

Adaptação de protocolos de RT-PCR para a detecção de vírus de videira do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido

Alexcátia dos Anjos Silva¹; Débora Maria Sansini Freitas²

Resumo

Este trabalho teve por objetivo adaptar protocolos de RT-PCR conhecidos, a partir de uma extração de ácidos nucleicos de menor custo para a detecção rotineira de viroses da videira. Foram testados 15 acessos de videira do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Semiárido. A detecção molecular foi direcionada a oito vírus distintos: *Grapevine leafroll-associated virus -1, -2, -3 e -4* (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3 e GLRaV-4), *Grapevine virus A (GVA)*, *Grapevine virus B (GVB)*, *Rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV)* e *ao Grapevine fleck virus (GFkV)*. Destes, apenas o GLRaV-1 não foi detectado. Na detecção do GLRaV-4, observaram-se bandas inespecíficas em todos os testes. Os demais apresentaram bons resultados de detecção.

Palavras-chave: detecção de rotina, *Vitis* spp., BAG Embrapa Semiárido.

Introdução

O Brasil é o terceiro maior exportador de frutas do mundo, destacando-se dentre elas as uvas de mesa, produzidas e exportadas em grande parte a partir do polo Petrolina, PE e Juazeiro, BA (Feldberg et al., 2008).

As videiras (*Vitis* spp.) podem ser afetadas por muitas pragas e patógenos. Dentre os patógenos, merecem destaque os vírus, que diminuem a sua pro-

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.

atividade e prejudicam seu rendimento econômico. Já foram relatadas cerca de 13 espécies de vírus presentes em videiras no Brasil (Basso et al., 2014). As videiras podem apresentar ou não sintomas relacionados aos vírus (Saldarelli et al., 2005). A utilização de mudas sadias é o principal controle de vírus de videira, sendo necessário que elas sejam previamente testadas.

Dentre as técnicas utilizadas para a detecção de vírus em videiras, o método de RT-PCR (*Reverse transcription-polymerase chain reaction*) apresenta resultados eficazes e de alta sensibilidade (Gambino; Gribaudo, 2006).

O objetivo deste trabalho foi adaptar protocolos de RT-PCR para a detecção de vírus da videira.

Material e Métodos

A extração de ácidos nucleicos totais das plantas de videiras foi realizada conforme o protocolo de Rott e Jelkmann (2001), como tecido lenhoso maduro de plantas pertencentes ao BAG da Embrapa Semiárido. As variedades de videiras utilizadas na extração foram: Vênus, Saturn, Júpiter, Paulistinha, IAC 138-22, Marroo Seedless, BRS Linda, CG 4113, BRS Clara, Carmenere 433, Centenial Seedless, Feal, Concord Clone, BRS Morena e Royalty.

O protocolo de RT-PCR de cada vírus foi testado separadamente, utilizando, cada um, diferentes combinações de *primers* na transcrição reversa e no PCR.

Para a síntese do cDNA foram utilizados 3 µL do RNA total, e 2 µL de *primer reverse* de cada oligonucleotídeo, ou de *primers* p(dN)6 (NNN NNN), ou de p(dT)15 (TTT TTT TTT TTT TTT) a 20 mM. A mistura seguiu para o termociclador a 70 °C por 5 minutos e em gelo também por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados, aos tubos, 4 µL de tampão da enzima M-MLV 5X, 4 µL de MgCl₂ 25mM, 1 µL de dNTP 10mM, 1 µL de transcriptase reversa e 5 µL de H₂O DEPC, levados ao termociclador a 25 °C por 5 minutos, 42 °C por 90 minutos e 70 °C por 15 minutos.

A etapa de PCR foi realizada utilizando-se 3 µL de cDNA de cada amostra, 2,5 µL de tampão da Taq DNA Polimerase 10x, 1 µL de MgCl₂ 50 mM, 0,5 µL dNTP 10 mM, 1,25 µL de *primer reverse* e a mesma quantidade para o *primer forward*, ambos a 20 mM, 0,125 µL de Taq DNA Polimerase 5 U/µL e 15,4 µL de H₂O Milli-Q.

Os produtos de PCR foram colocados a uma temperatura inicial de 94 °C por 3 minutos e depois de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento de 50 °C por 30 segundos e extensão de 72 °C por 30 segundos e, por fim, foram submetidos a uma temperatura de 72 °C por 15 minutos.

As variações nos ciclos, temperaturas e concentrações de reagentes foram realizadas com base nos resultados preliminares dos fragmentos obtidos por cada *primer* em gel de agarose (Tabela 1).

Tabela 1. Modificações sucessivas realizadas no RT-PCR para detecção de cada vírus de videira (*Vitis* spp.).

Dose MgCl ₂	Dose Taq	Dose Primer	Temperatura de anelamento/ciclos utilizados	Primer usado na transcrição	Vírus
GLRaV -2	0,16 µL	2 µL	52 °C/35 ciclos; 54 °C / 40 ciclos; 56 °C / 40 ciclos	Reverse	
GLRaV-4		1,3 µL	52 °C/35 ciclos; 54 °C/40 ciclos; 56°C/ 40 ciclos, 57 °C/42 ciclos; 54 °C/43 ciclos; 56 °C/43 ciclos e 58 °C /43 ciclos	Reverse, p(dN)6	
GRSPaV		0,7 µL	53 °C /35 ciclos; 56 °C / 40 ciclos e 58 °C/ 45 ciclos	p(dN)6 e p(dT)15	0,75 µL
GfKV		0,7 µL	53 °C/35 ciclos; 56 °C/40 ciclos e 58 °C/45 ciclos	p(dN)6 e p(dT)15	0,75 µL
GLRaV-1	0,16 µL	1,3 µL	52 °C /40 ciclos; 57 °C/ 42 ciclos	p(dN)6	
GLRaV-3	0,16 µL		52 °C /40 ciclos	p(dN)6	
GVA	0,16 µL		52 °C /40 ciclos	p(dN)6	
GVB		1,3 e 0,13 µL	57 °C /42 ciclos; 50 °C/ 45 ciclos	p(dN)6	0,75 µL

Os produtos da reação foram aplicados em gel de agarose a 1,5% e corridos em tampão TBE 1x sob eletroforese por 1 hora e 20 minutos a 80 V. A leitura foi realizada em fotodocumentador sob luz UV após coloração com Gel Red®.

Resultados e Discussão

A partir de pares de *primers* testados separadamente, foram detectados sete vírus de videira: GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GVA, GVB, GfKV, GRSPaV (Tabela 2).

Figura 2. Condições ótimas encontradas para a detecção de viroses através de RT-PCR em videiras (*Vitis* spp.) amostradas do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Semiárido.

Amostras positivas de videiras do BAG da Embrapa Semiárido	Primers senso e antissenso	Tamanho do fragmento	Primer utilizado na transcrição reversa	Alterações no RT-PCR para a detecção	Vírus detectado
Apesar das modificações, apresentou bandas inespecíficas para Centennial Seedless, Feal, Concord Clone, BRS Morena, Marroo Seedless, BRS Linda, CG 4113, BRS Clara, e Carmener 433	HSP4A (CTC AAA CCA GCG GCT GTT G) e HSP4B (GTG ATA CCA TAT ACA TAC CGA CC) (Routh et al., 1998)	441 pb	Antissenso	TA* de 58°C /43 ciclos; 1,3 µL de primer	GLRaV-4
Royalty, Marroo Seedless, BRS Linda, CG 4113, BRS Clara, e Carmener 433	(GGT GAT AAC CGA CGC CTC TA) e (CCT AGC TGA CGC AGA TTG CT) (Gambino; Gribaudo, 2006)	543 pb	Antissenso	TA* de 56°C/ 40 ciclos; 0,16 µL de Taq	GLRaV-2
Saturn, BRS Clara, Paulistinha	(TAC GTT AAG GAC GGG ACA CAG G) e (TGC GGC ATT AAT CTT CAT TG) (Gambino; Gribaudo, 2006))	336 pb	Antissenso e p(dN)6	TA* de 52°C/ 40ciclos; 0,16 µL de Taq	GLRaV-3
Vênus, Saturn, Júpiter, Paulistinha, e IAC 138-22	(GGG TGG GAT GTA GTA ACT TTT GA) e (GCA AGT GAA ATG AAA GCA TCA CT) (Gambino; Gribaudo, 2006)	155 pb	Antissenso	TA* de 56°C/ 40 ciclos, 0,7 µL de primer, 0,75 µL de MgCl ₂	GRSPaV
Vênus, Saturn, Júpiter, Paulistinha, e IAC 138-22	(TGA CCA GCC TGC TGT CTC TA) e (TGG ACA GGG AGG TGT AGG AG) (Gambino; Gribaudo, 2006))	179 pb	Antissenso e p(dT)15	TA* de 56°C/40 ciclos, 0,7 µL de primer, 0,75 µL de MgCl ₂	GFKV
Madalena	(GAG GTA GAT ATA GTA GGA CCT A e TCG AAC ATA ACC TGT GGC TC) (Gambino; Gribaudo, 2006))	272 pb	Antissenso e p(dN)6	TA* de 52°C /40 ciclos 0,16 µL de Taq	GVA
Carmener 433, Vênus, IAC 138-22, Júpiter	(GTG CTA AGA ACG TCT TCA CAG C) e (ATC AGC AAA CAC GCT TGA ACC G) (Gambino; Gribaudo, 2006))	460 pb	Antissenso	TA* de 57°C /42 ciclos, 1,3 µL de primer, 0,75 µL de MgCl ₂	GVB
Não detectado	(TCT TTA CCA ACC CCG AGA TGAA) e (GTG TCT GGT GAC GTG CTA AAC G) (Gambino; Gribaudo, 2006)	232 pb	Antissenso	-	GLRaV-1

*TA= Temperatura de anelamento.

Foram testadas diversas combinações de protocolos de transcrição reversa e PCR, utilizando-se o método de extração com sílica descrita por Root e Jekmann (2001), que se mostrou rápido e eficaz para a obtenção do RNA total de amostras de tecido lenhoso maduro de videira. A qualidade do RNA obtido foi confirmada pela amplificação da região 18S do gene da videira em 100% das amostras, que serviu como controle da extração do RNA e RT-PCR.

Gambino et al. (2008), utilizando tecidos do lenho da videira, obteve 70% de eficácia no RT-PCR empregando-se o mesmo par de oligonucleotídeos na etapa do PCR e outro oligonucleotídeo randômico (Random Nonamers, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante a etapa de transcrição reversa.

Os produtos de RT-PCR reforçaram a aplicabilidade do método com uso da sílica ao demonstrar que as amostras de videira se apresentaram positivas para várias espécies de vírus. O RT-PCR para GVB e GLRaV-3 apenas obteve resultados positivos para viroses quando testados no processo de RT com o *primer reverse* randômico p(dN)6 (NNN NNN). Todos os *primers* foram amplificados, exceto o do GLRaV-1, que não foi detectado nas amostras testadas com o par de *primers* descrito. Provavelmente, as amostras não eram positivas para este vírus, embora seja possível ocorrer inespecificidade do *primer* utilizado por causa das variações no genoma do vírus estudado.

Gambino e Gribaudo (2006) utilizaram uma temperatura de anelamento no RT-PCR de 56 °C, comum a todos os iniciadores: 18S rRNA, GLRaV-2, GVB, ArMV, GRLaV-3, GVA, GLRaV-1, GFkV, GRSPaV e GFLV. Como o processo descrito por esses autores foi modificado, empregando-se outras etapas de extração, RT e PCR, as temperaturas de anelamento ótimas mudaram de 52 °C para GVA e GLRaV-3, e de 57 °C para GVB. A detecção do GLRaV-4 com o par de *primers* HSP4A e HSP4B (Routh et al., 1998), cuja temperatura para o Imuno-capture RT-PCR (IC -RT-PCR) era de 64 °C, não foi bem sucedida, pois mesmo com o ajuste de temperaturas de anelamento e as concentrações de *primers*, cloreto de magnésio, DNA total e Taq DNA polimerase, não foi possível a eliminação da banda inespecífica.

Após vários testes, a temperatura que melhor se adequou foi 56 °C, apresentando ainda duas bandas, uma específica de 441 pb e outra inespecífica de aproximadamente 290 pb. Isso ocorre porque esse *primer* só deve ser usado em IC-RT-PCR, um método bem específico, que utiliza produtos de imunocaptura de partículas de vírus, que elimina problemas relacionados à presença de substâncias inibidoras e outros contaminantes, comparado a outros tipos de extração de RNA (Routh et al., 1998).

A temperatura de anelamento de 64 °C, utilizada no IC-RT-PCR por Routh et al. (1998), não geraram tais bandas inespecíficas, portanto, esse *primer* provavelmente não serve para a detecção do GLRaV-4 em RT-PCR convencio-

nal, pois não se encontrou uma ótima temperatura de anelamento e, quando submetido a temperaturas superiores a 59 °C, as bandas não ficaram visíveis no gel de agarose. Nenhuma das videiras testadas foi positiva para a presença de GLRaV-1.

Conclusões

O protocolo de Rott e Jelkmann (2001), com alterações da temperatura de anelamento e concentração de reagentes do PCR, é eficiente para a extração de RNA de videiras.

Foram detectados seis vírus em algumas amostras do BAG da Embrapa Semiárido: GLRaV-2, GVB, GLRaV-3, GVA, GFkV e GRSPaV.

Referências

- BASSO, M. F.; FAJARDO, T. V. M.; PIO-RIBEIRO, G.; EIRAS, M.; ZERBINI, F. M. Avanços e perspectivas no estudo das doenças virais e subvirais em videira com ênfase na realidade brasileira. **Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP)**, v. 22, p. 160-207, 2014.
- FELDBERG, N. P.; DIAS, M. S. C.; REGINA, M. A. Avaliação agrônômica de cultivares de videiras apirenas na região de Jaíba, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 644-648, 2008.
- 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.
- 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**, n. 19, p. 520-525, 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/pca.1078>>. Acesso em: 14 maio 2018.
- ROUTH, G.; ZHANG, Y. P.; SALDARELLI, P.; ROWHANI, A. Use of degenerate primers for partial sequencing and RT-PCR-based assays of *grapevine leafroll-associated viruses 4 and 5*. **Phytopathology**, v. 88, n. 11, p. 1238-1243, 1998.
- 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, p. 411-420, 2001.
- SALDARELLI, P.; CASTELLANO, M. A.; HARRISON, B. D.; MARTELLI, G. P. Two grapevine viruses in an ornamental *Vitis* species from Scotland. **Journal of Plant**, v. 87, n. 1, p. 76, mar. 2005.