



FOL 05250
2000
FL-05250

Revista Brasileira de Genética

ISSN 1516-4349

Número 5

Dezembro, 2000

Detecção de geminivírus com sonda não radioativa

Embrapa

Recursos Genéticos e Biotecnologia

República Federativa do Brasil

Presidente

Fernando Henrique Cardoso

Ministério da Agricultura e do Abastecimento - MA

Ministro

Marcus Vinícius Pratini de Moraes

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Embrapa

Diretor - Presidente

Alberto Duque Portugal

Diretores - Executivos

Elza Angela Battaglia Brito da Cunha

José Roberto Rodrigues Peres

Dante Daniel Giacomelli Scolari

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Chefe Geral

Luiz Antonio Barreto de Castro

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Bonifácio Peixoto Magalhães

Chefe Adjunto de Comunicação Negócios e Apoio

José Manuel Cabral de Sousa Dias

Chefe Adjunto Administrativo

Arthur da Silva Mariante

Detecção de geminivírus com sonda não radioativa

Alice Kazuko Inoue-Nagata

Tatsuya Nagata

Isabel Cristina Bezerra

Flávio M. Santana

Simone da Graça Ribeiro

Antônio Carlos de Ávila

Leonardo de Britto Giordano

FOL 5250 ex. 2

Embrapa

Recursos Genéticos e Biotecnologia

Brasília, DF

2000

Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Circular Técnica N.º 5

Exemplares desta publicação podem ser solicitados a:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cliente

Parque Estação Biológica – PqEB – W/5 norte Final

CEP 70.770-900 - Caixa Postal 02372

PABX: 0 (XX) 61 448-4768

Fax: 0 (XX) 61 448-4700

<http://www.cenargen.embrapa.br>

Comitê de Publicações

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Secretária Executiva: Miraci de Arruda Camara Pontual

Membros: Antonio Emídio Dias Feliciano da Silva

Marcos Rodrigues de Faria

Marta Aguiar Sabo Mendes

Marisa de Góes

Rui Américo Mendes

Suplentes: Sueli Corrêa Marques de Mello

Vera Tavares Campos Carneiro

Tratamento Editorial: Miraci de Arruda Camara Pontual

Normalização Bibliográfica: Maria Iara P. Machado e

Emerlindo Antônio Quilambo

Editoração Eletrônica: Rita de Cássia Sales Santana

Tiragem: 200 exemplares



NAGATA, A.K.I.; NAGATA, T.; BEZERRA, I.C.; SANTANA, F.M.; RIBEIRO, S. da G.; ÁVILA, A.C. de; GIORGIANO, L. de B. **Deteção de geminivírus com sonda não radioativa** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 15p. il. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 5).

ISSN 1516-4349

1. Geminivírus - deteção 2. Geminivírus – esteróide digoxigenina I. Nagata, T. II. Bezerra, I.C. III. Santana, F.M. IV. Ribeiro, S. da G. V. Ávila, A.C. de VI. Giorgiano, L. de B. VII. Título VIII. Série.

CDD 576.6483

© Embrapa – 2000

SUMÁRIO

Resumo.....	05
1. Introdução.....	06
2. Protocolo de deteção de geminivírus com sonda não radioativa.....	07
3. Resultados.....	09
4. Considerações Finais.....	11
5. Referencias Bibliográficas.....	12
6. Anexo.....	14

Detecção de geminivírus com sonda não radioativa

Alice Kazuko Inoue-Nagata¹
Tatsuya Nagata²
Isabel Cristina Bezerra³
Flávio M. Santana⁴
Simone da Graça Ribeiro⁵
Antônio Carlos de Ávila⁶
Leonardo de Britto Giordano⁷

Resumo - A recente expansão de geminivirose em tomateiros nas regiões produtoras do Brasil vem causando grande preocupação. A diagnose e o monitoramento da incidência desta doença é dificultada pela falta de uma metodologia simples para sua detecção. A hibridização de ácidos nucleicos com sondas radioativas é um dos métodos mais utilizados para a diagnose de geminivírus, mas o seu uso é restrito devido à necessidade de infra-estrutura especial, treinamento de pessoal e demanda de radioquímicos com regularidade. Neste trabalho, descreve-se um protocolo de detecção de geminivírus com a utilização de sonda não radioativa, eliminando assim os inconvenientes e custos advindos do uso de produtos radioquímicos.

A técnica permite a detecção de geminivírus utilizando-se o esteróide digoxigenina como marcador. A reação é visualizada por meio de reação sorológica e colorimétrica ou por quimioluminescência. A sensibilidade do teste é alta, obtendo-se detecção de até 0,1fg do DNA homólogo.

¹ Eng.^a Agr.^a, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Hortaliças

³ Bióloga, MSc., Embrapa Recursos Hortaliças

⁴ Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Hortaliças

⁵ Bióloga, MSc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁶ Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Hortaliças

⁷ Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Hortaliças

1. Introdução

O tomateiro é uma das hortaliças de maior importância no Brasil, tanto para consumo *in natura* como para o setor agroindustrial. Anualmente, esta cultura movimenta um montante de aproximadamente U\$ 500 milhões e contribui na geração de empregos diretos e indiretos (Agrianual 99).

No Brasil, a ocorrência de geminivírus em tomateiros foi descrita pela primeira vez em 1975, no estado de São Paulo (Matyis *et al.*, 1975). Entretanto, durante muitos anos a ocorrência de geminivírus em tomateiros foi restrita e sem grande importância econômica. Nos últimos cinco anos, os geminivírus vêm causando danos significativos em tomateiros. Perdas na produção variando de 40 a 100% foram relatados no Distrito Federal, São Paulo, Bahia, Pernambuco e Minas Gerais (Bezerra *et al.*, 1996; 1997; Rezende *et al.*, 1996; Zerbini *et al.*, 1996; Faria *et al.*, 1997; Ribeiro *et al.*, 1998a; 1998b). A emergência desses vírus tem sido associada à introdução e rápida disseminação de uma nova espécie de mosca-branca (inseto vetor), que foi recentemente detectada em associação com tomateiros no Brasil (França *et al.*, 1996). Para que se possa controlar a doença, é necessário conhecer a distribuição do vírus nas distintas regiões produtoras de tomate sendo necessário o desenvolvimento de teste diagnóstico eficiente. Descreve-se aqui um método de detecção de geminivírus em plantas por hibridização de ácidos nucleicos com a utilização de sonda não radioativa.

Geminivírus

Os geminivírus, espécies da família *Geminiviridae*, são pequenos vírus de plantas com cerca de 18 x 30nm, que apresentam partículas de morfologia isométrica geminada (Figura 1) e genoma constituído de DNA de fita simples. Os geminivírus que infectam os tomateiros pertencem ao gênero *Begomovirus*. Os begomovírus são transmitidos por mosca-branca (*Bemisia* sp.) para dicotiledôneas. A maioria dos begomovírus possui genoma bipartido constituído por duas moléculas de DNA de fita simples de aproximadamente 2,6-2,9 Kb, denominadas componente A e B. Essas duas moléculas são responsáveis por diferentes funções durante o processo de infecção. Informações adicionais sobre a estrutura do genoma e função gênica podem ser encontrados na revisão de Lazarowitz (1992). A capa

proteica é codificada pelo componente A e apresenta grande semelhança entre as várias espécies de *Begomovirus*. A semelhança entre eles na região da capa proteica e em outras regiões do genoma permite a utilização de uma sonda preparada com um vírus para detectar outras espécies em técnicas envolvendo hibridização de ácidos nucleicos.

Detecção de geminivírus

A diagnose de doenças causadas por geminivírus inicia-se com a avaliação dos sintomas. Em geral, os sintomas são caracterizados por amarelecimento e deformação das folhas (Figura 1), além de perda da qualidade dos frutos. Entretanto, a expressão dos sintomas é altamente dependente de condições climáticas, do genótipo e das condições fisiológicas do hospedeiro, dificultando a sua avaliação. O uso de testes sorológicos com anticorpos policlonais e monoclonais para detecção do vírus (Abouzid *et al.*, 1998) tem sido restrito devido a problemas ligados a baixa concentração de vírus no tecido da planta.

Em geral, a diagnose de plantas infectadas por geminivírus tem sido feita por técnicas baseadas em hibridização de ácidos nucleicos utilizando sondas radioativas (Gilbertson *et al.*, 1991) e PCR (Rojas *et al.*, 1993). Estes testes são específicos e de alta eficiência, porém exigem uma boa infra-estrutura e treinamento, envolvem problemas associados ao uso e descarte de material radioativo, além de ter um custo bastante elevado.

2. Protocolo de detecção de geminivírus com sonda não radioativa

Produção da sonda marcada com digoxigenina

O DNA utilizado para a preparação da sonda foi amplificado por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para as duas extremidades da capa proteica produzindo fragmentos de DNA de aproximadamente 900 bases. Para a síntese da sonda, a 3 microgramas (3µg) do DNA desnaturado a 100°C por 10 min., foi acrescido hexanucleotídeos, deoxinucleotídeos, deoxinucleotídeo ligado a digoxigenina e a enzima "Klenow fragment" em um volume de 20µl e incubado a 37°C por uma hora segundo a recomendação do fabri-

cante (Roche). A reação foi interrompida com a adição de 2µl de 0,2M EDTA e precipitada com 2,5µl 4M cloreto de lítio e 75µl etanol. A quantificação da sonda foi realizada em teste comparativo com o padrão fornecido pelo fabricante (Roche).

Preparação das amostras a serem testadas

O DNA utilizado para a confecção da sonda (DNA homólogo) foi fervido e imediatamente resfriado antes de ser diluído em 0,4N NaOH, seguido de aplicação em várias concentrações em membrana de náilon (Hybond N+, Amersham-Pharmacia). A membrana foi neutralizada com 0,5M Tris, pH 7,5 por 5 min., seca à temperatura ambiente e armazenada a 4°C.

Tecido de plantas foi triturado em 0,4N NaOH e aplicados nas diluições de 10^{-1} a 10^{-4} em membranas de náilon. A membrana foi então neutralizada com 0,5M Tris, pH 7,5 por 5' e tratada com álcool 95% por 5 min. para a remoção da pigmentação verde das amostras. A membrana foi seca à temperatura ambiente e armazenada a 4°C.

Hibridização

As membranas foram colocadas em cilindro com tampa rosqueável com a face contendo o DNA voltada para o interior do tubo. As membranas foram dispostas uma do lado da outra evitando superposição (em caso de haver superposição, utilizar tela de náilon apropriada para separação das membranas). O tampão de hibridização (5x SSC*, 0,1% N-lauroylsarcosine (p/v), 0,02% SDS ("sodium dodecyl sulphate") (p/v), 1% agente bloqueador ("blocking reagent" - Roche) foi adicionado ao tubo e todas as bolhas de ar retiradas com o uso de bastão de vidro. As membranas foram pré-hibridizadas por no mínimo 1 hora a 68°C para se bloquear a superfície livre da membrana. Um total de 25ng/ml da sonda marcada com digoxigenina foi adicionada ao tampão de hibridização (2,5ml/100cm²) e transferidos para o cilindro substituindo o tampão anterior. As membranas foram hibridizadas durante toda a noite (16-20 h.) a 68°C. Após a hibridização, a sonda foi removida e armazenada a -20°C. As membranas foram então lavadas por duas vezes com 2x SSC, 0,1% SDS por 5 min. a temperatura ambiente seguida de duas lavagens com 0,5x SSC, 0,1% SDS por 15 min. a 68°C.

* 20x SSC: 175,3 g NaCl e 88,2 g citrato de sódio em 1 litro de volu-

me final com o pH ajustado a 7 com NaOH.

Visualização da reação por colorimetria

As membranas foram lavadas por 1 min. em tampão maleico (0,1M ácido maleico, 0,15M NaCl, pH 7,5) e em seguida bloqueadas com 1% de agente bloqueador em tampão maleico por 60 min. As membranas foram incubadas com anticorpo anti-digoxigenina conjugado com fosfatase alcalina (AP-alkaline phosphatase, Roche) na concentração de 75mU/ml em tampão maleico com agente bloqueador por 1 h. e lavadas 3 vezes por 10 min. com tampão maleico com 0,3% tween-20. As reações foram visualizadas com a adição de NBT ("nitro blue tetrazolium") e BCIP ("5-bromo-4-chloro-3 indolyl phosphate") em tampão de detecção (0,1M Tris-HCl, 0,1M NaCl, 50mM MgCl₂, pH 9,5).

Visualização da reação por quimioluminescência

As membranas foram lavadas por 1 min. em tampão fosfato salino acrescido de 0,05% tween-20 e em seguida bloqueadas com 1% de agente bloqueador em tampão fosfato salino por 1h. As membranas foram incubadas com anticorpo anti-digoxigenina conjugado com peroxidase (HRP-horseradish peroxidase, Roche) na concentração 75mU/ml em tampão fosfato salino com agente bloqueador por 1 h., seguido de 3 lavagens de 10 min. com tampão fosfato salino-tween-20. Após as lavagens as membranas foram colocadas sobre uma superfície lisa e cobertas com a solução reveladora (ECL) e incubadas por 1 min. O excesso da solução foi removido e as membranas foram envoltas por filme de PVC e colocadas em contato com filme de raio-X (Kodak X-OMAT) por 5 min. a 4h. O filme de raio-X foi revelado de acordo com as recomendações do fabricante.

3. Resultados

A técnica de hibridização de ácidos nucleicos consiste em utilizar a atração de ácidos nucleicos complementares. A sonda é marcada com um elemento que permite a sua detecção após a hibridização com o ácido nucleico fixado a uma membrana. A sonda pode ser marcada com elementos radioativos que causam a impressão direta do filme de raio-x ou com qualquer outro agente passível de visualização. Neste trabalho, utilizou-se sondas marcadas com digox-

xigenina. Para a síntese da sonda, a enzima polimerase incorporou nucleotídeos ligados à digoxigenina produzindo uma fita de DNA homogeneamente marcada. Como parte do processo de visualização da reação, o anticorpo anti-digoxigenina conjugado com uma enzima (fosfatase alcalina ou peroxidase) foi adicionado e ligado ao híbrido presente na membrana. A enzima fosfatase alcalina permite a visualização da reação por colorimetria com a precipitação do substrato NBT e BCIP. A enzima peroxidase, na presença do substrato quimioluminescente, cataliza uma reação luminescente capturada pelo filme de raio-x. A reação quimioluminescente pode apresentar uma sensibilidade maior se a exposição ao filme for realizada em um longo período de tempo.

Sensibilidade do teste

O DNA homólogo (específico de geminivírus que deu origem à sonda) foi aplicado na membrana em várias concentrações para se verificar a sensibilidade do método de detecção (Figura 2A). De 1ng a 0,1fg de DNA purificado homólogo aplicado nas membranas, a reação foi observada em todas as concentrações. O resultado foi semelhante tanto por colorimetria (Dig-AP) como por quimioluminescência (Dig-HRP1) demonstrando a alta sensibilidade do teste. Uma maior exposição ao filme de raio-X da membrana tratada com o substrato quimioluminescente aumentou a nitidez da reação (Dig-HRP2). O controle negativo utilizado, DNA purificado de lambda, não apresentou qualquer reação com a sonda (Figura 2A) demonstrando a especificidade do teste.

Detecção de geminivírus em suco de planta

Folhas de tomate infectadas com geminivírus foram maceradas em 0,4N NaOH e aplicados em membranas de náilon nas diluições 10^{-1} a 10^{-3} . As membranas foram hibridizadas e a reação positiva foi observada nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} tanto por colorimetria (Dig-AP) como como quimioluminescência (Dig-HRP1, Dig-HRP2) (Figura 2B). O suco de planta sadia foi aplicada de modo semelhante na membrana (Figura 2B). Não foi observada reação da sonda com a planta sadia.

Teste de folhas de tomate coletadas no campo

Para se verificar a possibilidade de utilização deste método em testes de rotina, folhas de plantas de tomateiro foram coletadas no campo para serem testadas. Folhas de plantas com sintomas (1a, 2a, 3a, 4a, 1b e 2b) e sem sintomas (3b, 4b, 1c e 2c) típicos de geminivírus foram avaliadas (Figura 2C). Os resultados por colorimetria (Dig-AP) e quimioluminescência (Dig-HRP1, Dig-HRP2) foram exatamente os mesmos. As plantas com sintomas de geminivírus reagiram positivamente com a sonda específica para geminivírus. Das quatro plantas sem sintomas de geminivírus, uma mostrou reação positiva no teste (1c) indicando que a observação dos sintomas é menos sensível que a hibridização. O controle positivo (3c) mostrou reação similar às demais plantas infectadas e o controle negativo (4c) não reagiu com a sonda, conforme esperado.

4. Considerações finais

O método aqui descrito mostra a viabilidade da detecção de geminivírus em plantas sem a necessidade do uso de produtos radioquímicos. A preparação da amostra a ser hibridizada é simples e dispensa qualquer tipo de equipamento. A preparação da sonda requer equipamentos comuns disponíveis em laboratórios de biologia molecular. Na falta destes equipamentos, as sondas marcadas podem ser adquiridas e estocadas em freezer por um longo período sem qualquer perda na sensibilidade do teste. O único equipamento necessário é o forno de hibridização com controle da temperatura. Esta metodologia viabiliza a detecção de geminivírus em um grande número de amostras de modo eficiente e sensível sem a necessidade de grande investimento em infra-estrutura e pessoal.

5. Referências Bibliográficas

ABOUZID, A.M.; PURCIFULL, D.E.; POLSTON, J.E.; BECKHAM, K.A.; CRAWFORD, W.E.; PETERSEN, M.A.; HIEBERT, E. Serological studies using polyclonal antiserum prepared against the cabbage leaf curl geminivirus coat protein expressed in *Escherichia coli*. in: **Workshop Bemisia Geminiviral Dis.**, 2., 1998, USDA-ARS, U.S. [Resumos...] Orlando: Horticultural Research Laboratory.

AGRIANUAL 99. **Anuário Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP/Argos, 1998. 521p.

BEZERRA, I.C.; RIBEIRO, S.G.; DE ÁVILA, A.C.; GIORDANO, L.B. Survey of geminivirus infection in tomato producing areas in Federal District. VIII **Encontro Nacional de Virologia**, 8. São Lourenço-MG, **Abstract...** [S.L.:s.n.], v.16, p. 289.

BEZERRA, I.C.; LIMA, M.F.; RIBEIRO, S.G.; GIORDANO, L.B.; DE ÁVILA, A.C.; Occurrence of geminivirus in tomato producing areas in Submedio São Francisco. **Fitopatologia Brasileira** 22 (Suplemento):331. (Resumo). 1997.

CHRISTIE, R.G.; KO, N.-J.; FALK, B.W.; HIEBERT, E.; LASTRA, R.; BIRD, J.; KIM, K.S. Light microscopy of geminivirus-induced nuclear inclusion bodies. **Phytopathology**, v.76, p.124-126, 1986.

FARIA, J.C.; SOUZA-DIAS, J.A.C.; SLACK, S.; MAXWELL, D.P. A new geminivirus associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil. **Plant Disease**, v.81, p.423, 1997.

FRANÇA, F.H.; VILLAS-BOAS, G.L.; CASTELO-BRANCO, M. Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera:Aleyrodidae) no Distrito Federal. **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil**, v.25, p.369-372, 1996.

GILBERTSON, R.L.; HIDAYAT, S.H.; MARTINEZ, R.T.; LEONG, S.A.; FARIA, J.C.; MORALES, F.J.; MAXWELL, D.P. Differen-

tiation of bean-infecting geminiviruses by nucleic acid hybridization probes and aspects of bean golden mosaic in Brazil. **Plant Disease**, v.75, p.336-342, 1992.

LAZAROWITZ, S.G. 1992. Geminiviruses: genome structure and gene function. **Critical Reviews in Plant Science**, v.11, p.327-349, 1992.

MATYIS, J.C.; SILVA, D.M.; OLIVEIRA, A.R.; COSTA, A.S. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v.1, p.267-275, 1975.

REZENDE, E.A.; FILGUEIRA, F.A.R.; ZERBINI, F.M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; FERNANDES, J.J.; GILBERTSON, R.L. Tomato infected with geminivirus in greenhouse conditions at Uberlândia-MG, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.424, 1996. (Resumo).

RIBEIRO, S.G.; DE ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; FERNANDES, J.J.; FARIA, J.C.; LIMA, M.F.; GILBERTSON, R.L.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; ZERBINI, F.M. Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. **Plant Disease**, v.82, p.830, 1998a.

RIBEIRO, S.G.; BEZERRA, I.C.; RESENDE, R.O.; LIMA, M.F.; RESENDE, L.V.; DE ÁVILA, A.C. New tomato geminiviruses in mixed infections in Brazil. 2nd **International Workshop on Bemisia and Geminiviruses**, San Juan, Porto Rico, Abstract P-63.

ROJAS, M.R.; GILBERTSON, R.L.; RUSSEL, D.R.; MAXWELL, D.P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, v.77, p.340-347, 1993.

ZERBINI, F.M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; FERNANDES, J.J.; GILBERTSON, R.L.; CARRIJO, I.V. Um novo geminivirus isolado de tomateiro (*L. esculentum*) em Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.430, 1996.

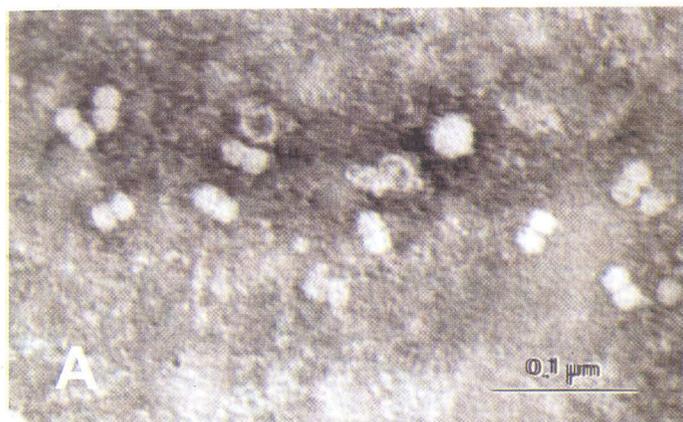


Fig. 1.

A) Micrografia eletrônica de partícula purificada de geminivírus (Cortesia do professor Elliot W. Kitajima, ESALQ).

B) Tomate com sintoma de amarelecimento e deformação foliar, típicos de geminivírus.

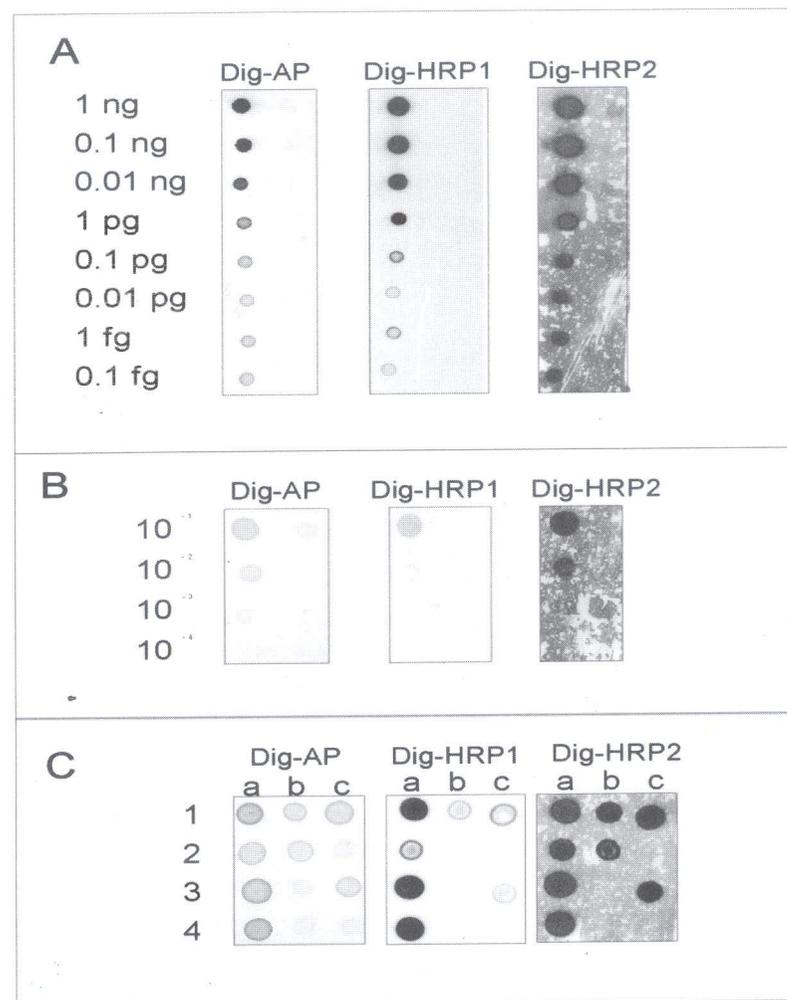


Fig. 2. Hibridização com sonda marcada com digoxigenina. A: Teste com DNA homólogo para se determinar a sensibilidade e especificidade do teste. O DNA foi diluído para 1ng a 0,1fg; B: Teste com diluições de suco de planta infectada e sadia. O DNA foi diluído de 10^{-1} a 10^{-4} ; C: Teste realizado em amostras coletadas no campo. Folhas coletadas de plantas com sintomas típicos de geminivírus (1a, 2a, 3a, 4a, 1b e 2b) ou sem sintomas de geminivírus (3b, 4b, 1c e 2c) foram testadas. Planta infectada (3c) e sadia (4d) foram utilizadas como controles. A detecção foi feita por colorimetria (Dig-AP) ou por quimioluminescência com curta (Dig-HRP1) ou longa (Dig-HRP2) exposição ao filme de raio-x).



Recursos Genéticos e Biotecnologia

Detecção de geminivírus ...

2000

FL-05250



CENARGEN- 18742-1

**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA
E DO ABASTECIMENTO**

**GOVERNO
FEDERAL**
Trabalhando em todo o Brasil