

Detecção de Vírus de Macieiras e Pereiras por IC-RT-PCR Usando Anticorpos Policlonais contra Proteínas Virais Expressadas em *Escherichia coli*

Osmar Nickel¹
Thor Vinícius Martins Fajardo²

Introdução

Infecções virais são uma ocorrência comum em macieiras e pereiras e responsáveis por significativas perdas econômicas em termos de produtividade e qualidade comercial dos frutos.

Apple stem pitting virus (ASPV) (gênero *Foveavirus*) e *Apple stem grooving virus* (ASGV) (gênero *Capillovirus*) ambos pertencentes à família *Betaflexiviridae* são especialmente relevantes na certificação de plantas-matrizes e procedimentos de quarentena. Ambos vírus estão associados ao declínio e morte de plantas enxertadas em porta-enxertos sensíveis, geralmente em infecções complexas (NICKEL et al., 1999). ASPV é associado a várias disfunções em pereiras incluindo o “amarelamento das nervuras”, o “empedramento da polpa da pera”, a “mancha anelar ferruginosa do marmeleiro” e a “deformação de frutos do marmeleiro” (PAUNOVIC et al., 1999) e em macieiras a “ruga verde” e a “rachadura-estrela”. O ASGV infecta citros, quivi, macieiras, pereiras e marmeleiros. Ambos vírus podem induzir redução de magnitude variável da produção, da pega da enxertia, do vigor, da circunferência do tronco e das brotações anuais (HADIDI; BARBA, 2011).

Em um contexto de mercados competitivos e intenso movimento de material vegetativo e propagativo de macieiras e pereiras, está se tornando obrigatória a certificação destes materiais. Para atender esta demanda, métodos de detecção de vírus em procedimentos de certificação de plantas devem ser práticos (rápidos e simples), sensíveis (detectar baixas concentrações de vírus) e confiáveis (robustos e reproduzíveis) orientando-se em normas internacionais (JELKMANN, 2004). O diagnóstico de ASGV e ASPV baseia-se em métodos biológicos, sorológicos e moleculares. Os métodos biológicos são caros e trabalhosos, consomem muito tempo, e são suscetíveis a fatores ambientais, afetando a expressão de sintomas. A eficiência dos testes imunoenzimáticos do tipo ELISA é restrita a janelas sazonais e os mesmos têm baixa sensibilidade devido à baixa concentração de vírus em tecidos lenhosos.

Assim, cada vez mais os métodos moleculares ganham a preferência pela sua versatilidade, confiabilidade e a relação custo-benefício. Entretanto, também na RT-PCR podem ocorrer falsos negativos devidos a dificuldades de pareamento dos

¹ Engenheiro-agrônomo, Dr., Pesquisador, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. E-mail: osmar.nickel@embrapa.br.

² Engenheiro-agrônomo, Dr., Pesquisador, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. E-mail: thor.fajardo@embrapa.br.

iniciadores, baixo teor de vírus do tecido analisado e/ou inibidores contidos no extrato vegetal (POREBSKI et al., 1997), ou falsos-positivos decorrentes de reações inespecíficas. A captura de partículas virais por anticorpos específicos (IC, imunocaptura) e o tratamento das amostras durante processamento em IC-RT-PCR contribuem para reduzir o efeito destes fatores inibidores e aumentar a qualidade do molde de RNA e a confiabilidade da PCR em testes com tecidos lenhosos (JELKMANN; KEIM-KONRAD, 1997).

Material e Métodos

Material vegetal

Extratos vegetais foram feitos de casca de ramos jovens e folhas jovens de macieiras e pereiras. Controles sadios: plântulas de cv. Pyrodwarf e cv. Maruba-kaido (*Malus prunifolia* var. *ringo*) ME330

obtidas de cultivo de meristemas e indexadas. Cultivares analisadas estão contidas na Tabela 1.

Clonagem e expressão de proteínas virais, produção de anticorpos

A clonagem e expressão do gene de CP de ASGV no vetor pMAL (New England Laboratories) e a produção de anticorpos foi feita como relatado anteriormente (NICKEL et al., 2004). Usando-se os iniciadores ASPV/*EcoRI*7930f e ASPV9262r, um fragmento de ASPV de 1331 bp foi amplificado do clone pGEM/ASPV1553-1ch11 (Genbank AY572458; RADAELLI et al., 2006), e expressado no vetor de expressão procariótico pRSET (Invitrogen) em *Escherichia coli* BL21(DE3) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A purificação da proteína de fusão foi feita em colunas de agarose-Ni²⁺-ácido nitriloacético (Qiagen) sob condições não desnaturantes. A imunização de coelhos foi iniciada com 1 mg de proteína de fusão

Tabela 1. Detecção de ASGV e ASPV em macieiras e pereiras por IC-RT-PCR e resultados adicionais de RT-PCR convencional e/ou indexagem biológica.

Cultivar/Código de Acesso*	ASGV			ASPV		
	RT-PCR	IC-RT-PCR	Index. biológica	RT-PCR	IC-RT-PCR	Index. biológica
Braeburn M061	-	+	+	+		+
Daiane I M211	+	+	+			
Delicious M176	-	+	-	+	+	+
Fred Hough M284	+	+				
Fuji Kiko M069	-	+		+	+	+
Fuji More M182			-	+	+	+
Fuji Precoce M210			-	+ ^{rf}	+	+
Fuji Select M184	+/- ^{re}	+	-			
Fuji Suprema 9 M186	+	+	+			
Golden Delicious M177	-	+	+			
Maruba ME330	-	-	-	-	-	-
Maxi Gala M163	-	-	+	-	-	-
Mishima M185				+	+	+
MR1789**	+	+	+	+	+	+
Royal Gala M011	+	+	+			
Royal Gala M012	+	+	+			
Royal Gala M015					+	
Royal Gala M175	+	+				
Starkrimson P056				+	+	+
Abate Fetel P015	+	+		+	+	+
Yali P021				+ ^{rf}	+	
William's P07				+	+	
Pyrodwarf P01				-	-	-

*Código de acesso, banco de isolados virais, Embrapa Uva e Vinho; ** Cultivar antiga, desconhecida, Estação Experimental da Epagri, São Joaquim, SC; +, amostra infectada; -, amostra não infectada; ausência de +/- indica amostra não testada; rf, reação muito fraca; re, resultados erráticos.

emulsificada com adjuvante completo de Freund (Sigma), seguida de 5 injeções de reforço com 300, 450, 675, 750 e 860 μg proteína de fusão com adjuvante incompleto de Freund.

IC-RT-PCR

Tubos de polipropileno foram cobertos com 200 μL de IgG purificada (1mg/mL), diluída 1:100 em tampão de cobertura ($\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2(\text{CO}_3)$, pH 9.6), e incubados 4 horas a 37 °C. Alíquotas de 200 μl de extrato bruto (0,5 g/5 mL de tampão de extração (TE) de ELISA, pH 7.4) clarificado por centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos foram adicionadas aos tubos e incubados durante a noite a 4 °C. Para avaliar a sensibilidade do método os extratos de raspas de casca de ramos e folhas jovens, pulverizados em N_2 líquido e macerados com TE, foram diluídos em TE por múltiplos de 10 a partir do extrato bruto. Entre cada passo os tubos foram lavados três vezes por 5 minutos com PBS-Tween 20. Síntese de cDNA e RT-PCR foi feita com o kit comercial OneStep RT-PCR kit (Qiagen). Após transcrição reversa por 30 minutos a 50 °C e inativação da RT a 95 °C por 15 minutos seguiram-se 35 ciclos de amplificação por PCR: desnaturação, 40 segundos a 94 °C; pareamento, 40 segundos a 50 °C; extensão, 1 minuto a 72 °C e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C em termociclador MJ Research PTC-100. Foram utilizados os iniciadores: 1, ASPV3480f (5' AGCGGTTGCCTATTTTTGCTCC 3') (posição 3480-3501) e 2, ASPV3770r (5' GTCAGGTCAAAGATGCTGAAACC 3') (posição 3750-3770) (RADAELLI et al., 2006); iniciadores

3, ASPV9256r (5' ATAGCCGCCCCGGTTAGGTT 3') (posição 9237-9256) e 4, ASPV8993f (5' CTCTTGAACCAGCTGATGGC 3') (posição 8993-9012) (SCHWARZ; JELKMANN, 1998; acesso D21829); 5, ASGV5873f e 6, ASGV6396r (acesso D14995); (NICKEL et al., 1999). Os produtos da IC-RT-PCR foram analisados em géis de agarose 1,2% a 90 V por 90 minutos em presença de brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta.

Resultados e Discussão

Os anticorpos produzidos contra ambas proteínas capsidiais recombinantes (rCP) tiveram um bom desempenho na captura de partículas de ASPV e ASGV em IC-RT-PCR. As reações foram consistentes com extratos brutos clarificados de cascas de ramos e folhas jovens de macieiras, permitindo a amplificação de um fragmento de tamanho esperado de 523 pb das cultivares Braeburn, Delicious e Fuji Kiko, infectadas com ASGV, enquanto as mesmas amostras na ausência de anticorpos apresentaram uma reação falso-negativa (Figura 1). Amostras da macieira Fuji Precoce, claramente infectada com ASPV, apresentaram reação muito próxima de negativos em reações sem o IgG específico; o fragmento de tamanho esperado possuía intensidade praticamente imperceptível, enquanto a imunocaptura com anticorpos contra rCP de ASPV permitiu a visualização de um fragmento de DNA positivo e intenso (Figura 2). Na detecção de ASPV em pereiras cv. Abate Fetel, a imunocaptura promoveu um substancial aumento da intensidade

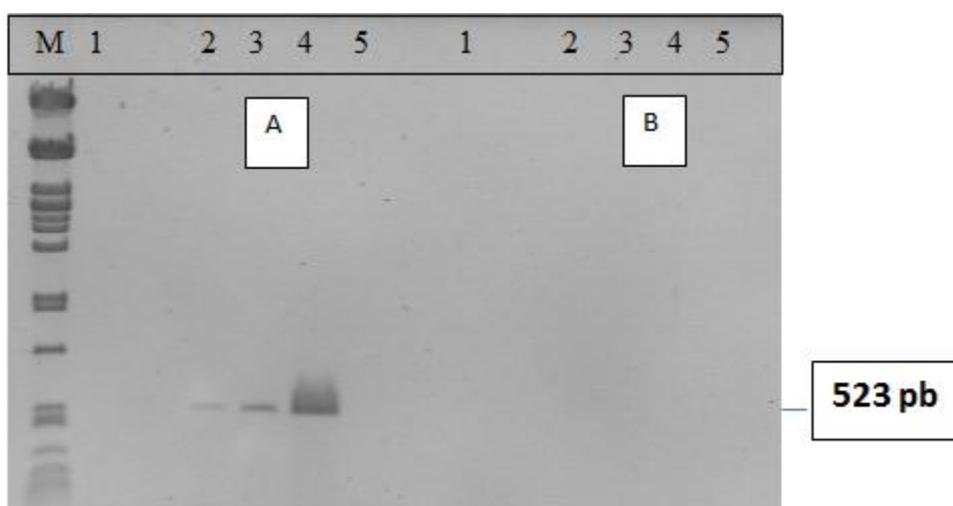


Fig. 1. Análise de produtos de IC-RT-PCR de macieiras em gel de agarose 1,2%. M, marcador molecular DNA λ/PstI ; A, com pré-cobertura de anticorpos J2S (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). 1, Maruba-kaido (controle sadio); 2, 3, 4, cvs. Braeburn, Delicious e Fuji Kiko infectadas com ASGV, e 5, cv. Maxi Gala acesso M163, sem ASGV; B, mesmas amostras sem imunocaptura.

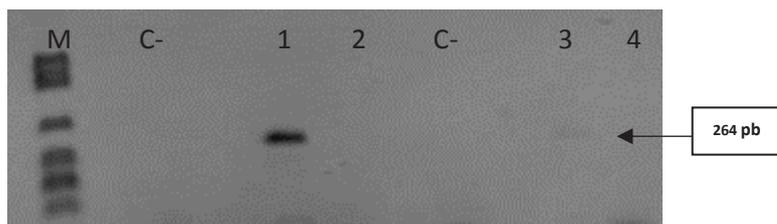


Fig. 2. Análise de produtos de IC-RT-PCR em agarose 1,2%. 1-2, Imunocaptura com anticorpos N5S (10 $\mu\text{g/mL}$). M. DNA λ /*Pst*I; C-, controle sadio; 1, cv. Fuji Precoce infectada com ASPV; 2, cv. Maxi Gala M163 livre de ASPV; 3-4, respectivamente, as mesmas amostras sem imunocaptura (seta indica reação sem IgG).

da reação (Figura 3), comparativamente à mesma amostra sem IgG. NEMCHINOV et al. (1998) e JAMES (1999), entretanto, ao contrário do que se observou neste estudo, relataram que a adsorção direta de nucleoproteínas contidas em extratos brutos às paredes de tubos de polipropileno não pré-cobertos com anticorpos era tão sensível quanto a imunocaptura. Por outro lado, o relato de ROWHANI et al. (1995) dá suporte aos resultados aqui obtidos. Estes autores relataram que os níveis de detecção devidos à “adsorção direta” de partículas virais às paredes dos tubos, i.é, sem imunocaptura prévia, foram geralmente mais baixos que a análise por imunocaptura. Os autores observaram que a interferência dos extratos de certas espécies vegetais pode reduzir a adsorção direta aos tubos mais fortemente que em imunocaptura, e NOLASCO et al. (1993) relataram que a adsorção direta de oito espécies virais resultou em reação negativa. RADAELLI et al. (2004) observaram que leituras de absorbância em ELISA foram positivas somente em casca de radículas enquanto a IC-RT-PCR permitiu a detecção de ASGV em folhas, casca de frutos, casca de ramos e casca de radículas de macieiras cv. Fuji Suprema durante os meses de verão.

Um incremento significativo de sensibilidade por uma IC-RT-PCR aninhada foi relatado (LUNELLO et

al., 2005), embora neste caso a etapa adicional de uma segunda PCR, aninhada, a ser realizada, pode representar perda da vantagem prática operacional oferecida pela IC-RT-PCR em uma etapa única.

A sensibilidade do método envolvendo a imunocaptura com anticorpos específicos foi determinada por diluições seriadas de fator 10 do extrato bruto de casca de ramos e folhas no inverno de 2015, da cv. Fuji Select infectada com ASGV. Para este experimento específico constatou-se 10^{-3} (1:1000) como ponto final de diluição (Figura 4). Em algumas análises (não mostrado) a detecção positiva de ASGV foi além deste limite, embora com um sinal pouco perceptível a 10^{-4} (1:10000). Este nível de sensibilidade é significativo e comparável a outros relatos (WETZEL et al., 1992; NOLASCO et al., 1993), devendo-se considerar que certos vírus, especialmente em plantas herbáceas, atingem alta concentração comparativamente a plantas lenhosas. Resultados divergentes de diferentes estudos podem ser atribuídos a fatores que afetam as reações como o tipo de isolado viral, a época do ano, tipo de tecido e condição fisiológica dos tecidos analisados, os tubos de reação, tampões e as diferentes condições experimentais usadas. Extratos de ácidos nucléicos em tecidos de macieiras e pereiras geralmente contém altos

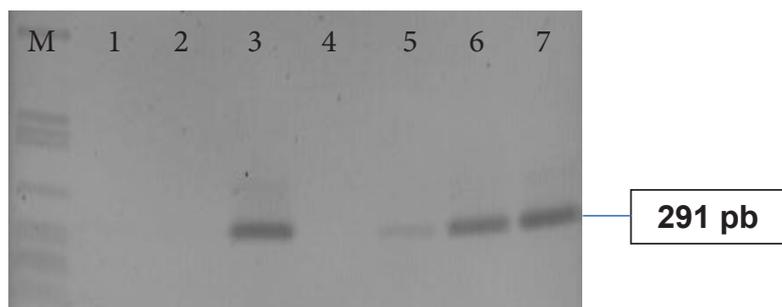


Fig. 3. Análise de produtos de IC-RT-PCR de pereiras em agarose 1,2%. M, marcador, *Pst*I/ λ DNA. 1, água (controle); 2 e 4, cv. Pyrodwarf (controle sadio); 3, 5, 6 e 7, cv. Abate Fetel infectada com ASPV; amostras 3, 6 e 7, com anticorpos N1S (10 $\mu\text{g/mL}$); 5, sem imunocaptura.

teores de inibidores da RT-PCR como glicosídeos, taninos, polifenóis e polissacarídeos (POREBSKY et al., 1997). As etapas de lavagem da IC-RT-PCR favorecem a remoção substancial destas substâncias inibidoras, depois que partículas virais foram imobilizadas pelos anticorpos, reduzindo falsos-negativos resultantes de baixa concentração de RNA viral. O efeito adicional da lavagem pode ser o de compensar uma redução do molde amplificável causado por inibidores. De outra forma estes inibidores poderiam interferir com a atividade enzimática, especialmente durante a transcrição reversa. Assim, a combinação de RT-PCR e IC pode ser vista como uma estratégia para superar dificuldades advindas da inibição e para aumentar a sensibilidade, como ficou demonstrado neste estudo. Adicionalmente a imunocaptura pode ser usada para a amplificação seletiva e isolamento de um vírus de uma infecção viral mista, identificação de isolados virais e estudos filogenéticos (GEMECHU et al., 2006).

Atualmente a produção de anticorpos, ao contrário da purificação convencional muito trabalhosa, tem a vantagem de poder ser feita por clonagem e expressão de proteínas virais quiméricas em sistemas procarióticos (NICKEL et al., 2004; FAJARDO et al., 2007). Um aspecto prático adicional da IC-RT-PCR é que a mesma pode ser feita usando-se um simples extrato de ELISA realizado em poucos minutos. O método prescinde

de tratamento térmico ou adição de detergentes para o rompimento do envelope nuclear das partículas virais imobilizadas nas paredes dos tubos visando sua exposição à transcrição (NOLASCO ET AL., 1993; WETZEL ET AL., 1992; ROWHANI ET AL. 1995).

Os resultados obtidos por IC-RT-PCR com 20 cultivares de macieiras e pereiras infectadas por ASGV e ASPV (Tabela 1), são consistentes com infecções virais já detectadas anteriormente. O acesso M163 da cv. Maxi Gala, usado dentro do desenho experimental de imunocaptura do presente estudo como controle negativo de ASGV e ASPV, destaca-se por apresentar recorrentes reações negativas em RT-PCR e IC-RT-PCR com os iniciadores descritos (reações não mostradas). Entretanto o acesso M163 estaria infectado por ASGV, revelado por indexagem biológica em *Malus micromalus* 273.a, embora não se possa descartar a presença de um outro vírus, responsável pela reação da indicadora.

Conclusão

Os anticorpos policlonais usados em conexão com IC-RT-PCR representam um relevante suporte para aumentar sensibilidade e confiabilidade do diagnóstico de ASGV e ASPV em macieiras e pereiras para certificação de material oriundo de procedimentos de eliminação de vírus.

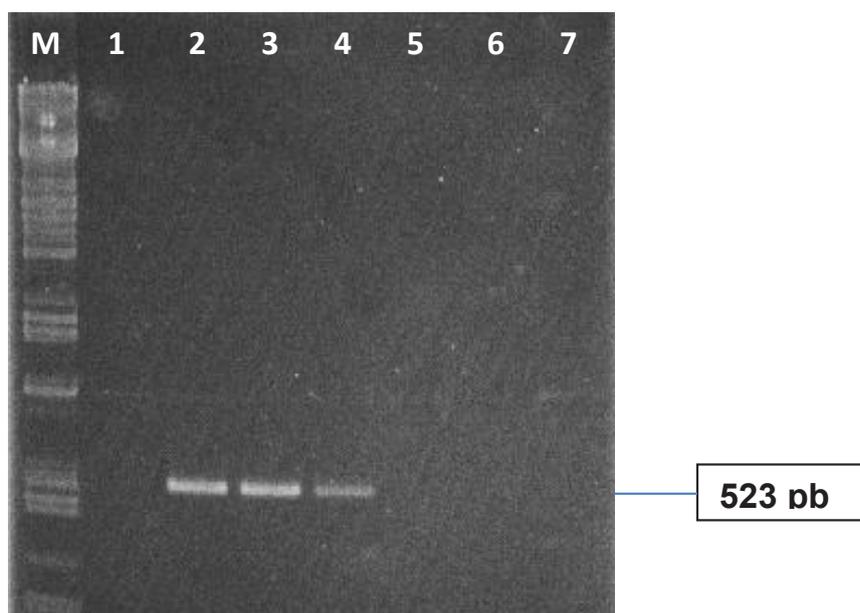


Fig. 4. Análise de produtos de IC-RT-PCR de macieira cv. Fuji Select infectada com ASGV em agarose 1,2%. M: marcador $\lambda/PstI$; 1, Água (controle sem molde); Diluições a partir do extrato bruto, 2, 10^{-1} ; 3, 10^{-2} ; 4, 10^{-3} ; 5, 10^{-4} ; 6, 10^{-5} ; 7, 10^{-6} . Anticorpos J3S ($10 \mu\text{g/mL}$).

Agradecimentos

Os autores agradecem ao técnico Marcos F. Vanni por excelente suporte técnico, ao CNPq e à Embrapa pelo apoio financeiro com bolsas de iniciação científica para Daiana F. Rizzon (Universidade do Vale do Rio dos Sinos), Sheila Montipó, Letícia Bücker, Flavia Z. de Villa e Luiza G. Polesi (Universidade Estadual do Rio Grande do Sul).

Referências

- FAJARDO, T. V. M.; BARROS, D. R.; NICKEL, O.; KUHN, G. B.; ZERBINI, F. M. Expression of *Grapevine leafroll-associated virus 3* coat protein gene in *Escherichia coli* and production of polyclonal antibodies. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 6, p. 496-500, Nov./Dec. 2007. DOI: 10.1590/S0100-41582007000600007
- GEMECHU, A. L.; CHIEMSOMBAT, P.; ATTATHOM, S.; REANWARAKORN, K.; LERSRUTAIYOTIN, R. Cloning and sequence analysis of coat protein gene for characterization of *sugarcane mosaic virus* isolate from sugarcane and maize in Thailand. **Archives of Virology**, v. 151, n. 1, p. 167-172, Jan. 2006.
- HADIDI, A.; BARBA, M. Economic impact of pome and stone fruit viruses and viroids. In: HADIDI, A.; BARBA, M.; CANDRESSE, T.; JELKMANN, W. (ed..) *Virus and Virus-like diseases of pome and stone fruits*, Saint Paul, **American Phytopathological Society**, 2011. Cap. 1, p. 1-7.
- JAMES, D. A simple and reliable protocol for the detection of apple stem grooving virus by RT-PCR in a multiplex PCR assay. **Journal of Virological Methods** v. 83, n. 1-2, p. 1-9, Dec. 1999.
- JELKMANN, W. International Working Group on Fruit Tree Viruses. **Acta Horticulturae**, v. 657, p. 575-596, Aug. 2004. DOI: 10.17660/ActaHortic.2004.657.93.
- JELKMANN, W.; KEIM-KONRAD, R. Immunocapture polymerase chain reaction and plate-trapped ELISA for the detection of *Apple stem pitting virus*. **Journal of Phytopathology**, v. 145, n. 11-12, p. 499-503, Dec. 1997. DOI: 10.1111/j.1439-0434.1997.tb00357.x
- LUNELLO, P.; DUCASSE D.; CONCI, V. Improved PCR detection of potyviruses in *Allium* species. **European Journal of Plant Pathology**, v. 112, n. 4, p. 371-378, 2005. DOI: 10.1007/s10658-005-6232-3.
- NEMCHINOV L., HADIDI, A., FAGGIOLI, F. PCR-Detection of *Apple stem pitting virus* from pome fruit hosts and sequence variability among viral isolates. **Acta Horticulturae**, v. 472, p. 67-73, 1998. DOI: 10.17660/ActaHortic.1998.472.5
- NICKEL O., JELKMANN, W.; KUHN, G. B. Occurrence of *Apple stem grooving capillovirus* in Santa Catarina, Brazil, detected by RT-PCR. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 444-446, 1999.
- NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M.; TRIVILIN, A. P.; MACHADO, M. A.; TARGON, M. L. P. N. Production and use polyclonal antibodies to the coat protein of Apple stem grooving virus expressed in *Escherichia coli*. **Acta Horticulturae**, v. 657, p. 35-40, 2004. DOI: 10.17660/ActaHortic.2004.657.1.
- NOLASCO, G.; DE BLAS, C.; TORRES, V.; PONZ, F. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. **Journal of Virological Methods**, v. 45, n. 2, p. 201-218, Dec. 1993. DOI: 10.1016/0166-0934(93)90104-Y.
- PAUNOVIC S.; MAKSIMOVIC V.; RANKOVIC, M.; RADOVIC, S. Characterization of a virus associated with pear stony pit in cv. Württemberg. **Journal of Phytopathology**, v. 147, n. 11-12, p. 695-700, Nov. 1999. DOI: 10.1046/j.1439-0434.1999.00449.x.
- POREBSKI, S., BAILEY, L. G.; BAUM, B. R. Modification of a CTAB DNA Extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 15, n. 1, p. 8-15, 1997.
- RADAELLI P.; RIZZON, D. F.; NICKEL O.; SCHONS, J.; FAJARDO T. V. M. Detecção de *Apple stem grooving virus* em macieiras por RT-PCR, IC-RT-PCR e ELISA. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, resumo 844, p. S251, 2004.

RADAELLI, P.; NICKEL, O.; SCHONS J.; ARAGÃO, F. J. L.; FAJARDO, T. V. M. Diagnóstico biológico e molecular e análise da seqüência de nucleotídeos do gene da proteína capsial de um isolado do *Apple stem pitting virus*. **Fitopatologia Brasileira**, v.3 1, n. 1, p.51-56, jan./fev. 2006.

ROWHANI, A.; MANINGAS, M. A; LILE, L. S.; DAUBERT, S. D.; GOLINO, D. A. Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. **Phytopathology**, v. 85, n. 3, p. 347-352, 1995.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHWARZ, K.; JELKMANN, W. Detection and characterization of European Apple stem pitting virus sources from apple and pear by PCR and partial sequence analysis. **Acta Horticulturae**, v. 472, p. 75-86, 1998. Doi: 10.17660/ActaHortic.1998.472.6.

WETZEL, T.; CANDRESSE, T.; MACQUAIRE, G.; RAVELONANDRO, M.; DUNEZ, J. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. **Journal of Virological Methods**, v. 39, n. 1-2, p. 27-37, Sep. 1992. Doi: 10.1016/0166-0934(92)90122-T

Comunicado Técnico, 182

Embrapa Uva e Vinho
Rua Livramento, 515 - Caixa Postal 130
95700-000 Bento Gonçalves, RS
Fone: (0xx) 54 3455-8000
Fax: (0xx) 54 3451-2792
<https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/>



1ª edição

Comitê de Publicações

Presidente: César Luis Girardi
Secretária-executiva: Sandra de Souza Sebben
Membros: Adelião Cargnin, Alexandre Hoffmann, Ana Beatriz da Costa Czeremainski, Henrique Pessoa dos Santos, João Caetano Fioravanço, João Henrique Ribeiro Figueredo, Jorge Tonietto, Rochelle Martins Alvorcem e Viviane Maria Zanella Bello Fialho

Expediente

Editoração gráfica: Alessandra Russi
Normalização bibliográfica: Rochelle Martins Alvorcem