

RESUMO EXPANDIDO

Preservação de controles positivos do gênero *Potyvirus* para análises em quarentena vegetal

Passador, Martha Maria¹; Uzzo, Roberta Pierry¹; Yuki, Valdir Atsushi²; Dudienas, Christina¹

¹Instituto Agrônômico (IAC), Centro de Sanidade Vegetal, Núcleo do Quarentenário. Campinas, SP.

²Instituto Agrônômico (IAC), Centro de Sanidade Vegetal, setor de Virologia Vegetal. Campinas, SP.

Autor para correspondência: Martha Maria Passador. E-mail: quarentenario.labmol@gmail.com

Resumo

A obtenção e preservação de materiais para emprego como controles positivos em testes de diagnose por PCR, constitui uma importante ferramenta para reforçar as análises dos materiais recebidos no Quarentenário IAC. A constituição e estabelecimento de um banco de controles positivos proporciona uma maior confiabilidade aos diagnósticos de doenças quarentenárias, contribuindo para o fornecimento de resultados corretos às instituições públicas e privadas que buscam o serviço de quarentena vegetal. O objetivo deste estudo foi demonstrar a viabilidade de RNA viral, de um *Potyvirus*, extraído pelo método CTAB 2%, a -80 °C por um período de 4 anos. A viabilidade deste material foi preservada por este período e assim permitiu seu uso como controle positivo para as análises de materiais em quarentena vegetal.

Introdução

Por uma série de razões, é aconselhável o uso de protocolos integrados que incluem o uso de técnicas de biologia molecular, seguidas pela confirmação de outras técnicas baseadas em diferentes princípios biológicos (López et al., 2009). Sendo assim, para aprimorar e complementar os diagnósticos oferecidos, tornam-se importantes as análises por meio de PCR, realizadas concomitantes às executadas por membros que compõem a comissão de quarentena do Quarentenário IAC.

Em alguns casos os diagnósticos podem ser simples, e baseados em análises visuais, quando há presença de sintomas típicos, e ocasionalmente, alguns sinais. Porém, muitas vezes certos métodos necessitam ser complementados por ferramentas que proporcionam resultados com maiores detalhes. Para a eficiência dos diagnósticos, 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).

Para que os resultados de análises por PCR sejam mais consistentes, é importante o uso de controles positivos, que consistem em uma referência para estas reações, e assim evitar a ocorrência de falsos positivos ou falsos negativos. Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi demonstrar a manutenção de RNA de dois isolados virais do gênero *Potyvirus* utilizados para controles positivos em reações de PCR, para este grupo de vírus.

Materiais e métodos

Para estes testes foram utilizados isolados de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) previamente caracterizados (Narita et al., 2011) e mantidos em plantas de maracujá doce e maracujá azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* e *Passiflora alata*), em casa de vegetação do setor de Virologia Vegetal do Instituto Agrônômico (Campinas, SP). As extrações do RNA

viral foram realizadas no mês de março de 2017, segundo o método de extração por CTAB 2% (Doyle e Doyle 1987, Masoomi Aladizgeh 2016) a partir de fragmentos provenientes de folhas das referidas plantas exibindo sintomas típicos de mosaico.

Os produtos das extrações foram armazenados em microtubos de 1,5 mL (DNase e RNase free), em ultrafreezer a -80 °C. E a cada 60 dias foram avaliados quanto à integridade e também por RT-PCR e visualizados em gel de agarose. Para evitar os descongelamentos sucessivos da mesma amostra, ela foi dividida em 10 amostras, e a cada verificação, uma amostra diferente era testada.

A integridade foi confirmada por eletroforese em gel de agarose na concentração 1,2%, contendo 6µL 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 avaliar a viabilidade, a reação de RT-PCR foi realizada em uma só etapa, utilizando-se os oligonucleotídeos Wcien e PV1 (Mota et al, 2004), descritos na literatura, universais e genéricos para este grupo de vírus. 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 oligonucleotídeo 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 o par de oligonucleotídeos utilizado (Mota et al, 2004) seguindo as fases desnaturação, anelamento, extensão e extensão final, sendo na última etapa mantidos a baixa temperatura (4°C). Os resultados da amplificação por reação de PCR foram submetidos a eletroforese e gel de agarose (1,2%), seguindo as condições já mencionadas no texto.

Resultados

A integridade confirmada por eletroforese em gel de agarose demonstrou que o material se manteve viável até o final das avaliações. A concentração e qualidade do ácido nucleico determinadas em equipamento QIAxpert® System – Qiagen, demonstraram-se satisfatórias (razão 260/280: 1,7 - 2,15).

Na figura 1 estão apresentados os produtos das reações de PCR das amostras de CABMV preservados por um período de 4 anos. Todas as amostras testadas foram positivas, portanto, o RNA extraído e armazenado manteve-se viável durante este período. Isto possibilitou seu uso como controle positivo para as análises de materiais em quarentena vegetal, por pelo menos quatro anos.

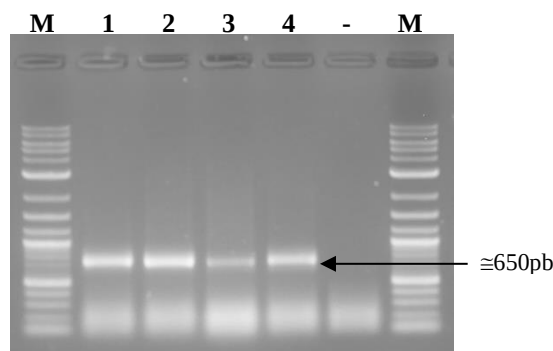


Figura 1: Gel de agarose com produtos das reações de PCR para o gênero *Potyvirus* (CABMV).

M - Marcador Molecular 1 kb plus DNA ladder BioLabs®. Linhas 1 e 2- Amostras provenientes de maracujá doce. Linhas 3 e 4 - Amostras provenientes de maracujá azedo. Controle negativo com água livre de nucleases (-)

Discussão e conclusões

Quando se trata de diagnósticos para fitovírus constituídos por RNA deve-se considerar a natureza instável deste ácido nucléico. O conhecimento e divulgação de metodologias que permitam a obtenção de concentrações adequadas ou suficientes de RNA, bem como o seu armazenamento, constituem uma importante ferramenta para as análises por métodos moleculares.

A possibilidade de armazenamento de ácidos nucleicos para uso em rotina como controles positivos em reações de PCR possibilita mais dinamismo para as análises dos materiais em quarentena vegetal. A coleta e armazenamento de controles positivos, constitui uma importante ferramenta para reforçar as análises dos materiais recebidos para quarentena vegetal (Passador et al. 2018).

Desta forma, quando possível, podem ser aplicadas metodologias já estabelecidas e testadas, de modo que, conforme os materiais vegetais são recebidos para análise, não haja necessidade de paralisar o fluxo de trabalho para a realização de testes preliminares. A constituição e estabelecimento de um banco de controles positivos proporciona o enriquecimento dos diagnósticos de doenças quarentenárias, contribuindo para o fornecimento de resultados confiáveis às empresas e outras instituições que buscam o serviço de quarentena vegetal

Por meio dos resultados observados ao longo do período de análise, é possível concluir que tanto o método de extração empregado, como a temperatura de -80 °C contribuíram para manutenção do RNA. O presente trabalho permitiu verificar e divulgar a possibilidade de armazenamento de ácidos nucleicos, principalmente RNA por períodos significativos, e assim permitir seu uso em diversos estudos e atividades, como por exemplo, controles positivos usados em reações de PCR no Quarentenário IAC.

Referências

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15

López MM, Llop P, Olmos A, Marco-Noales E, Cambra M, Bertolini E (2009) Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? *Curr. Issues Mol. Biol.* 11(1):13-46. <https://doi.org/10.21775/cimb.011.013>

Masoomi Aladizgeh F, Jabbari L, Khayam Nekouei R, Aalami A (2016) A simple and rapid system for DNA and RNA isolation from diverse plants using handmade kit. Protocol Exchange. <https://doi.org/10.21203/rs.2.1347/v2>

Mota LDC, Della Vecchia MGS, Gioria R, Kitajima EW, Rezende JAM, Camargo LEA, Amorim L (2004) *Pfaffia mosaic virus*: a new potyvirus found infecting *Pfaffia glomerata* in Brazil. Plant Pathol 53:368-373. <https://doi.org/10.1111/j.0032-0862.2004.01001.x>

Narita N, Yuki VA, Pavan MA (2011) Não transmissibilidade do CABMV do maracujazeiro por sementes. Summa Phytopathol, 37(4): 221. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052011000400013>

Passador MM, Yuki VA, Marubayashi JM, Ito MF, Uzzo RP, Dudienas C (2018) Coleta e preservação de controles positivos para diagnose de fitopatógenos no Quarentenário/IAC. In: 41º Congresso Paulista de Fitopatologia, Summa Phytopathologica, 44 (supl.)