

DETECÇÃO DE dsRNA EM FEIJOEIRO 'BLACK TURTLE SOUP' E AMPLIFICAÇÃO RT-PCR DE ENDORNAVÍRUS

Thatiane Suzana Alves Pereira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Eliezer Rodrigues de Souto (Orientador), e-mail: ersouto@uem.br

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências Agrárias/Maringá, PR.

Área: Ciências Agrárias, subárea Agronomia

Palavras-chave: dsRNA, RT-PCR, *Phaseolus vulgaris*

Resumo:

A maior parte dos vírus causadores de doenças em plantas apresentam genoma composto por RNA de fita simples. Porém, recentemente foram identificados vírus não patogênicos, desprovidos de capa proteica, com genoma composto de RNA de fita dupla (dsRNA), classificados como *Endornavirus*, infectando dentre outras hospedeiras, várias cultivares de *Phaseolus vulgaris*. Neste trabalho foi testado um método de extração e detecção eletroforética de dsRNA, e a amplificação por RT-PCR de parte do genoma de *endornavírus* do feijoeiro cv. Black turtle soup. Foram testadas duas linhagens, Black turtle soup + (BTS+) e (BTS-), a primeira com endornavírus, e a segunda livre de vírus. Após a semeadura, folhas extraídas de cada grupo de plantas adultas foram desidratadas, e submetidas à extração de dsRNA, e após, à eletroforese em gel de agarose, e à amplificação RT-PCR com iniciadores específicos para o gene da replicase de endornavírus. Nas plantas BTS+ foram detectadas bandas com cerca de 15 Kbp, típicas de dsRNA. Após, a RT-PCR confirmou a presença de endornavírus com a amplificação de uma banda de aproximadamente 380 pb de uma região do gene codificador da polimerase viral.

Introdução

Os *Endornavirus* possuem genoma de dsRNA de fita simples, com tamanho variando de 9,8 a 17,6 Kbp. Infectam fungos, oomicetos e plantas, através dos esporos e sementes (Fukuhara et al., 2006; Gibbs et al., 2000). Recentemente foi comprovada a existência de fitas duplas de RNA na cultivar Black turtle soup do feijoeiro, representando duas novas espécies do gênero *Endornavirus* (Okada et al., 2013). O objetivo deste trabalho foi testar o protocolo de extração de dsRNA como proposto por Khankhum et al. (2017), em duas linhagens de feijoeiro 'Black turtle soup', e confirmar a

presença de endornavírus através da amplificação RT-PCR com iniciadores específicos.

Materiais e métodos

Em solo adubado foram semeadas duas linhagens da cultivar de feijoeiro Black turtle soup, as quais foram previamente identificadas como BTS+ e BTS- conforme identificadas por Okada et al. (2013). Com o estágio vegetativo completo, as folhas emitidas foram retiradas, picotadas e desidratadas em sílica gel. Após, seguiu-se o protocolo de extração de dsRNA conforme proposto por Khankhum et al. (2017). Basicamente os tecidos foliares foram desidratados e macerados em cadinho de porcelana, sendo utilizados de 50 a 70 mg para extração de dsRNA. Após, o tecido macerado foi transferido para microtubos de 2 ml, sendo adicionados 500 µl de tampão STE, 100 µl de SDS 10%, e 100 µl de suspensão de bentonite a 2 %. As amostras foram misturadas no vórtex, centrifugadas, e depois foi coletado o sobrenadante, sendo este transferido para novo tubo, onde foi adicionado o tampão STE. Finalmente, após adição de fibras de celulose, o dsRNA foi extraído. Para eliminação de DNA contaminante, realizou-se o tratamento com enzima DNase (37 °C por 30 min), em sequência, o dsRNA foi visualizado por eletroforese em gel de agarose a 1,2%. Posteriormente, as amostras com presença de dsRNA foram testadas com iniciadores que amplificam parte do gene da replicase de endornavírus, em reações de RT-PCR conforme Okada et al. (2011).

Resultados e Discussão

Para as amostras BTS+ foram obtidas bandas de alto peso molecular de tamanho aproximado de 15 Kpb. Nas amostras BTS- não houve detecção de bandas, conforme a Fig.1.

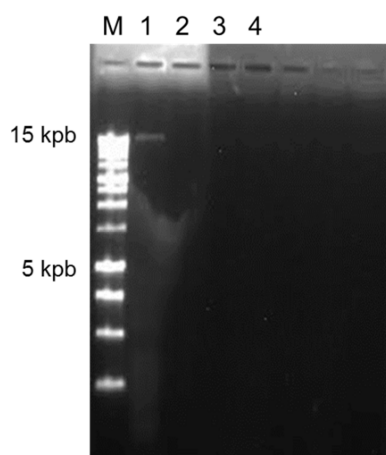


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1,2% para detecção de dsRNA em feijoeiro 'Black turtle soup' (BTS). M- DNA Ladder, 1- cultivar BTS+, 2 – 4 - cultivar BTS-.

Após a detecção de dsRNA nas amostras BTS+ foi realizada nova extração conforme descrito anteriormente, obtendo-se 30 µl de produto de dsRNA. Partiu-se então para a reação de transcrição reversa (RT) com o iniciador Endor-R (5'-CTAGWGCKGTBGTAGCTTGWCC-3'), seguido da reação de PCR com o iniciador Endo-R e Endor-F (5'-AAGSGAGAATWATHGTRTGG CA-3'), os quais amplificam 381 pb da enzima de replicação de endornavírus. Na Figura 2 notam-se fragmentos do tamanho de aproximadamente 380 pares de bases (pb) indicativos da presença de endornavírus nessas amostras.

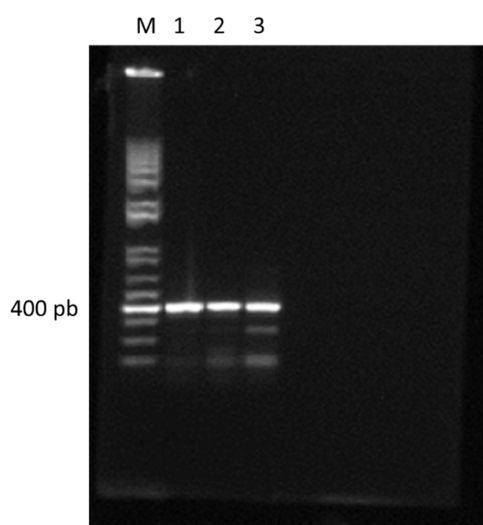


Figura 2. Eletroforese em gel de agarosea 1,2% após RT- PCR utilizando dsRNA extraído de feijoeiro BTS+, M- DNA Ladder 100 pb, 1-3- Produto de 380 pb correspondente ao gene da replicase de endornavírus da linhagem BTS+

Conclusão

- Os protocolos de extração de dsRNA e RT-PCR foram eficientes para detecção de endornavírus na cultivar Black turtle soup de feijoeiro.

Agradecimentos

Ao meu orientador e aos pós-graduandos Jackson, Renato e Danielle pelo auxílio na condução dos experimentos, e ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica.

Referências

Fukuhara T, Koga R, Aoki N, Yuki C, Yamamoto N, Oyama N, Udagawa T, Horiuchi H, Miyazaki S. The wide distribution of endornaviruses, large double-stranded RNA replicons with plasmid-like properties. **Arch Virol** 151, 995–1002, 2006.

Gibbs M. J, Koga R, Moriyama H, Pfeiffer P & Fukuhara T. Phylogenetic analysis of some large double-stranded RNA replicons from plants suggests they evolved from a defective single stranded RNA virus. **J Gen Virol** v.81, p.227–233, 2000.

Khankhum S, Escalante C, Souto E R, Valverde R A. Extraction and electrophoretic analysis of large dsRNAs from desiccated plant tissues infected with plant viruses and biotrophic fungi. **Eur J Plant Pathol.** 147:431–441, 2017.

Okada R, Kiyota E, Sabanadzovic S, Moriyama H, Fukuhara T, Saha P, Roossinck M.J, Severin A, Valverde R.A. Bell pepper endornavirus: molecular and biological properties, and occurrence in the genus *Capsicum*. **J Gen Virol** v.92, p.2664-73, 2011.

Okada R, Yong C K, Valverde R A, Sabanadzovic S, Aoki N, Hotate S, Kiyota E, Moriyama H, Fukuhara T. Molecular characterization of two evolutionarily distinct endornaviruses co-infecting common bean (*Phaseolus vulgaris*). **J Gen Virol**, v. 94, p.220-229, 2013.