

CARACTERIZAÇÃO DA NOVA VARIANTE DO VÍRUS Y DA BATATA (POTATO VIRUS Y – PVY), CAUSADORA DE ENCRESPAMENTO SEVERO (PVYN-CURL) NA CV. MONALISA-REGIÃO DE CASA BRANCA-SP .

EDUARDO N. A. **MENDONÇA**¹; HAIKO E. **SAWAZAKI**²; JOSÉ A. C. **SOUZA-DIAS**³

No 0700008

RESUMO

Foram analisados através de RT-PCR e sequenciamento os isolados de potyvirus em plantas de batata, manifestando sintomas de um novo potyvirus denominado PVYN^N-curl (DQ530509), coletadas na região do estado de São Paulo e também de testes biológicos realizados na instituição. Foram confirmadas as evidências de que é seletiva e específica a mutação observada em um sítio específico da região da capa protéica, na posição do nucleotídeo 1868 de um isolado considerado padrão de PVY^N (N605-X97895). A mutação de uma adenina substituindo uma guanina foi observada apenas no genoma do PVY^N-curl, em relação a todos os PVY^N, PVY^{NTN}, PVY^{N:O} e PVY-W do GenBank, com exceção de onze isolados provenientes da China, os quais mostraram as maiores porcentagens de similaridade (98 a 97%) com o novo isolado de PVY^N causador de encrespamento na folha de batata. A tentativa de estabelecer um primer específico baseado no sítio de mutação mostrou que o PCR ficou não repetitivo, muito dependente de pouco tempo e temperatura para anelamento, indicando que a melhor estratégia seria a metodologia “single nucleotide polymorphism” (SNP). A extração de RNA total pela técnica “Leaf Soak” adaptada deu resultado positivo em 90% das reações de RT-PCR.

ABSTRACT

Potyvirus isolates from potato plants showing symptoms of a new potyvirus named PVY^N-curl (DQ530509), were collected at the region of São Paulo state and also from biological tests performed at the institution and analysed by RT-PCR and sequencing. The evidences that is selective and specific the observed mutation in the region of the coat protein gene, at nucleotide 1868 position from the isolate considered a PVY^N pattern (N-605-X97895), consisting in a guanine substitution by adenine were confirmed for the PVY^N-curl genome in relation to all PVY^N, PVY^{NTN}, PVY^{N:O} e PVY-W from GenBank, except eleven chinese isolates, which showed the biggest similarity percentage (98 a 97%) to the new PVY^N isolate causing curling leave symptoms. The attemptative of stablishing a specific primer based in the mutation site showed a not repetitive PCR, too much dependent of small time and temperature for annealing, indicating

1. Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, PUC-Campinas, Campinas-SP, * e-mail

2. Orientador: Pesquisador, APTA-IAC, Campinas-SP.

3. Colaborador: Pesquisador, APTA-IAC, Campinas-SP.

that the best strategy would be the “single nucleotide polymorphism” (SNP) methodology. The total RNA extraction by a modified “Leaf Soak” technique gave 90% positive results in the RT-PCR analysis.

INTRODUÇÃO

O cultivo comercial da batata (*Solanum tuberosum* L.) no Brasil cobre cerca de 170 mil ha, com produção anual em torno de 2,5 milhões de toneladas, em até três cultivos/ano. Na última década o vírus que mais vem causando prejuízos nesta cultura é o *Potato vírus Y* – PVY (Potyviridae, Potyvirus), conhecido como vírus do mosaico. Além da estirpe de PVY^O que causa mais danos em relação à estirpe PVY^N, uma variante dessas estirpes que deprecia os tubérculos (PVY^{NTN}) foi recentemente introduzida no Brasil, aumentando os problemas fitossanitários. Consistente com a rápida evolução da formação de variantes do PVY, ocorreram indícios da incidência de um novo tipo de PVY^N causando sintomas diferentes, como o encrespamento da folha e danos nos tubérculo de batata, na região de Casa Branca no estado de São Paulo. Face à rápida evolução destes variantes de potyvirus, a rápida identificação é crucial para facilitar e possibilitar o controle sanitário das mesmas. Estudo molecular preliminar realizado por este laboratório com amostra de planta sintomática identificou, por análise de BLAST de uma seqüência deste PVY^N causador do encrespamento em batata, a substituição de uma base de Adenina no lugar de Guanina, em relação a todos os PVY^N, PVY^{NTN}, PVY^{N:O}, PVY^{N-W} e PVY^O do Genbank, com exceção de onze isolados originados da China, os quais mostraram as maiores porcentagens de similaridade (98 a 97%) com o novo isolado, denominado PVY^{N-curl}. O objetivo deste trabalho foi confirmar as evidências que sustentam ser seletiva e específica a alteração observada em um sítio específico, com uma adenina no lugar de uma guanina, para o PVY^{N-curl}, através da caracterização por RT-PCR e sequenciamento de isolados sintomáticos coletados na região do Estado de São Paulo. Esta evidência possibilita a utilização da metodologia “single nucleotide polymorphism” (SNP) que não requer sequenciamento, o que facilita o diagnóstico a nível molecular da nova virose, auxiliando assim as medidas fitossanitárias de controle, bem como possível erradicação desta variante (PVY^{N-curl}).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados amostras de campos de batata de duas regiões de bataticultura que apresentaram plantas com sintomas de encrespamento das folhas: Itapetininga 07-08/2006 e Vargem Grande do Sul em 06/2007, além de folhas de batata de um teste realizado na Seção

de Virologia/IAC para avaliação “in loco” da taxa de difusão do PVY^N-curl. Três canteiros foram estudados pelo crescimento e sintomas de infecção através de análises de ELISA e RT-PCR de plantas gerados por tubérculos de batata da cultivar “Monalisa”. Em cada canteiro foram plantados os tubérculos de 20 plantas dispostos como: sadia à esquerda, infectada no centro e sadia a direita. Foram também amostradas plantas de *Datura metel* infectadas através de enxertia de plantas de batata sintomáticas colhidas no campo. Inicialmente cada amostra foi submetida a imunodiagnose (ELISA) de acordo com Souza-Dias et al. (1999). A extração do RNA total foi realizada pelo método TRI (Sigma). Foi testado também um método alternativo de extração denominado ‘Leaf soak’ (Roberts et al, 2000) que segundo os autores permite a utilização direta do extrato sem purificação do RNA. O cDNA foi feito de acordo com o Gene Amp PCR Core ki (Applied Biosystem). O PCR com os primers N/F e N/R de acordo com Boonham et al. (2002). A reação de PCR foi feita utilizando-se para cada 5 µL da reação de cDNA, 1mM de MgCl₂, 1X tampão, 1,0 unidades de AmpliTaq DNA polymerase, 0,075µM de cada primer (N/F e R/F de Boonham et al, 2002) em um volume de 15 µL. Utilizou-se o termociclador 9600 da Perkin Elmer com desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de 40 segundos a 94° C, 1 minuto a 58° C e 1 minuto a 72° C e uma etapa final de 5 minutos a 72° C. A reação foi checada por eletroforese em gel agarose 1% onde os fragmentos foram visualizados pela fluorescência do brometo de etídio, intercalado nas moléculas de DNA, por UV, através do IMAGE MASTER. O sequenciamento foi feito de acordo com o kit Big Dye Terminator da ABI PRISM. Após análise de BLAST os nucleotídeos foram alinhadas pelo BioEdit para construção do dendrograma pelo ClustalX e Njplot. Foi realizado o Western Blotting das amostras Para certificação do tipo de potyvirus foi também realizado o Western Blotting com antisoro específico para o PVY^{NTN}.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram testadas cerca de 70 amostras de plantas sintomáticas coletadas nas regiões de Itapetininga, Vargem Grande do Sul e dos testes realizados na Virologia/IAC. As amostras com resultado positivo para o teste ELISA foram analisadas por RT-PCR com os primers N/F e N/R de Boonham (2002). Utilizou-se como controle negativo amostra não infectada. Verifica-se pela Figura 1 que as amostras infectadas com PVY^{NTN} amplificaram (com primers N/F e O/R) uma banda ligeiramente maior (605pb) enquanto as sintomáticas, fragmentos com 549pb, específicos do PVY^N e a amostra infectada com PVY^O deu resultado negativo.

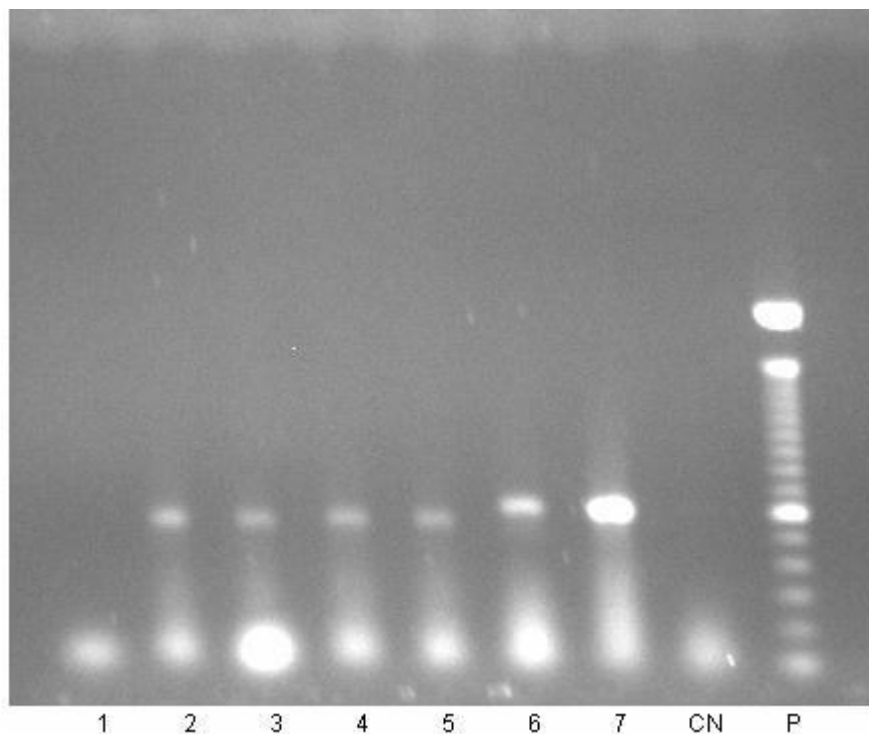


Figura 1. Perfil RT-PCR de 9 plantas de batata infectadas com PVYNcurl usando os primers N/F e R/F de Boonham et al (2002) usando o RNA total extraído pelo método de extração “Leaf Soak”. CN= controle negativo; P= padrão 100pb.

A extração de RNA total pela técnica “Leaf Soak” obteve sucesso em 90% das amostras dentre aproximadamente 12 destas, obtidas em 3 extrações. O procedimento foi adaptado em relação ao original, como macerar a folha amostrada e não diluir o extrato 10 vezes como indicado. A tentativa de estabelecer um primer específico para o PVY^N-curl baseado no sítio de mutação mostrou que o PCR ficou não repetitivo, muito dependente de pouco tempo e temperatura para anelamento, indicando que a melhor estratégia seria a metodologia “single nucleotide polymorphism” (SNP). A tentativa de estabelecer um primer específico baseado no sítio de mutação mostrou que o PCR ficou não repetitivo, muito dependente de pouco tempo e temperatura para anelamento, indicando que a melhor estratégia seria a metodologia “single nucleotide polymorphism” (SNP). análises de proteína fosse confirmada a suspeita da presença do vírus PVY N e não NTN. O Western Blotting não deu resultado positivo para o PVY^N-curl, confirmando que o novo potyvirus não é um PVY^{NTN}. As análises de BLAST confirmaram as evidências de que é seletiva e específica a mutação observada em um sítio específico da região da capa protéica, na posição do nucleotídeo 1868 de um isolado considerado padrão de PVY^N (N605-X97895). A mutação de uma adenina substituindo uma guanina foi observada apenas no

genoma do PVY^N-curl, em relação a todos os PVY^N, PVY^{NTN}, PVY^{N:O} e PVY-W do GenBank, com exceção de onze isolados provenientes da China (AY841267, AY841258, AY742716, AY742731, AY742729, AY742727, AY742718, AY742715, AY742720, AY742719, AY742732), os quais mostraram as maiores porcentagens de similaridade (98 a 97%) com o novo isolado de PVY^N causador de encrespamento na folha de batata. O dendrograma construído com os nucleotídeos das seqüências dos fragmentos amplificados e outros isolados do Genebank (Fig. 2) confirma que o isolado PVY^N-Curl tem maior similaridade com os isolados chineses em relação aos isolados de PVY^N e PVY^{NTN}.

Os resultados observados através de seqüenciamento e Western Blotting confirmaram que o novo potyvirus é um PVY^N. Confirmou-se a mutação da guanina pela adenina no nucleotídeo localizado no final da capa protéica. A técnica para extração de RNA total denominada “Leaf Soak” foi bastante vantajosa devido ao menor custo e tempo necessário para execução.

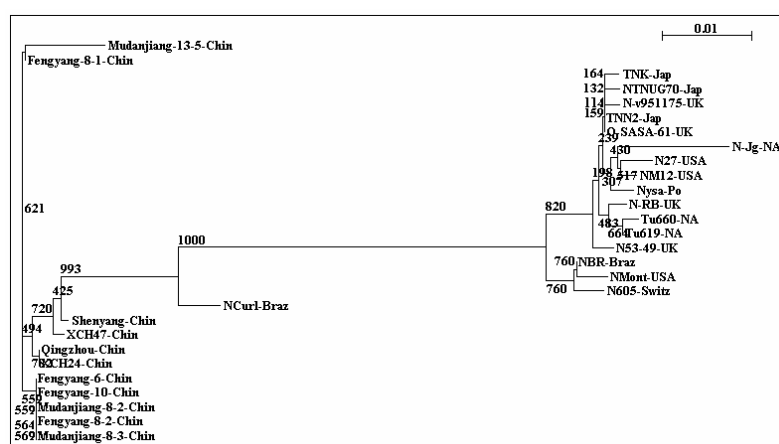


Figura 2. Dendrograma obtido com a seqüência de nucleotídeos do fragmento do PVY^Ncurl obtido com os primers N/F e N/R de Boonham et al (2002) e 18 acessos do GenBank: Ncurl Bras(DQ530509); XCH47-Chin (AY841267); Shenyang-Chin (AY742715); N605-Switz (X97895); N-Mont-USA (AY884983); O-SASA-61-UK (AJ585198); TU619-NA (AJ390309); NBR-Bras (AF255660); N53-49-UK (PVI390299); TNN2-Jap (AB025415); Tu 660-NA (AY166866); N-v951175-UK (PVI390304); Nysa-Pol (Z70237); NTNUG70-Jap (AB042813); TNK-Jap (AB025417); N-RB-UK (PVI390285); NM12-USA (PVU09508); N27-USA (PVU91747); N-Jg-NA (AY166867).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrianual.. Mercado & Perspectivas – Batata. FNP Consultoria e Comércio, <http://www.fnp.com.br>. Batata. Editora Argos Comunicação. São Paulo. p.172-180, 2004.

- Boonham, N.; Walsh, K.; Preston, S.; North, J.; Smith, P. & Barker, I. The detection of tuber necrotic isolates of Potato virus Y, and the accurate discrimination of PVY(O) PVYN and PVYC strains using RT-PCR, J. Virol. Methods v.102, n.1–2, p. 103–112. 2002.
- Roberts C.A., Dietzgen R.G., Heelan L.A., MacLean D.J. Real-time RT-PCR fluorescent detection of tomato spotted wilt virus. Journal of Virological Methods, v.88, n.1, p. 1-8, 2000.
- Sawazaki, H.E, JAC Souza-dias, DG Módolo. Sequência de nucleotídeos da capa protéica de isolado brasileiro do Potato virus YNTN. In: XXXVI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2003, Uberlândia. XXXVI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, manejo Integrado de doenças de plantas.2003.
- Souza-Dias, JAC and JF Tristão. Rise of PVY Incidence in Seed-PotatoRegions of São Paulo State (Brazil) Associated With the Introduction of 'Atlantic' Potatoes. American Potato Journal v.74,,p.469.1997.