

**DIFICULDADES E LIMITAÇÕES EM TESTE SOROLÓGICO E  
MOLECULAR UTILIZADOS PARA DIAGNOSE VIRAL EM *Solanum  
lycopersicon***

**ALUNO: ELIAS LUIZ NEVES**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. RICARDO DIOGENES DIAS SILVEIRA**

**URUTAI, GO 2022**

**ELIAS LUIZ NEVES**

**DIFICULDADES E LIMITAÇÕES EM TESTE SOROLÓGICO E MOLECULAR UTILIZADOS PARA DIAGNOSE VIRAL EM *Solanum lycopersicon***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso em Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí como parte dos requisitos para conclusão do curso de graduação, sob orientação do Prof. Dr. Ricardo Diógenes Dias Silveira

**URUTAI, GO 2022**

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP  
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano**

NEL42d Neves, Elias Luiz  
Dificuldades e Limitações em testes Sorológico e  
Molecular utilizados para diagnose viral em solanum  
lycopersicum / Elias Luiz Neves; orientador Ricardo  
Diognes Dias Silveira. -- Urutaí, 2022.  
25 p.

TCC (Graduação em Licenciatura em Ciências  
Biológicas) -- Instituto Federal Goiano, Campus  
Urutaí, 2022.

1. Diagnose viral. 2. Solanum lycopersicon. 3.  
Limitações. I. Dias Silveira, Ricardo Diognes ,  
orient. II. Título.

Responsável: Johnathan Pereira Alves Diniz - Bibliotecário-Documentalista CRB-1 nº2376



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO**

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação Técnico-Científica

Tese

Dissertação

Monografia – Especialização

Artigo - Especialização

TCC - Graduação

Artigo Científico

Capítulo de Livro

Livro

Trabalho Apresentado em Evento

Produção técnica. Qual: \_\_\_\_\_

Nome Completo do Autor: Elias Luiz Neves

Matrícula: 2018101220530015

Título do Trabalho: DIFICULDADES E LIMITAÇÕES EM TESTE SOROLÓGICO E MOLECULAR UTILIZADOS PARA DIAGNOSE VIRAL EM *Solanum lycopersicon*

**Restrições de Acesso ao Documento [Preenchimento obrigatório]**

Documento confidencial:  Não  Sim, justifique: \_\_\_\_\_

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 25/10/2022

O documento está sujeito a registro de patente? [ ] Sim [ x ] Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? [ ] Sim [ x ] Não

## DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

1. O documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
2. Obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
3. Cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Urutaí, 25 de outubro de 2022

Elias Luiz Neves

Assinado eletronicamente pelo o Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:

Ricardo Diógenes Dias Silveira

Assinatura eletrônica do(a) orientador(a)

Documento assinado eletronicamente por:

- Elias Luiz Neves 2018101220530015 Discente em 25/10/2022 09:58:28.
- Ricardo Diogenes Dias Silveira PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO em 25/10/2022 09:30:37.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 25/10/2022. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador 437253

Código de Autenticação 4535566



INSTITUTO FEDERAL GOIANO

Reitoria Rua 88, 310, Setor Sul, GOIANIA / GO, CEP 74.085-010

None



### ATA DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHO DE CURSO

Às 14 horas do dia vinte e sete de setembro de 2022, reuniu-se:

( ) Presencialmente na sala nº \_\_\_\_ do Prédio \_\_\_\_\_ do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Urutai

( x ) Por vídeo conferência

a Banca Examinadora do Trabalho de Curso intitulado "DIFICULDADES E LIMITAÇÕES EM TESTE SOROLÓGICO E MOLECULAR UTILIZADOS PARA DIAGNOSE VIRAL EM *Solanum lycopersicon*" composta pelos professores

1 Ricardo Diógenes Dias Silveira

2 Marco Antônio Moreira de Freitas

3 Rafaela Souza Alves Fonseca

4 (suplente, quando necessário) Cleberly Evangelista dos Santos

para a sessão de defesa pública do citado trabalho, requisito parcial para a obtenção do Grau de **Licenciado em Ciências Biológicas**. O Presidente da Banca Examinadora, Prof. Ricardo Diógenes Dias Silveira, passou a palavra ao licenciando(a) **Elias Luiz Neves** para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos membros da Banca Examinadora e respectiva defesa da licencianda. Logo após, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença do(a) licenciado(a) e do público, para expedição do resultado final. A Banca Examinadora considerou que o(a) discente foi ( **X** ) **APROVADO** / ( ) **NÃO APROVADO** por unanimidade, tendo sido atribuído a nota (8,73) ao seu trabalho. O resultado foi então comunicado publicamente ao(a) licenciando(a) pelo Presidente da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Banca Examinadora deu por encerrada a defesa.

Assinatura dos membros da Banca Examinadora	Notas
1. Rafaela Souza Alves Fonseca	8,6

2. Marco Antônio Moreira de Freitas	8,6
3. Ricardo Diógenes Dias Silveira	9,0
Média final:	8,73

Urutai-GO, 27 de setembro de 2022

Documento assinado eletronicamente por:

- Rafaela Souza Alves Fonseca, 202110433040080 - Discente, em 25/10/2022 15:03:36.
- Marco Antonio Moreira de Freitas, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 28/09/2022 08:23:45.
- Ricardo Diogenes Dias Silveira, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 27/09/2022 14:56:34.

Este documento foi emitido pelo SIAP em 27/09/2022. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suaap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 429360

Código de Autenticação: 325a068d6c



## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, por ser meu refúgio, fortaleza e socorro bem presente;

Aos meus familiares, amigos e colegas de turma por estarem sempre presentes nessa minha trajetória, durante os quatro anos de experiência e busca por conhecimento;

Ao meu grande amigo Marcos Filipe pela parceria de sempre, e que mesmo distante tem me dado total apoio e conselhos;

Ao IF Goiano Campus Urutaí pela oportunidade de treinamento e possibilidade de realização do curso;

Ao meu antigo Orientador Prof. Dr. Ivandilson Pessoa pela oportunidade de orientação em alguns projetos de Iniciação Científica no antigo Laboratório de Genética Molecular do IF Goiano Urutaí

A Doutoranda em Melhoramento de Plantas Leticia de Maria, pelos ensinamentos e toda ajuda durante o início da minha graduação e iniciações científicas;

Ao meu Orientador do IF Goiano Professor Dr. Ricardo Diógenes pela orientação e grande apoio;

A todo corpo docente e aos servidores do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí, que de forma direta ou indireta auxiliaram e participaram da minha formação acadêmica durante todos esses anos. Em especial aqueles ligados ao curso de Licenciatura em Ciências Biológicas;

Ao meu Orientador da Embrapa Hortaliças Dr. Erich Yukio, pelos ensinamentos, e apoio durante o decorrer do trabalho;

A Pesquisadora do Laboratório de Virologia da Embrapa Hortaliças, Dra. Alice Nagata, pela oportunidade de treinamento e realização da pesquisa.

A equipe do Laboratório Virologia e Biologia Molecular da Embrapa Hortaliças, respectivamente: Paula Rodrigues, Doriam Yeast, Ivair Jr, Tadeu Araujo, Yanka, Milena, Barbara, Jonas e João por toda ajuda e colaboração;

Por fim, agradeço a Embrapa Hortaliças onde essa pesquisa foi realizada.

Com Fé e Perseverança, tudo se alcança.  
(Autor desconhecido)

## Lista de ilustrações

**Figura 1.**A Plantação de tomate em área de produtor rural em Taquara DF. B Plantas de tomate com sintomas típicos de fitovioses

.....11

**Figura 2.** Resultado do DOT-ELISA utilizando os anticorpos PVY e PEPMV para detecção de *Potyvirus*

.....17

**Figura 3.** Resultado da aplicação no DOT-ELISA utilizando os anticorpos TSWV, GRSV e TSWV para detecção de *Orthospovirus*

.....17

**Figura 4.** Resultado da PCR utilizando primers para detecção de *Potyvirus* e *Orthospovirus*

.....18

**Figura 5.** Resultado obtido na PCR Cloroplasto

.....19

**Figura 6.** Gel da PCR para detecção de *Potyvirus* e *Orthospovirus*

.....19

**Figura 7.** Resultado do Dot-ELISA para detecção de TSWV

.....20

**Figura 8.** Gel da RT PCR para detecção de TSWV

.....20

**Figura 9.** Resultado da purificação do produto de PCR da amostra positiva para TSWV

.....21

## Sumário

1. Introdução.....	8,9,10
2. Materiais e Métodos.....	11
2.1. Coleta de material vegetal.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b> 11
2.2. Teste sorológico Dot-ELISA.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b> 12
2.3. Teste molecular-Extração de RNA-RT e RT PCR.....	13
2.4 Dot-ELISA para detecção TSWV.....	14
2.5 RT PCR para detecção de TSWV.....	15
2.6 Purificação.....	15,16
3. Resultados.....	17,18,19,20,21
4. Discussão.....	22
5. Conclusão.....	23
6. Referências.....	24

## **DIFICULDADES E LIMITAÇÕES EM TESTE SOROLÓGICO E MOLECULAR UTILIZADOS PARA DIAGNOSE VIRAL EM *Solanum lycopersicon***

### **Resumo**

A cultura do tomateiro destaca-se como uma das solanáceas de maior produtividade tanto no Brasil quanto no mundo. Sua importância está relacionada tanto a questões nutricionais, quanto socioeconômicas. Entretanto, vários problemas podem ocasionar perdas severas na produtividade de tal cultura, destacando-se a suscetibilidade por infecções virais, geralmente transmitidas por insetos vetores. Nosso objetivo foi realizar diagnose de gêneros de vírus fitopatogênicos em amostras de tomate sintomáticas presentes em uma área produtora de tomate no Núcleo Rural Taquara, Planaltina DF, utilizando o teste sorológico (Dot-ELISA) e Molecular (RT PCR). Assim também, relatar acerca das dificuldades e limitações encontradas no decorrer da pesquisa

Amostras foliares de tomate sintomáticas para fitovirose foram coletadas em área de produtor rural no Núcleo rural Taquara DF. No total, Trinta e seis amostras foram levadas para o Laboratório de Virologia vegetal a fim de realizar os testes de diagnose viral. O primeiro teste realizado foi o teste sorológico Dot-ELISA, na qual foram utilizados anticorpos específicos PVY e PEPMV para detecção de *Potyvirus* e GRSV TCSV, TSWV para detecção de *Orthospovirus*. Das Trinta e seis amostras, apenas sete reagiram para os anticorpos utilizados na detecção de *Potyvirus*, Já em relação aos anticorpos utilizados para detecção de *Orthospovirus* apenas quatro amostras reagiram, sendo assim positivas. O RNA viral de todas as amostras que tinham dado positivas no teste sorológico foi extraído pelo método TRizol® a fim de realizar a detecção molecular. Em seguida, realizou-se uma Transcrição Reversa a fim de produzir DNA complementar, seguida de uma RT-PCR utilizando primers específicos, para detectar *Potyvirus* e *Orthospovirus*. O resultado do teste molecular não foi o esperado, pois observamos a ausência de bandas nos géis, e não amplificação do produto de PCR. Assim foi necessário realizar um novo teste, com outras amostras, para fins de comparação. Com isso, nosso trabalho evidencia, ambos os testes de detecção possuem algumas limitações, sendo necessário cuidados essenciais para que possamos obter os resultados eficazes.

**Palavras chave:** Diagnose viral; *Solanum lycopersicon*; Limitações

## 1. Introdução

O tomate (*Solanum lycopersicum*) é uma das solanáceas de maior importância tanto no Brasil quanto no mundo. Sua importância se dá tanto por questões nutricionais, pois é fonte de várias vitaminas, tais como vitaminas A e C (ALVARENGA e COELHO, 2013), além de ser rico em compostos antioxidantes naturais (ILAHY et al., 2011). Essa solanácea está constantemente presente na mesa dos consumidores, seja na forma in natura nas saladas e também na forma processada como em concentrados e molhos de tomate (VILELA et al., 2012).

Outra grande importância da tomaticultura se deve a sua relevância socioeconômica, pois sua alta produtividade apresenta grande potencial de rentabilidade ao produtor, assim como seu cultivo contribui para a geração de empregos no setor de produção (IBGE, 2009).

Alguns fatores podem contribuir na perda de produtividade da cultura do tomateiro, sendo os mais comuns a infecção por fitopatógenos, microrganismos, como fungos, bactérias, vírus e nematoides, com potencial de causar doenças em plantas. Outros fatores destacam-se à falta de nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento e crescimento, bem como devido a presença de plantas daninhas nas áreas de cultivos.

Na cultura do Tomateiro, um dos principais fitopatógenos que tem causado problemas drásticos, prejudicando seu potencial produtivo, é devido infecção de fitovíroses. Normalmente, os vírus de plantas são disseminados na natureza por diferentes organismos vetores, sendo os insetos o grupo mais importante. Dentre os insetos, os vetores em geral são sugadores como pulgões, cigarrinhas, membracídeos, cochonilhas, tripes e moscas-brancas (KITAJIMA & REZENDE, 2004).

EIRAS\_(2004) afirma que entre os principais os gêneros de vírus que acomete a cultura do tomateiro, destacam-se o gênero *Begomovirus* transmitidos por mosca branca *Orthospovirus* transmitidos por tripes e *Potyvirus* transmitidos por pulgões. De acordo com JOYCE e TAKEMATSU\_(2010) as moscas brancas são insetos sugadores, que geralmente na forma larval e jovem são encontrados na fase abaxial das folhas, sendo transmissores de *Begomovirus*. Já os tripes são insetos muito pequenos que possuem a capacidade de sugar a seiva de folhas e flores, causando estrias e deformações, transmitindo assim vírus do gênero *Orthospovirus*, provocando a doença do vira cabeça do

tomateiro. Em relação aos pulgões, são insetos sugadores de tamanho reduzido, que podem transmitir vírus de plantas doentes para sadias, normalmente são transmissões de vírus do gênero *Potyvirus*. Assim, PETERSEN et al., (2019) relata que o conhecimento de como o vetor atua é essencial para obter estratégias de controle eficazes, de modo a controlar sua infestação, e redução de possíveis perdas na produtividade devido a transmissão das fitoviroses.

Os sintomas decorrentes da infecção viral nas plantas tendem a ser variados. A manifestação destes, podem ser como mosaico, clorose; necrose; deformação foliar, além de nanismo e presença anéis cloróticos nos frutos (NAGATA, et al., 2005).

Dentro da área da Fitopatologia, técnicas moleculares e imunológicas são utilizadas nas diagnoses das diversas doenças de plantas. Segundo Rezende et al. (2011), o diagnóstico se refere na identificação de uma doença e do seu agente causal, com base nos sintomas e sinais. Assim, a diagnose correta pode auxiliar produtores e profissionais a evitar erros prejudiciais a cultura, levando a recomendação adequada de medidas de controle, principalmente no uso de agrotóxicos (EMBRAPA, 2008).

No tomateiro é possível diagnosticar as doenças de vírus com caráter fitopatogênicos inicialmente por anamnese, através da análise de sintomas, e do histórico dessas plantas, assim também utilizando testes sorológicos (Dot-ELISA) e testes moleculares (RT PCR). No teste Dot-ELISA, anticorpos específicos produzidos para um determinado grupo de vírus são empregados na sua detecção. Nesta reação, as partículas virais presentes no extrato preparado pela maceração de tecido vegetal infectado em tampão são utilizadas como antígeno (LIMA e FAJARDO, 2012).

O resultado deste teste é determinado por uma reação enzimática de enzimas, como a fosfatase alcalina e peroxidases conjugadas ao anticorpo, atuando sobre um substrato específico (NICKEL; FAJARDO, 20015). A avaliação é realizada pela mudança de coloração das amostras, enquanto as positivas adquirem coloração arroxeada, as amostras sadias apresentam uma coloração verde.

Dentre os testes moleculares utilizados na diagnose dos vírus com genoma de RNA, o mais utilizado é a transcrição reversa seguido da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). O processo envolve as enzimas transcriptase reversa e Taq DNA polimerase e a reação é automatizada pela incubação em um termociclador programado inicialmente para executar a transcrição reversa do RNA em DNA complementar.

Posteriormente, o DNA complementar é utilizado para ser amplificado por PCR em outro termocilador, visando à produção de um grande número de cópias do fragmento alvo deste DNA. Com isso, ocorre a amplificação um fragmento do genoma do vírus, compreendido entre dois iniciadores, sendo realizada a partir do RNA do vírus utilizado como molde (LIMA; FAJARDO, 2015).

Logo, o objetivo deste trabalho foi justamente realizar diagnose de gêneros de vírus fitopatogênicos em amostras de tomate sintomáticas presentes em uma área produtora de tomate no Núcleo Rural Taquara, Planaltina DF, utilizando o teste sorológico (Dot-ELISA) e Molecular (RT PCR). Assim também, relatar acerca das dificuldades e limitações encontradas no decorrer da pesquisa

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Coleta de Material vegetal

Foi realizado uma visita técnica em uma área de produtor rural de tomate (Figura 1A) no Núcleo rural Taquara, em Planaltina DF. Trinta e seis amostras de plantas de tomates sintomáticas para fitovirose (Figura 1B) foram coletadas e levadas ao laboratório de virologia vegetal da Embrapa Hortaliças para realização dos testes de diagnose viral



*Figura 1A* Plantação de tomate em área de produtor rural do núcleo rural em Taquara DF. *B.* Plantas de tomate com sintomas típicos de Fitovirose.

## 2.2 Teste Sorológico Dot-ELISA

O primeiro teste realizado foi o teste Dot-ELISA, na qual consiste na detecção viral utilizando os anticorpos específicos produzidos contra a proteína capsidial do grupo de fitovirus presentes nas amostras. Inicialmente, a identificação se deu por sintomas aparentes de vírus do gênero dos *Orthospovirus* e *Potyvirus*. Com isso, foram utilizados anticorpos específicos para espécies de vírus pertencentes a esses dois gêneros, sendo os anticorpos PVY e PEPMV, pertencentes aos *Potyvirus* e GRSV, TCSV, TSWV pertencentes aos *Orthospovirus*.

Primeiramente, as amostras foram colocadas em saquinhos plásticos em contato com tampão PBS, depois maceradas com rolete, para que os vírus presentes nas amostras foliares pudessem ser dispersos no extrato proteico formado com a maceração. Aliquotas de cerca de 6µl das amostras presentes no extrato proteico foram gotejadas nas membranas de nitrocelulose. Sendo que as mesmas amostras foram gotejadas em uma membrana identificada para cada anticorpo utilizado juntamente com um controle positivo.

Por cerca de 30 minutos as membranas foram secas a temperatura ambiente e posteriormente, foram colocadas em uma solução de bloqueio contendo leite em pó desnatado + tampão PBS, deixadas sob agitação por um período de 2 horas. Após esse período, cada membrana foi separada e colocada em caixas de gerbox contendo 20 ml de tampão PBS onde adicionou cerca de 1,25µl de anticorpo específico (IgG) para cada mL de tampão utilizado e levadas sob agitação por 2 horas.

Ademais, cada membrana foi lavada 3 vezes por 3 minutos com tampão PBS 0,5x. Depois, foram deixadas sob agitação por 2 horas em uma caixa de gerbox contendo cerca de 30 mL de tampão + 1µl de IgG conjugado. Em continuidade após o período das 2 horas, houve novamente a lavagem de 3 vezes por 3 minutos cada.

Para fins de revelação e detecção, as amostras foram levadas a outra caixa de gerbox contendo cerca de 30 ml de tampão de revelação, onde neste foi adicionado cerca de 90 µl de BCIP e 180µl de NBT.

## 2.3 Teste Molecular para Diagnose- Extração de RNA, RT e RT-PCR

### Extração de RNA

Foi realizado a extração do RNA total apenas das amostras que estavam positivas do teste do Dot-ELISA. O RNA foi extraído utilizando método Trizol.

De início, cerca de 100 mg de tecido foliar foi macerado na presença de 1 mL de Trizol e incubados a TA por 5 min. Após adicionar 200µl de clorofórmio, as amostras foram centrifugadas a 12:000 rpm por 15 minutos, 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, onde adicionou 500µl de isopropanol e incubou por 10 min a TA. Posteriormente, foi levado a centrifugação a 12:000 rpm por 15 min a 4 °C. Após ser retirado da centrifuga, adicionou 1 ml de etanol 70% gelado e centrifugou-se novamente por 5 min a 12:000 rpm. Depois houve o descarte do sobrenadante, e ressuspensão em água tratada com DEPC.

### Transcrição Reversa (RT)

Após realizar a extração do RNA daquelas amostras, foi necessário realizar um Transcrição Reversa (RT), para fins de obtenção de cópias de DNA complementar (cDNA). Foi preparado um mix inicial contendo: 12µl de dNTPs; 6µl de primer (M4T) + 6µl de primer (RANDO); 96µl de água + 1µl do RNA extraído e incubados a 70°C por 10 minutos. O segundo mix utilizado foi preparado nas seguintes proporções: 48µl Tp 5x MMV; 12µl MMLV, 12µl de RNASE e 12µl de DTT. Aplicou-se 8µl do mix 2 no mix 1 contendo o RNA e levados a incubação no termociclador por 37 °C por 50 minutos para ativar a enzima e depois por 85 °C a 10 minutos para inativar a enzima.

### RT PCR

O DNA complementar oriundo da transcrição reversa foi utilizado para ser amplificado via PCR, utilizando primers específicos para detecção de *Orthospovirus* e *Potyvirus*. Sendo utilizado os primers (Py11F + M4 R) para detecção de *Potyvirus* nas amostras que pelo DOT-ELISA estavam positivas para esse grupo de vírus e primers (GRSV F+R), (TCSV F+R) e (TSWV F+R) para detecção de *Orthospovirus*

O mix de PCR realizada para detecção de *Potyvirus* foi realizada na seguinte proporção: 58µl de água; 9µl de tampão 10x; 7.2µl de MgCL; 3,6µl de DNTPs; 0,9µl de primer Py11 + 0,9µl de primer M4 além de 0,9µl da enzima Taq Polimerase. O mix foi aplicado em 9 microtubos de PCR contendo 1 µl de DNA em cada, identificadas de

acordo com a numeração das amostras coletadas no campo. As amostras foram levadas ao Termociclador para fins de amplificação utilizando o programa Py11M4.

Já para detecção de *Othospovirus* foi realizado mix para cada primer utilizado, nas seguintes proporções: 39 µl de água; 6µl de tampão; 4.8µl de MgCL; 2,4µl de DNTPs, 0,6µl de cada primer, 0,6µl da enzima Taq Polimerase + 1µl de cDNA. As amostras foram levadas ao Termociclador para fins de amplificação utilizando o programa TOSPO. Após a retirada do Termociclador, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% e levadas a corrida sobre eletroforese, a fim de separar os fragmentos de cDNA de acordo com o seu tamanho molecular.

### **PCR cloroplasto para confirmação da eficiência da RT**

Foi necessário realizar uma PCR utilizando primers para detectar contaminação com DNA do cloroplasto, presentes na RT. O intuito era verificar se a RT tinha funcionado.

A reação de PCR foi levada ao Termociclador utilizando o programa CHLO, sendo realizado 1 ciclo de 95°C por 2 min; 40 ciclos de 95°C por 30 s, 50°C por 30s e 65°C por 1 min; seguido de 1 ciclo de 65°C por 8 minutos

### **2.4 Dot-ELISA para detecção de TSWV**

Para fins de comparação, e relatar acerca das dificuldades e limitações encontradas nos testes anterior, foi necessário realizar o Dot-ELISA de uma outra amostra que apresentava sintomas decorrentes da infecção de *Orthospovirus*, sendo assim utilizado apenas o anticorpo TSWV.

O Dot-ELISA foi realizado para apenas três amostras de tomate, sendo que uma estava totalmente sadia, utilizada como controle negativo, outra que estava infectada com *Orthospovirus*, controle positivo e outra que apresentava sintomas decorrentes, porém incerto se realmente estava infectada.

As três amostras foram colocadas em saquinhos contendo tampão PBS e maceradas com rolete. Logo após, cerca de 6µl das amostras presentes no extrato

proteico foram gotejadas em uma membrana de nitrocelulose e deixadas a secar por 30 minutos em temperatura ambiente.

Adiante, foi colocada em uma solução de bloqueio contendo leite em pó desnatado + tampão PBS, deixada sob agitação por um período de 2 horas. Logo após, a membrana foi separada e colocada em caixa de gerbox contendo 20 ml de tampão PBS onde adicionou cerca de 1,25µl de anticorpo específico (IgG) para cada mL de tampão utilizado e levadas sob agitação por 2 horas.

No mais, a membrana foi lavada 3 vezes por 3 minutos com tampão PBS 0,5x. Depois deixada sob agitação por 2 horas em uma caixa de gerbox contendo cerca de 30 mL de tampão + 1µl de IgG conjugado. Após o período das 2 horas, houve novamente a lavagem de 3 vezes por 3 minuto.

Para fins de revelação e detecção, a amostra foi levada a outra caixa de gerbox contendo cerca de 30 ml de tampão de revelação, onde neste foi adicionado cerca de 90 µl de BCIP e 180µl de NBT.

## **2.5 RT PCR para detecção de TSWV**

A extração do RNA dessa amostra foi realizada pelo método Trizol®, seguido de uma RT para obtenção de cDNA. Logo depois foi realizada uma PCR para fins de amplificação e detecção utilizando primers específicos para TSWV(*Orthostospovirus*). A reação de PCR foi realizada nas seguintes proporções: 26 µl de água, 4 µl de TP10x, 3.2 µl de MgCl, 0,4 µl primer (tswv1) + 0,4 primer(tswv2); 0,4 taq + 1 µl de DNA. A mostra foi levada ao Termociclador e amplificada pelo programa TOSPO.

## 2.6 Purificação

O produto da reação de PCR foi purificado utilizando o protocolo DNA purification by Centrifugation. Inicialmente o produto de PCR foi transferido para um tubo de coleta, onde sobre esse foi colocado uma minicoluna e incubado a temperatura ambiente por 1 minuto, seguida de centrifugação a 16: 000 rpm.

Adicionou cerca de 700 µl de solução de lavagem de Membrana e centrifugou a 16.000 rpm por 1 minuto. Logo mais houve a lavagem com 500 µl de solução de lavagem de membrana, seguida de outra centrifugação a 16.000 rpm por 5 minutos. Cuidadosamente a Minicoluna foi transferida para um tubo de 1,5 ml onde adicionou cerca 15 µl de Água sem Nuclease e incubada a 60 °C por 5 minutos e centrifugação a 16.000 rpm por 1 minuto.

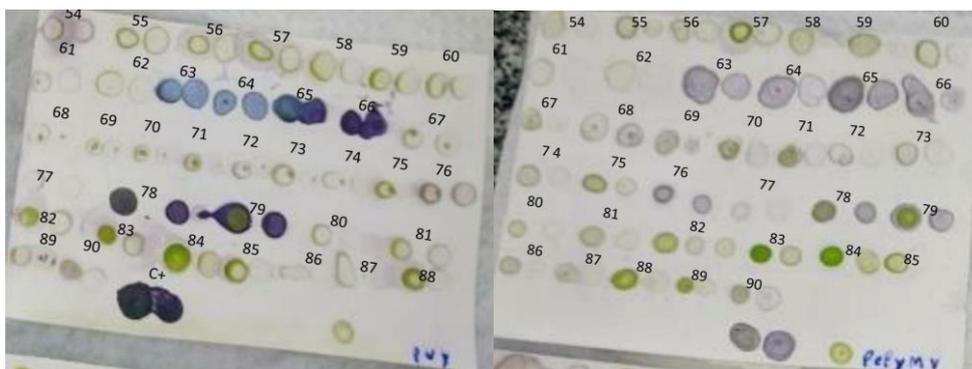
Com isso, após verificar a qualidade da purificação em gel de agarose, a amostra foi levada a Sequenciamento.

### 3.0 Resultados

#### Dot-ELISA

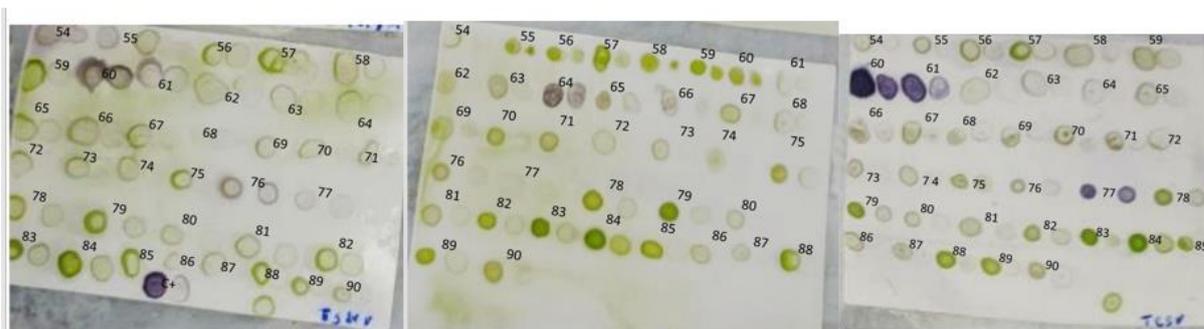
O teste do DOT-ELISA foi realizado para as 36 amostras. Entretanto, em cada amostra foi aplicado uma quantidade mais concentrada de 6µl e uma diluída em tampão PBS, sendo assim 90 no total. No decorrer do procedimento, em cada membrana identificada foi aplicado um anticorpo específico, sendo PEPMV e PVY para detecção de Potyvirus e GRSV, TcSV e TsWV para detecção de *Orthotospovirus*

Como avaliação do DOT-ELISA se baseia na mudança de coloração das amostras, na qual amostras positivas infectadas desenvolvem coloração visivelmente escura, nosso teste demonstrou que nas membranas onde foi utilizado os anticorpos específicos para detecção de *Potyvirus*, sendo PEPMV e PVY, as amostras 63,64,65,66,76,78 e 79 apresentaram resultados positivos ( Figura 2)



**Figura 2** Resultado do DOT-ELISA utilizando os anticorpos PvY e PEPMV para detecção de Potyvirus. No total apenas 7 amostras reagiram para os anticorpos utilizados.

Já em relação a detecção de *Orthotospovirus*, foram utilizados os anticorpos TCSV, GRSV e TSWV. O resultado demonstrou que as amostras 54,60,61,76 e 77 estavam positivas para esse gênero de vírus (Figura 3).



**Figura 3** Resultado do DOT-ELISA utilizando os anticorpos TSWV, GRSV e TSWV para detecção de Tospovirus. Nota-se que apenas 5 amostras reagiram para os anticorpos utilizados.

## RT-PCR

Após extrair o RNA das amostras que estavam positivas de acordo com o teste do Dot-ELISA, foi necessário realizar uma transcrição reversa, afim de produzir cópias de DNA complementar, a partir de daquele RNA extraído. Posteriormente, foi realizado uma PCR para fins de amplificação do fragmento genômico de interesse, utilizando primers específicos para detecção de *Potyvirus* e *Orthospovirus*.

O resultado obtido nesta etapa não foi o esperado. Observamos que após realizar a PCR revelar o gel dessas amostras, notamos que em todas as amostras aplicadas não houve o aparecimento de bandas nos tamanhos esperados, sendo bandas do tamanho de 1750 pb nas amostras de detecção de *Potyvirus* (PvY) e 450 pb nas amostras de detecção de *Orthospovirus*. (TCSV, TSWV e GRSV) (Figura 4).

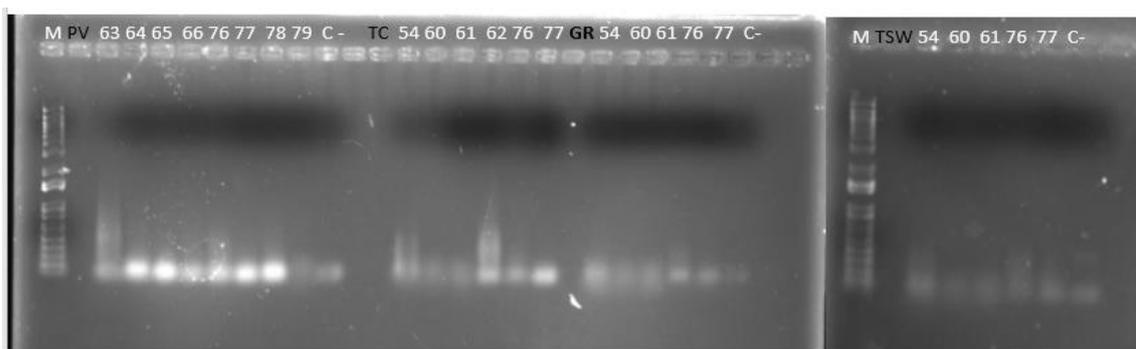


Figura 4. Resultado da PCR utilizando primers para detecção de *Potyvirus* e *Orthospovirus*. Nota-se a presença de rastros e ausência de bandas, sendo indicativo de contaminação.

Ao observar que não houve o aparecimento de nenhuma banda esperada, foi necessário realizar uma PCR para amplificar sequências genômicas da sub unidade ndhB do DNA cloroplastidial, utilizando Primer Clo 9F e 13R. O intuito era verificar se a RT PCR realizada, tinha de fato funcionado. As Amostras utilizadas foram as que deram positivas no teste do Dot-ELISA, utilizando assim o produto da RTPCR destas amostras (cDNA) mais um controle positivo.

O aparecimento de bandas de aproximadamente 1065 pb, era até esperado, mesmo não sendo um resultado eficaz para esse trabalho, sendo indicativo da presença de DNA nestas amostras (contaminação com DNA).

Principalmente era esperado o aparecimento de bandas de aproximadamente 385 pb como indicativo de que a RTPCR realizada foi eficiente.

Em relação ao resultado do nosso gel notamos que algumas amostras apresentavam bandas de tamanho esperado de 385 pb, sendo as amostras: 54;63;64;65;66;76 e 78 (Figura 5). As demais não foram consideradas pois apresentava o tamanho de aproximadamente 1065pb, como indicativo de contaminação de DNA, como dito anteriormente.

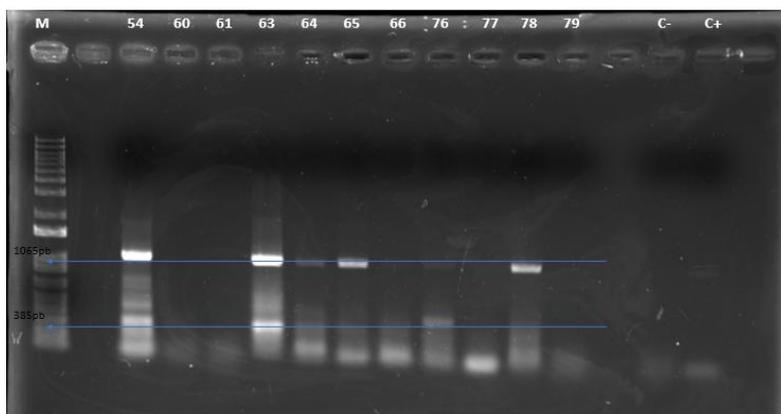


Figura 5 Resultado obtido na PCR Cloroplastidial

Com isso, uma nova PCR foi realizada para as amostras que se apresentaram o tamanho de 385 pb. A PCR foi realizada novamente utilizando primers para detecção de *Potyvirus*, sendo os primers PY11 e M4 e os primers TSWV, TCSV e GRSV para detecção de *Orthospovirus*. O resultado das aplicações dessas amostras indicou a ausência de bandas, pois o produto da PCR não amplificou, dando indicativo de que pelo teste molecular essas amostras não estão infectadas para esse grupo de vírus (Figura 6).

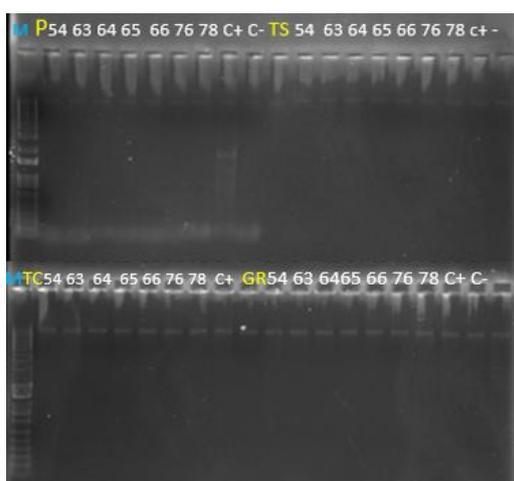


Figura 6. Resultado do gel da PCR para detecção de *Potyvirus* e *Orthospovirus*. Nota-se a ausência de bandas do produto da PCR.

### Dot-ELISA para detecção de TSWV

O Dot-ELISA foi realizado para apenas três amostras de tomate, sendo que uma estava totalmente sadia, utilizada como controle negativo, outra que estava infectada com *Orthotospovirus* (TSW), controle positivo e outra que apresentava sintomas decorrentes (amostra 2262), porém incerto se realmente estava infectada.

Como resultado deste teste, a amostra 2262, tida inicialmente como incerta, reagiu ao anticorpo TSWV, apresentando assim resultado positivo (Figura7).

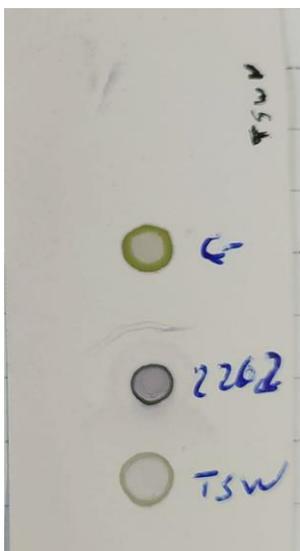
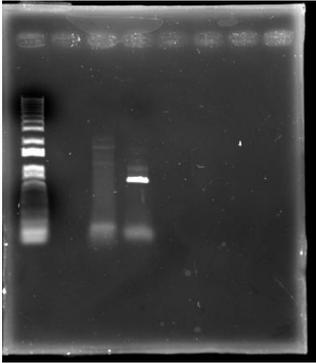


Figura 7 Resultado do Dot-ELISA para detecção de TSWV. Nota-se que a amostra 2262 apresentou resultado positivo para o anticorpo TSWV.

### RT PCR

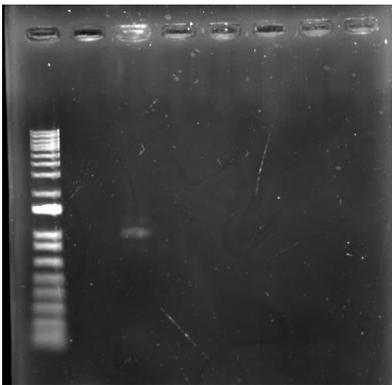
O resultado dessa RT foi o esperado, pois no gel de agarose, observou o aparecimento de bandas de 750 pb, tamanho característico do genoma de TSWV. Sendo indicativo que o produto dessa RT PCR amplificou.



*Figura 8 Gel da RT PCR para detecção de TSWV*

### **Purificação**

Após observar êxito na RT PCR realizada para a amostra 2262, foi necessário realizar uma purificação do produto de amplificação dessa amostra afim de eliminar todas as impurezas presente. Como resultado é possível observar novamente a presença de bandas de 750 pb nessa amostra (Figura 9), o que ressalta êxito na purificação e posteriormente a amostra foi levada a sequenciamento.



*Figura 9 Produto de PCR purificado da amostra 2262 positiva para TSWV*

#### **4.0 Discussão**

Esse trabalho ressalta que apesar de algumas amostras estar positivas no teste do Dot-ELISA, no teste molecular utilizado para confirmar a detecção, essas amostras não tiveram um resultado esperado. Isso demonstra, que os teste utilizados para diagnose viral de plantas apresenta algumas limitações, sendo necessário cuidados essenciais para que esse teste possa ser eficaz.

O Dot-ELISA baseia-se em um teste qualitativo, apenas em confirmação visual devido a mudança de coloração das amostras, quando essas estão positivas pro anticorpo especifico utilizado. Entre os cuidados necessários para a eficácia deste teste, destaca-se uniformidade na aplicação das amostras, de modo que consiga visualizar melhor o resultado obtido, além de evitar que uma amostra se contamine com a outra durante a aplicação. Outras limitações baseiam-se na sensibilidade, pois pode ocorrer uma reação cruzada entre as amostras, devido principalmente contaminação entre estas.

Neste teste algumas amostras nos deram indicativos de positivo, porém, um resultado incerto de infecção devido à falta de clareza na coloração das amostras pós a revelação. Isso pode ter ocasionado devido a possibilidade de o anticorpo ter reagido com algum material da planta, e não necessariamente com o antígeno.

Já em relação a RT PCR, esse teste pode ser considerado um teste mais sensível, pois o RNA é uma molécula instável e degrada muito fácil. Os cuidados devem ocorrer inicialmente durante a extração do RNA das amostras, sendo necessário a manipulação das amostras com luvas, evitando com que as amostras sejam contaminadas com RNAses, enzimas que degradam RNA. Já as vidrarias, ponteiras e tubos utilizados devem ser todas autoclavadas.

Levando em consideração o teste para detecção de TSWV como indicativo de eficiência e fins de comparação com o teste anterior, foi possível observar que obteve o resultado esperado, pois houve uma atenção maior durante a execução do procedimento, impedindo assim a repetição dos erros cometidos anteriormente.

## 5.0 Conclusão

Nesse trabalho concluímos que para o teste sorológico, as amostras 63,64,65,66,76,78 e 79 estavam positivas para os anticorpos PEPMV e PVY utilizados na detecção de Potyvirus. Já as amostras 54,60,61 e 76 estavam positivas para os anticorpos GRSV, TCSV, TSWV utilizados na detecção de *Orthospovirus*. Entretanto, o teste molecular não funcionou devido à ausência de bandas devido a não amplificar o produto de PCR, pois qualidade da RT não estava eficiente.

Assim também, no teste realizado para detecção de TSWV, para fins de comparação, tanto o teste sorológico quanto o teste molecular apresentaram resultado significativo e esperado, pois foi possível purificar o DNA mandar para sequenciamento.

Por tanto, concluímos que no decorrer da execução dos procedimentos, alguns cuidados essenciais eram necessários para obter uma melhor precisão desses resultados.

## 6.0 Referências

- AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira: Tomate. 19 ed. São Paulo: Informa economics FNP. 2014. p. 440-446, 480p.
- ALVARENGA, M. A. R. Origem, Botânica e descrição da planta. In: ALVARENGA, M. A. R. (Ed.). Tomate: produção em campo, casa de vegetação e hidroponia. 2.ed. rev. e ampl. Lavras: Editora Lavras, 2013. cap.1, p. 11-21.
- ALVARENGA, M. A. R. Origem, botânica e descrição da planta. In: Tomate: produção em campo e casa-de-vegetação e em hidroponia. Lavras: UFLA. p.13-23, 2004.
- BASSO, M. F. et al. Avanços e perspectivas no estudo das doenças virais e subvirais em videira com ênfase na realidade brasileira. In: Revisão Anual de Patologia de Plantas, v. 22, Passo Fundo, p. 1-25, 2014.
- EIRAS, M. et al. Characterization of a non-L3 gene-resistance breaking Pepper mild motle virus isolate in Capsicum. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.29, n.6, p. 670-675, novdez.2004.
- EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Diagnose de doenças de plantas: coleta, e transporte. 2008. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/52992/1/FDDiagnose0001.pdf>. Acesso em: 17 de jun de 2022.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2011. Levantamento sistemático da produção agrícola. 2022.
- ILAHY, R.; HDIDER, C.; LENUCCI, M. S.; et al. Antioxidant activity and bioactive compound changes during fruit ripening of high-lycopene tomato cultivars. Journal of Food Composition and Analysis, San Diego, v.24, n.5, p.588-595, 2011.
- JOYCES, T.; TAKEMATSU, A.P. **Pragas de plantas ornamentais**. 2010. Artigo em Hypertexto.Disponível<[http://www.infobibos.com/Artigos/2010\\_1/PragasOrnamentais/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2010_1/PragasOrnamentais/index.htm)>. Acesso em: 27/6/2022
- KITAJIMA, E. W.; REZENDE, J. A. M. Os vírus, esses terríveis inimigos. Cultivar HF, Pelotas, n. 23, p. 18-24, dez.2003 / jan.2004
- LIMA, M. F.; FAJARDO, T. V. M. Doenças causadas por vírus. In: LIMA, M. F.; MOREIRA, F. R. B. (Ed.). Uva de Mesa: Fitossanidade. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2012. p. 43-58. (Frutas do Brasil, 14).
- NAGATA, A.K.I; AVILA, A.C; LOPES C.A. Doenças do Tomateiro: Doenças Viróticas Embrapa Hortaliças, 2005.
- NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M. Obtenção de material propagativo livre de vírus e diagnóstico de vírus em macieiras e pereiras. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2009. 55 p. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 69)
- PETERSEN, S. M.; KEITH, C.; AUSTIN, K.; HOWARD, S.; SU, L.; QIU, W. A natural reservoir and transmission vector of Grapevine vein clearing virus. Plant Disease, v. 103, n. 3, p. 571-577, 2019.

VILELA, N. J.; MELO, P. C. T.; BOITEUX, L. S.; et al. Perfil socioeconômico da cadeia agroindustrial no Brasil. In: CLEMENTE, F. M. V. T.; BOITEUX, L. S. (Eds.). Produção de tomate para processamento industrial. Brasília: Embrapa, 2012. cap.1, p.17