

ADAPTAÇÃO DE PROTOCOLO DE RT-PCR PARA ANÁLISES DE VÍRUS DO GÊNERO *POTEXVIRUS*

PASSADOR, M.M.¹; UZZO, R.P.¹; MARUBAYASHI, J.M.²; YUKI, V.A.¹;
DUDIENAS, C.¹

¹Instituto Agrônomo (IAC), Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade, Núcleo Quarentenário. Campinas, SP.

²Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas (FCA-UNESP), Departamento de Produção Vegetal. Botucatu, SP.

RESUMO

Para complementar a eficiência das análises fitopatológicas em Quarentenário, é viável o uso de protocolos adequados que apresentem precisão e especificidade. Dentro deste contexto, o presente estudo teve como objetivo, adaptar um protocolo de PCR precedida pela transcrição reversa (RT-PCR) de modo a estabelecer um método padrão em uma única etapa para diagnose de vírus pertencentes ao gênero *Potexvirus*. A detecção do produto de PCR foi realizada em eletroforese em gel de agarose, e foi possível verificar a amplificação do fragmento alvo, porém com anelamentos inespecíficos. Desta forma, para aprimorar a técnica, amostras foram submetidas à reação de RT-PCR com gradiente de temperatura de anelamento, o que possibilitou estabelecer as condições apropriadas para o ciclo da reação. Os produtos purificados da reação de RT-PCR foram submetidos a sequenciamento para confirmação dos isolados analisados. A metodologia proposta no presente estudo, permitiu confirmar a presença de duas espécies do gênero *Potexvirus* em reação de RT-PCR em uma única etapa.

Palavras-chave: Fitopatologia, metodologia, biologia molecular

INTRODUÇÃO

Para a eficiência dos diagnósticos de fitopatógenos, alguns pontos importantes devem ser considerados, tais como, a interação entre plantas e pragas, a adequação de avanços científicos e tecnológicos aos procedimentos quarentenários, e as melhorias estruturais necessárias (Marques et al., 2016). Em alguns casos os diagnósticos podem ser simples, e baseados em análise visual, quando há presença de sintomas, e ocasionalmente, alguns sinais. Porém, muitas vezes certos métodos necessitam ser complementados por ferramentas que proporcionam resultados mais acurados e pontuais.

Muitas técnicas para detecção podem ser desenvolvidas, aplicadas e adaptadas, de acordo com a ocasião e necessidade. Dentre as técnicas utilizadas, o método de RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction) apresenta resultados eficazes e de alta sensibilidade (Gambino e Gribaudo, 2006). É uma técnica muito eficiente para identificação de vírus em plantas. Baseia-se na amplificação e detecção do material genético dos vírus de RNA, em amostras vegetais infectadas (Fajardo e Nickel, 2015). Há variações da técnica, uma destas variações é a RT-PCR *one step* (realizada em uma única etapa e em tubo único).

Muitas metodologias que descrevem primers universais e genéricos são muito importantes para aplicações em diagnósticos para grupos de patógenos, como por exemplo os vírus. Para o gênero *Potexvirus*, Van der Vlugt e Berendsen (2002) desenvolveram e descreveram um eficiente método que permite identificar infecções causadas por este gênero de vírus utilizando um conjunto de primers combinado com um primer para cDNA, sendo a RT e PCR realizadas em etapas distintas. Com relação aos vírus do gênero *Potexvirus*, são transmitidos naturalmente por contato, material propagativo infectado e não apresentam vetores. Os sintomas comuns para este grupo são manchas anelares. Podem causar diversos danos econômicos, ademais, há espécies consideradas de importância quarentenária para o Brasil. O presente estudo teve como objetivo adaptar o método de RT-PCR desenvolvido por Van der Vlugt e Berendsen (2002) para uma única etapa, mantendo a sensibilidade e especificidade para a detecção de vírus do gênero *Potexvirus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente estudo, foram utilizados vírus do gênero *Potexvirus*, das espécies *Hydrangea ringspot virus* (HdRSV) e *Cymbidium mosaic virus* (CymMV), os isolados foram mantidos em plantas de *Hydrangea* sp. e *Oncidium* sp., respectivamente, em casa de vegetação do setor de Virologia Vegetal do Instituto Agrônomo (Campinas, SP). As extrações do RNA viral para HdRSV foram realizadas no mês de março de 2019, e para CymMV foram realizadas no mês de janeiro de 2020, a partir de fragmentos provenientes de folhas das referidas plantas exibindo sintomas típicos. Para esta etapa foi utilizado o kit comercial Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp.®).

Os produtos das extrações foram armazenados em microtubos de 1,5 mL (DNase e RNase free), em ultrafreezer a -80 °C, até sua utilização. A integridade foi confirmada por eletroforese em gel de agarose na concentração 1,2%, contendo 4µL de corante fluorescente de ácidos nucleicos (Brilliant Green®). O gel com as amostras foi submetido à eletroforese com tampão TAE (Tris-acetato-EDTA), por 45 minutos, 100V e 80 mA. A concentração e qualidade do ácido nucleico foi determinada em equipamento QIAxpert® System (Qiagen).

Para a reação de RT-PCR realizada em uma só etapa, foram utilizados os primers Potex-5 (5'-CAYCARCARGCMAARGAYGA-3'), Potex-2RC (5'-AGCATRGCNSCRCTCYTG-3') e também Potex-1RC (5'-TCAGTRTTDGCRTCRAARGT-3') para a transcrição reversa, descritos por Van der Vlugt e Berendsen (2002). Para um volume de 25 µl de reação, foi utilizado 12,5 µl do mix para PCR GoTaq® Green Master Mix (Promega®), 0,25 µl de cada primer e 1 unidade da enzima AMV (Avian myeloblastosis virus, Promega®), e água livre de nucleases (Promega®) para completar o volume de 25 µl.

Os microtubos contendo o mix e amostra foram levados ao termociclador (TProfessional, Biometra®), programado para os oligonucleotídeos utilizados (Van der Vlugt e Berendsen, 2002; Q-bank Plant Viruses and Viroids, 2014). Para adaptação da metodologia para RT-PCR em única etapa, ao ciclo da PCR foi acrescentada a condição para a transcrição reversa (60°C por 37 minutos), pois no mix já foram adicionados o primer para RT e a enzima AMV. Esta etapa foi seguida pelas fases de desnaturação inicial (94°C por 4 min); desnaturação, anelamento e extensão (35x: 94°C por 30 s; 52°C por 30 s; 72°C por 45 s) e extensão final (72°C por 10 min), sendo na última etapa mantidos a baixa temperatura (4°C). Os resultados da

amplificação por reação de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (1,2%), seguindo as condições já mencionadas no texto.

Com a finalidade de padronizar a metodologia para uso em análises de rotina, e evitar anelamentos inespecíficos, foi aplicada a estratégia de RT-PCR com temperaturas de anelamento em gradiente. Foram avaliadas cinco temperaturas de anelamento, a partir da temperatura estabelecida pelos autores (52°C), acrescentando e diminuindo 2°C: 48.1°C; 50°C; 54°C; 56°C; 58°C.

Para confirmação dos resultados das reações de RT-PCR, os produtos das reações foram purificados com o kit comercial QIAquick Purification Kit (Qiagen®) e enviados para sequenciamento. A sequências obtidas foram analisadas e confirmadas por meio da ferramenta BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGETYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) disponível para consulta on-line no website do NCBI/GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

RESULTADOS

A integridade das amostras foi confirmada por eletroforese em gel de agarose. A concentração e qualidade do ácido nucleico determinadas em equipamento QIAxpert® System (Qiagen®), demonstraram-se satisfatórias (razão 260/280: 1,7 - 2,15).

A RT-PCR foi realizada em uma única etapa. Desta maneira, fragmentos com aproximadamente 584pb foram verificados para *Potexvirus* após eletroforese em gel de agarose, confirmando a quantidade de pares de bases descrita pelos autores dos oligonucleotídeos.

Além das amplificações por RT-PCR, também foi possível verificar amplificações múltiplas de produtos inespecíficos, e após a reação de RT-PCR com gradiente de temperatura, foi verificado somente o gene de interesse. Dentre as temperaturas avaliadas, a temperatura de 58°C, permitiu somente a amplificação do fragmento com aproximadamente 584pb. Na Figura 1 estão apresentados os produtos das reações de RT-PCR de uma das amostras de *Potexvirus* para demonstrar a eficiência da metodologia proposta, bem como a temperatura de anelamento adequada para a situação, e esta condição foi eficiente para as duas espécies de *Potexvirus* avaliadas.

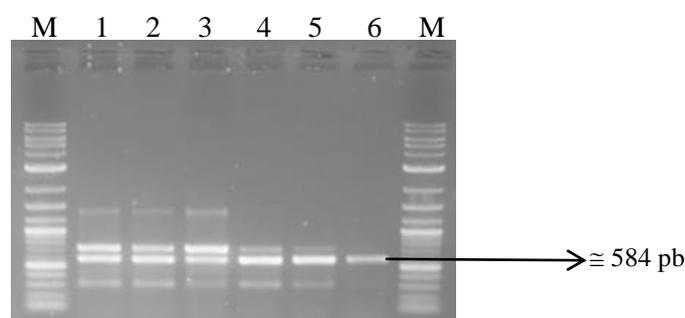


Figura 1: Resultados da RT-PCR em uma única etapa para *Potexvirus* com gradiente de temperatura de anelamento. Linhas 1 a 6: 48.1°C; 50°C; 52°C; 54°C; 56°C; 58°C.

As sequências foram alinhadas e comparadas com outras sequências das espécies avaliadas que estão depositadas no GenBank, utilizando o programa Blast-n. Na análise filogenética foi incluída a sequência *Zucchini yellow mosaic virus* (MK214425.1) como grupo taxonômico externo (Figura 2).

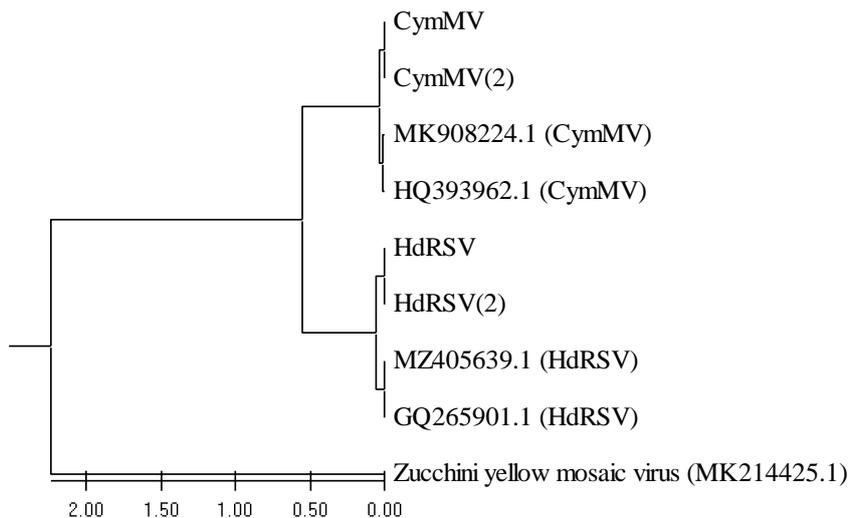


Figura 2: Representação de relações filogenéticas entre as sequências dos fragmentos de RT-PCR obtidos com o gênero *Potexvirus*, comparadas com sequências depositadas no GenBank. Árvore Filogenética construída pelo método UPGMA.

DISCUSSÃO

Certas metodologias proporcionam resultados satisfatórios, mas mesmo assim, é possível estudar maneiras de adaptá-las para cada rotina de trabalho e objetivos. No presente estudo, uma metodologia eficiente para identificação de espécies do gênero *Potexvirus*, foi adaptada visando a otimização do tempo, bem como economia de recursos.

O método e os primers descritos por Van der Vlugt e Berendsen (2002) para detecção destes fitovírus demonstra muita sensibilidade e confiabilidade. Possivelmente, como muitas metodologias, não seja viável para todas as espécies, porém demonstrou eficiência para muitas espécies de importância econômica (Van der Vlugt e Berendsen, 2002; Silva, 2011; Mejías et al., 2015; Monger e Eden., 2019; Evallo et al., 2021).

A transcrição reversa, para a produção do cDNA a partir da molécula de RNA, pode ser realizada em duas ou em apenas uma única etapa, por meio da transcriptase reversa, utilizando kits comerciais, primers específicos para esta finalidade, bem como a adaptação de protocolos disponíveis na literatura. Quando há possibilidade de realização da RT-PCR em uma única etapa, os resultados são obtidos em menos tempo, mantendo a qualidade das análises.

As condições de temperatura do ciclo da RT-PCR foram aprimoradas após o ajuste da temperatura de anelamento, e foi possível detectar a temperatura mais adequada para evitar

anelamentos inespecíficos. Tais produtos inespecíficos são observados no gel de agarose como bandas coradas pelo intercalante de DNA, que tem menor ou maior peso molecular que o produto esperado (Persing, 1993; Rebouças, 2001), e assim comprometendo a clareza e confiabilidade dos resultados.

CONCLUSÃO

Adaptações de metodologias para determinadas rotinas de trabalho e ocasiões permitem o uso de técnicas recentes, ou que foram desenvolvidas há algum tempo, mas ainda são viáveis e muito importantes para o estudo de patógenos, como os fitovírus. O conjunto de primers descritos por Van der Vlugt e Berendsen (2002) apresenta sensibilidade notável na detecção para este gênero de vírus, portanto está claro que podem ser usados para detecção de um número considerável de espécies. A metodologia proposta no presente estudo será aplicada em outras espécies para prosseguir com a confirmação de sua eficiência, porém, até o momento, permitiu a utilização de primers universais e genéricos para a análise dos materiais utilizados, confirmando a presença de duas espécies o gênero *Potexvirus* em reação de RT-PCR em uma única etapa.

REFERÊNCIAS

- EVALLO, E.; TAGUIAM, J. D.; BALENDRES, M. A. A brief review of plant diseases caused by *Cactus virus X*. **Crop Protection**, v. 143, 2021.
- FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O. **Técnicas de detecção e estudo de vírus em plantas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2015. 8 p.
- GAMBINO, G.; GRIBAUDO, I. Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction with co-amplification of a plant RNA as internal control. **Phytopathology**, v. 96, n. 11, p. 1223-1229, 2006.
- MARQUES, A. S. DOS A.; LOPES-DA-SILVA, M.; GONZAGA, V.; FERNANDES, F. R.; BENITO, N. P.; VEIGA, R. F. DE A. Fundamentos biológicos, ferramentas operacionais e inovação em quarentena vegetal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 483-493, 2016.
- MEJÍAS, A.; RODRÍGUEZ-ROMÁN, E.; ROMANO, M.; ZAMBRANO, K.; MARYS, E. New Record of *Cassava common mosaic virus* infecting Chaya (*Cnidoscolus chayamansa* McVaug) in Venezuela. **Plant Disease**, v. 99, n. 8, p. 1190, 2015.
- MONGER, W. A.; EDEN, R. J. First report of *Nerine latent virus* in *Haemanthus albiflos* in the UK. **New Disease Reports**, v. 39, n. 1, p. 3, 2019.

PERSING, D. Target selection and optimization of amplification reactions. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER, F.C.; WHITE, T.J. **Diagnostic molecular microbiology – principles and applications**. Washington: Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 1993. p. 88-104.

Q-BANK PLANT VIRUSES AND VIROIDS (2014). **Protocol for RT-PCR for Potexvirus (generic)**. URL: <http://www.q-bank.eu>.

REBOUÇAS, N.A. **Biologia molecular aplicada à medicina: fundamentos teóricos e práticos**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2001. 66 p.

SILVA, J.M. DA. Detecção sorológica e molecular do *Cassava common mosaic virus* em mandioca na região noroeste do Paraná. **Dissertação** apresentada à Universidade Estadual de Maringá – Área de concentração: Genética e Melhoramento. Linha de Pesquisa: Virologia Vegetal. Orientador: Prof. Dr. Eliezer Rodrigues de Souto. Maringá – PR. 2011.

VAN DER VLUGT, R. A. A.; BERENDSEN, M. Development of a general Potexvirus cDNA and PCR primer set. **European Journal of Plant Pathology**, v.108, p. 367–371, 2002.