



DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE PRIMERS DEGENERADOS PARA A DETECÇÃO DE CILEVÍRUS

Ana Carolina Lindo Ferreira de **Castro**¹; Nicolly de Sousa Silva **Laurindo**²; Laura Pereira **Rossetto**²; Gianluca Lima Michea-**Gonzalez**²; Ricardo **Harakava**³; Pedro Luis **Ramos-González**⁴; **Juliana Freitas-Astúa**⁵

Nº 24801

RESUMO - No Brasil, os membros da família Kitaviridae, particularmente os vírus do gênero Cilevirus, destacam-se por causar doenças em culturas de grande importância econômica. Os membros deste gênero possuem genomas divididos em duas moléculas de RNA de fita simples e sentido positivo. Eles são divididos em três subgrupos (SG) em função da sua organização genômica, mas apenas dois destes SG possuem representantes relatados no Brasil. O SG 1 compreende os três membros considerados mais importantes por infectar plantas cultivadas, como citros e maracujazeiro. Já os vírus do SG2 em geral afetam plantas ornamentais de menor relevância econômica. A detecção desses patógenos é realizada predominantemente por meio de ensaios de RT-PCR utilizando iniciadores específicos para cada espécie viral, tornando-se um método dispendioso e laborioso. O objetivo deste trabalho foi desenhar dois pares de iniciadores degenerados capazes de detectar 1) a maior quantidade de espécies do gênero Cilevirus e 2) os três membros do SG 1 e avaliar a sua eficiência através de ensaios de RT-PCR. O domínio RdRp2 do gene RdRp foi selecionado como alvo por ser a região mais conservada entre os membros das diferentes espécies. O alinhamento das sequências foi realizada pelo algoritmo MAFFT no programa Geneious Prime e o desenho dos iniciadores foi realizado manualmente identificando-se as regiões mais conservadas dos extremos 5' e 3'. As condições da PCR foram otimizadas por meio de ajustes de temperatura de anelamento e concentração dos iniciadores. Os resultados demonstraram que o par de iniciadores desenvolvido para os cilevírus foi capaz de amplificar membros de quatro das seis espécies testadas. O par de iniciadores degenerados para os vírus do SG 1 eficientemente detectou todas as três espécies desse grupo.

Palavras-chaves: Cilevirus, Iniciadores degenerados, RT-PCR

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduada em Ciências Biológicas, Universidade Anhembi Morumbi, São Paulo-SP, anacarolinacastro012@gmail.com

2 Colaboradores: Alunos de Pós-Graduação, Instituto Biológico, São Paulo-SP

3 Colaborador: Pesquisador, Instituto Biológico, São Paulo-SP

4 Coorientador: Pós-doutor, Instituto Biológico, plrg1970@gmail.com

5 Orientador: Pesquisadora, Instituto Biológico e Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA; juliana.astua@embrapa.br



ABSTRACT - In Brazil, members of the Kitaviridae family, particularly viruses of the Cilevirus genus, are known for causing diseases in crops of great economic importance. The Cilevirus genus is genomically divided into Subgroup 1, which includes members that infect plants of greater economic importance, and Subgroup 2, which includes viruses that affect ornamental plants. The detection of these pathogens is predominantly performed by means of RT-PCR assays using primers specific for each viral species, making it a very expensive and laborious method. The objective of this work was to design and evaluate degenerate primers capable of detecting the largest number of species of members of the Cilevirus genus and for members of Subgroup 1 and to evaluate their efficiency through RT-PCR assays. The RdRp2 domain of the RdRp gene was selected as the target because it is the most conserved region among members of the different species. Sequence alignment was performed using the MAFFT algorithm in the Geneious Prime program, and primer design was performed manually, identifying the most conserved regions at the 5' and 3' ends. PCR conditions were optimized by adjusting the annealing temperature and primer concentration. The test results demonstrated that the primer pair developed for members of the Cilevirus genus was able to amplify four of the six species tested. The degenerate primer pair for Subgroup 1 viruses detected all three species of this group.

Keywords: Cilevirus, degenerate primers, RT-PCR