

Detecção de um begomovírus em amostras foliares de tomateiro com sondas não-radioativas

Detection of a begomovirus in tomato leaf samples using non-radioactive probes

Flávio Martins Santana^I Alice Kazuko Inoue-Nagata^{II} Tatsuya Nagata^{III}
Simone da Graça Ribeiro^{IV} Antônio Carlos de Ávila^V
Leonardo de Britto Giordano^{VI}

- NOTA -

RESUMO

O aumento na ocorrência de begomovirose (geminivirose) em tomateiros, *Lycopersicon esculentum* Mill., em várias regiões brasileiras, vem causando grandes prejuízos para o agronegócio de tomate, devido à ocorrência do inseto vetor, *Bemisia argentifolii* (*Bemisia tabaci* biotipo B). A diagnose é realizada em geral por "polymerase chain reaction" (PCR) ou por hibridização com sondas radioativas. A PCR é um método de alta sensibilidade, porém apresenta a desvantagem da possibilidade de obtenção de resultados falso-positivos, devido a contaminações, ou falso-negativos causados por inibidores contaminantes da reação, ou pela extrema especificidade dos iniciadores. A hibridização de ácidos nucléicos com sondas radioativas tem o seu uso limitado devido à necessidade de infra-estrutura especial, treinamento de pessoal, riscos para a saúde do manipulador e demanda constante de radioquímicos. O presente trabalho tem por finalidade demonstrar a viabilidade do uso do método de hibridização com sondas não-radioativas para a detecção de um begomovírus de tomateiro do Brasil. A sensibilidade do teste foi alta, obtendo-se detecção de até 0,1fg do DNA homólogo e em extrato bruto foliar diluído até 100 vezes.

Palavras-chave: *Lycopersicon esculentum*, geminivírus, diagnose, digoxigenina.

ABSTRACT

Major outbreaks of tomato begomoviruses (geminiviruses) in several tomato *Lycopersicon esculentum*

Mill growing in many parts of Brazil have been imposing significant losses upon the tomato agribusiness, due to the introduction of the *Bemisia argentifolii* (*Bemisia tabaci* biotype B). Polymerase chain reaction (PCR) and hybridization are generally used for diagnosis. The PCR is a detection method with high sensitivity, however it has the disadvantage of producing false-positives, due to contamination, or false-negatives caused by inhibitors or because of the high primer specificity. The use of nucleic acid hybridization with radio-labelled probes is restricted due to the requirement of special infrastructure and handling experience, the risk for the user's health and a regular radiochemical element supply. This study is aimed at demonstrating the usefulness of the hybridization method with non-radioactive probes for detection of a tomato begomoviruses in Brazil. The sensitivity of this method was high enabling the detection of 0.1fg of homologous DNA and in crude sap extract diluted up to 100-fold.

Key words: *Lycopersicon esculentum*, geminivirus, diagnosis, digoxigenin.

O tomateiro, *Lycopersicon esculentum* Mill., é uma das hortaliças de maior importância no Brasil, tanto para consumo *in natura* como para o setor agroindustrial. Um dos principais problemas na cadeia de produção de tomate reside na alta incidência de vírus da família Geminiviridae, gênero Begomovirus, constituídos de DNA de fita simples e circular. A

^IPrograma de Pós-graduação em Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas (UFPEl), Embrapa Clima Temperado, CP. 403, 96001-970, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: fsantana@cpact.embrapa.br. Autor para correspondência.

^{II}Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, Brasil.

^{III}Curso de Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, DF, Brasil.

^{IV}Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil.

^VLaboratório de Virologia da Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, Brasil.

^{VI}Laboratório de Melhoramento Vegetal da Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, Brasil.

ocorrência da doença tem sido generalizada desde o Nordeste ao Sudeste brasileiro, além de demais países sul-americanos, onde perdas de 40% até 100% da produção têm sido relatadas. Os sintomas da doença são amarelecimento de nervuras, rugosidade, diminuição do tamanho das folhas, clorose internerval e mosaico dourado (TAVARES 2002; RIBEIRO et al., 2003). A transmissão desse vírus se dá pela mosca-branca, *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (SANTOS et al., 2004). A diagnose é, em geral, realizada pela avaliação dos sintomas e por meio de testes de detecção por “polymerase chain reaction” (PCR) e por hibridização com sonda radioativa (SANTANA et al., 2001; NAGATA et al., 2004). Os métodos de hibridização com sonda não-radioativa já vêm sendo utilizados para detecção de begomovírus fora do Brasil (SÁNCHEZ-CAMPOS et al., 1999). Este trabalho teve como objetivo avaliar o uso do método de detecção por hibridização com sonda marcada com digoxigenina aplicado a um isolado de begomovírus em tomateiro no Brasil.

A sonda não-radioativa foi preparada com o clone contendo o gene completo da capa protéica (pCP) do isolado DF-BR2 de tomate, presente no Distrito Federal, uma possível variante do begomovírus *Tomato rugose mosaic virus* - TRMV (INOUE-NAGATA et al., 1999). A síntese da sonda foi feita utilizando-se o DIG-High prime labeling kit (Roche) seguindo-se as recomendações do fabricante, usando 3µg do DNA amplificado do clone pCP por PCR com os oligonucleotídeos CP1 e CP2 (fragmento de 0,9kb), contendo todo o gene da capa protéica (NAGATA et al., 2004).

A hibridização foi realizada em membranas de náilon (Hybond N+, Amersham Biosciences) com a aplicação de plasmídeos ou de extratos de plantas diluídos em 0,4N NaOH. Após a aplicação, a membrana foi neutralizada com Tris 0,5 M pH 7,5 por cinco minutos, secada a temperatura ambiente e armazenada a 4°C. Um total de 25ng.ml⁻¹ da sonda marcada com digoxigenina foi utilizada para a hibridização conforme a recomendação do fabricante. A hibridização foi realizada a 68°C, usando-se o tampão de hibridização padrão (5x SSC, N-lauroylsarcosine 0,1%, SDS 0,02%, reagente bloqueador 1% (Roche)) e as lavagens foram realizadas a 68°C, duas vezes com 2x SSC, SDS 0,1% por cinco minutos e duas vezes com 0.5x SSC, SDS 0,1% por 15 minutos.

As membranas foram então bloqueadas por uma hora a temperatura ambiente ou por toda a noite a 10°C em tampão maléico (ácido maléico 100mM, NaCl 150mM pH 7,5) com reagente bloqueador a 1% (reagente bloqueador - Roche). À solução bloqueadora, foi acrescentado anticorpo antidigoxigenina conjugado

com fosfatase alcalina (AP-alkaline phosphatase, 150mU.ml⁻¹) e incubado por uma hora a temperatura ambiente ou por toda a noite a 10°C. Três lavagens foram realizadas com tampão maléico acrescido de 0,3% de tween-20 por 15 minutos e a revelação foi feita com a adição de NBT (nitro blue tetrazolium) e BCIP (5-bromo-4-chloro-3 indolyl phosphate) em tampão de revelação (Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,1M, MgCl₂ 50mM, pH 9,5).

Um processo alternativo de revelação por quimioluminescência foi avaliado. O bloqueamento foi feito por uma hora a temperatura ambiente ou por toda a noite a 10°C em tampão fosfato salino (PBS) com reagente bloqueador a 1%. À solução bloqueadora, foi acrescentado anticorpo antidigoxigenina conjugado com peroxidase (HRP-horseradish peroxidase, 75mU.ml⁻¹), sendo incubado por uma hora a temperatura ambiente ou por toda a noite a 10°C. Três lavagens foram realizadas com PBS – Tween-20 (0,05%) por 15 minutos. A revelação foi feita com a adição de substrato quimioluminescente (ECL detection kit, Amersham), conforme as recomendações do fabricante. O excesso da solução contendo substrato foi removido e as membranas foram expostas ao filme de raios-X (Kodak X-OMAT) por cinco minutos (curta exposição) ou por toda a noite (longa exposição).

Para se verificar a possibilidade de utilização deste método em testes de rotina, foram avaliadas folhas de tomateiro coletadas no campo. Foram avaliados, por colorimetria e quimioluminescência, folhas com sintomas e sem sintomas de begomovírus.

O DNA homólogo ao do TRMV, DF-BR2 foi aplicado na membrana em várias concentrações para se avaliar a sensibilidade do método de detecção (Figura 1A). 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 exposição mais longa da membrana ao filme de raios-X permitiu uma maior nitidez da reação (Dig-HRP2). O controle negativo utilizado, DNA purificado de bacteriófago lambda, não apresentou qualquer reação com a sonda (Figura 1A), demonstrando a especificidade do teste.

Extratos de folhas de tomate infectadas com o isolado DF-BR2 ou plantas sadias foram aplicados em membranas de náilon nas diluições 10⁻¹ a 10⁻⁴. As membranas foram hibridizadas e a reação positiva foi observada nas diluições 10⁻¹ e 10⁻², tanto por colorimetria (Dig-AP), como por quimioluminescência (Dig-HRP) (Figura 1B). Não foi observada reação da sonda com o extrato de planta sadia, o que mostra que,

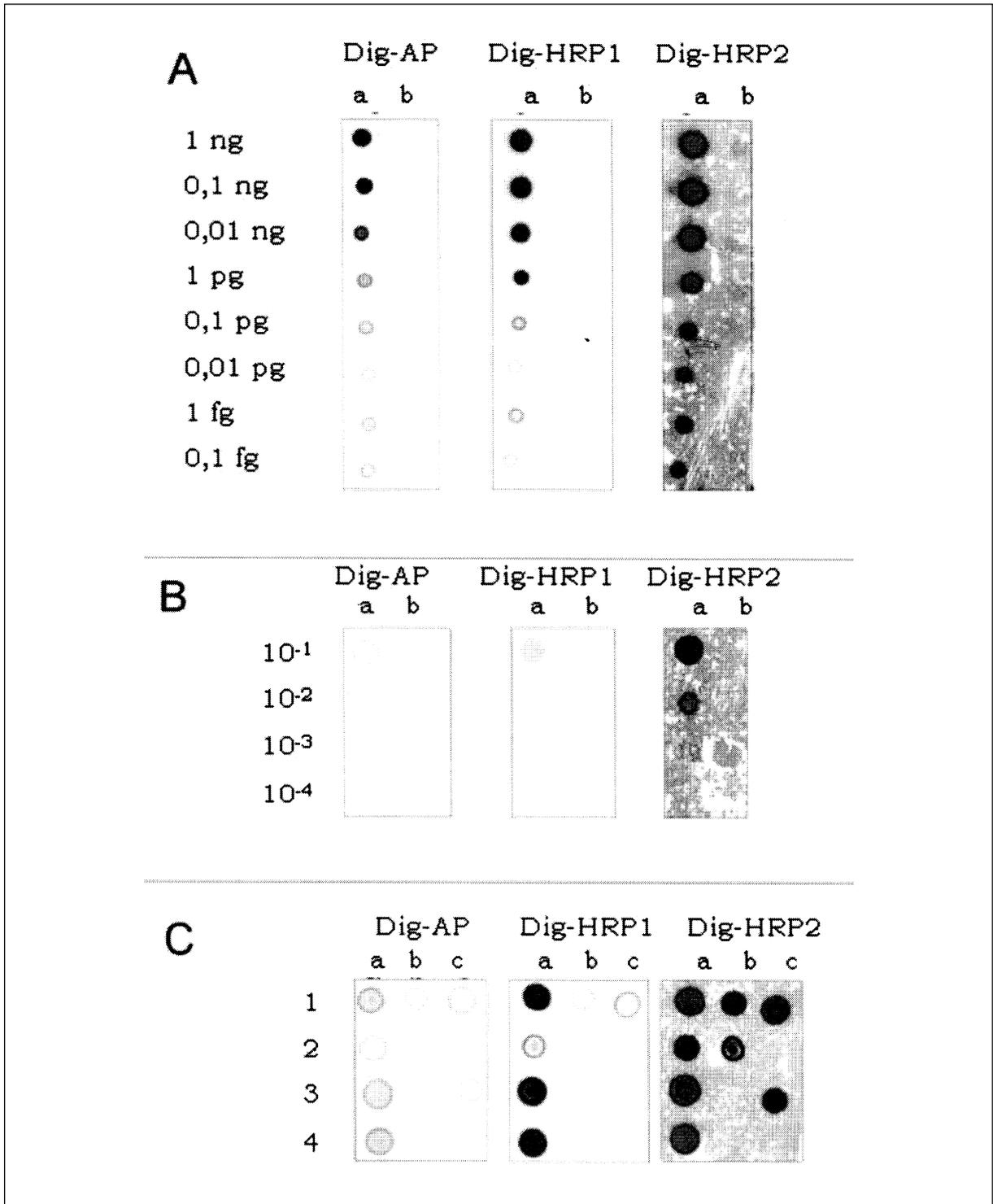


Figura 1 - Hibridização com sonda marcada com digoxigenina. A: Teste com DNA homólogo para se determinar a sensibilidade e especificidade do teste. Aplicadas diluições de 1 ng a 0,1fg do DNA homólogo (+) nas colunas "a" e DNA de bacteriófago lambda (-) nas colunas "b"; B: Teste com diluições de 10⁻¹ a 10⁻⁴ do extrato de plantas infectadas (+) nas colunas "a" e sadias (-) nas colunas "b"; C: Teste com amostras coletadas no campo. Folhas com sintomas típicos de geminivírus (1a, 2a, 3a, 4a, 1b e 2b) ou sem sintomas (3b, 4b, 1c e 2c) foram avaliadas. Planta infectada (3c) e sadia (4c) utilizadas como controles. Detecção por colorimetria (Dig-AP), quimioluminescência curta (Dig-HRP1) ou longa (Dig-HRP2) exposição ao filme de raios-X.

por este método, pode-se detectar plantas infectadas em diluições de dez a 100 vezes.

Das folhas provenientes do campo (Figura 1C), com sintomas (1a, 2a, 3a, 4a, 1b e 2b) ou sem sintomas (3b, 4b, 1c e 2c), os resultados por colorimetria (Dig-AP) e quimioluminescência (Dig-HRP1, Dig-HRP2) foram os mesmos. As plantas com sintomas de begomovírus reagiram positivamente com a sonda específica. Das quatro plantas sem sintomas, uma mostrou reação positiva no teste (1c), indicando que o método pode identificar plantas infectadas, mesmo que essas não apresentem sintomas aparentes. O controle positivo (3c) mostrou reação similar às demais plantas infectadas e o controle negativo (4c) não reagiu com a sonda, conforme esperado.

A hibridização com sondas radioativas é um método altamente específico e de amplo uso em detecção, porém esbarra na necessidade de uma infraestrutura adequada, de treinamento de pessoal e no aumento de riscos para a saúde dos usuários. Como alternativa à hibridização por sondas radioativas, surgiram os reagentes para a confecção de sonda não-radioativa, com o uso de digoxigenina, biotina etc.

O método avaliado neste trabalho utilizou sondas marcadas com digoxigenina, que mostraram eficiência e praticidade. A sensibilidade foi bastante alta, chegando à escala de fentogramas, quando hibridizado com DNA homólogo. A grande vantagem deste método é a longevidade da sonda, que pode ser usada por várias vezes e por pelo menos um ano, sem a perda da atividade, segundo informações do fabricante. O método vem sendo empregado rotineiramente na Embrapa Hortaliças para detecção de DF-BR2, com uma modificação em relação ao método descrito: o protocolo de detecção utilizado para anticorpo conjugado com fosfatase alcalina está sendo realizado com o tampão PBS-T. Esta modificação foi feita devido à baixa longevidade do tampão maléico, que apresenta crescimento microbiano com muita facilidade, mesmo após autoclavagem.

O método de hibridação com sonda não-radioativa viabiliza a detecção de um begomovírus em tomateiro, em um grande número de amostras, de modo eficiente e sensível. Comparando-se os níveis de detecção pela sonda com o DNA purificado e com extrato da planta infectada, poder-se-ia inferir que, com este método, é possível diagnosticar plantas infectadas com DF-BR2 até a escala de fentogramas, o que, para este trabalho, correspondeu a uma diluição do extrato da planta infectada em até 100 vezes. Para confirmação desses valores, poder-se-ia realizar a quantificação do vírus na planta por PCR em tempo real.

REFERÊNCIAS

- INOUE-NAGATA, A.K. et al. Expression of the coat protein of tomato infecting geminivirus in *Escherichia coli* for serological studies. **Virus Reviews & Research**, v.4, p.151-199, 1999. (Resumo).
- NAGATA, T. et al. Print-capture PCR for detection of tomato geminiviruses from plants and whiteflies. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.91-93, 2004.
- RIBEIRO, S.G. et al. Distribution and genetic diversity of tomato-Infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, v.148, p.281-295, 2003.
- SÁNCHEZ-CAMPOS, S., et al. Displacement of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)-Sr by TYLCV-Is in tomato epidemics in Spain. **Phytopathology**, v.89, p.1038-1043, 1999.
- SANTANA, F.M. et al. Sources of resistance in *Lycopersicon spp. to* a bipartite whitefly-transmitted geminivirus from Brazil. **Euphytica**, v.122, p.45-51, 2001.
- SANTOS, C.D.G. et al. Espécies vegetais hospedeiras de begomovírus isolados de tomateiro em Goiás e no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.450-455, 2004.
- TAVARES, C.A.M. Perspectivas econômicas da tomaticultura frente aos problemas causados pelo geminivírus. **Biológico**, v.64, p.157-158, 2002.