes de sinalização do SA em *Arabidopsis*, o *NDR1* e o *EDS1*.

O processo de senescência, conhecido por ser a última fase no desenvolvimento foliar, é caracterizado por alterações dramáticas no metabolismo celular e na degeneração das estruturas celulares. Tem-se verificado que alguns genes induzidos durante a fase de senescência (SAGs) foliar aparecem também sobreexpressos em resposta a infecções provocadas por agentes patogênicos. Por exemplo, tem-se observado a sobre-expressão de SAG em resposta a doenças causadas por fungos, bactérias e vírus, que provocam uma resposta de hipersensibilidade, ou durante as infecções induzidas por fungos e bactérias patogênicas, que provocam necroses nas folhas (Espinoza *et al.*, 2007).

O nível mais elevado de SA, em folhas senescentes, está envolvido na regulação positiva de SAG durante a senescência foliar. A concentração de SA endógeno encontrada em folhas senescentes de *Arabidopsis* foi quatro vezes maior do que em folhas saudáveis. O SA é a hormona envolvida na resposta ao agente patogênico e na morte celular mediada pelo agente patogênico (Morris, 2000).

Entre os SAGs, estão genes que codificam proteínas tais como proteases, lipases, proteínas envolvidas na mobilização de nutrientes e minerais, transportadores, fatores de transcrição, proteínas relacionadas com a tradução e enzimas antioxidantes, entre outros. Assim, parte da resposta da planta à infecção parece ser a ativação da senescência.

Demonstrou-se ainda que vários genes induzidos por vírus são também expressos em níveis elevados durante a senescência natural em plantas saudáveis (Espinoza *et al.*, 2007).

Como já foi referido, a senescência foliar é um processo regulado que corresponde à última fase do desenvolvimento da folha. Nesta fase, os nutrientes acumulados nas folhas durante a estação de crescimento são mobilizados e reciclados em novas folhas ou órgãos de armazenamento. A mudança mais visível nas folhas senescentes é a degradação da clorofila, que é acompanhada por reduções na atividade fotossintética, com a diminuição do RNA total e de proteínas (Espinoza *et al.*, 2007).

Em adição ao envelhecimento, vários sinais ambientais e de desenvolvimento são capazes de desencadear a senescência, tais como a secura e o amarelecimento foliar. Entre as tentativas para elucidar os mecanismos moleculares que controlam este processo dinâmico, uma série de genes associados à senescência foram identificados (Lim *et al.*, 2005).

Em contraste, os genes associados à baixa senescência codificam principalmente proteínas envolvidas na fotossíntese (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Gan, 2003).

O gene *SAG12* (*Senescence-associated gene 12*) está associado à senescência foliar (Morris *et al.*, 2000).

As funções dos genes de defesa associados à via de sinalização de SA foram recentemente revistas. A identificação de genes de resistência permitiu concluir que codificam proteínas contendo domínios de ligação a nucleótidos e repetições ricas em leucina [genes NBS-LRR proteins – (Nucleotid binding site-Leucine Rich Repeat)] e ocorrem em clusters no genomas das plantas e tem colocalizam-se com loci de resistência (Gao *et al.*, 2014), já descritos por Velasco, *et al.* (2007).

A sequência do genoma de *V. vinifera* evidencia genes relacionados com a sua defesa distribuídos pelos 19 cromossomas (Moroldo *et al.*, 2008), com algumas demonstrações de serem modelados, de forma significativa, ao nível da transcrição por infeção patogénica (Fung *et al.*, 2008 e Camps *et al.*, 2010).

As espécies de *Vitis* variam nos níveis de ativação dos genes relacionados com a defesa como componente do sistema imune inato da planta que não depende dos genes de resistência (Gao *et al.*, 2014).

### **1.3.1 Família de genes *EDL* em videira**

O gene *EDS1* é considerado um regulador positivo de resistência inata (Gao *et al.*, 2014) e, conseqüentemente, tem sido relatado como membro de um circuito de “feedback” positivo dependente do SA (Rustérucci *et al.*, 2001; Shirano *et al.*, 2002; Shah, 2003 e Chandra-Shekara *et al.*, 2004). Sabe-se também que codifica proteínas semelhantes a lipases (Falk *et al.*, 1999; Jirage *et al.*, 1999 e Feys *et al.*, 2005).

Uma série de genes ortólogos de *EDS1* (genes originados a partir de um único gene do último ancestral comum e cuja proteína manteve a função biológica) foram analisados nas castas Norton e Cabernet Sauvignon e revelaram expressão diferenciada após a infecção com *Erysiphe necator*.

Nem todos os membros de uma família de genes partilham necessariamente a mesma função. A duplicação de genes é um dos principais motores de evolução (Gao *et al.*, 2010). Os genes parálogos de *EDS1* (*EDS1-Like* – *EDL*) (genes originados por duplicação antes ou depois da especiação e que podem ter ou não o mesmo papel biológico) foram também estudados em videira uma vez que em *Arabidopsis* eles se mostraram dependentes do SA para positivamente aumentar a defesa (Rustérucci *et al.*, 2001; Shirano *et al.*, 2002; Shah, 2003; Chandra-Shekara *et al.* 2004,) e na cultivar Chardonay *EDS1* foi induzido por *Plasmopara viticola* e pelo SA (Chong *et al.*, 2008).

No caso das infecções por fungos há um segundo passo crítico para a patogênese e que é a penetração da epiderme e da parede celular para o estabelecimento do haustório. Isto requer um novo nível de defesa e novos genes como o *Phytoalexin deficient 4 (PAD4)* e o *Senescence-associated gene (SAG101)* (Lipka *et al.*, 2005).

Relativamente ao gene *EDS1* e ao gene *EDL1*, a expectativa é que desempenhem papéis importantes na resistência à infecção.

O *EDL1* e o *EDL2* mostraram fortes interações no núcleo e no citoplasma, onde a proteína *EDS1* dimeriza e interage com outros genes. O *EDL2*, em certas situações, pode ser uma versão não funcional do *EDS*, possivelmente regulando a quantidade de dímeros *EDS1* funcionais. Na vinha, os genes *EDS1* e *EDL2* podem formar um complexo para regular o sistema de defesa (Gao *et al.*, 2014).

O *EDL5* pode não ser um gene funcional ortólogo do *EDS1*. Nem todos os membros de uma família de genes partilham necessariamente a mesma função (Gao *et al.*, 2014)

Os genes *EDL*, em particular, *EDL1*, *EDL2* e *EDL5* são muito semelhantes em termos de sequência nucleotídica e são outros componentes do mecanismo de defesa da videira. *EDS1*, *EDL2* e *EDL5* pertencem a uma família de genes. Contudo, o *EDL2* e o *EDL5* divergem do *EDS1* (Gao *et al.*, 2010).

Concluindo, os genes *EDS1*, *EDL2* e *EDL5* são genes de defesa da via do SA. Reagem à sua presença, com diferentes expressões e conseqüentemente induzem diferentes níveis de resistência a uma determinada gama de agentes patogénicos, nomeadamente ao oídio. O *EDS1* é provavelmente o membro da família mais importante na imunidade inata da videira (Gao *et al.*, 2014).

## 1.4 Expressão génica

A expressão génica é o processo pelo qual a informação codificada por um gene é usada na síntese de um produto funcional. Estes produtos são, em regra, proteínas mas no caso de genes não codificadores de proteínas o produto é um RNA funcional (de transferência, ribossomal, micro ou de interferência, entre outros). É a manifestação fenotípica de genes a qual pode ser modulada a diferentes níveis: pelo processo de transcrição, processamento do RNA, tradução e, eventualmente, pela modificação da proteína. A regulação da expressão de genes refere-se ao controlo da quantidade e do momento do aparecimento de um produto funcional. Apesar de quase todas as células de um organismo terem o mesmo conjunto de genes, somente uma pequena fração destes é usada numa certa célula em determinado momento. É este padrão altamente controlado, chamado de perfil de expressão génica, que torna as células específicas de cada tecido.

A medição da expressão é muito importante na medida em que facultava informação valiosa sobre as funções de um gene numa célula (tecido). Focando-nos nos genes codificadores de proteínas, a presença, a localização e a funcionalidade da proteína deveriam, idealmente, ser as formas de avaliação da expressão. Contudo, como o primeiro produto resultante da expressão génica é o mRNA, é frequentemente mais fácil detectá-lo e quantificá-lo e usar estas medições para inferir sobre-expressão de um determinado gene em particular

A medição da expressão de um gene é um processo dinâmico e o mesmo gene pode ter diferentes modos de ação sob determinadas circunstâncias. Pode variar com a temperatura, presença de outros factores como agentes causadores de doença.

Há diversos processos de quantificação de mRNA. A transcrição reversa do mRNA para sintetizar cDNA e a quantificação deste por real-time PCR é um processo atual, sensível e relativamente económico (Udvardi *et al.*, 2008).

O processo inicia-se pela separação do mRNA e isolamento de outros componentes celulares. Para tal, longas cadeias de nucleótidos de Timina (cadeias poli-T) são usadas para, por complementaridade, emparelhar com as Adeninas das cadeias poli-A das moléculas de mRNA. Seguidamente, o mRNA como é uma molécula muito frágil, difícil de manusear e analisar, é convertida em cadeias de DNA complementares, cDNA. Isto é feito, revertendo o processo natural que as células usam para produzir mRNA a partir de DNA. É chamado de transcrição reversa, o qual usa uma enzima chamada transcriptase reversa.

A molécula de cDNA assim produzida, na verdade um híbrido de mRNA-cDNA, é depois convertida numa molécula de cDNA de dupla cadeia por PCR, à semelhança do que se faz para DNA.

Através de uma reação de PCR, a qual assenta na multiplicação de fragmentos de cDNA especificamente selecionados pelo uso de pequenas sequências que lhe são complementares, os “primers”, consegue-se detetar e quantificar um determinado gene.

A deteção é feita por SybrGreen, um fluoróforo que se intercala nas cadeias duplas de DNA, e assim se vai acumulando durante a síntese exponencial de moléculas.

Pelo exposto, infere-se que quando se pretende fazer uma quantificação de cDNA por rt - PCR tem que se assegurar o controlo de diferentes parâmetros de modo a obter medições precisas e exatas. É necessário ter consciência da existência de variações não controláveis na quantidade da amostra inicial, na recuperação de RNA e na sua integridade, na eficiência da síntese de cDNA e eficiência da reação de quantificação por real-time PCR e na própria atividade transcricional dos tecidos analisados.

Atualmente o mecanismo mais frequentemente utilizado para normalizar os parâmetros atrás mencionados é o recurso a um gene de referência (Andersen *et al.*, 2013). Para um gene ser validado como gene de referência a sua expressão não pode variar nas células e tecidos em estudo. Alguns autores referem que um gene de controlo deveria ser universal e, por isso, ter uma expressão constante em todos os tecidos, células, condições experimentais e delineamentos. Infelizmente, a literatura revela que nunca foi encontrado um gene que satisfizesse estes requisitos em simultâneo (Vandesompele *et al.*, 2002) e, na verdade, tal também não seria necessário uma vez que a maioria das experimentações restringem-se a poucos tecidos ou a diferentes estádios histológicos de um mesmo tecido, como por exemplo, folhas doentes e saudáveis, tratadas e não tratadas, etc. Nestas situações, a probabilidade de encontrar um ou dois genes com expressão constitutiva, estável, é elevada, contudo, a identificação destes genes não é tarefa banal. Primeiro, tem que se identificar o gene e depois tem que se verificar a sua estabilidade (Andersen *et al.*, 2013).

A maioria dos estudos, encontrados em diferentes sistemas, recomenda o uso de 2 ou 3 genes de referência distintos como controlos internos.

Uma série de genes de expressão constitutiva como a actina (Li *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2005; Domoki *et al.*, 2006; Reid *et al.*, 2006), a tubulina (Jeong *et al.*, 2006), o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GPDH*) (Reid *et al.*, 2006; Sekalska *et al.*, 2006), o rRNA, a poliubiquitina e o fator de alongamento 1- $\alpha$  (EF1- $\alpha$ ) (Reid *et al.*, 2006; Jain *et al.*, 2006), o 18S e o 25SrRNA têm sido referidos, (Jain *et al.*, 2006) em vários estudos com, por exemplo, em *Arabidopsis*, *Medicago sativa* L. (*Luzerna*), *Vitis vinifera* L. e *Oryza sativa* (arroz). Por exemplo, o gene *GPDH*, em videira, encontra-se referido na literatura como expresso num nível constante em determinadas condições experimentais tendo sido considerado um gene de referência (Reid *et al.*, 2006; Espinoza *et al.*, 2007; Monteiro *et al.*, 2013).

Foi demonstrado que o gene *GPDH* se comporta como um gene de manutenção num repertório amplo de tratamentos bióticos e abióticos (Mahalingam *et al.*, 2003). Tanto em *Arabidopsis* como em *V. vinifera* a expressão do *GPDH* não foi significativamente diferente entre plantas infetadas por vírus e plantas de controlo em determinadas condições experimentais (Espinoza *et al.*, 2007). Recentemente, González-Agüero *et al.* (2013) referiram que os genes *UBQ10*, *PIP2B* e *EF1-α* (Reid *et al.*, 2006) apresentaram diferenças apreciáveis entre estados fenológicos e foram considerados instáveis, não-uniformes e com muito baixos níveis de expressão em videira. Contudo, perante a colonização da madeira de videira com *Phaeomonilla chlamydospora*, o gene *EF1-α* foi um dos que obteve melhores resultados (Borges *et al.*, 2014). Efetivamente, conclui-se que não há uma concordância entre autores e também não há concordância, para o mesmo gene, entre os resultados estatísticos obtidos a partir de diferentes tratamentos como por exemplo, geNorm, NormFinder e BestKeeper (Borges *et al.*, 2014). Os genes *TCPB* e *AIG1*, nunca referenciados por qualquer autor, foram selecionados como estáveis em todas as amostras estudadas por González-Agüero, *et al.* (2013) e propostos como genes de referência a ser usados em qPCR em estudos com uvas de mesa.

### **1.5 Objetivos deste estudo**

Nesta investigação introdutória, propoemo-nos:

1. Investigar uma possível correlação entre a presença da FD e mecanismos de defesa da videira:
  - Analisar os perfis de expressão dos genes de interesse, relacionados com processos de defesa das plantas,
    - numa casta branca, “Arinto” e
    - nunca casta tinta, “Padeiro de Basto” e
  - relacioná-los com o processo de infeção pela FD.
2. Selecionar genes que envolvam a ativação do sistema de defesa inato da planta como base para o desenvolvimento de estratégias alternativas de combate à doença.

## II. Material e Métodos

### 2.1 Castas utilizadas neste estudo

É do conhecimento geral que a severidade dos sintomas da FD varia entre castas. Até à data não há registos analiticamente e estatisticamente válidos sobre a susceptibilidade relativa das castas estudadas neste trabalho. De acordo com os testemunhos dos técnicos da região dos Vinhos Verdes, em particular da Sub-Região do Lima e do Cávado, as castas mais frequentes são a Loureiro, Arinto, Trajadura, Vinhão, Borraçal e Padeiro de Basto sendo a última a que mais rapidamente apresenta sintomas da doença da FD e se mostra afetada e com prejuízos. A casta Padeiro de Basto tem, em regra, grande vigor e uma folhagem viçosa e tenra até mais tarde do que as restantes castas. Nesta conjuntura, o objetivo principal desta tese de mestrado é estudar os perfis de expressão dos referidos seis genes, em geral, relacionados com mecanismos de defesa das plantas, e avaliar as suas respostas face à infeção pela FD, em plantas das castas “Padeiro de Basto” e “Arinto”.

A “Arinto” é uma casta branca de qualidade, da família *Vitaceae*, espécie *Vitis vinifera*, muito versátil, por isso é cultivada em quase todas as regiões vitivinícolas. Recomendada em toda a Região Demarcada dos Vinhos Verdes, com exceção das Sub-Regiões de Monção e de Melgaço; de área de cultivo em grande expansão é oriunda da zona interior da Região e muito produtiva.

Na região dos Vinhos Verdes é conhecida por “Pedernã”. Contudo, é na região da Estremadura, nomeadamente em Bucelas que esta casta ganhou notoriedade, sendo considerada a casta "rainha" da região.

É uma casta de vigor médio, por vezes forte, e de rendimento elevado. O cacho da casta Arinto é grande, compacto e composto por bagos pequenos ou médios de cor amarelada, amadurecendo tardiamente. Esta casta é frequentemente utilizada na produção de vinhos de lote (mais do que uma casta) e também de vinho espumante. Na região de Bucelas, produz vinhos monovariais (uma só casta), equilibrados e harmoniosos, de elevada acidez, cor citrina e marcadamente florais e frutados, com aromas a limão e maçã verde, quando jovens. Com o tempo desenvolvem-se aromas de mel. O sabor é fresco, harmonioso e persistente ([www.enoteca.pt](http://www.enoteca.pt); [www.vinhoverde.pt](http://www.vinhoverde.pt), [www.winershop.com/pt](http://www.winershop.com/pt); [www.clubevinhosportugueses.wordpress.com](http://www.clubevinhosportugueses.wordpress.com)).

A “Padeiro-de-Basto” é uma casta tinta de qualidade média, conhecida também por “Tinto Matias” ou “Tinto-Cão” e ainda por “D. Pedro” no concelho de Braga, autorizada em quase toda a Região Demarcada dos Vinhos Verdes com exceção da Sub-Região de Monção e concelhos (seis) mais a Sul da Região; muito produtiva, sendo cultivada particularmente na Sub-Região de Basto, sendo hoje também recomendada nas Sub-

Regiões do Ave e do Cávado. Dá origem a vinhos de cor vermelha rubi a vermelha granada, de aroma e sabor a casta, harmoniosos e saborosos ([www.vinhoverde.pt](http://www.vinhoverde.pt); [www.clubevinhosportugueses.wordpress.com](http://www.clubevinhosportugueses.wordpress.com)).

## 2.2 Material vegetal e condições de armazenamento

Colheram-se cinco amostras (Quadro I) de folhas de videira de duas castas, num total de nove sub-amostras, sendo uma tinta, *Padeiro-de-Basto*, e outra branca, *Arinto*, no concelho de Amares (Viana do Castelo) em meados do mês de outubro de 2015. Optou-se por estas duas castas, visto que são das mais representativas da região dos Vinhos Verde, que ambas apresentavam sintomas da doença da FD e a casta “Padeiro de Basto” parece ser mais susceptível à doença do que a casta “Arinto”, embora esta casta também seja susceptível (Figuras 1, 2 e 3).



**Figura 1** - Videira de “Padeiro de Basto” sem sintomas do fitoplasma Flavescencia Dourada.



**Figura 2** - Videira de Padeiro de Basto com sintomas do fitoplasma Flavescencia Dourada.



**Figura 3** – Vinha de Arinto com alguns exemplares com sintomas do fitoplasma Flavescencia Dourada.

Cada sub-amostra foi composta por folhas colhidas ao longo do sarmento (parte basal, mediana e da extremidade). As folhas foram colocadas dentro de tubos Falcon de 50 mL e armazenadas, de imediato, em azoto líquido (N<sub>2</sub>) (Figura 4) onde permaneceram durante o transporte até à sua conservação a -80 °C. Macerou-se o material vegetal, em almofariz, com azoto líquido e acondicionadas a -80 °C para posterior extração dos ácidos nucleicos (DNA e RNA). Os remanescentes de todas as matrizes foram guardados a -80 °C, para utilizações posteriores.



**Figura 4** – As sub-amostras de material vegetal em azoto líquido.

**Quadro I** – Características das amostras colhidas, do material vegetal.

Amostras	Sub-amostras	Casta	Descrição
1	1	Padeiro de Basto	Com sintomas de Flavescência Dourada
	2		
2	3		Sem sintomas de Flavescência Dourada
	4		
3	5		Com sintomas de Flavescência Dourada
	6		
	7		
4	8	Arinto	Sem sintomas de Flavescência Dourada
5	9		Com sintomas de Flavescência Dourada

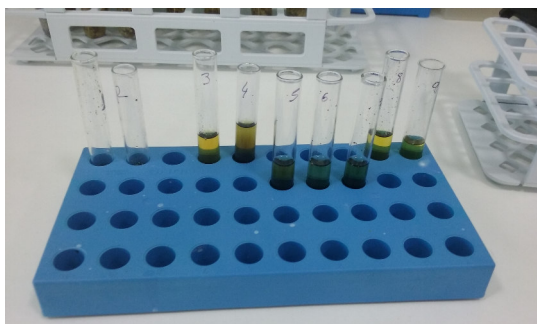
### 2.3 Detecção de vírus pela técnica do teste DAS-ELISA (“Double Antibody Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay”)

Efetou-se o teste ELISA para deteção dos seguintes vírus:

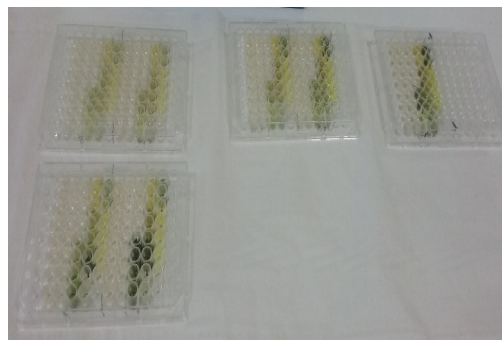
- Urticado – *Grapevine fanleaf virus*, GFLV;
- Mosaico de Arabis – *Arabis mosaic virus*, ArMV;
- Marmoreado – *Grapevine fleck virus*, GFKV;

- Enrolamento foliar 1, 2 e 3 – *Grapevine leafroll virus*, GLRaV-1, 2 e 3;
- Mosaico cromado – *Grapevine chrome mosaic virus*, GCMV.

Macerou-se o material vegetal em azoto líquido, homogeneizando-se 300 g de cada sub-amostra 1:20 (p/v) em tampão de extração (Anexo 1) (Figura5).



**Figura 5** - Sub-amostras de material vegetal, maceradas em tampão de extração.



**Figura 6** – Placas de microtitulação, preenchidas com as sub-amostras de material vegetal.

Utilizaram-se dois alvéolos por sub-amostra (análise em duplicado) de placas de microtitulação (Figura 6), para cada vírus. Este teste desenrolou-se em quatro fases, a seguir descritas:

**1.** Revestimento das placas de microtitulação com o anticorpo monoclonal específico de cada vírus.

Usou-se a diluição 1/1000 (v/v) do anticorpo IgG em tampão de revestimento (Anexo 1), ou seja, 20  $\mu$ L em 20 mL de tampão. Adicionaram-se 100  $\mu$ L a cada poço. Cobriram-se as placas com uma tampa e incubou-se numa mini estufa a 37 °C durante 4 h.

**1a.** Esvaziaram-se os poços e lavaram-se 3 vezes com tampão de lavagem (Anexo 1) removendo-se qualquer líquido e, por fim, secaram-se as placas invertendo-as e batendo levemente sobre papel absorvente.

**2.** Antígeno: incubação do extrato de planta.

Adicionaram-se 100  $\mu$ L por poço (Figura 6). Cobriram-se as placas com uma tampa e incubaram-se entre 4 °C e 6 °C durante a noite.

**2a.** Lavaram-se as placas de acordo com o descrito em 1a, na manhã seguinte.

**3.** Conjugado: Incubação do anticorpo marcado com enzima.

Diluiu-se o conjugado de enzima 1000 x em tampão de conjugado (Anexo 1). Adicionaram-se 200  $\mu$ L por poço. Cobriu-se novamente as placas com uma tampa e foram a incubar a 37 °C durante 5 h.

**3a.** Lavaram-se as placas de acordo com **1a**.

**4.** Substrato: Hidrólise do substrato enzimático. Reação de cor indica sub-amostra infetada.

Dissolveu-se o substrato enzimático, pNPP (p-Nitrophenyl Phosphate Substrate), 1 mg/ml em tampão de substrato. Adicionaram-se 100 µL por poço. Incubou-se as placas à temperatura ambiente (20-25 °C) protegidas da claridade.

**4a.** Leitura dos resultados. Observou-se visualmente o desenvolvimento de cor amarela e realizaram-se 3 leituras periódicas num espectrofotómetro 'Microplate Bio-Rad Model 550' num comprimento de onda de 405 nm, entre 30-120 min após o início da reação. Devido aos valores das sub-amostras negativas serem muito baixos considerou-se como referência o valor 0,100. Resultados com valores de DO de 0,100 foram considerados inconclusivos, repetindo-se a análise sempre que tal aconteceu.

## **2.4 Detecção de fitoplasmas**

### **2.4.1 Extração do ácido desoxirribonucleico (DNA)**

Extraiu-se o DNA das nove sub-amostras com o kit comercial "DNeasy Plant Mini Kit" (Qiagen, Alemanha). Adicionaram-se 400 µL de tampão AP1 e 4 µL de RNase A (20 mg/mL) a 100 mg de material vegetal macerado. Misturou-se vigorosamente no vórtex e incubou-se 10 min a 65 °C com agitação num "Thermo Mixer" (Qiagen, Hilden, Alemanha).

Adicionaram-se 130 µL de Tampão P3, misturou-se e incubou-se durante 5 min em gelo. Pipetou-se para uma coluna "QIAshredder" colocada num tubo coletor de 2 mL e centrifugou-se 2 min a 20000 g. Estas colunas contêm uma membrana com porosidade adequada à remoção dos restos celulares e dos precipitados criados pelo tampão AP1 e P3 permitindo a obtenção rápida de um lisado translúcido. Transferiu-se o lisado eluído para um novo tubo. Adicionaram-se 1,5 volumes de tampão AW1 e misturou-se por pipetagem. Transferiu-se 650 µL da mistura para uma nova coluna composta por uma membrana de sílica colocada num tubo coletor de 2 mL. Esta coluna permite a adsorção do DNA quando a concentração de sais caotrópicos é elevada. Assim, remove-se a água de moléculas hidratadas, carboidratos, polifenóis e outros metabolitos das plantas. Centrifugou-se 1 min a 6000 g. Descartou-se o sobrenadante e repetiu-se o passo com o resto da amostra. Nesta altura, a coluna está saturada de DNA e resíduos que foram co-adsorvidos com o DNA. Colocou-se a coluna num novo tubo coletor de 2 mL para proceder à sua lavagem e remover o máximo de resíduos. Para tal, adicionaram-se 500 µL de tampão AW2, centrifugou-se 1 min a 6000 g e descartou-se o eluído. Procedeu-se a uma nova lavagem com outros 500 µL do mesmo tampão e centrifugou-se durante 2 min a 20000 g. Transferiu-se a coluna para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e eluiu-se o DNA, o mais purificado

possível, com 100 µL de tampão AE. Incubou-se 5 min à temperatura ambiente (15-25 °C) e centrifugou-se 1 min a 6000 g. Repetiu-se o passo da eluição, seguido de incubação e centrifugação, obtendo um volume final de 200 µL de extrato de DNA. Quantificou-se o DNA total extraído de todas as sub-amostras num espectrofotómetro (NanoDrop2000 Technologies, Wilmington, USA).

Armazenaram-se os DNAs a -20 °C e posteriormente utilizaram-se em PCR em tempo real (rt-PCR).

#### **2.4.2 Detecção de FD e BN por rt-PCR triplex**

A deteção dos fitoplasmas Flavescência Dourada (FD) e Bois Noir (BN) em videira seguiu as recomendações do fabricante do KIT “Flavescence dorée/Bois noir Triplex Real-Time PCR” (méthode IpadLab, Qualiplant) que permite detetar simultaneamente os fitoplasmas FD e BN e o controlo interno. O Kit fornece “primers” e sondas com a tecnologia “Taq-Man®”, controlo interno, controlos positivos, controlos negativos e PCR “master mix”. As sondas “Taq-Man” são específicas para cada uma das deteções a realizar, ou seja, controlo interno, FD e BN e apresentam-se marcadas com fluóforos com comprimentos de onda de absorvância e de emissão diferentes de modo a permitir a deteção em comprimentos de onda da gama visível não confundíveis. Assim, a sonda de BN, marcada com o fluorocromo VIC emite no amarelo/verde (554 nm), a sonda da FD, marcada com o fluorocromo FAM, emite no verde (516 nm) e a sonda para o gene *COX* (Citocromo oxidase subunidade I), marcada com o fluorocromo Cy5, emite no vermelho (670 nm). Correu-se, sob as mesmas condições, um controlo negativo (C-) e um positivo (C+), fornecidos pelo Kit e duas amostras internas que já tinham sido testadas anteriormente com resultados positivos relativamente à presença da FD.

Realizaram-se todos os passos em gelo. Descongelou-se e armazenou-se a “Master Mix” da FD-BN e quando completamente descongelado misturou-se, com o vortex, de forma a homogeneizar o seu conteúdo. Transferam-se 22 µL da “Master Mix” para cada microtubo de rt-PCR, correspondente a cada teste a ser realizado. Preparou-se também um para controlo negativo e outros dois para controlos positivos da FD. Adicionaram-se 3 µL de cada sub-amostra de DNA em cada microtubo de rt-PCR e 3 µL de controlos positivos e de controlo negativo nos microtubos específicos. A fim de verificar a ausência de uma contaminação dos reagentes, incluiu-se um controlo sem DNA (branco ou “Non-template Control – NTC”) adicionando 3 µL de água livre de nuclease em 22 µL da FD-BN “Master Mix”. Colocou-se o anel já com os microtubos no termociclador “Rotor-Gene Q” (Qiagen, Hilden, Alemanha). Utilizaram-se as condições, descritas no seguinte Quadro II:

**Quadro II** – Descrição das condições utilizadas no rt-PCR.

Passos	Temperatura	Duração	Ciclos
Ativação enzimática e desnaturação inicial	95 °C	10 min	1
Desnaturação	95 °C	15 min	45
Hibridação dos “primers” e sondas e polimerização	60 °C	50 seg	

Analisaram-se todas as sub-amostras de DNA em duplicado.

## 2.5 Análise da expressão génica

Efetuar-se-ão três repetições, para cada sub-amostra, de extração do ácido ribonucleico e da síntese de cDNA, as quais foram testadas por PCR em tempo real (rt-PCR) em triplicado, de acordo com os seguintes protocolos:

### 2.5.1 Extração do ácido ribonucleico (RNA)

Macerou-se o material vegetal em azoto líquido e pesaram-se 150 mg de cada sub-amostra para se proceder à extração do RNA das mesmas. Juntaram-se 1,5 mL de tampão de extração, o qual tinha sido preparado previamente pela adição de 2-β-mercaptoetanol (150 µL num total de 15 mL de tampão de extração utilizado). Adicionaram-se 100 µL de “Sarkosyl” 20%. Posteriormente, incubou-se a 70 °C no “thermo mixer”, durante 10 min com agitação esporádica. Centrifugou-se a 10000 g, numa centrifuga “Hermle Z216MZ” (Wehingen, Germany), durante 10 min à temperatura ambiente (22-25 °C). A partir daqui, seguiu-se com o protocolo do EZNATM “Plant RNA Kit”. Retirou-se o sobrenadante para um novo tubo (tipo “Eppendorf”) e adicionou-se um volume de isopropanol idêntico ao recolhido. Misturou-se utilizando o “vortex” para precipitar o RNA. Centrifugou-se a 10000 g durante 2 min à temperatura ambiente (22-25 °C) para precipitar o RNA e decantou-se o sobrenadante. Inverteu-se o tubo (tipo “Eppendorf”) em papel de modo a drenar qualquer líquido residual. Adicionaram-se 100 µL de solução tampão RB pré-aquecido a 65 °C e misturou-se utilizando o “vortex” para dissolver o depósito. Adicionaram-se 250 µL de tampão RB com 5 µL de 2-β-mercaptoetanol e seguidamente adicionaram-se 350 µL de etanol a 70% (v/v). Misturou-se utilizando o “vortex”. Aplicou-se a totalidade da sub-amostra numa Mini Coluna “HiBind” RNA colocada num tubo (tipo “Eppendorf”) de 2 mL. Centrifugou-se a 10000 g durante 30 seg à temperatura ambiente (22-25 °C). Descartou-se o eluído e colocou-se novamente a coluna no tubo. Adicionaram-se 500 µL de RNA “Wash Buffer” I e centrifugou-se durante 30 seg a 10000 g. Descartou-se o eluído, bem como o tubo coletor. Colocou-se a Mini Coluna “HiBind” RNA num tubo “Eppendorf” novo de 2 mL e adicionaram-

se 500  $\mu\text{L}$  de RNA “Wash Buffer” II diluído com etanol absoluto. Fechou-se a coluna cuidadosamente e centrifugou-se durante 30 seg a 10000  $g$  à temperatura ambiente (22-25  $^{\circ}\text{C}$ ). Descartou-se o líquido recolhido. Reutilizou-se o tubo coletor. Lavou-se a *Mini Coluna* “HiBind” RNA com outros 500  $\mu\text{L}$  de RNA “Wash Buffer” II. Centrifugou-se durante 30 seg a 10000  $g$  à temperatura ambiente (22-25  $^{\circ}\text{C}$ ) e descartou-se o líquido recolhido. Colocou-se a coluna no tubo coletor e centrifugou-se à velocidade máxima durante 1 min. Transferiu-se a coluna para um “Eppendorf” de 1,5 mL e eluiu-se o RNA, adicionando 50  $\mu\text{L}$  de água tratada com DEPC. Centrifugou-se à velocidade máxima durante 1 min à temperatura ambiente (22-25  $^{\circ}\text{C}$ ). Quantificou-se as sub-amostras de RNA no espectrofotómetro já referido (NanoDrop2000 Technologies, Wilmington, USA). Guardaram-se as mesmas a -80  $^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.4.2 Eletroforese em gel de agarose a 1,5%**

Para garantirmos a integridade e pureza do RNA e desta forma confirmarmos a ausência de DNA nas nossas sub-amostras da primeira extração, submetaram-se as mesmas a uma eletroforese, em gel de agarose (Sigma, Sintra, Portugal) a 1,5% contendo brometo de etídio (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), em tampão TAE 1x (0,04 M Tris-acetato, 0,001 M EDTA) num aparelho de eletroforese Horizon 11.14 (Biometra, Göttingen, Alemanha) durante 30 min a 98 V. Previamente adicionaram-se, a cada sub-amostra de RNA, 2  $\mu\text{L}$  de tampão de carregamento da amostra (Anexo 2).

Os géis de agarose foram visualizados num equipamento de captação de imagem, modelo G:Box HR (Syngene, Reino Unido).

#### **2.5.3 Síntese de cDNA por transcrição reversa (RT-PCR)**

Realizou-se a síntese da primeira cadeia de cDNA a partir do mRNA total extraído usando o kit “SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR” (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia). As reações de transcriptase reversa continham 2  $\mu\text{L}$  da sub-amostra de RNA, 1  $\mu\text{L}$  de oligo (dT)20 (50  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de uma mistura de dNTPs (10 mM) e decorreram num volume final de 10  $\mu\text{L}$  perfeito com água tratada com DEPC. Posteriormente, e após terem sido incubadas a 65  $^{\circ}\text{C}$  durante 5 min, preparou-se uma *mix* de síntese de cDNA que continha  $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 10x “RT buffer”, reverse transcriptase (“SuperScript III RT” (200 U/ $\mu\text{L}$ )), e “RNase inhibitor” (40 U/ $\mu\text{L}$ ) a qual se adicionou à reação anterior. Incubaram-se as sub-amostras a 50  $^{\circ}\text{C}$  durante 50 min, seguindo-se um período de 5 min a 85  $^{\circ}\text{C}$ . Colocou-se no gelo. Centrifugou-se e juntou-se 1  $\mu\text{L}$  de “RNase H” a cada tubo e incubou-se a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 20 min. Efetuaram-se todas as reações de síntese de cDNA num termociclador “Touchgene Gradient Thermocycler” (Techne, Staffordshire, UK) e os “primers” foram sintetizados pela ThermoScientific (Ulm, Germany).

Armazenaram-se os cDNAs a -20 °C e posteriormente utilizaram-se em rt-PCR numa diluição de 1:10.

Relativamente às reações de rt-PCR, prepararam-se as misturas de reação para cada gene de acordo com a informação contida no Quadro III:

**Quadro III** – Cálculo dos volumes utilizados em rt-PCR.

	Volumes/reação (µL)	Volumes/9 reações (µL)
Sybr <sup>®</sup> Green	6,25	185,63
“Primer” F	0,25	7,43
“Primer” R	0,25	7,43
cDNA	5	-
DEPC “treated water”	0,75	22,28

#### 2.5.4 Seleção de genes de interesse envolvidos em mecanismos de defesa

Após pesquisa bibliográfica, selecionaram-se os genes da videira envolvidos na resposta a infeções por diversos patogéneos, a serem submetidos a estudo de expressão génica: *VvEDS1*, *VvEDL1*, *VvEDL2*, *VvEDL5* (Gao *et al.*, 2014), *VvSAG12* (Espinoza *et al.*, 2007) e *VvNPR1.1* (Le Henanff *et al.*, 2009). As sequências dos “primers” usados em rt-PCR foram adotadas dos autores atrás referidos e encontram-se no Quadro IV.

#### 2.5.5. Seleção do gene de referência

Para este trabalho selecionaram-se os genes de *Actina* e *GPDH*, como candidatos a genes de referência. A avaliação de ambos foi feita por duas abordagens:

- 1) Quantificação relativa dos cDNAs destes dois genes nos extratos de cDNA. Para tal, foi considerado o valor médio dos Ct de três replicados obtidos por deteção com Sybr<sup>®</sup>Green.

$$2^{\Delta Ct_{cDNAx}} = 2^{[Ct_{GPDH} - Ct_{actina}]}$$

- 2) Determinação e comparação da eficiência da amplificação por rt-PCR através do declive de uma reta de regressão estabelecida a partir de uma série de 4 diluições de uma amostra com quantidade conhecida e ainda o valor do R<sup>2</sup>. A reta de regressão correlaciona o logaritmo da quantidade inicial da amostra com o valor de C<sub>t</sub> obtido durante a amplificação de cada diluição.

## 2.5.6 Otimização das condições de rt-PCR

A detecção da presença dos cDNAs dos genes referidos em 3.4.4. e 3.4.5. foi feita com Sybr®Green, no já referido termociclador “Rotor-Gene Q” (Qiagen, Hilden, Alemanha).

Em todos os ensaios foram empregues controlos de qualidade: controlos negativos e brancos (NTCs) sob as mesmas condições das sub-amostras. Utilizaram-se as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C durante 3 min, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 1 min; temperatura de “annealing” (Quadro IV) durante 1 min, extensão a 72 °C de acordo com o tamanho do fragmento, seguida por uma extensão final a 72° C durante 7 min. Efetuaram-se todas as reações em triplicado.

Para otimização das condições de reação, realizaram-se vários ensaios, fazendo variar a temperatura de hibridação (“annealing”) dos “primers”. Desta forma, determinou-se a temperatura ótima de “annealing” com base na qualidade das curvas de amplificação dos genes em estudo (Quadro IV).

### 2.5.6.1 Identidade dos produtos de PCR

Confirmou-se a identidade dos produtos de PCR pela determinação da temperatura de “melting” dos produtos obtidos em cada tubo de rt-PCR.

**Quadro IV** – Sequências “forward” (F) and “reverse” (R) dos “primers” usados na amplificação dos genes estudados, composição nucleotídica dos “primers”, temperaturas de “annealing” utilizadas e tamanho dos produtos de PCR (amplicões).

Genes	Sequência (5'-3') e tamanho dos “primers” (pb)	T de “annealing” (°C)	Tamanho produto de PCR (pb)	CG (%)
Vv- <i>ACTIN3</i>	F: CAC TTG GCC TAC CAA TTA AAG A (22)	57	138	41
	R: CCC CAC CTC AAC ACA TCT CC (20)			54
Vv- <i>GPDH</i>	F: CAG GAT GCC ATG TGG ACA A (19)	57	344	53
	R: GTG TTG CCT TCA TTG AAT GG (20)			45
Vv- <i>EDS1</i>	F: AGG GTT TTA TAT TGT TAT CTC AAG GC (26)	57	151	35
	R: GGA AGA AAA TAT CTT ATT ACT ACA TAA TGT TTC A (34)			24
Vv- <i>EDL1</i>	F: GAG CTT CCG GTG TCT TCT G (19)	57	210	58
	R: CTC GGC CTT TTC CTT ATA CTC A (22)			45
Vv- <i>SAG12</i>	F: AGC TTC CGA TGG CAG ATG (18)	57	561	56
	R: TCT TCA CAG CAG GTG GCA (18)			56
Vv- <i>EDL5</i>	F: CAC TTG GCC TAC CAA TTA AAG A (22)	57	167	41
	R: GCT TGA AGG CAT AGC ATG G (19)			53
Vv- <i>NPR1.1</i>	F: GAC CAC AAC CGA GCT TCT TGA TCT (24)	60	108	50
	R: ATA ATC TTG GGC TCT TTC CGC ATT (24)			42
Vv- <i>EDL2</i>	F: GCT GGA TCT TGG CTT CGC (18)	60	201	61
	R: CTT GCT TCT TCT CTC CAA TTA C (22)			41

### 2.5.6.2 Eficiência (E) da reação de rt-PCR

Estimou-se a E da reação de rt-PCR através do estabelecimento de uma reta de regressão a partir de uma série de diluições feitas a partir de um extrato de cDNA e da amplificação de um determinado gene. A reta de regressão correlaciona o logaritmo da quantidade inicial da sub-amostra com o valor de Ct obtido durante a amplificação de cada gene em cada diluição. O declive (d) da reta é a medida da E, pela fórmula:

$$E = (10^{(-1/d)} - 1) \times 100\%$$

Sempre que possível, de acordo com a capacidade do rotor do equipamento RotorGene Q, estimou-se a E da reação de rt-PCR para cada gene, em diferentes extratos de cDNA ao mesmo tempo.

### 2.5.7. Análise da expressão dos genes de interesse pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Realizou-se a análise da expressão dos genes referidos em 3.4.4., relativa ao gene de referência, pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Considerou-se o ciclo de rt-PCR para o qual a fluorescência devida à multiplicação das cópias do gene de interesse foi superior à fluorescência de “background” (Ct) e comparou-se com o ciclo de PCR em que também a fluorescência ultrapassou a de “background” para o gene de referência. Isto gerou um valor  $\Delta Ct$  ( $= C_{t\text{gene de interesse}} - C_{t\text{gene de referência}}$ ) para cada extrato de cDNA. Fez-se este cálculo para a sub-amostra de estudo e para o controlo e compararam-se os dois valores obtidos gerando o  $\Delta\Delta Ct = (C_{t\text{gene de interesse}} - C_{t\text{gene de referência}}) - (C_{t\text{gene de interesse}} - C_{t\text{gene de referência}})$ . Só se considerou uma diferença significativa quando  $2 < 2^{-\Delta\Delta Ct} < 0,5$ .

A reação de amplificação é traduzida numa curva exponencial que relaciona o número de ciclos de PCR, com um determinado nível de fluorescência, com a quantidade relativa de “template” no início da reação. O número de ciclos é denominado Ct onde t é o nível do limiar (“Threshold”), onde a fluorescência se encontra imediatamente acima do nível de ruído (“background”).

Na maioria dos estudos é assumido a mesma E para todas as reações na mesma corrida para o mesmo gene (Cook *et al.*, 2004). Contudo, variações na E devem ser averiguadas para detetar “outliers” óbvios e sistemáticos. É aconselhado descartar os “outliers”. A eficiência da reação para amplificação de um determinado cDNA não deve variar mais do que 10% entre a sub-amostra e o controlo.

A variação no valor de Ct para os replicados técnicos também deve ser averiguada e a média destes valores é usada nos cálculos subsequentes.

### III. Resultados e Discussão

Para avaliar o padrão de expressão de genes associados a mecanismos de resistência/tolerância, em particular, perante a infeção por FD e entender as suas relações regulatórias, idealmente, as plantas analisadas deveriam estar completamente isentas de outras doenças, o que sabíamos ser quase impossível, uma vez que os fungos do lenho e o míldio/oídio são muito frequentes nas vinhas nacionais. Neste trabalho conseguiu verificar-se o estado das plantas em termos da presença de vírus e fitoplasmas causadores de sintomatologia semelhante à da FD.

#### 3.1 Detecção de vírus nas duas castas

A deteção dos vírus “Grapevine LeafRoll 1-3” (GLRV), vírus da família *Closteroviridae* associados a doenças do enrolamento foliar, era imperativa uma vez que estes vírus são os mais prevalentes nas vinhas em Portugal assim como de toda a Europa, América do Norte e Sul, África, Ásia e Japão. A ausência destes vírus é uma exigência dos programas de certificação do material de propagação (Diretiva nº68/193/CEE do Conselho de 9 de Abril transposta pelo Decreto Lei 194/2006 de 27 de Setembro).

Os vírus *Grapevine Fanleaf Virus* (GFLV), *Arabis Mosaic Virus* (ArMV) e *Grapevine Chrome Mosaic Virus* (GCMV), do grupo dos *Nepovirus*, provocam elevados prejuízos uma vez que podem infetar todas as cultivares e porta-enxertos derivados de espécies americanas, de *V. vinifera* e híbridos.

Finalmente, o *Grapevine Fleck Virus* (GFkV) é um vírus altamente transmitido por enxertia, manifesta-se pelo aparecimento de manchas claras nas nervuras das folhas mais jovens e por um mosaico nas folhas mais velhas que enrugam e simultaneamente enrolam as suas margens inferiores no sentido ascendente, formando verdadeiros canudos. Apesar de parecerem muito típicos, nestas últimas, os sintomas não são muito evidentes. Por esta razão e ainda pelo facto do material foliar, usado neste estudo, ter sido colhido em outubro, uma fase muito adiantada do ciclo de atividade anual, houve a necessidade de também despistar a presença deste vírus. Efetivamente, o melhor material a ser colhido para constituir a amostra são as folhas adultas e o floema. Devido a dificuldades técnicas, não foi possível amostrar o floema, tendo a análise sido efetuada somente em folhas.

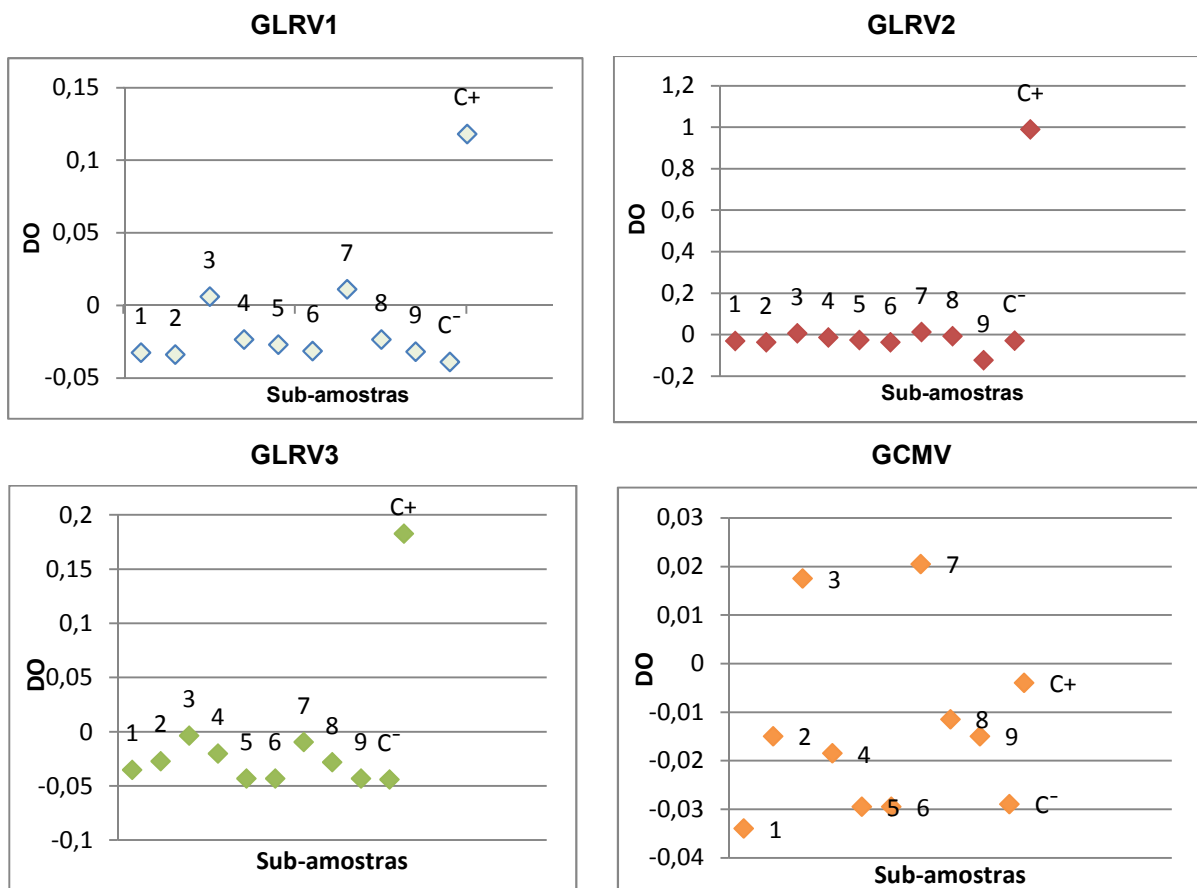
Normalmente, estes vírus são detetados por recurso a testes imunológicos. Os testes ELISA (“Enzyme-linked Immunosorbent Assay”) são simples e precisos para a maioria dos vírus. Aqui convém realçar que a sensibilidade do teste para GLRV-3 é baixa (Walsh e Pietersen, 2013). Teria sido mais aconselhável o uso de transcriptase reversa associada a

“loop-mediated isothermal amplification (LAMP)”. Contudo, o laboratório ainda não tem esta metodologia implementada e validada.

Através de testes ELISA não foram detetados, nas plantas em estudo, os sete vírus mais frequentemente encontrados na *V. vinifera* (Figura 7). Perante este resultado somos levados a concluir que as nossas sub-amostras não estavam infetadas por vírus, não podendo, no entanto, descartar a possibilidade destes estarem presentes em concentrações inferiores ao Limite de Detecção (LOD) dos métodos aplicados. Os vírus, em geral, apresentam-se distribuídos erráticamente nas vinhas, nas videiras e nos tecidos usados para análise e a sua concentração depende ainda da idade do tecido, da estação do ano e de fatores ambientais (Krebelj *et al.*, 2015).

Acresce ainda que as plantas podem ter sofrido infeções por outros agentes patogénicos, nomeadamente fungos, bactérias e/ou apresentado lesões por picadas de insetos para o que não se fez qualquer rastreio analítico.

**Figura 7** – Resultados, com valores médios, dos Testes ELISA.



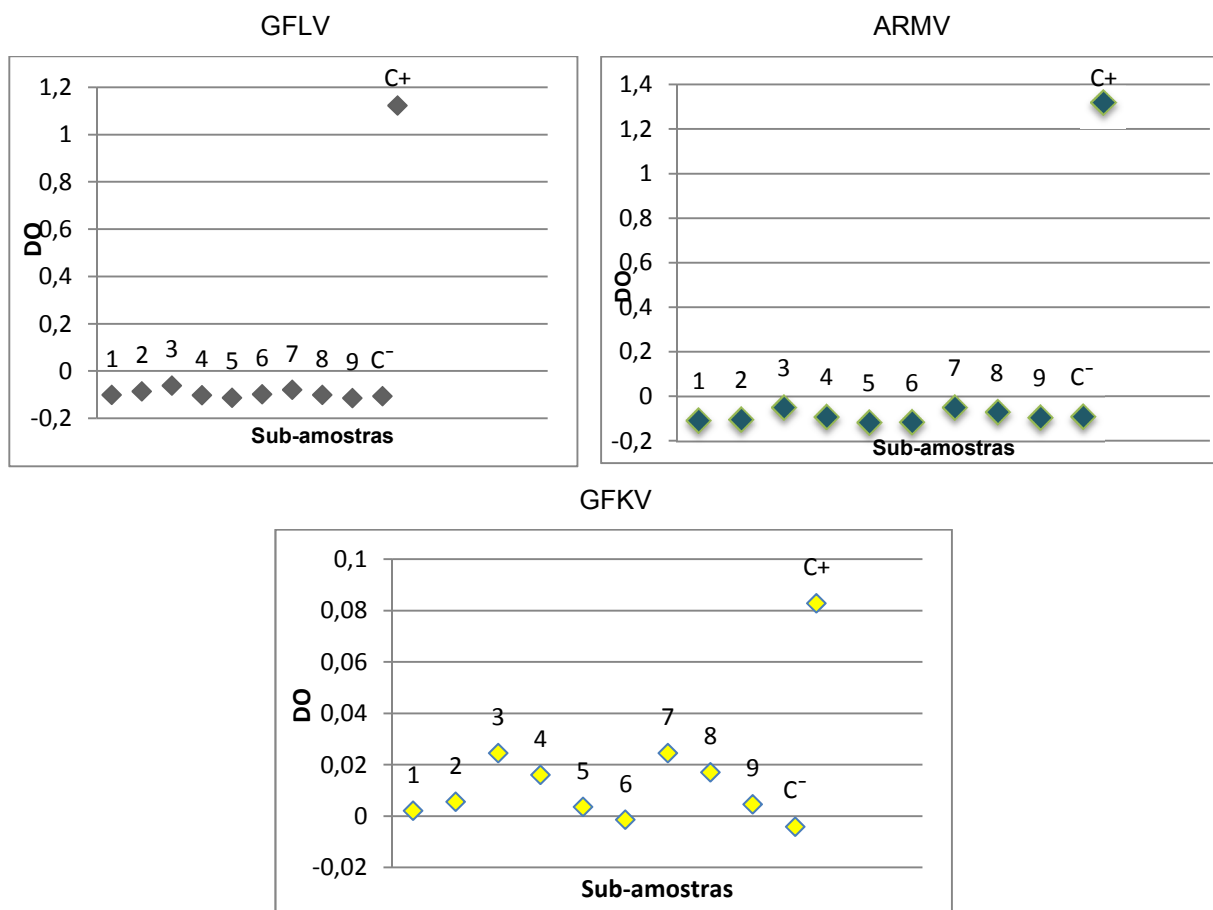
Legenda:

1,2,3,4,5,6,7,8 e 9- Subamostras

C<sup>+</sup>- Controlo Positivo

C<sup>-</sup>- Controlo Negativo

DO – Densidade ótica



### 3.2 Deteção de fitoplasmas nas duas castas e relação com sintomas

Para se efetuar o despiste dos dois fitoplasmas que, em Portugal, causam mais estragos nas vinhas, FD e BN, utilizaram-se métodos de PCR em tempo real, validados em ensaios interlaboratoriais internacionais (The Euphresco GRAFDEPI group, 2015). Extraiu-se o DNA total de cada sub-amostra pelo processo baseado no uso de colunas de sílica associado ao Kit comercial “DNeasy Plant Mini Kit” (Qiagen, Hilden, Alemanha) e avaliou-se a quantidade extraída e a qualidade por espectrofotometria (Quadro VI).

**Quadro V** – Concentração e qualidade dos DNAs extraídos.

Sub-amostras	DNA		
	Concentração (ng/μL)	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
1	8,8	1,87	0,76
2	5,9	1,86	0,89
3	8,3	1,62	0,87
4	10,2	1,65	0,9
5	7,5	1,77	0,94
6	4,5	1,64	0,8
7	5,8	1,96	0,74
8	13,7	1,58	0,85
9	7,8	1,56	0,56

A razão entre os valores de absorvância medida a 260 nm e a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) é determinada para verificar a qualidade do DNA e inferir sobre a possível contaminação com proteínas. Podem, no entanto, haver outros compostos com picos de absorvância perto de 280 nm. Este é o caso dos compostos polifenólicos, tão abundantes nas videiras (Gábor, 2013; Gorinstein *et al.*, 1993). O DNA puro deverá apresentar uma razão  $A_{260}/A_{280}$  entre 1,7 e 2,0, (Gallagher, 2011) sendo 1,8 o valor óptimo. Valores superiores refletem contaminação com RNA e valores inferiores devem-se a contaminações com proteínas (Varma *et al.*, 2007).

A razão  $A_{260}/A_{230}$  indica a presença de contaminantes do tipo polifenóis e carboidratos (Gallagher, 2011), pelo que valores baixos desta razão podem ser o resultado da presença dos mesmos, o que é muito frequente na vinha (Gábor, 2013; Gorinstein *et al.*, 1993).

Os valores do rácio  $A_{260}/A_{230}$  para ácidos nucleicos "puros" são muitas vezes mais elevados do que os respetivos valores da razão  $A_{260}/A_{280}$ . É expectável que os valores de  $A_{260}/A_{230}$  se localizem no intervalo 2,0-2,2 (Gallagher, 2011).

Como se pode verificar, as nossas sub-amostras, apresentaram valores dos rácios  $A_{260}/A_{280}$  e  $A_{260}/A_{230}$  entre 1,56 a 1,96 e entre 0,50 e 0,94, respetivamente, indicando que alguns DNAs se encontravam perto da pureza e outros com valores aceitáveis, apesar de inferiores aos do DNA puro. O aparente menor valor para as sub-amostras da casta branca pode dever-se somente ao reduzido número de repetições desta casta. Para se avaliar o efeito da casta teríamos que ter um maior número de sub-amostras e repetições da extração.

As concentrações obtidas foram muito baixas. Isto pode dever-se ao método de extração e à qualidade do material vegetal. Com o Kit "DNeasy Plant Mini Kit", normalmente, conseguem-se concentrações na ordem dos 20 ng/ $\mu$ L quando aplicado a amostras muito ricas em DNA como por exemplo, os meristemas apicais das raízes de milho. Contudo, este mesmo material, em combinação com métodos baseados em CTAB, permite obter extractos de DNA com concentrações cerca de 10x-15x superiores (de Andrade, comunicação pessoal). As folhas de videira disponíveis foram colhidas no Outono, numa fase muito avançada do ciclo vegetativo anual, o que prejudicou o rendimento da extração de DNA.

Em plantas lenhosas de folha caduca existem diferenças significativas na qualidade e na quantidade de DNA entre amostras colhidas na Primavera e no Outono, sendo que no Outono as concentrações obtidas são mais baixas. Dependendo do método de extração, as concentrações referidas na literatura para videira, no material de Outono varia de 30 a 370 ng/ $\mu$ L (Akkurt, 2012). Considerando que, se se tivesse usado um método baseado no uso de CTAB se teriam conseguido concentrações 10x a 15x superiores, então os nossos valores são compatíveis com os das amostras de outono.

Apesar de todos os extratos de DNA exibirem alguns contaminantes e concentrações baixas, revelaram ter DNA em quantidade e com qualidade suficiente para se testar a presença dos referidos fitoplasmas numa reação de PCR em tempo real, triplex, qualitativa (Quadro VII). A menor qualidade das sub-amostras 8 e 9 (casta branca) deve-se à presença de compostos distintos dos presentes nas sub-amostras da casta tinta, com efeitos diferentes na amplificação. Isso reflete-se no valor do ciclo de PCR para o qual se considerou haver uma amplificação do fragmento de DNA alvo.

Assim, como se pode constatar dos dados presentes no Quadro VII, na sub-amostra 8 a amplificação do gene de referência só se verifica numa réplica enquanto que na sub-amostra 9 foi possível nas duas réplicas. Por outro lado, se compararmos a sub-amostra 1 com a 9, com concentrações aproximadas, verifica-se um atraso na amplificação na sub-amostra 9 (o valor de  $C_t$  esperado é função da concentração). As duas sub-amostras têm somente 1 ng/ $\mu$ L de diferença na concentração do DNA total, contudo a amplificação do gene COX apresenta 2,2 ciclos de atraso o que, considerando uma amplificação exponencial, corresponde a cerca de  $2^{2.2} = 4,6x$  menos DNA. Este atraso na amplificação deve-se à presença de inibidores da ação da polimerase de DNA.

Ainda sabendo que estão presentes inibidores da reação de PCR, os resultados foram todos considerados válidos pois todos os valores de  $C_t$  observados são muito baixos, situando-se entre 12 e 23. Este método foi validado, durante o ensaio interlaboratorial internacional, com um valor de  $C_t$  correspondente ao de Cut-off de 37. Isto significa que quando o  $C_t > 37$  consideram-se as sub-amostras negativas. Todas as sub-amostras consideradas negativas não apresentaram curva de amplificação para os fitoplasmas alvo do teste.

Com o procedimento utilizado, numa única reação de PCR detectam-se os fitoplasmas FD e BN e ainda o controlo interno (gene COX).

**Quadro VI** – Resultados do rt-PCR triplex, relativos à deteção dos fitoplasmas FD e BN.

Sub-amostras.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	C <sup>+</sup> 311	C <sup>+</sup> 312	C <sup>+</sup> Kit	C <sup>-</sup> Kit
FD	Ver.	19,09	22,88	Neg.	Neg.	Neg.	20,92	20,92	Neg.	21,08	21,54	19,78	20,74	Neg.
		19,31	22,09	Neg.	Neg.	Neg.	21,73	21,27	Neg.	20,80			20,74	Neg.
	Méd.	19,20	22,49	Neg.	Neg.	Neg.	21,33	21,10	Neg.	20,94	21,54	19,78	20,74	
BN	Amar.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		Neg.
		Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.				Neg.
	Méd.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		Neg.
COX	Vermel.	13,58	15,49	14,28	14,82	15,83	15,81	14,98	14,63	15,78	12,52	12,23	13,53	15,09
		13,6	14,44	14,05	14,85	13,97	15,68	15,12	Neg.	15,80			13,60	13,57
	Média	13,59	14,97	14,17	14,84	14,90	15,75	15,05	Neg.	15,79	12,52	12,23	13,57	14,33

### 3.3 Perfis de expressão génica por rt-PCR

Os perfis de expressão génica foram obtidos por um processo analítico que implicou a realização de duas reações consecutivas: a reação da RT seguida da reação da polimerase de DNA (PCR) em cadeia. Este é um processo sensível, económico e preciso. Contudo, embora seja o processo de uso mais geral, pode apresentar diversos erros sistemáticos, inerentes à própria técnica, comprometendo todos os resultados e a sua reprodutibilidade.

Uma estimativa precisa da expressão génica é possível quando o material tem boa qualidade, as práticas laboratoriais são de elevada qualidade e se usam diversos genes de referência. O delineamento experimental, o cálculo da normalização da expressão génica e a análise estatística subsequente são da maior importância. Dá-se relevo ao primeiro e ao último destes três itens vitais (Rieu e Powers, 2009).

O número de amostras (repetições biológicas) e o número de réplicas (repetições técnicas) deve ser suficiente para permitir uma análise estatística robusta. O número de repetições biológicas deve ser no mínimo de três. Para este trabalho foram colhidas 3 amostras constituídas por 7 sub-amostras com FD e 2 amostras correspondentes a 2 sub-amostras sem FD, de duas castas (Padeiro de Basto e Arinto) em duas vinhas distintas. Neste estudo, o número de plantas amostradas foi baixo. Previamente à colheita de amostras, foi feita uma estimativa do custo das análises laboratoriais tendo por base a realização de triplicados técnicos independentes em todas as fases (extração de RNA, síntese de cDNA e rt-PCR). Previu-se assim 27 extrações de RNA, 81 sínteses de cDNA e 1500 reações de PCR em tempo real. O elevado valor associado foi o fator impeditivo para a realização de uma amostragem mais abundante. Por estes mesmo motivo, os resultados obtidos foram considerados preliminares para as duas castas e para os 6 genes estudados.

#### 3.3.1 Extração do ácido ribonucleico (RNA) e síntese de cDNA

Foram efetuadas três extrações de RNA, de cada sub-amostra, em três momentos distintos, onde foram obtidos os valores que constam dos Quadro VIII. A qualidade do RNA total extraído de todas as sub-amostras foi analisada por espectrofotometria, com base nas razões das absorvâncias medidas a 260 nm e 280 nm e a 260 nm e 230 nm,  $A_{260}/A_{280}$  e  $A_{260}/A_{230}$ , respetivamente. Um RNA é puro quando a razão  $A_{260}/A_{280}$  é  $>$  a 1,8 e a razão  $A_{260}/A_{230} > 2,0$  (Gallagher, 2011). Alguns autores consideram que uma razão  $A_{260}/A_{230} > 1,0$  é um indicador de pureza aceitável (LCSciences, 2011). O RNA é uma molécula instável e susceptível de degradação por RNases que, em contrapartida, são muito persistentes e podem ser co-extraídas com o próprio RNA. Sempre que o extrato de RNA tem uma razão  $A_{260}/A_{280} > 2,0$  é considerado relativamente livre de proteínas e, portanto, não seria

necessário adicionar um inibidor de RNases à reação de síntese de cDNA pela RT. Contudo, porque a razão  $A_{260}/A_{230}$  não foi boa, adicionou-se por precaução um inibidor de RNase numa concentração de 40 U/ $\mu$ L.

**Quadro VII** – Concentração e qualidade das sub-amostras de RNA obtidas em três períodos independentes.

Sub-amostras	RNAs 26 de Outubro			RNAs 2 de Dezembro			RNAs 10 de Dezembro		
	Conc. (ng/ $\mu$ L)	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$	Conc. (ng/ $\mu$ L)	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$	Conc. (ng/ $\mu$ L)	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
1	38,1	1,98	0,75	11,6	2,18	0,08	47,3	2,19	1,76
2	55,4	2,09	1,6	48,4	2,09	0,47	42	2,14	0,30
3	255,8	2,11	2,16	147,5	2,12	1,36	206,1	2,14	2,11
4	100,1	2,1	0,77	27,3	2,04	0,26	70,7	2,06	0,15
5	123,1	2,06	1,51	59,8	2,07	0,74	63,2	2,13	0,87
6	31,1	2,11	0,24	7,4	2,02	0,02	21,7	2,07	1,47
7	41,2	2,04	1,32	14,9	2,11	0,03	41,5	2,08	0,93
8	42	2,08	1,27	18,8	2,1	0,25	15,5	1,97	1,45
9	20,6	2,08	0,18	12,4	2,01	0,36	12,6	1,99	0,11

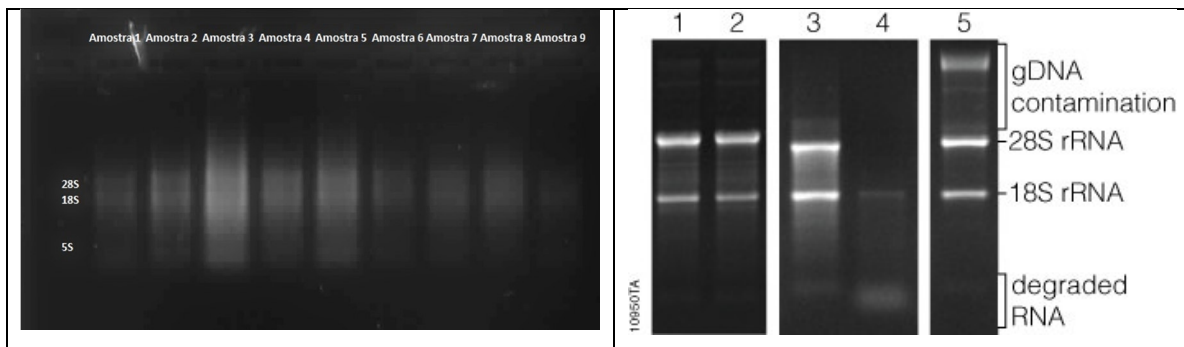
Tal como requerido e pela análise dos valores do Quadro VIII, comprovou-se que se aplicou um processo de extração que permitiu que todos os RNAs apresentem uma razão  $A_{260}/A_{280}$  de aproximadamente 2. Este facto vinha também referido na brochura que acompanha o Kit. No entanto, o mesmo raciocínio não se aplica aos valores da razão  $A_{260}/A_{230}$ . Estes variaram muito entre amostras e entre os três momentos de extração a partir da mesma sub-amostra. Obtiveram-se valores muito baixos (por exemplo 0,11 a partir da sub-amostra 9, em 10 de dezembro), refletindo muitos contaminantes, e valores considerados bons (por exemplo 2,16 a partir da sub-amostra 3, em 26 de outubro). A elevada variabilidade inter e intramostra está relacionada com a espécie vegetal mas também com a idade do material colhido (folhas adultas no fim do ciclo vegetativo anual) e ainda com alguma heterogeneidade da sub-amostra. Esta última não foi suficientemente reduzida durante a preparação das tomas da sub-amostra usadas para a extração. A quantidade máxima de tecido foliar permitida pelo kit, por extração, é de 100 mg. Quando a toma da amostra para análise é de muito pequena dimensão em relação à amostra colhida, o procedimento de sub-amostragem é crucial para se garantir que uma intensa redução de massa não afeta a representatividade da amostra (Petersen *et al.*, 2004). A variabilidade por nós registada é minimizada pelo número de repetições.

Os RNAs extraídos no dia 26 de outubro foram ainda analisados por separação eletroforética em gel de agarose a 1,5% (m/v) (Figura 12). Um RNA de eucariota com qualidade elevada deve apresentar uma banda de cerca de 4,5 Kb, correspondente ao 28S rRNA, com cerca do dobro da intensidade da banda correspondente ao 18S rRNA de aproximadamente 1,9 Kb e deve estar desprovido de DNA co-extraído.

Por comparação com uma imagem de gel de Graeber e coautores (2011) verificou-se que os nossos extratos de RNA apresentavam as duas bandas esperadas e ainda a correspondente ao 5S ou a tRNA. Não se visualizaram bandas de tamanho maior correspondentes a DNA genómico, contaminante do extrato de RNA. Este resultado é o esperado atendendo que o Kit de extração utilizado refere que para a maioria das aplicações, não é necessário proceder à digestão com DNase I.

Observou-se uma pequena sombra que poderá ser devida a contaminantes. A intensidade das bandas corresponde aos valores das concentrações inscritas no quadro VI.

Esta confirmação só foi feita para as sub-amostras da primeira extração, uma vez que o procedimento de extração de RNA foi sempre o mesmo. Portanto, não tendo nas primeiras extrações qualquer contaminação de DNA (Figura 12), assumiu-se que também não iríamos ter nas restantes.



**Figura 7** – Perfil eletroforético das sub-amostras de RNA extraídas no dia 26 de outubro.

Apesar dos valores correspondentes aos critérios de qualidade não serem excelentes, considerando que os ácidos nucleicos das amostras de *V. vinifera* são de difícil extração pelo facto de serem plantas lenhosas e que uma razão  $A_{260}/A_{230} > 1,0$  reflete um RNA de qualidade aceitável e que não há nítidas contaminações com DNA nem degradação, todos os RNAs extraídos foram utilizados para posterior síntese de cDNA e estes últimos utilizados para rt-PCR.

Antes da síntese de cDNA, normalmente procede-se à digestão do extrato de RNA com DNase I por forma a remover o DNA genómico contaminante que possa ser usado como molde durante a reação da transcriptase reversa. Os nossos extratos não foram tratados com DNase I uma vez que, no gel de agarose (Fig 12), não foram observadas bandas correspondentes a DNA e ainda porque todos os “primers” escolhidos para a amplificação do cDNA dos genes em estudo foram desenhados para exões flaqueantes de um intrão e já usados em estudos anteriores (Cao *et al.*, 1997; Espinoza *et al.*, 2007; Le Henanff *et al.*, 2009; Huynh *et al.*, 2005).

Para a síntese de cDNA, a partir de mRNA, utilizou-se um método baseado no uso de Oligo(dT)<sub>20</sub>, apropriado para transcreever mRNA de eucariotas e de retrovírus (só para

mRNA com cauda poli-A). Mais concretamente, este processo só selecciona os transcritos com trechos poli(A) que, por hibridação complementar, se ligam aos oligoT. Este processo é considerado o melhor; contudo, pode apresentar algumas dificuldades de transcrição reversa de mRNA muito longos e não transcreve reversamente o 18S rRNA. Para ultrapassar a primeira dificuldade referida, a transcriptase reversa utilizada foi a “SuperScriptIII” (Invitrogen Carlsbad, Califórnia) que maximiza o comprimento do cDNA, por permitir um melhor desenrolamento de estruturas secundárias, e assim aumenta o rendimento da produção conseguindo-se boas concentrações. A segunda dificuldade referida foi o motivo para não se ter escolhido o gene 18S rRNA como candidato a gene de referência.

No nosso estudo propusemo-nos a avaliar a expressão de seis genes envolvidos em processo de defesa da planta face a ataques por agentes de doença. Para uma correta comparação da expressão de diferentes genes no mesmo extrato, e entre extratos, deve-se assegurar que a reação da RT ocorre com a mesma eficiência para todos os mRNA e em todos os extratos.

Normalmente, não se quantifica o cDNA resultante, por leitura do valor de absorção sob luz UV. O procedimento mais comum é atribuir ao cDNA uma concentração relativa à quantidade de RNA utilizada na reação pela RT (Quadro VII) e considerar que embora a eficiência desta reação não seja controlável nas condições experimentais correntes, se a transcrição ocorrer sob as mesmas condições para todas as sub-amostras de mRNA, as eficiências são comparáveis.

Assim, tomando como exemplo o primeiro RNA da sub-amostra 1, que apresentava uma concentração de 38,1 ng/μL, e que, de acordo com o protocolo seguido para síntese de cDNA, foram usados 2 μL para a síntese de cDNA, tem-se 76,2 ng de RNA num volume de 10 μL de reação da RT. Isto corresponde a uma concentração final de 7,62 ng/μL (76,2 ng/10 μL) que significa que 1 μL de extrato de cDNA deverá conter o cDNA gerado a partir de 7,62 ng de RNA.

**Quadro VIII** – volume de cada RNA utilizado por síntese de cDNA (ng).

Sub-amostras	RNA utilizado por síntese de cDNA (ng)		
	1	2	3
1	76,2	23,2	94,6
2	110,8	96,8	84,0
3	511,6	295,0	412,2
4	200,2	54,6	141,4
5	246,2	119,6	126,4
6	62,2	14,8	43,4
7	82,4	29,8	83,0
8	84,0	37,6	31,0
9	41,2	24,8	25,2

No Quadro IX encontram-se as quantidades estimadas de RNA usadas em cada síntese de cDNA. De cada extrato de RNA foram sintetizados, pelo menos, três extratos de cDNA, em dias independentes. Os cDNA obtidos, por extrato foram homogeneizados e diluídos 10x antes de serem utilizados nos estudos de expressão gênica.

### **3.3.2 Otimização das condições de reação e seleção do gene referência para rt-PCR**

#### **3.3.2.1 “Primers” e produtos de PCR**

Todos os “primers” escolhidos para a amplificação do cDNA dos genes em estudo foram selecionados de trabalhos já publicados (Cao *et al.*, 1997; Espinoza *et al.*, 2007; Le Henanff *et al.*, 2009; Huynh *et al.*, 2005) mas teve-se o cuidado de averiguar as temperaturas de “melting”, os comprimentos e a composição em termos de GC. Relativamente aos valores considerados ótimos para estes parâmetros ( $T_m = 60\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ ; comprimento de 20-25 pb e teor de GC de 40-60%) verifica-se que somente o par de “primers” para o gene *EDS1* se apresenta desviante. Sendo que foi utilizado com sucesso pelos autores, foi também usado neste estudo pois o desenho de um novo par de “primers” e a sua validação acarretaria trabalho muito moroso e excedentário para esta tese. Assim, tivemos somente que otimizar as temperaturas de “annealing” (Quadro IV) com o objetivo de uniformizar ao máximo as condições analíticas, atendendo também às características da “master mix” utilizada e que tem a polimerase de DNA otimizada para funcionar a  $60\text{ }^\circ\text{C}$ . Isto foi conseguido com a criação e utilização de dois programas de amplificação, um tendo a temperatura de “annealing” e polimerização a  $57\text{ }^\circ\text{C}$  e o outro a  $60\text{ }^\circ\text{C}$ .

Foi ainda averiguado o tamanho do amplicão produzido que, para cada gene, deverá ser muito próximo do amplicão do gene de referência. Assim, deverá oscilar entre 150 e 200 pb. Desta forma minimizaram-se os erros devidos aos desvios do equipamento em termos de temperatura ou duração das fases do ciclo de amplificação e os erros devidos à programação do equipamento por parte do operador.

Nesta fase de otimização das rt-PCR testou-se, como já referimos no capítulo anterior, a temperatura de “melting” dos produtos de PCR gerados, que corresponde à temperatura necessária para separar 50% dos pares de bases das duas cadeias da dupla hélice do amplicão gerado, com os seguintes resultados:

**Quadro IX** – Genes e respectivas temperaturas de “melting” ( $T_{\text{melting}}$ ) do produto de PCR.

Gene	$T_{\text{melting}}$ (°C)			
	Média	Desvio Padrão	Min.	Max.
<i>GPDH</i>	82,86	0,24	81,96	82,62
<i>NPR1</i>	79,43	0,1	79,34	79,53
<i>EDL2</i>	83,14	0,19	82,95	83,33
<i>SAG12</i>	81,84	0,37	81,47	82,21
<i>EDL5 Tinta</i>	81,13	0,48	80,65	82,38
<i>EDL5 Branca</i>	82,87	0,10	82,76	82,97
<i>EDS1</i>	76,89	0,11	76,78	77
<i>EDL1</i>	83,01	0,52	82,48	83,53

Este quadro reflete as temperaturas de “melting” obtidas no nosso equipamento e com as nossas “mixes”, podendo variar com outros equipamentos e/ou com outras enzimas, num intervalo de  $\pm 1$  °C. Verifica-se que para cada gene foi somente obtida uma temperatura de “melting” o que significa que não houve amplificação inespecífica de outros produtos ou proveniente da presença acidental de DNA. Para o gene *EDL5* verifica-se que o intervalo de variação é de 1,73 °C (máx-min). Na verdade, o que se verificou é que a  $T_{\text{melting}}$  da casta branca ( $T_{\text{melting}}=82,87$  °C) é diferente da casta tinta ( $T_{\text{melting}}=81,13$  °C). Provavelmente, as duas castas têm alelos diferentes para este gene mas o sítio de ligação dos primers não se encontra alterado permitindo a ligação dos mesmos. Este resultado poderá ser confirmado por sequenciação.

### 3.3.2.2 Eficiência da reação de rt-PCR

Idealmente, cada gene de interesse e o gene de referência devem ser analisados numa só “corrida” de PCR para todas as sub-amostras. Com a padronização do ciclo de PCR, todas as reações foram executadas dessa forma nesta nossa experiência. Quando vários genes de interesse são analisados na mesma amostra, deverá optar-se pela maximização da amostra e assim analisar genes diferentes em diferentes momentos. Isto é a prática corrente mas deve-se assegurar que não se separam os pares de reações (gene de referência e gene de interesse) em cada amostra (Rieu e Powers, 2009).

A maioria dos termocicladores são de bloco ou placa. De um modo geral, apresentam gradientes de temperatura no bloco sendo os poços das extremidades os mais desviantes. Nas versões mais antigas, também o ângulo e a distância de leitura da fluorescência variava de poço para poço uma vez que a fonte emissora de luz e o leitor se encontravam em posições fixas. No nosso caso, o emissor e o leitor também estão em posições fixas, contudo, os tubos encontram-se dispostos num rotor que roda a 500 rpm e que passa junto dessas estruturas a tempos regulares e sempre à mesma distância. A leitura da fluorescência emitida é feita sempre que cada tubo passa em frente do leitor mantendo assim constante a distância e o ângulo. Por outro lado, o aquecimento e o arrefecimento do habitáculo, onde se encontra o rotor, são muito rápidos. São feitos por ar e, devido à permanente rotação, rapidamente fica homogeneizado. Assim, não foi necessário casualizar as sub-amostras nas “corridas”. A variação ocorrida pelo posicionamento no rotor durante o PCR é mínimo e não deverá causar problema. Há contudo, uma variação sistemática dentro de cada sub-amostra, introduzida durante a preparação do PCR.

Tal como mencionado por Udvardi, *et al.* (2008), uma experiência ideal deve ser composta por, pelo menos, para cada repetição biológica, duas réplicas técnicas de cada PCR. Neste estudo, fizeram-se três réplicas técnicas em cada rt-PCR. Desta forma puderam minimizar-se os erros de pipetagem e aumentar a precisão. Para as réplicas técnicas com valores de  $C_t$  aparentemente desviantes (desvio padrão > 0,40) foi calculada a diferença entre esse valor e a média das outras duas réplicas. Sempre que a diferença foi >0,5, esta réplica foi desconsiderada.

A reação de rt-PCR, na sua fase inicial, quando todos os componentes se encontram ativos e em quantidade não limitante, é exponencial. O progresso da reação depende da eficiência da amplificação (E), o que depende dos “primers”, da enzima utilizada, da mistura de reação e do DNA.

Apesar de uma série de fatores deverem ser observados durante a optimização das reações de rt-PCR, a eficiência e o fator de determinação ( $R^2$ ) são os mais importantes para avaliar a precisão destas reações. A análise de expressão de um gene de interesse relativamente a um gene de referência só pode ser feita pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  se a diferença

entre as eficiências das duas reações for inferior a 10%, pois eficiências muito distintas vão provocar abundância diferente de amplicões mesmo que esta fosse a mesma na amostra original.

A eficiência foi calculada tanto para os genes candidatos a genes de referência como para os genes de interesse, sob apreciação. A eficiência é uma variável dependente do declive de uma reta padrão estabelecida a partir de uma série de diluições sucessivas de um determinado extrato de cDNA. Esta reta correlaciona o logaritmo da concentração com o ciclo de PCR a partir do qual se considerou a amostra positiva ( $C_t$ ) para um determinado gene de interesse. No caso deste estudo, a eficiência foi calculada para as reações de amplificação dos genes candidatos a genes de referência e ainda para o gene *EDL5*, no cDNA obtido a partir do melhor e do pior mRNA, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{eficiência} = (10^{(-1/\text{declive})} - 1) \times 100\%$$

O rt-PCR para todos os alvos teve a mesma eficiência ou nunca teve uma diferença >10%.

### 3.3.2.3 Seleção do gene de referência

Antes da realização dos ensaios de expressão gênica, procedeu-se à comparação do comportamento dos dois genes selecionados como candidatos a genes referência (*GPDH* e *Actina*).

O método  $2^{-\Delta C_t}$  foi usado como uma medida do efeito do processo analítico (reação da TR e de PCR) no gene endógeno. Os extratos de cDNA de todas as sub-amostras foram homogeneizados e sujeitos a amplificação dos cDNA dos genes *GPDH* e *Actina* por rt-PCR usando “primers” específicos do gene *GPDH* e da *Actina*, respetivamente. A dose de variação da expressão de cada gene foi calculado por:

$$2^{-\Delta C_t} = 2^{(C_t \text{ amostra FD} - C_t \text{ amostra } \frac{S}{FD})}$$

e o resultado foi comparado com o rácio entre as quantidades de mRNA usado na síntese do cDNA destes genes nas diferentes sub-amostras (Quadro IX).

O valor de  $C_t$  é determinado de um gráfico log-linear onde se tem a fluorescência vs nº do ciclo de PCR. Assim o  $C_t$  é exponencial e não linear, pelo que não se deve fazer usar o  $C_t$  na análise estatística mas antes o  $2^{-\Delta C_t}$ . A análise de variância feita sobre as médias dos rácios da massa utilizada na síntese de cDNA e os obtidos após amplificação por PCR em tempo real, mostram que não há diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,933$ ;  $\alpha=0,05$ ). Desta forma confirma-se que os dois genes candidatos a genes de referência não alteram a quantidade esperada de transcritos, embora tenham revelado diferenças

significativas na eficiência ( $p=0,011$ ,  $\alpha=0,05$ ) e no valor de  $R^2$  ( $p=0,0089$ ,  $\alpha=0,05$ ). A eficiência do *GPDH* varia entre 80% e 95% (15% de variação) e a eficiência do gene da *Actina* varia de 91% a 107% (16% de variação) o que deverá estar relacionado com o tamanho do amplicão. Um tamanho de 344 pb (para o gene *GPDH*) não é tão otimizado para rt-PCR do que 138 pb (para o gene *Actina*). Contudo, em ambos os casos, os valores encontram-se dentro do intervalo de aceitação do laboratório (80-110%). O mesmo se verifica relativamente ao  $R^2$  que é sempre superior a 0,98. Desta forma, considerámos que não havia um parâmetro fortemente evidente de rejeição de qualquer um deles e perante a estabilidade observada nos dois genes candidatos a genes de referência deveríamos ter utilizado os dois para uma mais correta estimativa da expressão dos genes de interesse.

Neste caso, a média dos rácios de expressão destes genes seria usada como factor de normalização no método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  em combinação com a eficiência de todas as reações. Por falta de meios financeiros, optou-se por um só gene, optando-se pelo *GPDH* uma vez que já tinha sido demonstrada a sua estabilidade num amplo repertório de tratamentos bióticos e abióticos (Mahalingam *et al.*, 2003; Espinoza *et al.*, 2007). Todos os níveis de transcritos dos genes de interesse foram posteriormente normalizados para a expressão do gene *GPDH* de *V. vinifera* (*Vv-GPDH*; TC44984).

**Quadro X** – Comparação da expressão relativa de *GPDH* e *Actina* e dos parâmetros de avaliação da qualidade das reações de rt-PCR.

Am.	cDNA	RNA (ng/reacção)	Rác (m/m) esperado	Rác ( $2^{\Delta Ct}$ <i>GPDH</i> ) calc.	Rác ( $2^{\Delta Ct}$ <i>actina</i> ) calc.	Parametros	<i>GPDH</i>	<i>Actina</i>	$\Delta Ct$	$2^{\Delta Ct}$
1	1	64,67	97,20/64,67	$2^{0,53}$	$2^{0,64}$	eff	91	94		4,92
			1,50	1,44	1,56	$R^2$	0,991	0,995		
						Ct	20,55	22,85	2,3	
	2	97,20	132,07/97,20	$2^{0,48}$	$2^{0,26}$	eff	80	98		4,56
			1,36	1,39	1,20	$R^2$	0,994	0,998		
						Ct	20,02	22,21	2,19	
2	4	132,07	164,1/132,07	$2^{0,29}$	$2^{0,51}$	eff	84	107		5,31
			1,24	1,22	1,42	$R^2$	0,99	0,996		
						Ct	19,54	21,95	2,41	
3	5	164,07	164,1/64,67	$2^{1,30}$	$2^{1,41}$	eff	91	99		4,56
			2,54	2,46	2,66	$R^2$	0,994	0,995		
						Ct	19,25	21,44	2,19	
	6	40,13	65,07/40,13	$2^{0,71}$	$2^{0,90}$	eff	95	101		4,99
			1,62	1,64	1,87	$R^2$	0,994	0,995		
						Ct	21,26	23,58	2,32	
7	65,07	65,07/50,87	$2^{0,66}$	$2^{0,62}$	eff	95	94		4,38	
		1,28	1,58	1,54	$R^2$	0,992	0,998			
					Ct	20,55	22,68	2,13		
4	8	50,87	50,87/40,13	$2^{0,05}$	$2^{0,28}$	eff	85	91		4,26
			1,27	1,04	1,21	$R^2$	0,997	0,998		
						Ct	21,21	23,30	2,09	

Adicionalmente, averiguou-se a relação entre os valores de Ct após a amplificação do cDNA do gene de referência seleccionado, o *GPDH*, no extrato de cDNA obtido do mRNA com melhor qualidade (sub-amostra 3) e com pior qualidade (sub-amostra 9).

Verificou-se que o valor médio do Ct do cDNA da sub-amostra 3 varia em 3,71 unidades em relação ao valor médio do Ct da sub-amostra 9. Novamente, esta variação no valor de Ct deveu-se à quantidade inicialmente usada na síntese de cDNA. Na verdade a razão de 12,4 (511,6/41,2) verificada entre as quantidades de RNA usadas na síntese dos cDNA foi quase verificada na diferença entre os valores de Ct ( $2^{3,71} = 13,1$ ). O desvio verificado é consequência da eficiência das reações de rt-PCR que foram inferiores a 100% (Anexo 5) e à presença de outros RNA que não são quantificáveis. Estes resultados provam que a produção de cDNA foi semelhante em cada reação com a transcriptase reversa. Esta é a única forma de se ter algum controlo sobre a eficiência desta reação.

Em cada momento de síntese é importante verificar que o cDNA gera resultados de rt-PCR semelhantes.

Procedeu-se ainda ao cálculo da eficiência da reação de rt-PCR para este gene de referência (*GPDH*) e para o gene de interesse *EDL5* nos mesmos cDNA produzidos a partir do mRNA da sub-amostra 3 e da sub-amostra 9 por serem o de melhor e o de pior qualidade, respetivamente (Quadro VIII).

Desta forma, para cada cDNA, foram preparados quatro extratos diluídos, constituindo-se assim uma série de cinco concentrações diferentes. Cada um foi obtido do imediatamente mais concentrado por uma diluição 1:4. Cada extrato diluído foi utilizado em rt-PCR para amplificação do gene *GPDH* e do gene *EDL5*, em triplicado. Isto permitiu o ajuste de uma reta de regressão correlacionando os valores médios dos Ct's obtidos para os triplicados de cada extrato, com os logaritmos das respetivas concentrações. Os resultados encontram-se no Quadro XII.

**Quadro XI** – Comparação entre as eficiências e o  $R^2$  obtido para o cDNA do gene de referência e de um gene de interesse a partir de RNA com qualidades distintas.

cDNA	Gene	Eficiência (%)	$R^2$	Ct diluição menor	$2^{-\Delta Ct}$
3	<i>GPDH</i>	87,9	0,993	$15,87 \pm 0,82$	13,1
9		82,9	0,985	$19,58 \pm 0,38$	
3	<i>EDL5</i>	93,8	0,950	30,80	7,8
9		98,8	0,910	27,84	

Para as três séries de diluições do cDNA<sub>3</sub> foi possível estabelecer, para o gene *GPDH*, uma reta com o declive de 3,67, 3,66 e 3,62 que se podem traduzir nas eficiências da reação de amplificação de 87,3%, 87,6% e 88,8%, respetivamente. À semelhança do

cDNA<sub>3</sub>, foi feito o mesmo tipo de análise para o cDNA<sub>9</sub>, para o qual se conseguiram valores de declive de 3,92, 3,86 e 3,68. As reações decorreram assim com 80%, 87,1% e 81,5% de eficiência, ou seja, valores da mesma ordem de grandeza dos do cDNA<sub>3</sub> e dentro do intervalo de aceitação de acordo com as regras do laboratório onde decorreram as atividades práticas deste estudo (80-110%). Para cada par de cDNA (cDNA<sub>3</sub> e cDNA<sub>9</sub> por dia da síntese e de reação de PCR) a diferença de eficiências foi inferior a 10%.

O valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi sempre superior a 0,98 o que permitiu concluir que as condições de PCR estavam otimizadas. Os dados experimentais foram ajustáveis a um modelo linear e os resultados foram de elevada precisão.

Comparando agora os valores de Ct, verificou-se que o Ct mais baixo na série de 5 diluições, correspondente ao extrato de cDNA não diluído, foi de 15,87 e de 19,58, no extrato de cDNA<sub>3</sub> e cDNA<sub>9</sub>, respetivamente ( $\Delta Ct = 19,58 - 15,87 = 3,71$ ). Isto significa que a amplificação do cDNA do gene *GPDH* no extrato de cDNA<sub>9</sub> começou, em média, 3,71 ciclos mais tarde o que corresponde a ter 13,1 vezes menos cópias deste cDNA. Dos valores das concentrações de RNA total utilizado na síntese de cDNA, sabia-se que o extrato de cDNA<sub>3</sub> tinha 12,4 (511,6/41,2) vezes mais cDNA do que o extrato de cDNA<sub>9</sub>, valor muito aproximado ao valor calculado após as reações de rt-PCR. Assumimos assim que a reação da TR juntamente com a reação de rt-PCR não alteraram significativamente o rácio existente entre as quantidades do mRNA deste gene nos dois extratos (casta tinta saudável e casta branca na presença da doença). Como as eficiências não foram muito distintas e os amplicões são semelhantes e com nucleótidos semelhantes (temperatura de “melting” igual) não provocaram abundâncias diferentes de amplicões nas duas sub-amostras. Concluimos ainda que a casta e a presença da doença também não tiveram qualquer influência na presença do mRNA deste gene.

Assim, procedemos à análise da amplificação do cDNA do gene *EDL5* aplicando o princípio de que as reações da TR e de rt-PCR não foram a causa das diferenças observadas.

No caso do gene *EDL5*, verificou-se que os dois extratos mais diluídos de cada série de diluições não apresentaram amplificação em todos os replicados técnicos e que o Ct do extrato mais concentrado teve um Ct médio próximo de 30. Quando os valores de Ct são elevados, em particular  $Ct > 34$ , as quantidades de mRNA aproximam-se da cópia única. Assim, devido à distribuição heterogénea das moléculas no extrato, há sempre elevada variabilidade no valor do Ct e é de esperar menor precisão nestes resultados e maior probabilidade de não detetar diferenças de expressão. Efetivamente, verifica-se que para as rectas de regressão estabelecidas com base na amplificação do cDNA do gene *EDL5*, o valor de  $R^2 < 0,98$ , o que terá um efeito negativo na precisão.

Esta análise preliminar sugere uma sobre-expressão deste gene nas plantas infetadas com FD. Este resultado é discutido no sub-capítulo “EDL1 e EDL5” com mais detalhe uma vez que neste estudo preliminar se estão só a comparar dois extratos de cDNA sendo a planta saudável da casta tinta e a planta infetada da casta branca. Assim, para além do baixo número de repetições, não podemos excluir o efeito da casta.

### **3.4 Padrões de expressão dos genes de interesse**

A análise de expressão de cada gene de interesse pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , foi feita tomando a média dos valores de Ct da amostra sem FD como referência para o cálculo da expressão relativa de cada amostra e sub-amostra, em cada casta. Assim, a amostra 2 foi a referência para a casta tinta e a amostra 4 foi a referência para a casta branca. Este processo foi adotado de Margaria, *et al.* (2014). A sub-amostra 5 foi tratada separadamente uma vez que no teste de deteção de fitoplasmas deu negativo para FD. A sub-amostra 5 é constituída pelas folhas da base do sarmento e algumas destas encontravam-se tenras e verdes, sem sintomas de FD. Não se sabe se estas folhas não chegaram a sofrer a infeção ou se o fitoplasma foi eliminado.

#### **3.4.1 Estudo do gene *NPR1* e do gene *SAG12***

Nas duas castas em estudo, não se verificou alteração do nível de expressão do gene *NPR1* nas folhas com e sem FD ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,50$  na casta branca e  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1,29$  na casta tinta). Na sub-amostra 5 também não se observou uma diferença significativa na expressão ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1,67$ ). Estes resultados podem levar-nos a duas possíveis conclusões: 1) a ausência de sobre-expressão é uma das causas da grande susceptibilidade destas castas, que apresentavam sintomas muito intensos ou 2) a regulação da ação deste gene não se faz ao nível transcricional, mas sim ao nível proteico.

O gene *NPR1* é um componente regulador chave em diferentes mecanismos de defesa. Alguns autores, referem que uma sobre-expressão do gene *NPR1* está, em geral, associada a uma melhoria das capacidades defensivas de videira após infeção. Plantas com sobre-expressão de *NPR1* mostraram maior resistência a vários agentes patogénicos, sem que expressem constitutivamente os genes relativos à patogénese (Cao *et al.*, 1998; Chern *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2004; Makandar *et al.*, 2006). Contudo, foi também demonstrado que a regulação deste gene pode dar-se ao nível da proteína, post-tradução, com vantagens para a planta pois é um tipo de mecanismo que impede a ativação de respostas defensivas na ausência de infeção efetiva. A redução da proteína *NPR1* leva à separação dos seus monómeros constituintes, que assim adquirem capacidade de migração para o núcleo onde promovem a expressão eficiente de genes de defesa, de resposta à patogénese (genes

PR). Assim, neste caso, pode acontecer que estes genes não apresentam alterações significativas nos níveis de transcritos, mas apresentem a regulação ao nível da proteína (Spoel *et al.*, 2009). Efetivamente, foi verificado em videira que após infeção por míldio não houve alteração de expressão (Kortekamp, 2006).

Os nossos valores (Quadro XII), embora dentro do intervalo onde se considerou não haver alterações significativas na expressão, apresentam grande variação. O valor verificado na casta branca deve ser confirmado com um estudo em maior número de vinhas, de plantas e de tecidos vegetais. Aparentemente, a proteína NPR1 tem papéis distintos, associados a diferentes respostas de defesa, em função do tecido vegetativo onde se encontra (Dong, 2004). Neste estudo, o RNA foi extraído só de amostras de folhas inteiras.

Relativamente ao gene *SAG12* também não foi encontrada nenhuma diferença entre as plantas com FD e sem FD, tanto na casta Padeiro de Basto ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,75$ ) como na casta Arinto ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,89$ ) o que nos leva a colocar duas hipóteses: 1) a expressão da protease de cisteína poderá não ter sido induzida durante o processo de infeção ou 2) tanto as plantas com FD como as sem FD estavam no mesmo estadio de senescência foliar, não havendo, portanto, diferença entre elas.

De facto, os nossos resultados não vão ao encontro do que refere Pontier, *et al.* (1999) quando afirmam que em tabaco, por exemplo, a expressão do gene *SAG12* é induzida durante a resposta, do tipo de hipersensibilidade, contra vários agentes patogénicos. É curioso ver que as plantas doentes não apresentaram uma expressão mais elevada deste gene comparativamente às plantas saudáveis, uma vez que a doença provoca a queda das folhas. Contudo, como *SAG12* reflete o estadio de senescência foliar como resultado de fatores endógenos como a idade da folha, a nutrição em azoto e o desenvolvimento reprodutivo (Gombert *et al.*, 2006) e, no nosso estudo, todas as folhas estavam numa fase de senescência avançada devido ao ciclo anual, tanto nas plantas saudáveis como nas doentes a sobre-expressão devida à idade pode ter camuflado a sobre-expressão devida à infeção pela FD. Esta hipótese é corroborada pela comparação entre a expressão na sub-amostra 5 (base do sarmento) e nas sub-amostras 6 e 7 (zona mediana e extremidade do mesmo sarmento), todas colhidas na planta 3, mas com ausência e presença de FD, respetivamente. A folha mais jovem e “saudável” poderá estar sob uma resposta de hipersensibilidade contra a FD.

Esta última observação abre ainda possibilidade de se investigar a existência de regulação espacial e temporal, relativa à progressão da senescência, ao longo do eixo da planta da videira, tal como observado em Brassica (Gombert *et al.*, 2006).

Neste estudo preliminar, concluímos então que a expressão do gene *SAG12* deverá ser novamente estudada sugerindo-se a colheita de amostras antes do aparecimento dos

primeiros sintomas e em plena estação de desenvolvimento, mantendo-se a colheita de sub-amostras, em cada planta.

Quadro XII – Resultados do estudo do gene *NPR1* e do gene *SAG12*.

Gene	Casta	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Análise do resultado	Possíveis conclusões/observações
<b>NPR1</b>	Branca	0,50	✓ Não se verificou alteração do nível da expressão.	1) a ausência de sobre-expressão poderá ser uma das causas da grande suscetibilidade destas castas, que apresentavam sintomas muito intensos ou 2) a regulação da ação deste gene pode não ser ao nível transcricional, mas sim ao nível proteico. ✓ <u>É gene regulador chave na mediação do SA na resistência a agentes patogénicos.</u>
	Tinta	1,29		
	Sub. 5	1,67		
<b>SAG12</b>	Branca	0,89	✓ Não se verificou alteração do nível da expressão;	1) a expressão da protease de cisteína poderá não ter sido induzida durante o processo de infeção ou 2) tanto as plantas com e sem sintomas estavam no mesmo estadio de senescência foliar, não havendo diferença entre elas; 3) A folha mais jovem poderá estar sob a uma resposta de hipersensibilidade contra a FD
	Tinta	0,75		
	Sub. 5	2,87	✓ Apresentou sobre-expressão na sub. 5	

### 3.4.2 Estudo dos genes da família *EDS1* (*EDL*)

#### 3.4.2.1 Estudo dos genes *EDS1* e *EDL2*

Os nossos resultados (Quadro XIII) mostram que a casta Arinto apresenta sub-expressão de *EDS1* nas plantas infetadas com FD comparativamente às plantas sãs ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,36$ ) enquanto que na casta Padeiro de Basto não há diferenças entre plantas saudáveis e infetadas ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,84$ ).

O gene *EDS1* é um gene que se expressa constitutivamente em videira, mas com diferentes níveis em função da casta. Por exemplo, na casta Norton de *V. aestivalis*, a expressão deste gene é constitutiva e em níveis elevados e a casta foi considerada como resistente a mildio. Em contraste, a casta Cabernet Sauvignon, susceptível ao mesmo fungo, só apresenta expressão de *EDS1* após a sua indução pelo agente patogénico (Gao *et al.*, 2014).

Este gene apresenta-se como um componente chave nas respostas de defesa das plantas tendo sido observado o seu papel, conservado, em diferentes espécies de dicotiledóneas (Liu *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2013, Wang *et al.*, 2014). Por este motivo,

considerámos estranho que nas duas castas estudadas não tenha havido sobre-expressão deste gene perante a infeção com FD.

Curiosamente, observou-se que os níveis de expressão relativa de *EDL2* são muito semelhantes aos de *EDS1* ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,40$  e  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,75$ , na casta Arinto e na casta Padeiro de Basto, respetivamente). De acordo com Gao *et al.*, (2014), *EDS1* e *EDL2* interagem no núcleo e no citoplasma e *EDS1* dimeriza com *PAD4*. *EDS1* e *EDL2* complexam para regular o sistema de defesa. Assim, a nossa observação de uma alteração na mesma ordem de grandeza da expressão relativa, entre plantas com e sem FD, indicia a conservação da presença relativa das duas proteínas o que estará de acordo com uma possível interação entre elas. Contudo, somos levados a afirmar que estas não estarão envolvidas na defesa contra a FD.

Por outro lado, devemos ainda ter em atenção o facto de *EDS1* se expressar preferencialmente no floema, comparativamente a outros genes da família, sugerindo o desempenho de um papel importante na defesa contra agentes patogénicos colonizadores deste sistema, como é o caso da FD. Assim, a amostragem de folhas inteiras, sem a separação dos pecíolos e das nervuras pode ter diluído o RNA correspondente a este gene e assim alterado o resultado final. Acresce que a proporção de limbo e nervuras usadas em cada extração não foi controlada podendo estar também na base da variabilidade verificada intra-amostra. Em conclusão, a análise de expressão destes genes, para confirmação destes resultados, deverá ser repetida usando somente nervuras.

Comparando agora a expressão da sub-amostra 5 com as sub-amostras 6 e 7, não detetámos qualquer diferença na expressão destes dois genes ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,78$  para *EDS1* e  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1,56$  para *EDL2*). Esta sub-amostra apresenta um comportamento semelhante às amostras atrás analisadas embora tenha um valor de expressão ligeiramente superior para *EDL2*. Este resultado precisa de confirmação pois a verificar-se estatisticamente significativo, poderá estar associado a uma remissão da doença.

Analisámos ainda a expressão destes dois genes nas plantas sãs das duas castas e verificámos que a casta Arinto apresenta maior expressão do que Padeiro de Basto ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2,25$  e  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 12,95$ , respetivamente para *EDS1* e *EDL2*), o que é consistente com a sua menor susceptibilidade, referida por técnicos da Região de Ponte de Lima, em condições de campo. A fim de dar mais consistência a esta hipótese, relacionámos estes resultados com os da deteção de FD por rt-PCR, tomando novamente as sub-amostras 1 e 9 como exemplos (Quadro VII). Tinha-se calculado para a amostra 9 um atraso de 2,2 ciclos na amplificação do gene *COX*, pela presença de inibidores. Sendo que a deteção de FD foi feita no mesmo tubo de reação (rt-PCR triplex), pode assumir-se que o mesmo atraso deverá ter ocorrido na deteção de FD. Assim, o valor de Ct esperado seria de 18,74.

A sub-amostra 9 tinha menos 1 ng/ $\mu$ L de DNA do que a sub-amostra 1. No entanto, o seu Ct seria menor do que o da sub-amostra 1 (Ct=19,20), o que corresponderá a maior quantidade de fitoplasma. Isto leva a considerar que a casta Arinto suporta mais fitoplasma com menor manifestação de sintomas. A titulação do fitoplasma será um objetivo a alcançar futuramente.

Quadro XIII - Resultados do estudo do gene *EDS1* e do gene *EDL2*.

Gene	Casta	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Análise do resultado	Possíveis conclusões/observações
EDS1	Branca	0,36	✓ A casta Arinto apresentou sub-expressão.	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ É um gene que se expressa constitutivamente em videira, sendo <u>um componente chave nas respostas de defesa das plantas</u>.</li> <li>✓ Expressa-se preferencialmente <u>no floema</u> e sendo a FD um agente patogénico colonizador deste sistema: <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Considerámos estranho que nas duas castas estudadas não tenha havido sobre-expressão deste gene perante a infeção com FD.</li> </ul> </li> </ul>
	Tinta	0,84		
	Sub. 5	0,78	✓ A casta Padeiro de Basto não houve diferenças.	
EDL2	Branca	0,40	✓ Observou-se que os níveis de expressão relativa de EDL2 são muito semelhantes aos de EDL1	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ EDS1 e EDL2 interagem no núcleo e no citoplasma e EDS1 dimeriza com PAD4.</li> <li>✓ EDS1 e EDL2 complexam para regular o sistema de defesa.</li> <li>✓ Analisou-se ainda a expressão destes dois genes nas plantas <u>sãs das duas castas</u> e verificou-se que <u>a casta Arinto apresenta maior expressão para do que Padeiro de Basto</u> o que é consistente com a sua menor susceptibilidade, referida por técnicos da Região, em condições de campo.</li> </ul>
	Tinta	0,75		
	Sub. 5	1,68		

### 3.4.2.2 Estudo dos genes *EDL1* e *EDL5*

*EDL1* apresenta sobre-expressão na casta Arinto e não tem a sua expressão afetada pela presença de FD na casta Padeiro de Basto. O gene *EDL1* tem uma sequência muito aproximada à de *EDL2*, mas só foi detetada expressão nas raízes e em mais nenhum tecido (Gao *et al.*, 2014). Assim, a sua presença em folhas necessita de ser confirmada com análises de sequenciação. Neste estudo, não foi feita a confirmação da identidade dos produtos de PCR resultantes da amplificação dos cDNA por sequenciação. A deteção de transcritos de *EDL1* pode, na verdade, ser um artefacto e ter resultado de uma reação cruzada com *EDL2*. Pode pensar-se na existência de um alelo de *EDL2* capaz de ser detetado pelos “primers” de *EDL1* assim contribuindo para uma aparente sobre-expressão.

Os nossos resultados de expressão relativa para o gene *EDL5* apresentam-se muito próximos do limiar a partir do qual consideramos haver uma sobre-expressão ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1,80$  e  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1,71$  para Arinto e Padeiro de Basto, respetivamente). *EDL5* apresenta dois alelos nestas castas que se diferenciam pela temperatura de “melting” do produto de PCR nas

duas castas (Quadro X). Este pode ser, efetivamente, o gene que apresenta a regulação diferenciada perante uma infeção por FD. Analisando a expressão deste gene na sub-amostra 5 comparativamente às sub-amostras 6 e 7, verificamos que nestas folhas se apresenta realmente sobre-expresso ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 3,79$ ). Fica por esclarecer se esta sub-amostra é constituída por folhas que eliminaram o fitoplasma, eventualmente por terem *EDL5* expresso a um nível de exterminação do agente patogénico.

Comparando as plantas saudáveis da casta Arinto com as de Padeiro de Basto, verifica-se que este gene se encontra muito mais expressado em Arinto ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 7,44$ ) o que pode ser a razão da sua menor susceptibilidade (Quadro XIV).

Quadro XIV - Resultados do estudo do gene *EDL1* e do gene *EDL5*.

Gene	Casta	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Análise do resultado	Possíveis conclusões/observações
EDL1	Branca	2,48	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Apresentou <b>sobre-expressão</b> na casta Arinto;</li> <li>✓ Não teve a sua expressão afetada na casta Padeiro de Basto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Tem sequência muito parecida com a do EDL2 e só foi detetada expressão nas raízes (pesquisa bibliográfica);</li> <li>✓ Neste estudo foi detetada expressão nas folhas. Necessita confirmação com sequenciação.</li> </ul>
	Tinta	1,18		
	Sub. 5	0,93		
EDL5	Branca	1,80	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Apresentaram-se <b>muito próximos da sobre-expressão</b>.</li> <li>✓ Na sub-amostra 5 apresentou <b>sobre-expresso</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Em plantas sãs das castas Arinto e Padeiro de Basto, verifica-se que este gene se encontra <b>muito mais expresso</b> em Arinto, o que pode ser a razão da sua menor susceptibilidade;</li> <li>✓ Provavelmente apresenta dois alelos nestas castas.</li> <li>✓ Este poderá ser o gene com regulação diferenciada perante uma infeção por FD;</li> <li>✓ ? A sub.5 é constituída por folhas que eliminaram o fitoplasma, eventualmente por terem <i>EDL5</i> expresso a um nível de exterminação da FD?</li> </ul>
	Tinta	1,71		
	Sub. 5	3,79		

#### IV. Conclusão e prespetivas futuras

Neste estudo, podemos concluir que:

1. Os resultados obtidos foram considerados preliminares para as duas castas e para os seis genes estudados;
2. A grande variabilidade encontrada nas amostras, e conseqüentemente nas sub-amostras, não nos permitiu atribuir diferenças estatisticamente significativas;
3. Em todos os casos, o coeficiente de variação foi muito elevado o que leva a que a metodologia utilizada tenha baixa reprodutibilidade;
4. O baixo n.º de repetições biológicas e a altura tardia em que se fez a colheita das amostras pode ter dissimulado as sobre-expressões e/ou sub-expressões devidas à infeção pela FD, como mecanismos de defesa
5. Os genes SAG12 e EDL5 são potenciais candidatos a terem um envolvimento na defesa da planta quanto à FD.

Assim, este trabalho deverá ser continuado, sendo com genes de interesse o *SAG12* e o *EDL5*, num program de melhoramento. Acolheita de amostras deverá ser realizada em duas fases: a meio do ciclo fenológico das vinhas com ou sem sintomas (abril/maio) e em plena época de observação de sintomas (setembro/outubro).

Deverão ser ainda recolhidos diferentes órgãos como raízes (em estufa), floemas, meristemas apicais dos caules, folhas jovens e adultas e em maior número de réplicas biológicas. O RNA deverá ser ainda extraído em quantidade suficiente para a produção de cDNA e todo o cDNA produzido deverá ser homogeneizado numa só amostra. Assim, conseguir-se-á reduzir a variabilidade analítica.

Estudos desta natureza assumem cada vez maior importância, uma vez que o conhecimento que poderá provir dos mesmos pode, em concordância com as orientações da comunidade europeia, originar uma diminuição das aplicações de produtos fitofármacos como medidas de prevenção e combate aos agentes patogénicos, com implementação de tratamentos (nomeadamente, com ácido salicílico), não poluentes do ambiente, que desencadiam processos de defesa inatos das plantas, mais concretamente as sobre-expressões e/ou sub-expressões genéticas.

## Referências Bibliográficas

Akkurt, M. (2012) Comparison between modified DNA extraction protocols and commercial isolation kits in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Genetics and Molecular Research*, 11, 2343-2351.

Andersen, M.T., Liefting, L.W., Havukkala, I. e Beever, R.E. (2013) Comparison of the complete genome sequence of two closely related isolates of 'Candidatus Phytoplasma australiense' Reveals Genome Plasticity. *BioMed Central Genomics*, 14, 529-543.

Andrade, A., Batista, V., Sofia, J., Almeida, J. e Manteigas, A. (2015) *Scaphoideus titanus* Ball./ *Flavescência Dourada* na DRAP Centro – Plano de Ação Nacional para o Controlo da Flavescência Dourada 2015.

Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S.A., Radek, A.J., Shevchenko, D.V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J.W. e Hogenhout, S.A. (2006) Living with genome instability: The adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 188, 3682-3696.

Beanland, L., Hoy, C.W., Miller, S.A. e Nault, L.R. (2000) Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 93, 271–276.

Belbahri, L., Boucher, C., Candresse, T., Nicole, M., Ricci, P. e Keller, H. (2001) A local accumulation of the *Ralstonia solanacearum* PopA protein in transgenic tobacco renders a compatible plant pathogen interaction incompatible. *Plant Journal*, 28, 419–430.

Bertaccini, A. (2007) Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience*, 12, 673-689.

Bertaccini, A. e Duduk, B. (2011) Taxonomy of phytoplasmas associated with emerging diseases. *Emerging phytoplasma diseases of stone fruits and other crops and their possible impact on EU Countries- COST Action FA0807-European Cooperation in Science and Technology*, 1-6

Bertaccini, A., et al. (2014) Phytoplasmas and Phytoplasma Diseases: A Severe Threat to Agriculture. *American Journal of Plant Sciences*, 5, 1763-1788.

Bertamini, M. e Nedunchezian, N. (2001) Effects of phytoplasma stolbur-subgroup (Bois noir-BN) on photosynthetic pigments, saccharides, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, nitrate and nitrite reductases, and photosynthetic activities in field-grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. *Chardonnay*) leaves. *Photosynthetica*, 39, 119–122.

Bertamini, M., Nedunchezian, N., Tomasi, F. e Grando, M. S. (2002) Phytoplasma Stolbur-subgroup (Bois Noir-BN) infection inhibits photosynthetic pigments, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and photosynthetic activities in field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. *Chardonnay*) leaves. *Physiological Molecular Plant Pathology*, 61, 357–366.

Blomquist, C.L. e Kirkpatrick, B.C. (2002) Identification of phytoplasma taxa and insect vectors of peach yellow leaf roll disease in California. *Plant Disease*, 86, 759-63.

Borges, A.F., Fonseca, C., Ferreira, R.B., Lourenço, A.M. e Monteiro, S. (2014) Reference gene validation for quantitative RT-PCR during biotic and abiotic stresses in *Vitis vinifera*. *PLoS ONE*, 9(10): e111399.

Bosco, D., Minucci, C., Boccardo, G. e Conti, M. (1997) Differential acquisition of chrysanthemum yellows phytoplasma by three leafhopper species. *Entomology Experimental Application*, 83, 219-224.

Bressan, A., Girolami, V. e Boudon-Padieu E. (2005) Reduced fitness of the leafhopper vector *Scaphoideus titanus* exposed to Flavescence dorée phytoplasma. *Entomology Experimental Application*, 115, 283–290.

Buchanan-Wollaston, V., Earl, S., Harrison, E., Mathas, E., Navabpour, S., Page, T. e Pink, D. (2003) The molecular analysis of leaf senescence - a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal*, 1, 3-22.

Camps, C., Kappel, C., Lecomte, P., Léon, C., Gomès, E., Coutos-Thévenot, P. e Delrot, S. (2010) A transcriptomic study of grapevine (*Vitis vinifera* cv. *Cabernet-Sauvignon*) interaction with the vascular ascomycete fungus *Eutypa lata*. *Journal of Experimental Botany*, 61,1719-1737.

Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S. e Dong, X. (1994) Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, 11, 1583-1592.

Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S. e Dong, X. (1997) The *Arabidopsis NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *The Plant Cell*, 88, 57-63.

Cao, H., Li, X. e Dong, X. (1998) Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 6531-6536.

Carraro, L., Loi, N., Ermacora, P. e Osler, R. (1998a) High tolerance of European plum varieties to plum leptonecrosis. *European Journal of Plant Pathology*, 104, 141-145.

Carraro, L., Osler, R., Loi, N., Ermacora, P. e Refatti, E. (1998b) Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma by *Cacopsylla pruni*. *Journal of Plant Pathology*, 80, 233-239.

Carraro, L., Loi, N. e Ermacora, P. (2001) Transmission characteristics of the European stone fruit yellows phytoplasma and its vector *Cacopsylla pruni*. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 695–700.

Chandra-Shekara, A.C., Navarre, D., Kachroo, A., Kang, H.-G., Klessig, D. e Kachroo, P. (2004) Signaling requirements and role of salicylic acid in *HRT*- and *rrt*-mediated resistance to turnip crinkle virus in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 40, 647-659.

Chern, M.S., Fitzgerald, H.A., Yadav, R.C., Canlas, P.E., Dong, X. e Ronald, P.C. (2001) Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the *NPR1*-mediated signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 27, 101-113.

Chong, J., Le Henanff, G., Bertsch, C. e Walter, B. (2008) Identification, expression analysis and characterization of defense and signaling genes in *Vitis vinifera*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 469-481.

Christensen, N., Axelsen, K., Nicolaisen, M. e Schulz, A. (2005) Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Plant Science*, 11, 526-535.

Chung, B. e Choi, G. (2002) Elimination of aster yellows phytoplasma from *Dendranthema grandiflorum* by application of oxytetracycline as a foliar spray. *Plant Pathology Journal*, 18, 93-97.

Constable, A. J., Nicol, S. e Strutton, P. G. (2003) Southern ocean productivity in relation to spatial and temporal variation in the physical environment. *Journal of Geophysical Research*, 108, 8079-8100.

Dai, Q. e Sun, Z. (1995) Suppressive effects of N-triacontanol on symptoms of mulberry dwarf disease and on the causal phytoplasma. *Plant Pathology*, 44, 979-981.

Dai, Q., He, F.T. e Liu, P.Y. (1997) Elimination of phytoplasma by stem culture from mulberry plants (*Morus alba*) with dwarf disease. *Plant Pathology*, 46, 56-61.

Daire, X., Clair, D., Reinert, W. e Boudon-Padieu, E. (1997) Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 507–514.

Danielli, A., Bertaccini, A., Vibio, M., Mori, N., Murari, E., Posenato, G. e Girolami, V. (1996) Detection and molecular characterization of phytoplasmas in the planthopper *Metcalfa pruinosa* (Say) (Homoptera: Flatidae). *Phytopathologia Mediterranea*, 35, 62-65.

Decreto-Lei n.º 194/2006 de 27 de Setembro, regula a produção, controlo, certificação e comercialização de materiais de propagação vegetativa de videira, transpondo para a ordem jurídica interna a Directiva nº 2005/43/CE, da Comissão, de 23 de Junho, que altera os anexos da Directiva nº 68/193/CEE, do Conselho, de 9 de Abril, relativa à comercialização dos materiais de propagação vegetativa da videira.

Dickman, M.B., Park, Y.K., Oltersdorf, T., Li W., Clemente, T. e French, R. (2001) Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 6957–6962

Directiva 2002/11/CE do Conselho de 14 de Fevereiro de 2002, que altera a Directiva 68/193/CEE relativa à comercialização dos materiais de propagação vegetativa da vinha e revoga a Directiva 74/649/CEC.

Domoki, M., Gyorgyey, J., Biro, J., Pasternak, T.P., Zvara, A., Bottka, S., Puskas, L.G., Dudits, D. e Feher, A. (2006) Identification and characterization of genes associated with the induction of embryogenic competence in leaf-protoplast-derived alfalfa cells. *Biochimica et Biophysica, Acta* 1759, 543–551.

Dong, X. (2004) *NPR1*, all things considered. *Current Opinion Plant Biology*, 7, 547-552.

Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K. e Asuyama, H. (1967) Mycoplasma- or PLT group-like organisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 33, 259–266.

Elliot, S.L., Adler, F.R. e Sabelis, M.W. (2003) How virulent should a parasite be to its vector? *Ecology*, 84, 2568–2574.

Endeshaw, S.T., Murolo, S., Romanazzi, G. e Neri, D. (2012) Effects of Bois noir on carbon assimilation, transpiration, stomatal conductance of leaves and yield of grapevine (*Vitis vinifera*) cv. *Chardonnay*. *Physiologia Plantarum*, 145, 286–295.

Espinoza, C., Medina, C., Somerville, S. e Arce-Johnson, P. (2007) Senescence-associated genes induced during compatible viral interactions with grapevine and *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 58, 3197-3212.

Falk, A., Feys, B.J., Frost, L.N., Jones, J.D.G., Daniels, M.J. e Parker, J.E. (1999) *EDS1*, an essential component of *R* gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 3292-3297.

FAOSTAT- Food and agriculture organization of the united nations, 2012

Feys, B.J., Wiermer, M., Bhat, R.A., Moisan, L.J., Medina-Escobar, N., Neu, C., Cabral, A. e Parker, J.E. (2005) *Arabidopsis* senescence-associated gene101 stabilizes and signals within an *Enhanced disease susceptibility1* complex in plant innate immunity. *The Plant Cell*, 17, 2601-2613.

Fung, R.W.M., Gonzalo, M., Fekete, C., Kovacs, L.G., He, Y., Marsh, E., McIntyre, L.M., Schachtman, D.P. e Qiu, W. (2008) Powdery mildew induces defense-oriented reprogramming of the transcriptome in a susceptible but not in a resistant grapevine. *Plant Physiology*, 146, 236-249.

Gábor, K. (2013) The examination of UV absorption of polyphenols (Natural Substances, in UV Protection). *Hadmérnök VIII*, 3, 288-293.

Gambino, G., Gribaudo, I., Leopold, S., Scharl, A. e Laimer, M. (2005) Molecular characterization of grapevine plants transformed with GFLV resistance genes: I. *The Plant Cell Reports*, 24, 655-662.

Gan, S. (2003) Mitotic and postmitotic senescence in plants. *Science of Aging Knowledge Environment*, 38, RE7.

Gao, F., Shu, X., Ali, M.B., Howard S., Li N., Winterhagen, P., Qiu, W. e Gassmann, W. (2010) A functional EDS1 ortholog is differentially regulated in powdery mildew resistant and susceptible grapevines and complements an *Arabidopsis eds1* mutant. *Planta*, 231, 1037-47.

Gao, F., Dai, R., Pike, S. M., Qiu, W. e Gassmann, W. (2014) Functions of EDS1-like and PAD4 genes in grapevine defenses against powdery mildew. *Plant Molecular Biology*, 86, 381-93.

Gatineau, F., Larrue, J., Clair, D., Lorton, F., Richard- Molard, M. e Boudon-Padieu, E. (2001) A new natural planthopper vector of stolbur phytoplasma in the genus *Pentastiridius* (Hemiptera: Cixiidae). *European Journal of Plant Pathology*, 107, 263-271.

Gallagher, S. R. (2011) Quantification of DNA and RNA with absorption and fluorescence Spectroscopy. *Current Protocols in Cell Biology*, 7, Appendix 3D,1-8.

Garcia-Chapa, M., Batlle, A., Rekab, D., Rosquete, M.R. e Firrao, G. (2004) PCR-mediated whole genome amplification of phytoplasmas. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 231–242.

Gölles, R., Moser, R., Puhlinger, H., Katinger, H., Machado, M.L.C., Minafra, A., Savino, V., Saldarelli, P., Martelli, G.P. e Machado, A.C. (2000) Transgenic grapevines expressing coat

protein gene sequences of grapevine fanleaf virus, arabis mosaic virus, grapevine virus A and grapevine virus B. *Acta Horticulturae*, 528, 305-311.

Gombert, J., Etienne, P., Ourry, A. e Dily, F. L. (2006) The expression patterns of SAG12/Cab genes reveal the spatial and temporal progression of leaf senescence in *Brassica napus* L. with sensitivity to the environment. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 57, No. 9, pp. 1949–1956.

González-Agüero, M., García-Rojas, M., Genova, A.D., Correa, J., Maass, A., Orellana, A. e Hinrichsen, P. (2013) Identification of two putative reference genes from grapevine suitable for gene expression analysis in berry and related tissues derived from RNA-Seq data. *BioMed Central Genomics*, 14, 878-889.

Gorinstein, S., Weisz, M., Zemser, M., Tilis, K., Stiller, A., Flam, I. e Gat, Y. (1993) Spectroscopic analysis of polyphenols in white wines. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75, 115-120.

Gribaudo, I., Gambino, G., Leopold, S. e Laimer, M. (2005) Molecular characterization of transgenic grapevine plants. *Acta Horticulturae*, 689, 485-492

Hanboonsong, Y., Choosai, C., Panyim, S. e Damak, S. (2002) Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). *Insect Molecular Biology*, 11, 97–103.

Hogenhout S.A., Oshima K., Ammar E.D., Kakizawa S., Kingdom H.N. e Namba S. (2008) Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology*, 9, 403-23.

Hoshi A., Oshima K., Kakizawa S., Ishii Y., Ozeki J. e Hashimoto M. (2009) A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 6416–6421.

Himeno, M., Neriya, Y., Minato, N., Miura, C., Sugawara, K. e Ishii, Y. (2011) Unique morphological changes in plant pathogenic phytoplasma infected petunia flowers are related to transcriptional regulation of floral homeotic genes in an organ specific manner. *Plant Journal*, 67, 971–979.

Hren, M., Ravnikar, M., Brzin, J. e Ermacora, P. (2009) Induced expression of sucrose synthase and alcohol dehydrogenase I genes in phytoplasma-infected grapevine plants grown in the field. *Plant Pathology*, 58, 170–180.

Iocco, P., Franks, T. e Thomas, M.R. (2001) Genetic transformation of major wine grape cultivars of *Vitis vinifera* L. *Transgenic Research*, 10, 105-115.

IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team. (2004) Phytoplasma Taxonomy Group. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1243–1255.

Jain, M., Nijhawan, A., Tyagi, A.K. e Khurana, J.P. (2006) Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 345, 646–651.

Jaillon, O., Aury, J.M., Noe, I.B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N. e Jubin, C. (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, 449, 463-467.

Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M. e Adrian, M. (2002) Phytoalexins from the *Vitaceae*: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2731-2741.

Jeong, Y.M., Mun, J.H., Lee, I., Woo, J.C., Hong, C.B. e Kim, S.G. (2006) Distinct roles of the first introns on the expression of *Arabidopsis* profilin gene family members. *Plant Physiology*, 140, 196–209.

Jirage, D., Tootle, T.L., Reuber, T.L., Frost, L.N., Feys, B.J., Parker, J.E., Ausubel, F.M. e Glazebrook, J. (1999) *Arabidopsis thaliana* *PAD4* encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 13583-13588.

Jones, J. D.G. e Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature*, 444, 323-329.

Kawakita, H., Saiki, T., Wei, W., Mitsunashi, W., Watanabe, K. e Sato, M. (2000) Identification of mulberry dwarf phytoplasmas in the genital organs and eggs of leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*. *Phytopathology*, 90, 909–914.

Kortekamp, A. (2006) Expression analysis of defense-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44, 58-67.

Krebelj, J.A.; Ravnikar, C. U e Novak, M.P. (2015) Spatio-temporal distribution of *Grapevine fanleaf virus (GFLV)* in grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 142, 159-171.

Kube, M., Schneider, B., Kuhl, H., Dandekar, T., Heitmann, K., Migdo, A.M., Reinhardt, R. e Seemüller, E. (2008) The Linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma 'Candidatus Phytoplasma mali'. *BioMed Central Genomics*, 9, 306-320.

Kube, M., Mitrovic, J., Duduk, B., Rabus, R., e Seemuller, E. (2012) Current view on phytoplasma genomes and encoded metabolism. *The Scientific World Journal*, 185942, 1-25.

Laimer, M., Lemaire, O., Herrbach, E., Goldschmidt, V., Minafra, A., Bianco, P. e Wetzler, T. (2009) Resistance to viruses, phytoplasmas and their vectors in the grapevine in Europe: A review. *Journal of Plant Pathology*, 91, 7-23.

Landi, L. e Romanazzi, G. (2009) Biochemical pathways in phytoplasma-plant interactions in leaves of symptomatic and recovered Bois noir affected grapevines. *Extended abstracts 16th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine* - Dijon, France, 153-154.

Lee, I. M., Davis, R.E. e Gundersen-Rindal, D.E. (2000) Phytoplasma: phytopathogenic *Mollicutes*. *Annual Review of Microbiology*, 54, 221–255.

Lee, I.M., Martini, M., Bottner, K.D., Dane, R.A., Black, M.C. e Troxclair, N. (2003) Ecological implications from a molecular analysis of phytoplasmas involved in an aster yellows epidemic in various crops in Texas. *Phytopathology*, 93, 1368–1377.

- Le Henanff, G., Heitz, T., Mestre, P., Mutterer, J., Walter, B. e Chong, J. (2009) Characterization of *Vitis vinifera* *NPR1* homologs involved in the regulation of Pathogenesis-Related gene expression. *BioMed Central Plant Biology*, 9, 54-67.
- Li, L., Xu, J., Xu, Z.H., e Xue, H.W. (2005) Brassinosteroids stimulate plant tropisms through modulation of polar auxin transport in *Brassica* and *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 2738–2753.
- Liefting, L.W. e Kirkpatrick, B.C. (2003) Cosmid cloning and sample sequencing of the genome of the uncultivable mollicute, Western X-disease phytoplasma, using DNA purified by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters*, 221, 203–211.
- Lim, P.O. e Nam, H.G. (2005) The molecular and genetic control of leaf senescence and longevity in *Arabidopsis*. *Current Topics in Developmental Biology*, 67, 49-83.
- Lin, W.C., Lu, C.F., Wu, J.W., Cheng, M.L., Lin, Y.M., Yang, N.S., Black, L., Green, S.K., Wang, J.F. e Cheng, C.P. (2004) Transgenic tomato plants expressing the *Arabidopsis* *NPR1* gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases. *Transgenic Research*, 13, 567-581.
- Lincoln, J.E., Richael, C., Overduin, B., Smith, K., Bostock, R. e Gilchrist, D.G., (2002) Expression of the antiapoptotic baculovirus *p35* gene in tomato blocks programmed cell death and provides broad-spectrum resistance to disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 15217-15221.
- Lipka, V., Dittgen, J., Bednarek, P., Bhat, R., Wiermer, M., Stein, M., Landtag, J., Brandt, W., Rosahl, S., Scheel, D., Llorente, F., Molina, A., Parker, J., Somerville, S. e Schulze-Lefert, P. (2005). Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*. *Science*, 310, 1180–1183.
- Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R. e Dinesh-Kumar, S.P. (2002) Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant Journal*, 30, 415-429.
- Loake, G. e Grant, M. (2007) Salicylic acid in plant defense – the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 466-472.

Loi, N., Carraro, L., Musetti, R., Firrao, G. e Osler, R. (1995) Apple proliferation epidemics detected in scab-resistant apple trees. *Journal of Phytopathology*, 143, 581-584.

Maixner, M. e Reinert, W. (1999) *Oncopsis alni* (Schrank) (Auchenorrhyncha: Cicadellidae) as a vector of the alder yellows phytoplasma of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 87-94.

Maghuly, F., Leopold, S., Machado, A.D.C., Fernandez, E.B., Khan, M.A., Gambino, G., Gribaudo, I., Scharl, A. e Laimer, M., (2006) Molecular characterization of grapevine plants transformed with *GFLV* resistance genes: II. *The Plant Cell Reports*, 25, 546-553.

Mahalingam, R., Gomez-Buitrago, A., Eckardt, N., Shah, N., Guevara-Garcia, A., Day, P., Raina, R. e Fedoroff, N.V. (2003) Characterizing the stress/defense transcriptome of *Arabidopsis*. *Genome Biology*, 4, Article R20, 1-14.

Makandar, R., Essig, J.S., Schapaugh, M.A., Trick, H.N. e Shah, J. (2006) Genetically engineered resistance to *Fusarium* head blight in wheat by expression of *Arabidopsis NPR1*. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 19, 123-129.

Malembic, S., Saillard, C., Bové, J.M. e Garnier, M. (2002) Effect of polyclonal, monoclonal and recombinant (scFv) antibodies on *in vitro* morphology, growth and metabolism of the phytopathogenic mollicute *Spiroplasma citri*. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 2113-2119.

Margaria, P. e Palmano, S. (2011). Response of the *Vitis vinifera* L. cv. 'Nebbiolo' proteome to Flavescence dorée phytoplasma infection. *Proteomics*, 11, 212–224.

Margaria, P., Ferrandino, A., Caciagli, P., Kedrina, O., Schubert, A. e Palmano, S. (2014) Metabolic and transcript analysis of the flavonoid pathway in diseased and recovered Nebbiolo and Barbera grapevines (*Vitis vinifera* L.) following infection by Flavescence dorée phytoplasma. *Plant. Cell and Environment*, 37, 2183–2200.

Marzachi, C., Veratti, F. e Bosco, D. (1998) Direct PCR detection of phytoplasmas in experimentally infected insects. *Annals of Applied Biology*, 133, 45-54.

Melamed, S., Tanne, E., Ben-Haim, R., Edelbaum, O., Yogev, D. e Sela, I. (2003) Identification and characterization of phytoplasmal genes, employing a novel method of isolating phytoplasmal genomic DNA. *Journal of Bacteriology*, 185, 6513–6521.

Monteiro, F., Sebastiana, M., Pais, M.S. e Figueiredo, A. (2013) Reference gene selection and validation for the early responses to downy mildew infection in susceptible and resistant *Vitis vinifera* cultivars. *PLoS ONE*, 8, 1-10.

Mori, N., Bressan, A., Martini, M., Guadagnini, M., Girolami, V. e Bertaccini, A. (2002) Experimental transmission by *Scaphoideus titanus* Ball of two Flavescence dorée-type phytoplasmas. *Vitis*, 41, 99-102.

Moroldo, M., Paillard, S., Marconi, R., Fabrice, L., Canaguier, A., Cruaud, C., De Berardinis, V., Guichard, C., Brunaud, V., Le Clainche, I., Scalabrin, S., Testolin, R., Di Gaspero, G., Morgante, M. e Adam-Blondon, A.F. (2008) A physical map of the heterozygous grapevine 'Cabernet Sauvignon' allows mapping candidate genes for disease resistance. *BioMed Central Plant Biology*, 8, 66-79.

Morris, K., Mackerness, S.A., Page, T., John, C.F. e Murphy, A.M. (2000) Salicylic acid has a role in regulating gene expression during senescence. *Plant Journal*, 23, 677–685.

Mou, Z., Fan, W. e Dong, X. (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, 113, 935-944.

Murrall, D.J., Nault, L.R., Hoy, C.W., Madden, L.V. e Miller, SA. (1996) Effects of temperature and vector age on transmission of two Ohio strains of aster yellows phytoplasma by the aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Economic Entomology*, 89, 1223-1232.

Nicolaisen, M. (2001) REPORT on a literature study on Status quo of the knowledge on phytoplasma with the focus on *Euphorbia pulcherrima* and other ornamental plants' Danish Institute of Agricultural Sciences, Department of Plant Protection.

Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H.Y., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M. e Namba, S. (2004) Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics*, 36, 27-29.

Oshima, K., Kakizawa, S., Arashida, R., Ishii, Y., Hoshi, A., Hayashi, Y., Kagiwada, S. e Namba, S. (2007) Presence of two glycolytic gene clusters in a severe pathogenic line of *Candidatus Phytoplasma asteris*. *Molecular Plant Pathology*, 8, 481–489.

Oshima, K., Ishii, Y., Kakizawa, S., Sugawara, K., Neriya, Y., Himeno, M., Minato, N., Miura, C., Shiraishi, T., Yamaji, Y. e Namba, S. (2011) Dramatic transcriptional change in an intracellular parasite enable host switching between plant and insect. *PLoS ONE* 6, 1-9.

Oshima, K., Maejima, K. e Namba, S. (2013) Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. *Frontiers in Microbiology - Evolutionary and Genomic Microbiology*, 4, Article 230, 1-8.

Osusky, M., Zhou, G., Osuska, L., Hancock, R.E., Kay, W.W. e Misra, S. (2000) Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. *Nature Biotechnology* 18, 1162-1166.

Palermo, S., Elekes, M., Botti, S., Ember, I., Alma, A., Orosz, A., Bertaccini, A. e Kölber, M. (2004) Presence of Stolbur phytoplasma in Cixiidae from Hungarian grapevine growing areas. *Vitis* 43, 201-203.

Pieterse, C.M., Van Wees, S.C., Van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J. e Van Loon, L.C. (1998) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10, 1571-1580.

Parani, M., Singh, K.N., Rangasamy, S.R.S. e Ramalingam, R.S. (1996) A study on mechanism of phyllody disease resistance in *Sesamum alatum* Thonn. *Current Science*, 70, 86-89.

Petersen, L., C. Dahl, K.H. Esbensen (2004). Representative mass reduction in sampling – a critical survey of techniques and hardware. in Special Issue: 50 years of Pierre Gy's Theory of Sampling. Proceedings: First World Conference on Sampling and Blending (WCSB1). Esbensen & Minkinen (Eds). *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 74, 95-114

Pontier, D., Gan, S., Amasino, R.M., Roby, D. e Lam, E. (1999) Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns of expression. *Plant Molecular Biology* 39, 1243-1255.

Prins, M., Laimer, M., Noris, E., Schubert, J., Wassenegger, M. e Tepfer, M. (2008) Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Molecular Plant Pathology*, 9, 73-83.

Quartau, J.A., Guimarães, J.M. & André, G. 2001. On the occurrence in Portugal of the Nearctic *Scaphoideus titanus* Ball (Homoptera, Cicadellidae), the natural vector of the grapevine “Flavescence dorée” (FD). *The International organisation for Biological Control (IOBC) /The West Palearctic Regional Section (WPRS)*, 24 , 273-276.

Reid, K.E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F. e Lund, S.T. (2006) An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BioMed Central Plant Biology*, 6, 27-37.

Rieu, I. e Powers, S. J. (2009) Real-Time Quantitative RT-PCR: Design, Calculations, and Statistics. *The Plant Cell*, 21, 1031-1033.

Rusjan, D., Halbwirth, H., Stich, K., Mikulic-Petkovsek, M. e Veberic, R. (2012a) Biochemical response of grapevine variety ‘Chardonnay’ (*Vitis vinifera* L.) to infection with grapevine yellows (Bois noir). *European Journal of Plant Pathology*, 134, 231–237.

Rusjan, D., Veberic, R. e Mikulic-Petkovsek, M. (2012b) The response of phenolic compounds in grapes of the variety ‘Chardonnay’ (*Vitis vinifera* L.) to the infection by phytoplasma Bois noir. *European Journal of Plant Pathology*, 133, 965–974.

Rustérucchi, C., Aviv, D.H., Holt, B.F., Dangl, J.L. e Parker, J.E. (2001) The disease resistance signaling components *EDS1* and *PAD4* are essential regulators of the cell death pathway controlled by *LSD1* in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 13, 2211-2224.

Schneider, B., Torres, E., Martín, M.P., Schröder, M., Behnke, H.D. e Seemüller, E. (2005) ‘*Candidatus* Phytoplasma pini’, a novel taxon from *Pinus silvestris* and *Pinus halepensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 303–307.

Schuler, T.H., Poppy, G.M., Kerry, B.R. e Denholm, I. (1998) Insect-resistant transgenic plants. *Trends in Biotechnology*, 16, 168–175.

Seemüller, E., Garnier M. e Schneider, B. (2002) Mycoplasmas of plant and insects. In: Razin S, Herrmann R (eds), *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas*, New York, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 91–116.

Sekalska, B., Ciechanowicz, A., Dolegowska, B., e Naruszewicz, M. (2006) Optimized RT-PCR method for assaying expression of monocyte chemotactic protein type 1 (MCP-1) in rabbit aorta. *Biochemical Genetics*, 44, 133–143.

Sforza, R., Clair, D., Daire, X., Larrue, J. e Boudon- Padieu, E. (1998) The role of *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) in the occurrence of Bois noir of grapevines in France. *Journal of Phytopathology*, 146, 549-556.

Shah, J. (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 365-371.

Shirano, Y., Kachroo, P., Shah, J. e Klessig, D.F. (2002) A gain-of-function mutation in an *Arabidopsis* Toll Interleukin-1 Receptor-Nucleotide Binding Site-Leucine-Rich Repeat type R gene triggers defense responses and results in enhanced disease resistance. *The Plant Cell*, 14, 3149-3162

Sinclair, W.A., Griffiths, H.M. e Whitlow, T.H. (1997) Comparisons of tolerance of ash yellows phytoplasmas in *Fraxinus* species and rootstock-scion combinations. *Plant Disease* 81, 395-398.

Sousa, E., Andrade, R., Baltazar, C., Cantus, J.M., Carvalho, P., Cavaco, M., Chicau, G., Garrido, J., Lopez, J.M., Moratiel, R., Pedras, J., Teixeira, K., Maior J.V. e Sapec Agro (2014) Flavescência dourada - *Scaphoideus titanus*. Edição Sustainia – Agricultura Sustentável, Lda. *Cadernos Técnicos* N.º3.

Spielmann, H., Müller, L., Averbek, D., Balls, M., Brendler-Schwaab, S., Castell, J.V., Curren, R., Silva, O., Gibbs, N.K., Liebsch, M., Lovell, W.W., Merk, H.F., Nash, J.F., Neumann, N.J., Pape, W.J., Ulrich, P. e Vohr, H.W. (2000) *European Centre for Validation of Alternative Methods. The second ECVAM workshop on phototoxicity testing. The report and recommendations of ECVAM*, workshop 42. *ATLA* 28, 777–814.

Spoel, S.H., Mou, Z., Tada, Y., Spivey, N.W., Genschik, P., e Dong, X. (2009). *Cell*, 137, 860-872.

Sticher, L., Mauch-Mani, B. e Métraux, J.P. (1997) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 35, 235–270.

Sugio, A., Kingdom, H.N., MacLean, A.M., Grieve, V.M. e Hogenhout, S.A. (2011a) Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 1254–1263.

Sugio, A., MacLean, A.M., Kingdom, H.N., Grieve, V.M., Manimekalai, R. e Hogenhout, S.A. (2011b). Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 175–195

Sugio, A. e Hogenhout, S.A. (2012) The genome biology of phytoplasma: modulators of plants and insects. *Current Opinion in Microbiology*, 15, 247–254.

Suzuki, S., Oshima, K., Kakizawa, S., Arashida, R., Jung, H.Y., Yamaji, Y., Nishigawa, H., Ugaki, M. e Namba, S. (2006). Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 4252–4257.

Tada, Y., Spoel, S.H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J. e Dong, X. (2008) Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science*, 321, 952-956.

Tang, F., Yang, S., Gao, M., Zhu, H. (2013) Alternative splicing is required for RCT1-mediated disease resistance in *Medicago truncatula*. *Plant Molecular Biology*, 82, 367-374.

Tedeschi, R., Bosco, D. e Alma, A. (2002) Population dynamics of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae), a vector of apple proliferation phytoplasma in northwestern Italy. *Journal of Economic Entomology*, 95, 544–551.

Terlizzi, F. e Credi, R. (2007) Uneven distribution of stolbur phytoplasma in Italian grapevines as revealed by nested-PCR. *Bulletin of Insectology*, 60, 365-366.

Teixeira, K.G. (2015) Flavescência dourada em Portugal: Ponto de situação da doença e medidas de controlo à produção e circulação de materiais de propagação de videira. Direção Geral da Alimentação e Veterinária

Thomas, P.E. e Mink, G.I. (1998) Tomato hybrids with nonspecific immunity to viral and mycoplasma pathogens of potato and tomato. *Hortscience* 33, 764-765.

Thomma, B.P., Eggermont, K., Penninckx, I.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. e Broekaert, W.F. (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate- dependent defense response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 15107-15111.

Toth, K.F., Harrison, N., e Sears, B.B. (1994). Phylogenetic relationships among members of the class *Mollicutes* deduced from rps3 gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 119-124.

Tran-Nguyen, L.T., Kube, M., Schneider, B., Reinhardt, R. e Gibb, K.S. (2008) Comparative Genome Analysis of 'Candidatus Phytoplasma australiense' (Subgroup *tuf*-Australia I; *rp*-A) and 'Ca. Phytoplasma asteris' Strains OY-M. and AY-WB. *Journal of Bacteriology*, 190, 3979-3991.

Udvardi, M.K., Czechowski, T. e Scheible, W.-R. (2008) Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. *The Plant Cell*, 20, 1736-1737.

Valat, L., Fuchs, M. e Burrus, M. (2006) Transgenic grapevine rootstock clones expressing the coat protein or movement protein genes of Grapevine fanleaf virus: Characterization and reaction to virus infection upon protoplast electroporation. *Plant Science* 170, 739-747.

Vandesompele, J., Preter, K.D., Pattyn, F., Poppe, B., Roy, N.V., Paepe, A.D. e Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3, 1-12.

Varma, A., Padh, H. e Shrivastava, N. (2007) Plant genomic DNA isolation: An art or a science. *Biotechnology Journal*, 2, 386-392.

Velasco, R., Zharkikh, A., Troggio, M., Cartwright, D.A., Cestaro, A., Pruss, D., Pindo, M., Fitzgerald, L.M., Vezzulli, S. e Reid, J. (2007) A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS ONE*, 2, 1-18.

Veronesi, F., Bertaccini, A., Parente, A., Mastronicola, M. e Pastore, M. (2000) PCR indexing of phytoplasma-infected micropropagated periwinkle treated with PAP-II, a ribosome inactivating protein from *Phytolacca americana* leaves. *Acta Horticulturae*, 530, 113-119.

Vigne, E., Bergdoll, M., Guyader, S. e Fuchs, M., (2004) Population structure and genetic variability within isolates of Grapevine fanleaf virus from a naturally infected vineyard in France: Evidence for mixed infection and recombination. *Journal of General Virology*, 85, 2435-2445.

Vijayan, M.M., Pereira, C., Kruzynski, G. e Iwama, G.K. (1998) Sublethal concentrations of contaminant induce the expression of hepatic heat shock protein 70 in two salmonids. *Aquatic Toxicology*, 40, 101-108.

Vlot, A.C., Dempsey, D.A. e Klessig, D.F. (2009) Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 177–206.

Walsh, H.A. e Pietersen, G. (2013) Rapid detection of Grapevine leafroll-associated virus type 3 using a reverse transcription loop-mediated amplification method. *Journal of Virological Methods*, 194, 308-16.

Wang, J., Shine, M.B., Gao, Q.-M., Navarre, D., Jiang, W., Liu, C., Chen, Q., Hu, G. e Kachroo, A. (2014) Enhanced disease susceptibility<sup>1</sup> mediates pathogen resistance and virulence function of a bacterial effector in soybean. *Plant Physiology*, 165, 1269–1284.

Webb, D.R., Bonfiglioli, R.G., Carraro, L., Osler, R. e Symons, R.H. (1999) Oligonucleotides as hybridization probes to localize phytoplasmas in host plants and insect vectors. *Phytopathology* 89, 894–900.

Weisburg, W.G., Tully, J.G., Rose, D.L., Petzel, J.P., Oyaizu, H., Yang, D. e Van Etten, J. (1989) A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *Journal of Bacteriology* 171, 6455–6467.

Williams, M.E., Torabinejad, J., Cohick, E., Parker, K., Drake, E.J., Thompson, J.E., Hortter, M., e D.B. Dewald. (2005) Mutations in the *Arabidopsis* phosphoinositide phosphatase gene SAC9 lead to overaccumulation of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> and constitutive expression of the stress-response pathway. *Plant Physiology*, 138, 686–700.

Wit, P.J. (2007) How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 2726-2732.

Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51, 221– 271.

Woese, C.R., Kandler, O. e Wheelis, M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 4576-4579.

Yuan, Y., Zhong, S., Li, Q., Zhu, Z., Lou, Y., Wang, L., Wang, J., Wang, M., Li, Q. e Yang, D. (2007) Functional analysis of rice *NPR1* -like genes reveals that OsNPR1/NH1 is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. *Plant Biotechnology Journal*, 5, 313-324.

Zhang, Z., Henderson, C., Perfect, E., Carver, T.L.W., Thomas, B.J., Skamnioti, P. e Gurr, S.J. (2005). Review of genes and genomes, needles and haystacks: *Blumeria graminis* and functionality. *Molecular Plant Pathology*, 6, 561–575.

[www.enoteca.pt](http://www.enoteca.pt);

[www.winershop.com/pt](http://www.winershop.com/pt);

[www.clubevinhosportugueses.wordpress.com](http://www.clubevinhosportugueses.wordpress.com);

[www.vinhoverde.pt](http://www.vinhoverde.pt);

## **Anexos**

## **Anexo 1 - Tampões usados nos Testes ELISA**

Todos os tampões devem ser armazenados a 4 °C. São estáveis durante 1-2 meses após a diluição/preparação e devem ser preparados à temperatura ambiente (20 - 25 °C).

### Tampão de revestimento:

(PH 9,6; para 1000 ml) em água destilada:

- 1,59 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- 2,93 g de NaHCO<sub>3</sub>
- 0,2 g de NaN<sub>3</sub>

### Tampão de lavagem:

(PH 7,4; para 1000 ml) em água destilada:

- 8,0 g de NaCl
- 0,2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 1,15 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 0,2 g KCl
- 0,5 g Tween 20

### Tampão de extracção de vinha

(PH 8,2 / para 1000 ml) em água destilada (pH ajustado com HCl):

- 24,0 g de TRIS
- 8,0 g de NaCl
- 20,0 g de PVP K25 (MW 24.000)
- 10,0 g de PEG (MW 6000)
- 0,2 g de NaN<sub>3</sub>
- 0,5 g de Tween 20

### Tampão de conjugado

(PH 9,8; para 1000 ml) em água destilada (pH ajustado com HCl):

- 97,0 ml Dietanolamina
- 0,2 g de NaN<sub>3</sub>

## **Anexo 2 - Tampões usados no gel de agarose 1,5%**

### Tampão TAE 50x concentrado:

- 242 g Tris (hidroximetil aminometano)
- 57,1 mL de Ácido acético glacial
- 100 mL de EDTA 0,5 M (pH 8,0)

Misturou-se tudo dentro de um copo de precipitação de 1 L de capacidade até dissolver na totalidade.

Passou-se tudo para uma proveta de 1 L.

Adicionou-se água destilada até perfazer 1 L. Conservou-se a cerca de 4°C.

### Tampão TAE 1x concentrado:

- Mediu-se 20 mL de tampão TAE (50 x) e adicionou-se água destilada até perfazer 1 L.

Conservou-se a cerca 4 °C.

### Tampão de carregamento da amostra:

- Azul de bromofenol e
- Orange G

### Anexo 3 – Resultados dos Testes ELISA

Quadro XV – Resultados da detecção dos sete vírus através dos Testes ELISA.

Genes	GLRV1		GLRV2		GLRV3		GCMV		GFLV		ArMV		GFKV		
	Subam.	Valor	Resul.	Valor	Resul.	Valor	Resul.	Valor	Resul.	Valor	Resul.	Valor	Resul.	Valor	Resul.
1		-0,031	Neg.	-0,029	Neg.	-0,036	Neg.	-0,037	Neg.	-0,104	Neg.	-0,093	Neg.	0,000	Neg.
		-0,034	Neg.	-0,032	Neg.	-0,034	Neg.	-0,031	Neg.	-0,1	Neg.	-0,12	Neg.	0,004	Neg.
2		-0,039	Neg.	-0,038	Neg.	-0,037	Neg.	-0,028	Neg.	-0,096	Neg.	-0,111	Neg.	0,000	Neg.
		-0,029	Neg.	-0,038	Neg.	-0,017	Neg.	-0,002	Neg.	-0,077	Neg.	-0,094	Neg.	0,011	Neg.
3		0,003	Neg.	0,007	Neg.	0,015	Neg.	0,037	Neg.	-0,047	Neg.	-0,013	Neg.	0,028	Neg.
		0,009	Neg.	0,005	Neg.	-0,022	Neg.	-0,002	Neg.	-0,079	Neg.	-0,085	Neg.	0,021	Neg.
4		-0,026	Neg.	-0,019	Neg.	-0,021	Neg.	-0,020	Neg.	-0,098	Neg.	-0,092	Neg.	0,013	Neg.
		-0,021	Neg.	-0,010	Neg.	-0,019	Neg.	-0,017	Neg.	-0,110	Neg.	-0,089	Neg.	0,019	Neg.
5		-0,031	Neg.	-0,024	Neg.	-0,044	Neg.	-0,030	Neg.	-0,119	Neg.	-0,110	Neg.	0,002	Neg.
		-0,023	Neg.	-0,028	Neg.	-0,042	Neg.	-0,029	Neg.	-0,108	Neg.	-0,12	Neg.	0,005	Neg.
6		-0,039	Neg.	-0,035	Neg.	-0,044	Neg.	-0,036	Neg.	-0,101	Neg.	-0,118	Neg.	-0,002	Neg.
		-0,024	Neg.	-0,040	Neg.	-0,042	Neg.	-0,023	Neg.	-0,097	Neg.	-0,111	Neg.	-0,001	Neg.
7		0,020	Neg.	0,015	Neg.	-0,004	Neg.	0,032	Neg.	-0,071	Neg.	-0,029	Neg.	0,028	Neg.
		0,002	Neg.	0,008	Neg.	-0,015	Neg.	0,009	Neg.	-0,090	Neg.	-0,071	Neg.	0,021	Neg.
8		-0,025	Neg.	-0,014	Neg.	-0,027	Neg.	-0,015	Neg.	-0,100	Neg.	-0,07	Neg.	0,015	Neg.
		-0,022	Neg.	-0,003	Neg.	-0,029	Neg.	-0,008	Neg.	-0,104	Neg.	-0,069	Neg.	0,019	Neg.
9		-0,031	Neg.	-0,017	Neg.	-0,044	Neg.	-0,018	Neg.	-0,120	Neg.	-0,096	Neg.	0,003	Neg.
		-0,033	Neg.	-0,230	Neg.	-0,042	Neg.	-0,012	Neg.	-0,111	Neg.	-0,093	Neg.	0,006	Neg.
<b>C<sup>-</sup></b>		<b>-0,039</b>	<b>Neg.</b>	<b>-0,030</b>	<b>Neg.</b>	<b>-0,044</b>	<b>Neg.</b>	<b>-0,029</b>	<b>Neg.</b>	<b>-0,108</b>	<b>Neg.</b>	<b>-0,089</b>	<b>Neg.</b>	<b>-0,004</b>	<b>Neg.</b>
<b>C<sup>+</sup></b>		<b>0,118</b>	<b>Pos.</b>	<b>0,988</b>	<b>Pos.</b>	<b>0,183</b>	<b>Pos.</b>	<b>-0,004</b>		<b>1,122</b>	<b>Pos.</b>	<b>1,320</b>	<b>Pos.</b>	<b>0,083</b>	<b>Pos.</b>

## Anexo 4 - Eficiência das reações de rt-PCR do *GPDH* e *Actina*

Quadro XIV – Eficiência das reações de rt-PCR do *GPDH* e *Actina*.

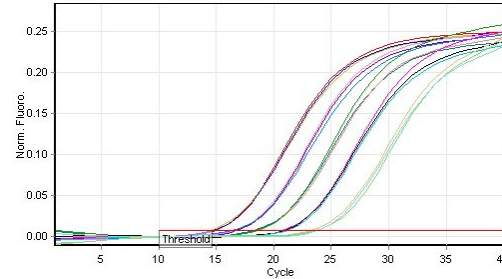
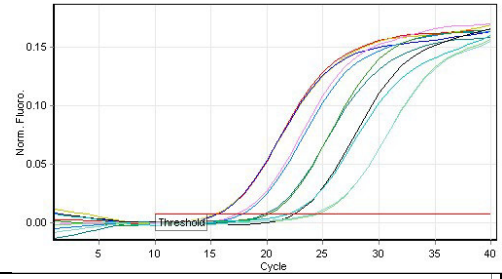
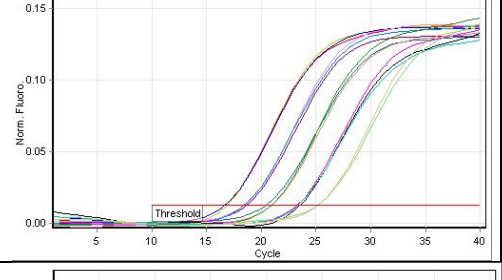
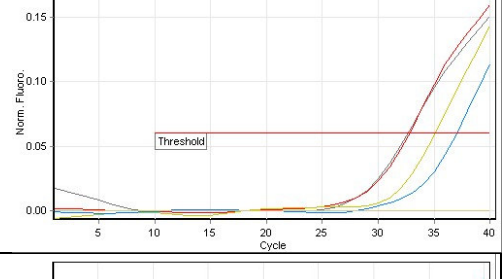
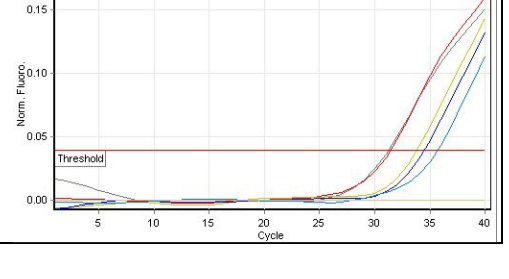
cDNA	Gene	Eficiência (%)	R <sup>2</sup>	Ct diluição menor	Curvas de amplificação
1	<i>GPDH</i>	91	0,991	20,55	
	<i>Actina</i>	94	0,995	22,85	
2	<i>GPDH</i>	80,0	0,994	20,02	
	<i>Actina</i>	98,0	0,998	22,21	
4	<i>GPDH</i>	84	0,99	19,54	

	<i>Actina</i>	107	0,996	21,95	
5	<i>GPDH</i>	91	0,994	19,25	
	<i>Actina</i>	98	0,995	21,44	
6	<i>GPDH</i>	95	0,994	21,26	
	<i>Actina</i>	101	0,995	23,58	
7	<i>GPDH</i>	95	0,992	20,55	

	<i>Actina</i>	94	0,998	22,68	
8	<i>GPDH</i>	85	0,997	21,21	
	<i>Actina</i>	91	0,998	23,30	

## Anexo 5 - Eficiência das reações de rt-PCR do *GPDH*

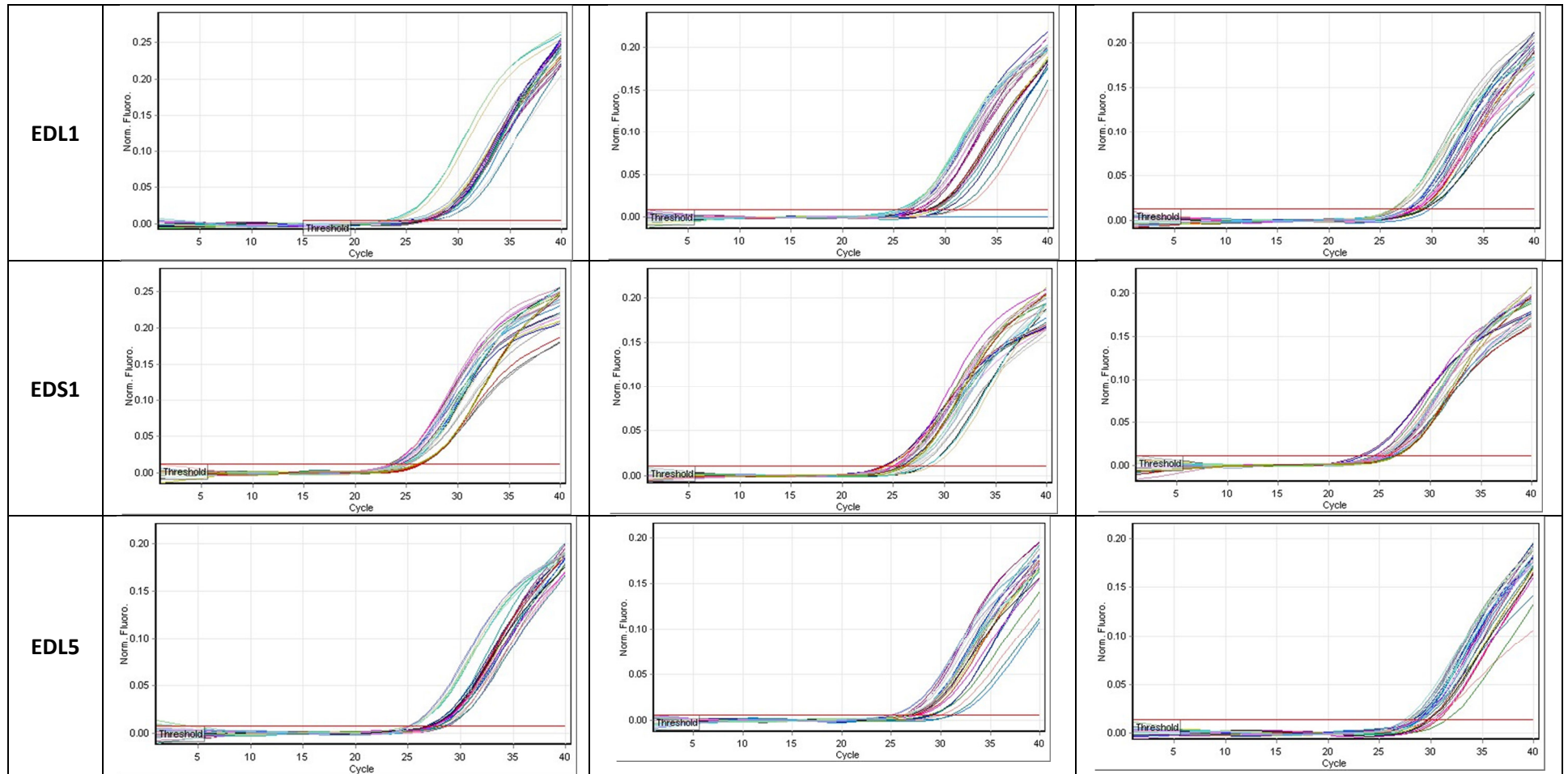
Quadro XVII – Eficiência das reações de rt-PCR do *GPDH*.

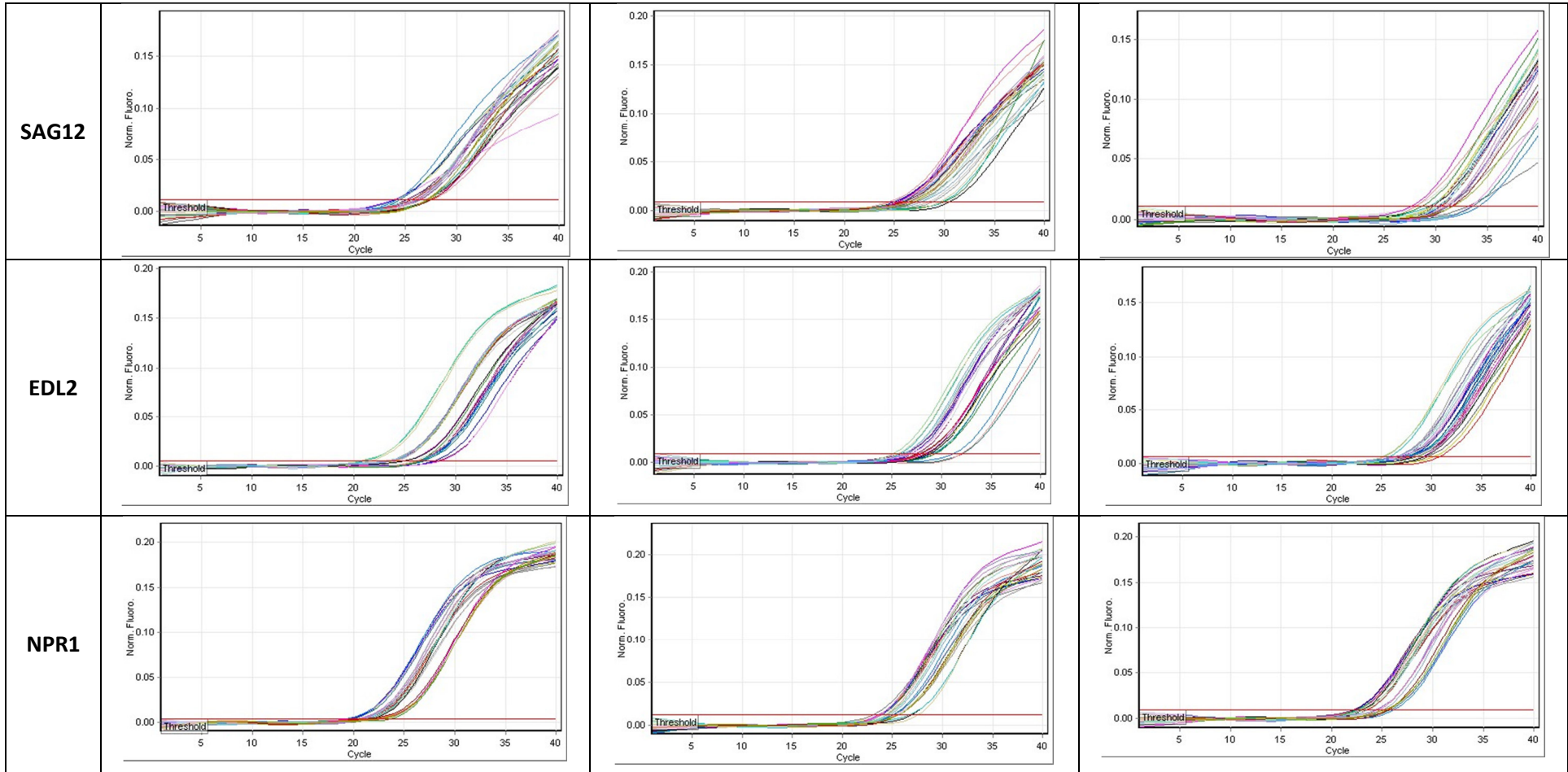
cDNA	Gene	Eficiência (%)	R <sup>2</sup>	Ct diluição menor	Curvas de amplificação
3	<i>GPDH</i> (2 repetições independentes)	87,3	0,99 1	15,22 (DP=0,22)	
		87,6	0,99 6	15,59 (DP=0,08)	
		88,8	0,99 3	16,79 (DP=0,10)	
	<i>EDL5</i>	104,1	0,93	30,25 (DP=0,34)	
		83,5	0,96	31,34 (DP=0,16)	

9	GPDH	80,0	0,99 2	19,25 (DP=0,22)	
		87,1	0,98 2	19,99 (DP=0,21)	
		81,5	0,98	19,50 (DP=0,44)	
	EDL5	93,1	0,98	26,07	
		104,5	0,84	29,61 (DP=0,33)	

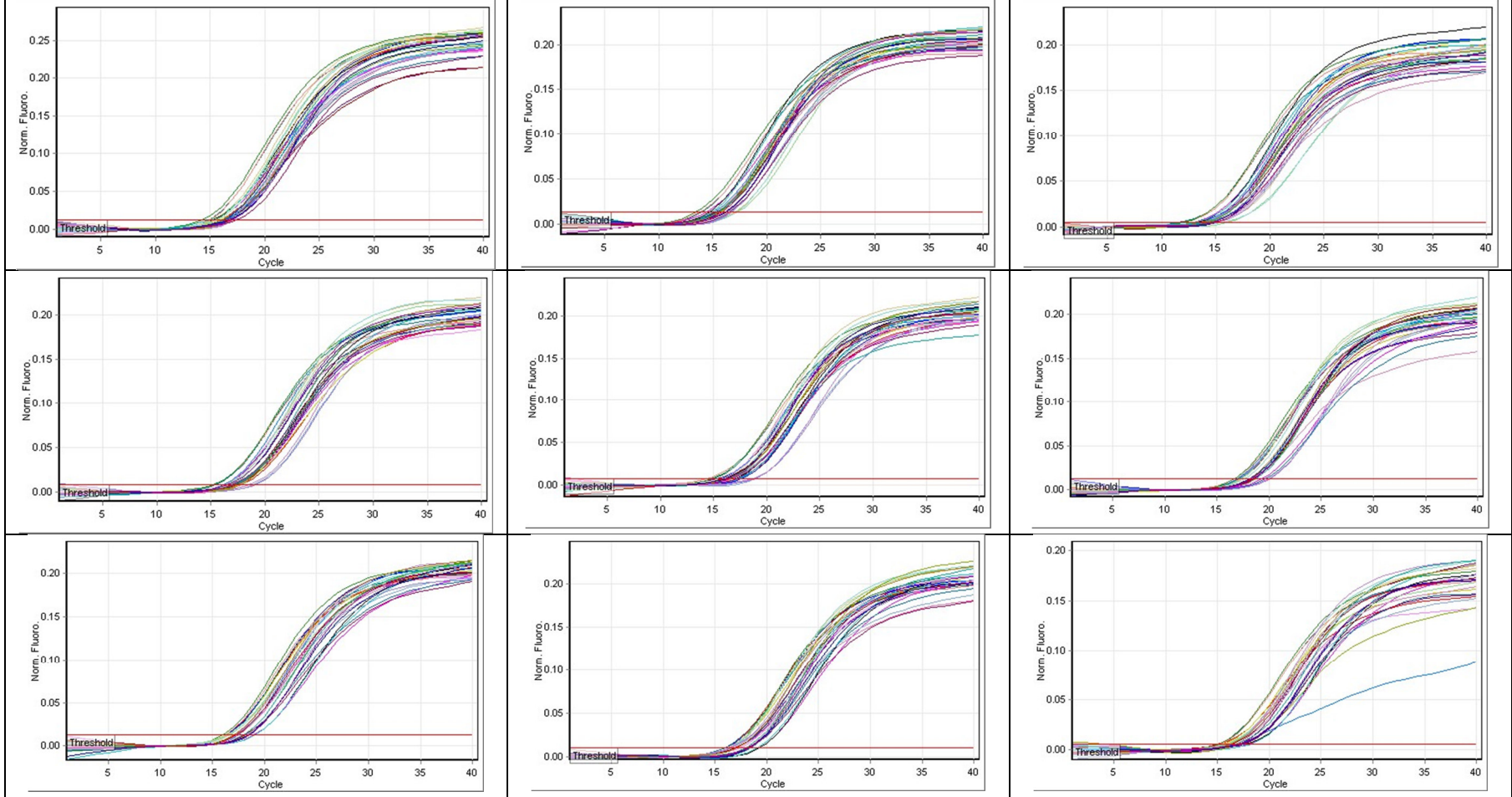
## Anexo 6 – Curvas de amplificação

Quadro XVIII – Curvas de amplificação dos genes de interesse e do gene de referência.





**GPDH**



### Anexo 7 – Padrões de expressão dos genes de interesse

Quadro XIX – Padrões de expressão dos genes *EDS1*, *EDL1*, *NPR1*, *EDL2*, *SAG12* e *EDL5*.

			12-11-2015	09-12-2015	15-12-2015	2 <sup>Δ(-ΔΔCt)</sup>			media	DesvPad	CoeVar
			1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>			
EDS1		-ΔΔCt PL1/PL2	-0,04	-0,81	-1,76	0,97	0,57	0,29	0,61	0,34	55,51
		-ΔΔCt SUB5/PL2	-0,24	-0,03	-0,95	0,85	0,98	0,52	<b>0,78</b>	0,24	30,43
		-ΔΔCt PL3/PL2	1,08	-0,35	-0,91	2,11	0,78	0,53	1,14	0,85	74,31
	branca	-ΔΔCt PL5/PL4	-2,10	-1,65	-0,95	0,23	0,32	0,52	<b>0,36</b>	0,15	41,21
	tinta	-ΔΔCt cFD/sFD	0,52	-0,63	-1,20	1,43	0,65	0,43	<b>0,84</b>	0,53	62,86
EDL1		-ΔΔCt PL1/PL2	0,92	-0,33	-1,22	1,89	0,80	0,43	1,04	0,76	73,17
		-ΔΔCt SUB5/PL2	0,59	0,018	-1,82	1,51	1,01	0,28	<b>0,93</b>	0,61	65,85
		-ΔΔCt PL3/PL2	1,58	-0,46	-1,41	2,99	0,73	0,38	1,36	1,42	103,92
	branca	-ΔΔCt PL5/PL4	2,67	-0,70	-1,09	6,36	0,62	0,47	<b>2,48</b>	3,36	135,42
	tinta	-ΔΔCt cFD/sFD	1,24	-0,32	-1,44	2,36	0,80	0,37	<b>1,18</b>	1,05	89,02
			30-11-2015	09-12-2015	15-12-2015	2 <sup>Δ(-ΔΔCt)</sup>			media	DesvPad	CoeVar
			1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>			
NPR1		-ΔΔCt PL1/PL2	-0,51	0,21	0,78	0,70	1,15	1,72	1,19	0,51	42,80
		-ΔΔCt SUB5/PL2	0,78	0,7	0,73	1,72	1,62	1,66	<b>1,67</b>	0,05	2,81
		-ΔΔCt PL3/PL2	0,28	0,45	0,79	1,21	1,36	1,73	1,44	0,27	18,49
	branca	-ΔΔCt PL5/PL4	-0,77	-2,18	-0,51	0,59	0,22	0,70	<b>0,50</b>	0,25	<b>50,07</b>
	tinta	-ΔΔCt cFD/sFD	-0,12	0,33	0,76	0,92	1,25	1,69	<b>1,29</b>	0,39	<b>30,08</b>
EDL2		-ΔΔCt PL1/PL2	-3,33	-0,63	0,23	0,10	0,65	1,17	0,64	0,54	83,94
		-ΔΔCt SUB5/PL2	10,65	0,35	1,06		1,27	2,08	<b>1,68</b>	0,57	34,11
		-ΔΔCt PL3/PL2	-2,07	-1,26	0,55	0,24	0,42	1,46	0,71	0,66	93,54
	branca	-ΔΔCt PL5/PL4	-2,03	-0,90	-1,25	0,24	0,54	0,42	<b>0,40</b>	0,15	<b>36,59</b>
	tinta	-ΔΔCt cFD/sFD	-1,14	-0,94	0,35	0,45	0,52	1,27	<b>0,75</b>	0,46	<b>60,73</b>

		30-11-2015	09-12-2015	16-12-2015	2 <sup>^</sup> (-ΔΔCt )			media	DesvPad	CoeVar	
		1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>				
SAG12		-ΔΔCt PL1/PL2	-0,74	-1,10	-0,21	0,60	0,47	0,86	0,64	0,20	31,51
		-ΔΔCt SUB5/PL2	-0,20	0,92	2,55	0,87	1,89	5,86	<b>2,87</b>	2,63	91,63
		-ΔΔCt PL3/PL2	-0,52	-1,43	-0,21	0,70	0,37	0,86	0,64	0,25	38,94
	branca	-ΔΔCt PL5/PL4	-0,24	0,10	-0,42	0,85	1,07	0,75	<b>0,89</b>	0,17	<b>18,70</b>
	tinta	-ΔΔCt cFD/sFD	-0,63	-1,26	0,25	0,65	0,42	1,19	<b>0,75</b>	0,40	<b>52,78</b>
EDL5		-ΔΔCt PL1/PL2	2,06	0,03	-0,99	4,17	1,02	0,50	1,90	1,98	104,54
		-ΔΔCt SUB5/PL2	3,20	0,68	-0,82	9,19	1,60	0,57	<b>3,79</b>	4,71	124,36
		-ΔΔCt PL3/PL2	1,91	-0,63	0,16	3,76	0,65	1,12	1,84	1,68	91,13
	branca	-ΔΔCt PL5/PL4	0,67	1,43	0,16	1,59	2,69	1,12	<b>1,80</b>	0,81	<b>44,94</b>
	tinta	-ΔΔCt cFD/sFD	1,98	-0,30	-1,38	3,94	0,81	0,38	<b>1,71</b>	1,94	<b>113,43</b>