

Ajustes em protocolo de multiplex voltado à detecção de vírus de videira presentes no Submédio do Vale do São Francisco

Alexcátia dos Anjos Silva¹; Débora Maria Sansini Freitas²

Resumo

Neste trabalho, testou-se diversos ajustes para um RT-PCR multiplex, que utiliza diferentes pares de oligonucleotídeos ao mesmo tempo, o que possibilita a detecção simultânea de várias espécies de vírus, fator que diminui o tempo e o custo das análises. Foram realizados testes para a detecção simultânea de vírus de videira (*Vitis* spp.), realizando-se a extração de ácidos nucleicos com sílica voltados à análise de rotina em laboratório, *primers* randômicos e pares de oligonucleotídeos específicos já descritos na literatura. Foram avaliadas temperaturas de anelamento de 50 °C, 50,5 °C e 51 °C, combinadas à cDNAs obtidos com os *primer* p(dT)15 e p(dN)6 e PCR com oito pares de oligonucleotídeos. Foram amplificados, com sucesso, fragmentos dos vírus *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine leafroll-associated virus -2* e *-3* (GLRaV-2 e GLRaV-3), *Grapevine fleck virus* (GFkV) e *Rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV).

Palavras-chave: RT-PCR, viroses, *Vitis* sp.

Introdução

A videira, quando acometida por viroses, sofre perdas em qualidade e produtividade dos frutos, gerando prejuízos ao produtor. Para se garantir que as mudas sejam saudáveis, é necessário que as mesmas sejam provenientes de plantas matrizes testadas em laboratório para a detecção de diversos vírus.

¹Estudante de Ciências Biológicas, UPE, estagiária da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

²Engenheira-agrônoma, D.Sc. em Ciências, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, debora.freitas@embrapa.br.

A detecção de viroses em videira pode ser feita por meio de testes biológicos, sorológicos ou moleculares. Os testes biológicos são realizados com a enxertia ou inoculação mecânica de plantas indicadoras, porém, são trabalhosos e demoram muito tempo para dar resultados. Os testes sorológicos dependem de anticorpos específicos que se ligam ao vírus, em métodos como ELISA, dot-blot e Western blot. Os testes moleculares são baseados na detecção dos ácidos nucleicos do vírus e são realizados por métodos como o PCR, RT-PCR, Northern blot e hibridização (Lima, 2009).

Muito utilizadas na rotina de laboratórios de diagnose e na pesquisa científica, as técnicas de Reverse transcriptase polimerase chain reaction (RT-PCR), e suas variações, têm grande eficiência na detecção de vírus de plantas.

O método multiplex é uma variante do PCR, onde em uma mesma reação, um ou mais loci são amplificados simultaneamente. Esse método pode ser empregado para RT-PCR, testes de DNA como análises de deleções, mutações e polimorfismos e análises quantitativas (Henegariu et al., 1997).

Os vírus já detectados no Submédio do Vale do São Francisco são o Grapevine virus A (GVA), Grapevine leafroll-associated virus 1, 2, 3 e 4 (GLRaVs -1, -2, -3 e -4), Grapevine fleck virus (GFkV), Grapevine rupestris vein feathering virus (GRVFV), Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV), Grapevine virus B (GVB) e Grapevine fanleaf virus (Fajardo et al., 2002; Catarino et al., 2015).

A adaptação de protocolos efetivos e menos onerosos é de fundamental importância para a pesquisa. Desta forma, este trabalho teve por objetivo adaptar um multiplex a partir de uma extração de RNA baseada em sílica visando à detecção rotineira de viroses da videira no Submédio do Vale do São Francisco.

Material e Métodos

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de Fitopatologia, de Genética Vegetal e no de Biotecnologia da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. Foram realizadas as extrações de ácidos nucleicos totais conforme Rott e Jelkmann (2001), de alguns genótipos de videiras do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Semiárido, localizado no Campo Experimental de Mandacaru, em Juazeiro, BA.

Os genótipos testados foram: Vênus, Saturn, Júpiter, Paulistinha, IAC 138-22, Marroo Seedless, Madalena, BRS Linda, CG 4113, BRS Clara, Carmenere 433; Centenial Seedless, Feal, Concord Clone, BRS Morena e Royalty.

A partir de *primers* randômicos p(dN)6 (NNN NNN) e p(dT)15 (TTT TTT TTT TTT TTT), foi realizada a transcrição reversa do RNA para cDNA. Para isso, 3 µL do RNA total de cada planta de videira e 2 µL do *primer reverse* p(dN)6 foi incubado a 70 °C por 5 minutos e, em seguida, posto no gelo por 5 minutos. A essa mistura foram acrescentados 4 µL do tampão da enzima M-MLV 5x), 4 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL de dNTPs, 1 µL de transcriptase reversa e 5 µL de H₂O DEPC e, então, realizada uma incubação a 25 °C por 5 minutos e a 42 °C por 90 minutos.

A PCR foi realizada em um total de 25 µL, contendo os *primers* (Tabela 1) descritos por Gambino e Gribaudo (2006). Foram acrescentados 2 µL do cDNA, 3,75 µL do tampão da Taq DNA Polimerase (10x), 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM, 0,7 µL de dNTPs, e 0,3 µL de Taq DNA Polimerase. Por fim, foi completada a reação com H₂O DEPC para um volume final de 25 µL. A mistura foi levada ao termociclador com temperatura de 94 °C por 4 minutos e 35 ciclos consecutivos de 94 °C por 30 segundos, 50 °C por 60 segundos e 72 °C por 60 segundos. Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose a 1,5% e colocados em tampão TBE 1X sob eletroforese por 1 hora a 80 V. A leitura foi realizada com luz UV em fotodocumentador após coloração com brometo de etídeo.

Os oligonucleotídeos foram alterados, conforme se observa na Tabela 1. Outros testes foram realizados com as seguintes alterações na etapa de PCR: foram modificadas as quantidades de 2 µL para 2,5 µL de cDNA e a temperatura de anelamento de 50 °C aumentada para 50,5 °C; foi aumentado de 35 para 42 o número de ciclos de desnaturação, anelamento e extensão.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados e alterações de doses utilizadas.

| Nome do vírus ou primer | Sequências dos primers forward e reverse | Dose do primer (20 mM) | Modificação da dose do primer (20 mM) |
|-------------------------|---|------------------------|---------------------------------------|
| GRSPaV | (GGG TGG GAT GTA GTA ACT TTT GA) e (GCA AGT GAA ATG AAA GCA TCA CT) | 0,75 µL | 1 µL |
| GFkV | (TGA CCA GCC TGC TGT CTC TA) e (TGG ACA GGG AGG TGT AGG AG) | 0,5 µL | 0,75 µL |
| GLRaV-1 | (TCT TTA CCA ACC CCG AGA TGAA) e (GTG TCT GGT GAC GTG CTAAAC G) | 0,375 µL | 0,6 µL |
| GLRaV-2 | (GGT GAT AAC CGA CGC CTC TA) e (CCT AGC TGA CGC AGA TTG CT) | 0,2 µL | 0,45 µL |
| GLRaV-3 | (TAC GTT AAG GAC GGG ACA CAG G) e (TGC GGC ATT AAT CTT CAT TG) | 0,75 µL | 1 µL |
| GVA | (GAG GTA GAT ATA GTA GGA CCT A) e (TCG AAC ATA ACC TGT GGC TC) | 0,75 µL | 1 µL |
| 18S (videira) | (CGC ATC ATT CAA ATT TCT GC) e (TTC AGC CTT GCG ACC ATA CT). | 0,1 µL | - |

Resultados e Discussão

O primeiro teste para a detecção simultânea de seis tipos de vírus de videira (GRSPaV, GFkV, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-1 e GVA), utilizando-se a técnica de multiplex PCR, foi realizado sob temperatura de anelamento de 50 °C e 35 ciclos de desnaturação anelamento e extensão não foi satisfatório, pois resultou em bandas inespecíficas com cerca de 300 pb, 410 pb e 600 pb.

No Multiplex PCR com anelamento de 50,5 °C, 42 ciclos e cDNA oriundo do *primer p(dN)6*, constatou-se a presença do vírus GLRaV-1 no genótipo Vênus e GLRaV-3 em Paulistinha, porém, sob essa temperatura, ainda se observaram bandas inespecíficas. Com o aumento da temperatura de anelamento para 51 °C e utilizando-se o cDNA das videiras com o *primer p(dN)6*, foram detectados, simultaneamente, os vírus: GFkV em CG 4113; GLRaV-3 em CG 4113, Júpiter, Carmenere 433, Centenial Seedless, Madalena, Vênus, Saturn e Paulistinha; e GVA em Centenial Seedless, Madalena e Vênus. Com uso do cDNA oriundo do oligonucleotídeo iniciador *p(dT)15* foram detectados: GVA em Centenial Seedless, Júpiter e Vênus; GFkV em Júpiter, Vênus, Carmenere 433, Saturn, IAC 138-22, CG 4113, Royalty e Marroo Seedless; GLRaV-2 em Madalena; e GRSPaV em Saturn, IAC 138-22, CG 4113, Marroo Seedles e Royalty.

Neste trabalho, foram adaptadas algumas variáveis para aproveitar ao máximo o uso dessa técnica para os vírus encontrados no Submédio do Vale do São Francisco, com uso para análises de rotina, as quais devem ser eficientes e com menor custo. A extração de ácidos nucleicos realizada indicou níveis aceitáveis de contaminantes do RNA.

Gambino e Gribaudo (2006) utilizaram, como base de seu multiplex, RNA extraído pelo kit de extração de RNA comercial modificado, e outro *primer* randômico comercial. O uso da extração RNA proposto por Root e Jelkmann (2001) não foi bem sucedido por causa da qualidade do RNA, que é menor por este processo do que pelo kit, apresentando contaminação por polissacarídeos complexos, compostos polifenólicos, aromáticos e outros compostos que podem se ligar ao ácido nucleico, precipitando-o (Gambino et al., 2008).

Embora a qualidade do RNA obtido não tenha sido ótima, o que prejudicou a detecção de alguns vírus, ela foi considerada suficiente devido aos diversos ajustes e testes realizados na tentativa de direcionar este tipo de protocolo com a extração de rotina, utilizando-se os mesmos *primers* descritos por Gambino e Gribaudo (2006), voltados para as viroses encontradas no Submédio do Vale do São Francisco.

Nenhum dos transcritos a partir de *primers* randômicos p(dN)6 ou p(dT)15, utilizados na transcrição reversa, geraram fragmentos de todos os vírus simultaneamente, na posterior etapa de PCR. O uso de *primers* randômicos permite a amplificação de diversas sequências de RNA concomitantemente, durante a etapa de transcrição reversa, diferentemente do uso de *primers* específicos, que amplificam somente a sequência-alvo. Por não serem específicos, podem permitir a obtenção de uma maior gama de fragmentos de diferentes vírus durante a etapa de PCR.

Conclusão

Foi possível obter resultados para a detecção simultânea dos vírus GVA, GFkV, GLRaV-2 e GRSPaV, utilizando o *primer* p(dT)15 e/ou pela detecção de GLRaV-1 e -3, GFkV e GVA, utilizando o *primer* p(dN)6, com os pares de *primers* descritos por Gambino e Gribaudo (2006), a partir do protocolo de extração de ácidos nucleicos totais de Rott e Jelkmann (2001).

Referências

- CATARINO, A.; FAJARDO, T. V. M.; PIO-RIBEIRO, G.; EIRAS, M.; NICKEL, O. Incidência de vírus em videiras no Nordeste brasileiro e caracterização molecular parcial de isolados virais locais. **Ciência Rural**, v. 45, n. 3, p. 379-385, 2015.
- FAJARDO, T. V. M.; KUHN, G.B.; EIRAS, M. ; NICKEL, O. Detecção de closterovirus em videira e caracterização parcial de um isolado do Grapevine leafroll-associated virus 3. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 1. p. 58-64, 2002.
- GAMBINO, G.; GRIBAUDO, I. Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcriptio n-Polymerase chain reaction WITH coamplification of a plant RNA as internal control. **Phytopathology**, v. 96, n. 11, p. 1223-1229, 2006.
- GAMBINO, G.; PERRONE, I.; GRIBAUDO I. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. **Phytochemical Analyses**, v. 19, n. 6, p. 520-525, 2008.
- HENEGARIU, O.; HEEREMA, N. A.; DLOUHY, S. R.; VANCE, G. H.; VOGT, P. H. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. **BioTechniques**, v. 23, n. 23, p. 504-511, 1997.

LIMA, M. F. **Detecção e controle de viroses em videiras**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2009. (Embrapa Semiárido. *Circular Técnica*, 90). Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPATSA-2010/42260/1/CTE90.pdf>>. Acesso em: 7 fev. 2018.

ROTT, M. E.; JELKMANN, W. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, n. 4, p. 411-420, 2001.