

DETECÇÃO DE dsRNA EM CULTURAS AGRONÔMICAS E NA VEGETAÇÃO ESPONTÂNEA

Bianca Stropa Fortes (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Renato Dias Lima (PGA/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, *Endornavirus*, RT-PCR

RESUMO

A maior parte dos vírus causadores de doenças de plantas apresentam genoma composto por RNA de fita simples. Porém, foram identificadas formas replicativas (dsRNA) associadas a vírus não patogênicos, desprovidos de capa proteica, e genoma composto de RNA de fita simples, classificados como *Endornavirus*. 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 e de plantas cultivadas selecionadas, e da vegetação espontânea. Folhas de cada grupo de plantas adultas foram 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. Em 8 plantas foram detectadas bandas com cerca de 15 Kpb, típicas de dsRNA. Em 3 dessas 8 plantas confirmou-se a provável incidência de endornavírus com a amplificação de aproximadamente 400 pb do gene codificador da polimerase viral.

INTRODUÇÃO

Com base no tipo de relacionamento com a planta hospedeira podemos classificar os vírus de plantas em vírus agudos, e em vírus persistentes. Os agudos seriam os vírus causadores de doenças, já os persistentes aparentemente não seriam patogênicos. A presença de dsRNA tem sido associada às formas replicativas dos vírus agudos com genoma de RNA de fita simples (ssRNA), ou à presença de vírus persistentes, como os endornavírus (OKADA *et al.*, 2013). Os endornavírus podem infectar além de plantas, fungos e oomicetos, sendo que a transmissão horizontal dos mesmos ainda não foi evidenciada em plantas (VALVERDE; GUTIERREZ, 2007). DsRNAs genômicos de endornavírus já foram detectados no arroz, pimenta, abacate, feijão comum, cucurbitáceas e cevada (OKADA *et al.*, 2013; SABANADZOVIC *et al.*, 2016) e em plantas da vegetação espontânea (HERSCHLAG *et al.*, 2020). Uma investigação profunda dos efeitos potenciais (benéficos ou maléficos) causados pelo endornavírus às plantas, ainda precisa ser feita. Neste trabalho o objetivo foi testar um protocolo para a detecção de dsRNA, em extratos foliares de soja, milho, trigo, dentre outras, e em plantas da vegetação

espontânea. Em amostras positivas para dsRNA também foram utilizados primers específicos para a amplificação parcial do gene codificador da RNA polimerase de endornavirus, através da RT-PCR.

MATERIAL 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 OKADA *et al.* (2013), sendo utilizadas respectivamente como controle positivo para a presença de dsRNA (BTS+) e ausência (BTS-). Com o estágio vegetativo completo, folhas emitidas dessas plantas 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 desidratados foram 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, havendo dsRNA na amostra, este pode ser visualizado por eletroforese em gel de agarose a 1,2%. Posteriormente, as amostras com evidência da presença de dsRNA, também foram testadas com primers que amplificam parte do gene da replicase de endornavírus, em reações de RT-PCR conforme OKADA *et al.* (2013). Este protocolo também foi utilizado, dentre outras, em amostras foliares de soja, milho, feijão, trigo, cevada, pimenta, e em plantas da vegetação espontânea (Tabela 1).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de dsRNA foi confirmada em amostras de feijão cv. Black turtle soup (BTS+) como esperado, e ainda, em 8 de 30 plantas testadas (Fig.1, Tabela 1).

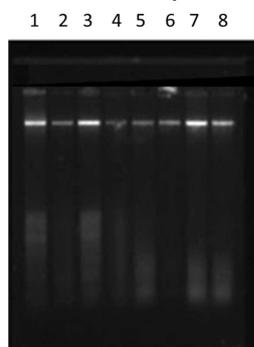


Fig.1 – Bandas de alto peso molecular (15 Kpb) indicando a presença de dsRNA em amostras de: 1- Feijão BTS (+), 2- 'Rio Tibagi', 3- Pimenta murupi, 4- Pimenta

cambuci, 5- Pimenta pitanga, 6- Pimenta bhut jolokia, 7- Feijão BRS ametista, 8- Feijão BRS pontal.

A amplificação por RT-PCR de aproximadamente 400 pb em 3 amostras positivas para dsRNA poderia ser considerada indicação da existência de endornavirus nessas plantas (Fig.2)

Tabela 1- Detecção de dsRNA e amplificação RT-PCR de aproximadamente 400 pb do gene codificador da RNA polimerase de endornavirus em plantas cultivadas e da vegetação espontânea.

| Plantas testadas | dsRNA | RT-PCR |
|----------------------------|-------|--------|
| Soja brasmex exus | - | - |
| Soja M5917 IPRO | - | - |
| Soja 61i63 RSF IPRO | - | - |
| Soja TMG 7262 RR | - | - |
| Soja BASF BS2602 IPRO | - | - |
| Soja 69 1x 66 | - | - |
| Milho FS670 Pwu | - | - |
| Milho FS 403 | - | - |
| Milho AS 1868 pro 4 | - | - |
| Milho ag9035 agroeste | - | - |
| Trigo toruk | - | - |
| Trigo LG oro | - | - |
| Trigo ponteiro | - | - |
| Trigo referência | - | - |
| Cevada irina | - | - |
| Cevada daniela | - | - |
| Pimenta murupi | + | - |
| Pimenta cambuci | + | - |
| Pimenta bhut jolokia | + | - |
| Pimentas pitanga | + | - |
| <i>Elephantopus elatus</i> | - | - |
| <i>Phyllanthus niruri</i> | - | - |
| <i>Portulaca oleracea</i> | - | - |
| Crotalaria | - | - |
| Tremoço branco comum | - | - |
| Ervilhaca | - | - |
| Feijão BRS ametista | + | + |
| Feijão BRS pontal | + | + |
| Feijão 'Rio Tibagi' | + | + |

1 2 3 4

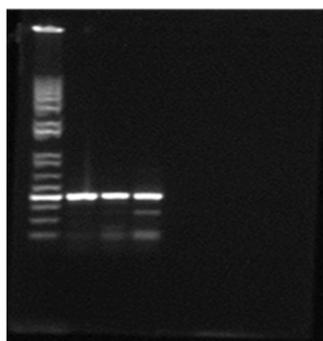


Fig. 2 – Amplificação RT-PCR de aproximadamente 400 pb do gene codificador da RNA polimerase de endornavirus em amostras de: **2-** feijoeiro ‘Rio Tibagi’, **3-** Feijão BRS ametista, e **4-** BRS pontal, **1-** 100 pb DNA ladder (Invitrogen).

Endornavírus não são amplamente disseminados em plantas cultivadas, bem como na vegetação espontânea. Também neste trabalho, não foram detectados dsRNA na soja, milho, trigo e cevada. Em pimenta (*Capsicum* sp) há relatos de endornavirus. Aqui, dsRNA foram detectados em 4 cultivares de pimenta, todavia a confirmação da presença de endornavirus por RT-PCR não foi positiva nessas amostras (Tabela 1).

CONCLUSÕES

- O protocolo utilizado foi eficiente na detecção de dsRNA em 8 de 30 plantas testadas.
- As amplificações por RT-PCR obtidas indicam que os dsRNA detectados em 3 de 8 plantas dsRNA positivas correspondem à parcial amplificação genômica de endornavirus.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica.

REFERÊNCIAS

HERSCHLAG, R.; OKADA, R.; ALCALA-BRISENO, R.I.; SOUTO, E, R.; VALVERDE, R.A. Identification of a novel endornavirus in *Geranium carolinianum* and occurrence within three agroecosystems. **Virus Res.** P.288, 198116, 2020.

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. **European Journal of Plant Pathology**, v.147, p. 431-441, 2017.

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*). **Journal of General Virology**, v. 94, n.1, p.220-229, 2013.

SABANADZOVIC, S.; WINTERMANTEL, W, M.; VALVERDE, R., A.; MCCREIGHT, J, D.; ABOUGHANEM-SABANADZOVIC, N. Cucumis melo endornavirus: Genome organization, host range and co-divergence with host. **Virus Res.** v.2, p.214-49-58, 2016.



VALVERDE, R.; A GUTIERREZ, D, L. Transmission of a dsRNA in bell pepper and evidence that it consists of the genome of an endornavirus. **Virus Genes** 35, p. 399–403, 2007.