

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) (21) **PI 0600151-3 A**



(22) Data de Depósito: 09/01/2006
(43) Data de Publicação: **02/10/2007**
(RPI 1917)

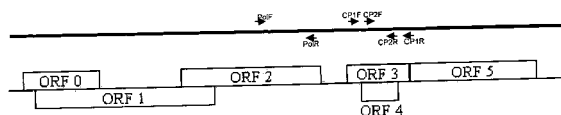
(51) *Int. Cl.:*
C12Q 1/68 (2007.01)
C12R 1/94 (2007.01)

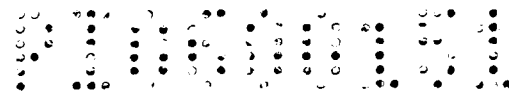
(54) **Título: TESTE MOLECULAR VOLTADO PARA A IDENTIFICAÇÃO E O DIAGNÓSTICO, IN VITRO, DO VÍRUS RESPONSÁVEL PELA DOENÇA AZUL DO ALGODOEIRO (CLRDV)**

(71) **Depositante(s):** Universidade Federal do Rio de Janeiro (BR/RJ), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA (BR/DF)

(72) **Inventor(es):** Maité Vaslin de Freitas Silva, Régis Lopes Corrêa, Márcia Soares Vidal, Paulo Augusto Vianna Barroso

(57) **Resumo:** TESTE MOLECULAR VOLTADO PARA A IDENTIFICAÇÃO E O DIAGNÓSTICO, IN VITRO, DO VÍRUS RESPONSÁVEL PELA DOENÇA AZUL DO ALGODOEIRO (CLRDV) A presente invenção se refere à descrição de ensaios moleculares para a identificação e diagnóstico, in vitro, do CLRDV (vírus responsável pela doença azul do algodoeiro). Os ensaios descritos são: 1) o RT-PCR, que utiliza primers desenhados para amplificar a região do capsídeo e parte da replicase viral; e 2) o "northern blot", que utiliza um fragmento da CP viral como sonda.





RELATÓRIO DESCRITIVO

5 **TESTE MOLECULAR VOLTADO PARA A IDENTIFICAÇÃO E O DIAGNÓSTICO, *IN VITRO*, DO VÍRUS RESPONSÁVEL PELA DOENÇA AZUL DO ALGODOEIRO (CLR DV)**

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

10 Esta invenção se refere ao desenvolvimento de ensaios moleculares para a identificação e diagnóstico, *in vitro*, do CLR DV (vírus responsável pela doença azul do algodoeiro): um por RT-PCR, usando primers desenhados para amplificar a região do capsídeo e parte da replicase viral, e outro por “northern blot” utilizando um fragmento da CP viral como sonda.

15

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A Doença Azul do Algodoeiro foi inicialmente observada na República Central Africana em 1949 e em seguida foi relatada também em diferentes
20 regiões da África, Ásia e Américas (Cauquil, 1977). No Brasil, uma doença similar denominada Mosaico das Nervuras em Ribeirão Bonito foi descrita em 1962 no estado de São Paulo e em seguida observada também nos estados de Mato Grosso e Goiás. Baseado em estudos sobre sintomatologia e modo de transmissão a doença azul e o mosaico das nervuras foram consideradas a
25 mesma doença. A doença é transmitida de forma circulativa e persistente pelo pulgão *Aphis gossypii* e os sintomas são caracterizados por nanismo, enrolamento foliar e amarelecimento das nervuras (Cauquil & Vaissayre, 1971). Os sintomas são mais fortes quando as plantas são infectadas em uma fase inicial do desenvolvimento. Sabe-se também que a transmissão mecânica não
30 é capaz de reproduzir os sintomas (Takimoto, 2003).

No Brasil, diversas variedades de algodão são cultivadas, incluindo genótipos desenvolvidos por instituições brasileiras públicas e privadas e genótipos introduzidos dos Estados Unidos e Austrália. Entretanto, essas variedades se mostraram altamente susceptíveis à doença Azul. Freire (1998) relatou perdas de até 1500 kg.ha⁻¹ de capulhos em alguns estados do Brasil. Portanto, a doença azul é um importante problema patológico em algodão no Brasil.

Hoje em dia, o diagnóstico da doença azul é realizado somente através da observação de sintomas característicos da doença (sintomatologia). Como os sintomas não são muito claros no início da doença, os produtores não são capazes de eliminar plantas infectadas nesse estágio, podendo resultar em grandes perdas.

Recentemente foi mostrado que a doença azul está associada com um novo vírus *Cotton leafroll dwarf virus (CLRDV)* que pertence à família *Luteoviridae* (Correa *et al.*, 2005).

A Doença Azul do algodoeiro é responsável, anualmente, por significativas perdas econômicas na cultura do algodão no Brasil e em alguns dos demais países plantadores desta cultura. Entretanto, não existe, até o momento, nenhum teste para fazer o diagnóstico da doença. Sua identificação, portanto, tem se baseado em observações de sintomas nas plantas aparentemente doentes. Esta invenção visa propiciar um teste diagnóstico preciso e reprodutível com 100% de certeza para a confirmação da doença em plantas sintomáticas e/ou assintomáticas.

O pedido de patente internacional WO 00/72663, de D & PL Technology Holding Corp., revela um gene de algodão mutante resistente à doença viral. Descreve ainda, plantas e sementes contendo o gene resistente à doença viral, no entanto, ainda não foi descrito nenhum método para se diagnosticar a presença do vírus nas plantas.

A necessidade da existência de testes diagnósticos para esta doença se faz necessária primeiramente para a identificação da presença da doença em campo e a sucessiva erradicação de plantas doentes. É importante a

identificação das plantas doentes na cultura, pois desta forma pode-se controlar a virose. A identificação da presença de algumas plantas doentes no início de um surto torna possível abortar o surto na plantação toda através da eliminação, o mais rápido possível, das plantas doentes e da eliminação de seu vetor, o pulgão.

Segundo Freire *et al.*, a doença azul é uma das principais doenças do algodoeiro do cerrado principalmente pela preferência dos produtores na utilização das cultivares CNPA ITA 90 e DP Acala 90, reconhecidamente susceptíveis a esta virose. Neste trabalho eles citam como consequência de infecções severas uma redução drástica na produção/planta (-91,5%), no número de capulhos (-51,2%), no peso de capulho (-53,3%) e na percentagem de fibras (-43,0%). Em infecções mais brandas a redução na produção relatada foi de -36,6%. Em 1998, Freire relacionou os prejuízos detectados no Mato Grosso, Paraguai, Goiás e Minas Gerais, resultantes de surtos desta doença. Apenas em Goiás estimou-se que na safra 1997/98 ocorreu quebra de 34.720 t de pluma.

Uma outra aplicação de grande importância para o uso dos testes diagnóstico aqui apresentados se refere aos estudos epidemiológicos da doença, que antes do advento destes testes diagnósticos era bastante limitado, pois diversas informações básicas não podiam ser resolvidas apenas pela análise de sintomas. Ainda na área de pesquisa agrônômica aplicada, os testes diagnósticos permitirão a seleção de cultivares de algodão, e outras plantas, naturalmente resistentes à Doença Azul e terá enorme valia em estudos de melhoramento genético buscando variedades resistentes.

A única forma de identificação de plantas doentes até o presente momento seria a observação de sintomas característicos da doença azul. A identificação da existência da doença a partir de observações de sintomas muitas vezes é ineficiente e subestima a presença do vírus (seu agente causal) em campo. Sintomas só podem ser observados em torno de 18 dias após a infecção da planta pelo vírus. Além disso, plantas assintomáticas podem ser portadoras do vírus e servirem de reservatório e/ou fonte de espalhamento da

infecção. Através do uso deste teste diagnóstico é possível uma identificação precisa e confiável da presença do vírus em plantas jovens onde os sintomas são ainda quase indetectáveis. Além disto, apenas teste diagnóstico como estes conseguem identificar a presença do vírus e da doença em plantas
5 assintomáticas. Todas estas características além de permitirem aumentar de maneira muito significativa à identificação da doença, levam, dentre outras conseqüências, à eliminação de plantas reservatórias para a doença e gera a possibilidade de total exclusão da doença do campo de cultura.

10 DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 apresenta uma barra preta que mostra o genoma do vírus responsável pela doença azul, as setas sinalizam as regiões que são amplificadas utilizando os pares de oligonucleotídeos propostos na invenção.

15 Referências: ORF 2 – polimerase viral; ORF 3 – capa protéica viral; PolF, PolR, CP1F, CP1R, CP2F e CP2R representam os locais de anelamento dos respectivos oligonucleotídeos no genoma viral.

A Figura 2 mostra a amplificação por RT-PCR de partes do genoma do
20 CLRDV. No painel superior pode-se verificar a amplificação com os oligonucleotídeos CP1F e CP1R em plantas doentes, vindas de Primavera do Leste, Mato Grosso. Os fragmentos amplificados, correspondendo ao capsídeo, foram separados em gel de agarose. No painel inferior tem-se uma confirmação de que a banda amplificada corresponde à capa protéica viral
25 realizada através de hibridação radioativa utilizando a CP viral como sonda marcada com P³². Após separação em gel de agarose (painel superior), os fragmentos amplificados foram transferidos para membranas de nylon e hibridados com sonda específica. Referências: Inoc – três plantas inoculadas apresentando sintomas típicos da doença azul do algodoeiro; Ni – plantas não
30 inoculadas; marcadores moleculares de λ DNA digerido com PstI estão mostrados na esquerda de cada gel.

A Figura 3 mostra a amplificação por RT-PCR da CP viral em plantas doentes do Paraná, observada em gel de agarose 0,8% através da incorporação de brometo de etídio ao DNA. Referências: 1- lambda DNA digerido com *Pst*I; 2 a 7 - plantas sintomáticas para doença azul do algodoeiro,; aqui se observa a presença algumas bandas inespecíficas, porém a banda correspondente ao tamanho esperado apresenta-se mais forte; 8 - controle negativo (planta sadia).

A Figura 4 mostra a detecção do vírus responsável pela doença azul do algodoeiro (CLR DV) usando o teste de “northern blot”. Pode-se observar nesta figura a presença do RNA genômico do vírus (banda superior) e do RNA subgenômico (banda inferior) nas duas plantas infectadas com a doença azul do algodoeiro. Referências: Inoc – duas plantas infectadas; Ni – planta não infectada usada como controle negativo.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção é a primeira possibilidade real de diagnosticar a Doença Azul. A sua utilização, e conseqüente identificação precoce da doença, pode levar a eliminação das plantas doentes e o controle da doença em campo, minimizando drasticamente os prejuízos gerados pelo espalhamento da doença no campo plantado e pelo uso de quantidades maciças de inseticidas para eliminar o inseto vetor.

Uma grande vantagem apresentada pela presente invenção é sua robustez. Os testes aqui descritos foram testados em isolados virais oriundos de diferentes regiões produtoras do Brasil e mostraram-se sempre 100% eficientes e confiáveis.

A existência destes testes diagnóstico terá fundamental importância também para o monitoramento de sementes infectadas. Isto se faz muito importante na transferência de sementes entre regiões produtoras. Por

exemplo, em nosso país há regiões livres da doença azul até o presente momento, como é o caso da região nordeste. O monitoramento de sementes através deste teste diagnóstico permitirá que medidas fitossanitárias sejam tomadas a fim de impedir a disseminação da doença para regiões livres desta
5 doença.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção visa descrever ensaios moleculares voltados para a identificação e o diagnóstico, *in vitro*, do CLRDV (vírus responsável pela
10 doença azul do algodoeiro). Os testes que serão aqui apresentados são: 1) o RT-PCR que usa primers desenhados para amplificar a região do capsídeo e parte da replicase viral; e 2) o “northern blot” que utiliza um fragmento da CP viral como sonda.

15 1) Por RT-PCR

O presente ensaio usa primers desenhados para amplificar a região do capsídeo e parte da replicase viral.

Com ele é possível se identificar a presença do vírus responsável pela doença azul do algodão, utilizando-se de seqüências de oligonucleotídeos
20 especificamente desenhadas para amplificar, *in vitro*, duas regiões do RNA viral, a seqüência correspondente à capa protéica (ORF3) e uma seqüência correspondente à parte da polimerase RNA dependente viral (ORF2).

Utilizando estes oligonucleotídeos são realizadas reações de RT-PCR que consistem, primeiramente, na produção de uma fita de c-DNA (DNA
25 complementar) para cada uma das regiões a serem amplificadas. O c-DNA é produzido utilizando-se os oligonucleotídeos reversos (CP1R, CP2R e/ou POLR). Em seguida, este c-DNA é utilizado em uma reação de polimerização em cadeia (PCR) gerando a amplificação dos fragmentos correspondentes a ORF3 e a ORF2.

30 Os parâmetros utilizados na reação de PCR, a título exemplificativo, foram: desnaturação inicial a 95°C por cinco minutos, seguido de 32 ciclos

compostos de 1 min a 95°C seguidos, de 1 min a 65°C para o par CP1F/CP2R, e a 60°C para os pares CP2F/CP2R e POLF/POLR; e mais 1 min a 72°C. Após estes ciclos a reação sofre extensão final de 10 minutos a 72°C.

O material amplificado na reação de PCR é, então, submetido à eletroforese em gel de agarose e os fragmentos podem ser visualizados e seus tamanhos analisados. Esta visualização ocorre através da incorporação de brometo de etídio ao DNA, observada sob luz ultravioleta. Os tamanhos esperados, como resultado da amplificação, são: 606 nucleotídeos para o par de oligonucleotídeos CP1F/CP1R; 351 para o par CP2F/CP2R e, 392 nucleotídeos para o par PLOF/PLOR. A presença do fragmento correspondente a qualquer destas amplificações, ou seja, CP viral inteira, parte da CP ou parte da polimerase, já é suficiente para a confirmação da presença do vírus na amostra analisada.

Escolhido um par de oligonucleotídeos faz-se a reação de RT-PCR. Os pares preferencialmente utilizados devem ser os que amplificam a capa protéica viral por ser esta proteína e sua correspondente seqüência nucleotídica muito conservadas. Em caso de resultado fracamente positivo pode-se então realizar outro RT-PCR utilizando-se qualquer um dos outros pares de oligonucleotídeos.

A amplificação, por exemplo, de fragmento correspondente à parte da polimerase, utilizando-se os pares de primers, ou oligonucleotídeos POLF/PLOR, confirma o diagnóstico positivo. Isto pode ser necessário em caso de ausência da banda correspondente à CP inteira ou a algum outro resultado que suscite dúvida como uma amplificação fraca, por exemplo. Este é o teste molecular através de RT-PCR no qual o resultado positivo se dá através da presença de bandas e o resultado negativo pela ausência da banda.

A Tabela 1 mostra a relação de oligonucleotídeos utilizados, suas respectivas seqüências e o local onde anelam.

Tabela 1: oligonucleotídeos a serem utilizados

Oligonucleotídeos	Seqüências	Local onde anelam
CP1F	5` ATGAATACGGTCGTGGGTAGAAGA 3`	Capa protéica
CP1R	5` CTATTTGGATTGTGGAATTGGCACC 3`	Capa protéica
CP2F	5'TGGTCCAAGCCCCTCGGAACACA 3`	Capa protéica
CP2R	5`TTCCGAATTTGTTAATCGTGGAGGA 3`	Capa protéica
POLF	5` ACCAGCTCCTCCAACAGCAGAATC 3`	Polimerase
POLR	5` CTCTGTATCGTTCTTTTGTG 3`	Polimerase

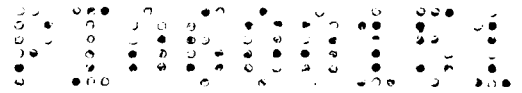
2) Por “northern blot”

O presente teste utiliza um fragmento da CP viral como sonda. Com este teste o diagnóstico é feito através de “northern blot” (também conhecido como hibridização de RNA fixado em membrana com sonda marcada radioativamente ou biotinizada) utilizando sonda marcada radioativamente (P^{32}) ou qualquer outro método de marcação.

Este teste diagnóstico, no qual são utilizados 15 µg de RNA total de cada planta para hibridização com o fragmento da CP marcado radioativamente, consiste em:

- 1) purificar RNA total de plantas suspeitas de estarem infectadas e submeter este RNA total à eletroforese em gel de agarose desnaturante (usando formolaldeído);
- 2) após a eletroforese, o RNA é transferido do gel para filtro de nylon e fixo a este filtro. Este filtro é, então, hibridizado com sonda marcada correspondente à regiões conservadas do genoma viral do CLRDV, entre elas a CP do vírus;
- 3) após a reação de hibridação o filtro ou membrana é lavado e exposto a filme de raio-X numa autoradiografia;
- 4) após alguns dias ou horas de exposição, faz-se a revelação do filme e observa-se se há ou não a presença de bandas correspondentes ao vírus na autoradiografia.

Os versados na técnica apreciarão que outras formas de consolidação e efetivação da presente invenção são possíveis a partir da descrição, e que pequenas modificações na forma de condução dos processos aqui descritos devem ser incluídas dentro do espírito da invenção e do alcance das reivindicações anexas.



REIVINDICAÇÕES

- 5 1) Teste molecular voltado para a identificação e o diagnóstico, *in vitro*, do vírus responsável pela doença azul do algodoeiro (CLRDV) **caracterizado por** ser do tipo RT-PCR ou do tipo "northern blot".
- 2) Teste, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** o RT-PCR usar primers desenhados para amplificar a região do capsídeo e parte da replicase viral; e por o "northern blot" usar um fragmento da CP viral como sonda.
- 10 3) Teste, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado por** o RT-PCR utilizar seqüências de oligonucleotídeos especificamente desenhadas para amplificar, *in vitro*, duas regiões do RNA viral, a seqüência correspondente à capa protéica (ORF3) e uma seqüência correspondente à parte da polimerase RNA dependente viral (ORF2).
- 15 4) Teste, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado por** as reações de RT-PCR consistirem: na produção de uma fita de c-DNA (DNA complementar) para cada uma das regiões a serem amplificadas; na utilização de tal fita de c-DNA numa reação de polimerização em cadeia (PCR) gerando a amplificação dos fragmentos correspondentes a ORF3 e a ORF2; o material amplificado na reação de PCR é submetido à eletroforese em gel de agarose, os fragmentos são visualizados e seus tamanhos analisados.
- 20 5) Teste, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado por** c-DNA ser produzido utilizando-se os oligonucleotídeos reversos (CP1R, CP2R e/ou POLR).
- 25 6) Teste, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado por** a amplificação, por exemplo, de fragmento correspondente à parte da polimerase, utilizando-se o pares de primers ou oligonucleotídeos POLF/PLOR, confirmar o diagnóstico positivo.

- 7) Teste, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado por** o resultado positivo se dar através da presença de bandas e o resultado negativo pela ausência da banda.
- 5 8) Teste, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** no “northern blot” o diagnóstico ser feito utilizando sonda marcada radioativamente (P^{32}) ou qualquer outro método de marcação.
- 10 9) Teste, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 8, **caracterizado por o** “northern blot” consistir em: purificar RNA total de plantas suspeitas de estarem infectadas; submeter o RNA total à eletroforese em gel de agarose desnaturante (usando formolaldeído); transferir o RNA do gel para filtro de nylon; hibridizar o filtro com sonda marcada correspondente à regiões conservadas do genoma viral do CLRDV, entre elas a CP do vírus; lavar o filtro ou a membrana e expor a filme de raio-X numa autoradiografia; após alguns dias ou horas de exposição, fazer a revelação
- 15 do filme e observar se há ou não a presença de bandas correspondentes ao vírus na autoradiografia.

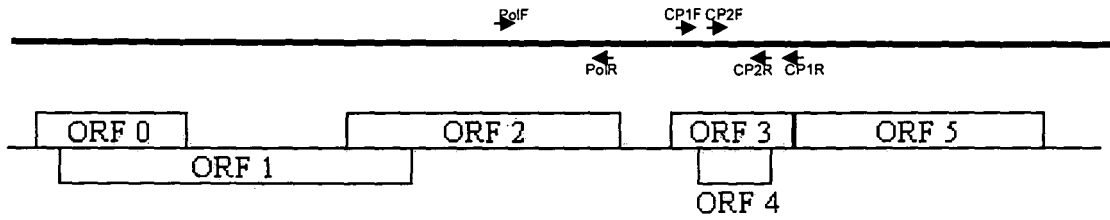
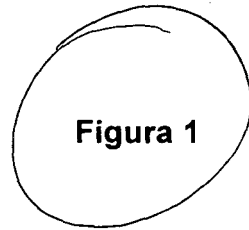


Figura 2

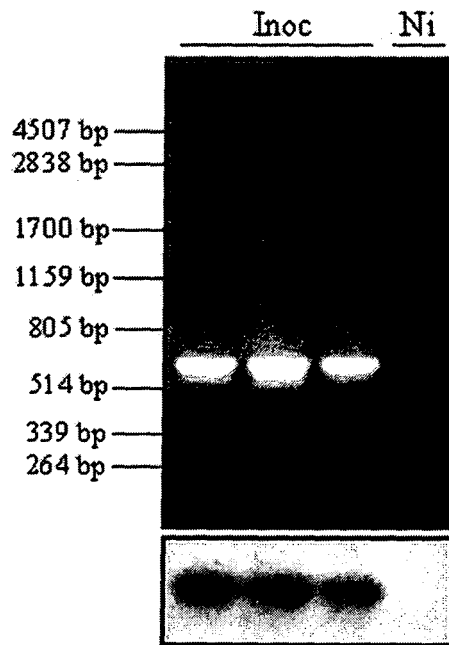


Figura 3

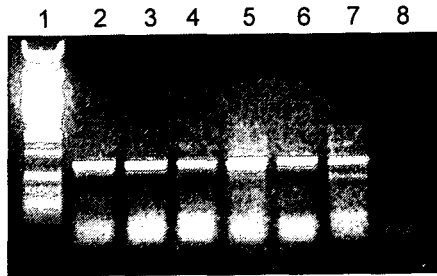
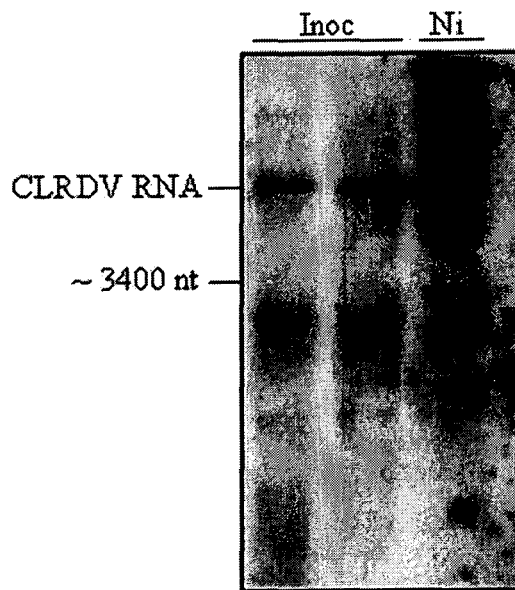


Figura 4





RESUMO

TESTE MOLECULAR VOLTADO PARA A IDENTIFICAÇÃO E O DIAGNÓSTICO, *IN VITRO*, DO VÍRUS RESPONSÁVEL PELA DOENÇA AZUL DO ALGODOEIRO (CLR DV)

5

A presente invenção se refere à descrição de ensaios moleculares para a identificação e diagnóstico, *in vitro*, do CLR DV (vírus responsável pela doença azul do algodoeiro). Os ensaios descritos são: 1) o RT-PCR, que utiliza primers desenhados para amplificar a região do capsídeo e parte da replicase viral; e 2) o "northern blot", que utiliza um fragmento da CP viral como sonda.

10