

ANA KAROLINY ALVES SANTOS

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTISSORO POLICLONAL PARA
DETECÇÃO DE Wheat stripe mosaic virus**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal, Área de Concentração: Proteção de Plantas e Agroecologia.

Orientador: Fábio Nascimento da Silva
Coorientador: Gustavo Felipe da Silva

LAGES

2021

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Santos, Ana Karoliny Alves
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTISSORO
POLICLONAL PARA DETECÇÃO DE Wheat stripe mosaic virus
/ Ana Karoliny Alves Santos. -- 2021.
71 p.

Orientador: Fabio Nascimento da Silva
Coorientador: Gustavo Felipe da Silva
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2021.

1. Benyvirus. I. Silva, Fabio Nascimento da. II. Silva, Gustavo
Felipe da. III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro
de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Produção Vegetal. IV. Título.

ANA KAROLINY ALVES SANTOS

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTISSORO POLICLONAL PARA
DETECÇÃO DE Wheat stripe mosaic virus**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Banca Examinadora

Orientador: Fábio Nascimento da Silva

Professor Dr. Fábio Nascimento da Silva)

Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV-
UDESC)

Membro: _____

Professor Dr. Álvaro Ferreira Júnior

Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (UFG)

Membro: _____

Professora Dr^a Mayra Juline Gonçalves

Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV-
UDESC)

Lages, 24 de fevereiro de 2021.

**A minha mãe, Mônica, que me
deu forças para chegar até aqui.**

**A minha irmã, Monique, por
ser a melhor companhia.**

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Deus, sem Ele eu nada seria.

À minha mãe, Mônica e minha irmã Monique por todo amor e apoio durante a caminhada.

Ao meu orientador professor Dr. Fábio Nascimento da Silva pela orientação, dedicação, paciência e por ter me dado à oportunidade de trabalhar na área de Virologia Vegetal.

Ao professor Dr. Gustavo Fellipe da Silva, pela orientação e por ter aberto as portas do laboratório para que o trabalho fosse realizado.

Ao professor Dr. Álvaro Ferreira Junior, por ter me recebido em seu laboratório e por ter tido paciência e dedicação durante os momentos de trabalho.

Aos meus amigos do laboratório de virologia que pela amizade e pela ajuda oferecida.

Aos amigos do laboratório de bioquímica que não mediram esforços para me ajudar.

Aos amigos da UFG que me receberam e me ajudaram durante o processo.

À Conceição e familiares que me receberam em Goiás.

À Universidade do Estado de Santa Catarina, aos professores e funcionários pela oportunidade da realização do Mestrado.

À Universidade Federal de Goiás que permitiu a parceria para a realização deste trabalho.

À Embrapa trigo e o Dr. Douglas Lau pela parceria no projeto realizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Aos amigos e a todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

Obrigada!

Eu aprendi qual é o valor que eu sonho alcançar
Eu entendi que o caminho pedras terá

...

Eu vi o meu limite vir diante de mim
Eu enfrentei batalhas que eu não venci
Mas o troféu não é de quem não fracassou
Eu tive muitas quedas, mas não fiquei no chão

...

Vejo vitórias e hoje eu olho para trás
E a minha frente eu sei
Existem muito mais
Eu sei que minha jornada aqui só começou
Ao longo dessa estrada sozinha não estou

E ao olhar pra trás, tudo que passou
Venho agradecer quem comigo estava
Ergo minhas mãos para reconhecer

E hoje eu sou quem eu sou
Pois Sua mão me acompanhava
Mas eu sei, não é o fim, é só o começo da jornada
Eu abro o meu coração pra minha nova história.

Pedro Valença

RESUMO

SANTOS, Ana Karoliny Alves. **Produção e caracterização de antissoro policlonal para detecção de Wheat stripe mosaic virus**. 2021. 70 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2021.

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é uma espécie cultivada principalmente no sul do Brasil e tem o mosaico comum do trigo, causado por wheat stripe mosaic virus (WhSMV) como uma das viroses mais importantes na região. Seu diagnóstico é baseado principalmente nos sintomas, já que, as técnicas moleculares apresentam custo elevado, especialmente para diagnóstico de vírus com genoma de RNA. No entanto, testes sorológicos usando imunoglobulinas apresentam elevada eficácia para identificação de viroses. Dentre os anticorpos tem-se as imunoglobulinas IgY que apresentam as seguintes vantagens: (i) redução do número de animais imunizados; (ii) elevada quantidade de anticorpos purificados por mL de gema sem a sangria da galinha; (iii) baixo custo; (iv) facilidade de execução; (v) bem estar animal; e (vi) menor número de animais utilizados na produção. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo a produção e caracterização de um antissoro policlonal capaz de interagir com a proteína capsidial do WhSMV. Para isso o gene que codifica a proteína capsidial do vírus foi inserido em vetor de expressão pET-15b, a transformação e expressão ocorreu em *Escherichia coli* BL21::DE3 *in vitro*. A proteína recombinante foi inoculada em galinhas poedeiras (*Gallus gallus domesticus*). Os ovos foram coletados, os anticorpos foram extraídos das gemas e purificados; foram realizados os testes ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) indireto e *Western blot* com o anticorpo extraído e a proteína capsidial purificada, confirmando a interação entre eles; foi realizado um teste de PCR com amostras de raiz e parte aérea de plantas infectadas, confirmando a presença do vírus em ambos os órgãos. O resultado do PCR foi aplicado no teste ELISA realizado com extrato total de proteínas das plantas saudáveis e infectadas, raiz e folhas, confirmando a interação entre anticorpo e antígeno com as amostras de parte aérea infectada, enquanto que nas amostras de raiz de planta infectada não houve interação. Com base nestes dados conclui-se que houve o reconhecimento específico da proteína viral purificada pelo IgY produzido em galinhas e que ocorreu o reconhecimento do WhSMV presente em extrato de folhas de planta infectada pelo IgY.

Palavras-chave: *Benyvirus*, Proteína capsidial, *Triticum aestivum*, diagnóstico, Tecnologia IgY.

ABSTRACT

SANTOS, Ana Karoliny Alves. **Production and characterization of polyclonal antiserum for Wheat stripe mosaic virus detection.** 2021. 70 p. Dissertation (Master's degree in Plant Production) – Santa Catarina State University. Postgraduate Program in Plant Production, Lages, 2021.

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is a species grown mainly in southern Brazil and the soil-borne wheat mosaic disease (SBWMD), caused by wheat stripe mosaic virus (WhSMV) is one of the most important viruses. Its diagnosis is based mainly on symptoms, since molecular techniques are expensive, especially for viruses with RNA genomes. However, serological tests using immunoglobulins are highly effective in identifying viruses. Among the antibodies are IgY immunoglobulins, which have the following advantages: (i) reduced number of immunized animals; (ii) high amount of purified antibodies per ml of yolk without the chicken bleeding; (iii) low cost; (iv) ease of execution; (v) animal welfare; and (vi) fewer animals used in production. Therefore, the present study aimed to produce and characterize a polyclonal antiserum capable of interacting with WhSMV capsid protein. For this, the gene encoding the virus's coat protein was inserted into the expression vector pET-15b, the transformation and expression occurred in *Escherichia coli* BL21::DE3 *in vitro*. The recombinant protein was inoculated in laying hens (*Gallus gallus domesticus*). The eggs were collected, the antibodies were extracted from the yolks and purified; indirect ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) and Western blot tests were performed with the extracted antibody and the purified coat protein, confirming the interaction between them; a PCR test was performed with root and shoot samples from infected plants, confirming the presence of the virus in both organs. The PCR result was applied in the ELISA test performed with total protein extract from healthy and infected plants, root, and leaves, confirming the interaction between antibody and antigen with samples from the infected plant leaves, while in the samples from infected plant root there was no interaction. Based on these data, it can be concluded that there was specific recognition of the viral protein purified by IgY produced in laying hens and that the recognition of WhSMV present in extract of infected plant leaves by IgY occurred.

Keywords: *Benyvirus*, Coat Protein, *Triticum aestivum*, diagnosis, IgY Technology

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Mapa do vetor de expressão pET-15b utilizado para inserção do gene que codifica a proteína capsidial do wheat stripe mosaic virus (WhSMV). No mapa são apresentados os sítios de enzimas de restrição, sítios de clonagem entre as enzimas NdeI e XhoI, a origem de replicação do vetor (Ori), e os genes marcadores de seleção Ap (resistência a ampicilina) e lacI. 29
- Figura 2 - Placa com meio de cultura LB contendo colônias de *Escherichia coli* após o processo de inserção do vetor recombinante pET-15b:CP. 31
- Figura 3 - Inoculação da proteína purificada CP do wheat stripe mosaic virus (WhSMV) via intramuscular. As inoculações foram realizadas no músculo peitoral da galinha pertencente a raça ISA Brown. 34
- Figura 4 - Sintomas de mosaico em plantas de trigo cv. Toruk coletadas na unidade experimental da Embrapa Trigo em Passo Fundo, Rio Grande do Sul. 36
- Figura 5 - Porcentagem de identidade de nucleotídeos entre isolados de wheat stripe mosaic virus (WhSMV) do Brasil, Paraguai e África do Sul. A nomenclatura dos isolados é apresentada pelo número de acesso no *GenBank* seguido do país de origem. A caixa em cor preta destaca o isolado WhSMV:BR:CEP11, que foi utilizado para produção do antissoro. 40
- Figura 6 - Porcentagem de identidade de aminoácidos entre isolados de wheat stripe mosaic virus (WhSMV) do Brasil, Paraguai e África do Sul. A nomenclatura dos isolados é apresentada pelo número de acesso no *GenBank* seguido do país de origem. A caixa em cor preta destaca o isolado WhSMV:BR:CEP11, que foi utilizado para produção do antissoro. 41
- Figura 7 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína capsidial (CP) do wheat stripe mosaic virus (WhSMV) do Brasil, Paraguai e África do Sul. A CP do isolado WhSMV:BR:CEP11 (MH151801_Brazil) foi utilizada para produção do antissoro. Os números do lado direito da figura representam a posição do aminoácido na proteína. 42
- Figura 8 - SDS-PAGE demonstrando que o vetor pET-15b foi expresso em *E. coli* induzida por 1mM de IPTG. 43
- Figura 9 - SDS-PAGE para verificação da purificação da proteína da capa do Wheat stripe mosaic virus expressa na fração insolúvel. 45
- Figura 10 - (A) Placa de poliestireno usada durante o teste com a proteína purificada contra o antissoro produzido por galinhas não inoculadas (esquerda) e galinhas inoculadas (direita). (B) Resultado das amostras do antissoro (IgY de galinha não inoculada) nas seis diluições (1:25; 1:50; 1:100; 1:200; 1:400 e 1:800) em relação a concentração do antígeno a 10, 5 e 2,5µg/mL (proteína viral purificada), com leitura realizada a 450nm. (C) Resultado das amostras do antissoro (IgY de galinha inoculada) nas seis diluições de 1:25 até 1:800

em relação a concentração do antígeno a 10, 5 e 2,5µg/mL, com leitura realizada a 450nm..... 47

Figura 11 - *Western blot* da proteína da capa do Wheat stripe mosaic virus purificada e detectada pelo anticorpo primário IgY. Na imagem são apresentados três métodos distintos para detecção de proteínas em membranas de nitrocelulose após eletroforese em gel de poliacrilamida e transferência de extrato bacteriano contendo: a proteína viral recombinante expressa (EB), da proteína viral purificada (PP) e marcador molecular (M). Foram carregados 10 µg da proteína viral purificada. Para o *Western blot*, o anticorpo primário IgY e o anti-IgY HRP foram adicionados, respectivamente, na diluição de 1:1000. As membranas foram expostas aos substratos TMB (membrana do centro) ou ECL (membrana da direita). As proteínas transferidas para membrana foram analisadas utilizando o corante *Ponceau* (membrana da esquerda)..... 49

Figura 12 - RT-PCR das amostras de plantas de trigo não infectadas pelo WhSMV (raiz e folha) e das amostras de plantas de trigo infectadas pelo WhSMV (raiz e folha)..... 50

Figura 13 - Média das absorbâncias obtidas no teste ELISA para os controles negativo (Amostras de folhas da cultivar de trigo TBIO Sossego), proteína viral purificada (C+), e A1 e A2 amostras de raiz e folha da cultivar de trigo TBIO Toruk, respectivamente. 52