

Detecção Rápida do Carlavirus em Feijão Através da Amplificação Isotérmica Mediada por Loop

Paulo Felipe Neves Estrela¹, Gabriela Rodrigues Mendes Duarte², Josias Correa de Faria³, Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza⁴, Claudio Brondani⁵ e Rosana Pereira Vianello⁶

¹ Graduando em Química na Universidade Federal de Goiás, estagiário da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO

² Química, doutora em Química, Universidade Federal de Goiás - Instituto de Química, Goiânia, GO

³ Engenheiro-agrônomo, Ph.D. em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO

⁴ Engenheiro-agrônomo, doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO

⁵ Engenheiro-agrônomo, doutor em Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO

⁶ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO

Resumo - O Carlavirus é uma doença viral transmitida pela mosca-branca e que causa danos à cultura do feijão, porém, menos agressiva quando comparada aos causados pelo vírus do mosaico-dourado. Atualmente, com o desenvolvimento da tecnologia do feijão transgênico, resistente ao mosaico-dourado, os sintomas de Carlavirus tornaram-se visíveis, trazendo impacto negativo para o desempenho do feijão geneticamente modificado (GM). Devido à semelhança dos sintomas apresentados pela planta quanto infectada com o Carlavirus e o mosaico-dourado, a diferenciação da doença fica comprometida. Dessa forma, testes moleculares baseados na amplificação do DNA representam uma técnica com grande potencial para detecção do vírus que infecta a planta. A reação da polimerase em cadeia (PCR), apesar de eficiente, demanda considerável tempo e infraestrutura laboratorial nas etapas de extração e purificação do RNA e síntese de cDNA, amplificação e detecção do produto-alvo. Alternativamente à PCR, a Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP) promove a amplificação de ácidos nucleicos em temperaturas constantes, tornando assim, o método instrumentalmente mais simples. Devido ao elevado número de amplicons gerados na LAMP em um baixo tempo e a possibilidade de integração da reação com formas alternativas de detecções, como a visual, a técnica demonstra elevado potencial para detecção viral diretamente no point-of-care. Portanto, o trabalho tem por objetivo o desenvolvimento inédito de uma metodologia rápida e simples de detecção específica do Carlavirus através da tecnologia LAMP para fins de monitoramento. A etapa inicial da metodologia envolveu o desenho de três conjuntos de primers iniciadores LAMP, em regiões variadas da sequência viral. Para isso, a sequência genômica do Carlavirus foi acessada e os seis primers foram desenhados utilizando o software V4 PrimerExplorer, seguido pela síntese dos mesmos. Paralelamente, quatro amostras de tecido foliar infectadas com o Carlavirus, bem como amostras de plantas sadias, foram coletadas em casa de vegetação e submetidas à extração de RNA e síntese de cDNA. A partir dos primers sintetizados e dos cDNAs foram realizadas as reações de amplificação, inicialmente utilizando uma PCR padrão e os pares de oligos F3 e B3. Os três conjuntos de oligos sintetizados apresentaram um padrão específico de amplificação para o Carlavirus e foram considerados adequados para serem utilizados na padronização da técnica. A padronização foi conduzida com volume final de 10 µL, contendo 1X tampão de Reação ThermoPol, MgSO₄, dNTPs, oligos internos (FIP e BIP) e externos (F3 e B3), bem como dois oligos do tipo loop, cuja presença visa reduzir o tempo da amplificação, a enzima Bst DNA polimerase (New England Biolabs) e cDNA de amostras virais. Posteriormente, o microtubo foi levado ao aquecimento a 72 °C por 15 minutos, e após o período de incubação, foi adicionado o reagente intercalante de DNA SYBR Green. Como resultado da técnica LAMP, foi observada a coloração verde em resposta à presença do Carlavirus na amostra, enquanto que na ausência do vírus ocorreu a alaranjada, permitindo a detecção viral por um método visual e sem a necessidade de realizar a eletroforese em géis de agarose. Em seguida, foi selecionado um conjunto de oligos iniciadores e a reação LAMP possibilitou a detecção do Carlavirus em apenas 15 minutos, utilizando 2 ng/µL de cDNA. A partir desse ponto estão sendo conduzidas novas reações de padronização para aumentar a especificidade da reação. A técnica LAMP, em desenvolvimento para detecção do Carlavirus, apresenta um elevado potencial de aplicabilidade diretamente nas lavouras de feijão, possibilitando assim um diagnóstico confiável, seguro e de baixo custo, com potencial de aplicação em larga escala, permitindo planejar de modo racional o manejo das áreas infectadas nas próximas safras de cultivo.