

## DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO YERBA MATE-ASSOCIATED CIRCULAR DNA VIRUS EM ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) COM PRIMERS ESPECÍFICOS

EDUARDA DE MATOS OLIVEIRA<sup>1</sup>; VITÓRIA NUNES DOS SANTOS<sup>2</sup>; DJULIA KUBAIKI WEIMER<sup>3</sup>; LAURA MACHADO CRESPO<sup>4</sup>; DANIELLE RIBEIRO DE BARROS<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – ufpeleduarda@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – vitorians1212@gmail.com

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas – laura.machadocrespo@gmail.com

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas – djuliakubaikiweimer2005@gmail.com

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pelotas – danielle.barros@ufpel.edu.br

### 1. INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) é uma espécie arbórea nativa da América do Sul com grande relevância socioeconômica, cultural e ambiental, especialmente nos Estados do Sul do Brasil, onde a cadeia produtiva da cultura representa uma das principais atividades agrícolas (PIASSETTA; MIKOS; AUER, 2021). Popularmente consumida na forma de chimarrão e chá, a erva-mate possui forte vínculo histórico com os povos indígenas guaranis, que já utilizavam suas folhas em infusões antes da colonização europeia (DANIEL, 2009). Atualmente, a planta também é reconhecida por seu valor nutricional e medicinal, destacando-se pelos compostos bioativos como cafeína, teobromina, polifenóis e saponinas, que lhe conferem propriedades antioxidantes e estimulantes (ARÇARI et al., 2009). Entre os patógenos potenciais, os vírus têm despertado atenção crescente, sobretudo por relatos na Argentina entre 2014 e 2020, que identificaram quatro vírus distintos associados à erva-mate: Yerba mate endornavirus (YmEV), Yerba mate chlorosis-associated virus (YmCAV), Yerba mate-associated circular DNA virus (YMaCV) e Yerba Mate Virus A (YmVA) (DEBAT et al., 2014; BEJERMAN et al., 2017; BEJERMAN et al., 2018; BEJERMAN et al., 2021). Dentre esses, o YMaCV, pertencente ao grupo de vírus de DNA circular, apresenta destaque por sua recente descoberta e pela ausência de informações sobre sua epidemiologia. Apesar da relevância econômica da cultura no Brasil, ainda não existem registros oficiais da ocorrência de viroses em ervais nacionais. Considerando a proximidade geográfica com áreas argentinas onde o YMaCV já foi descrito e a intensa troca de material vegetal entre países produtores do Cone Sul, existe risco significativo de ocorrência e disseminação do vírus em plantações brasileiras. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo diagnosticar a presença do Yerba mate-associated circular DNA virus (YMaCV) em plantações de erva-mate no Rio Grande do Sul, utilizando a técnica de PCR com primers específicos para essa espécie.

### 2. METODOLOGIA

Foram coletadas folhas de erva-mate em sete municípios produtores do Rio Grande do Sul: Ilópolis, Arvorezinha, Putinga, Coronel Bicaco, Santo Augusto, Mato Leitão e Venâncio Aires, totalizando 41 amostras. As coletas abrangeram diferentes sistemas de manejo. As amostras foram processadas por maceração em nitrogênio

líquido, e o DNA foi extraído segundo Doyle e Doyle (1987). Para a detecção do vírus, foram utilizados três pares de oligonucleotídeos específicos, desenhados a partir da sequência de referência do YMaCV (GenBank NC\_040708.1) e usando a ferramenta primers-Blast (NCBI) (Tabela 1). As reações de PCR foram conduzidas em volume final de 25 µL, contendo tampão, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, primers específicos e Taq DNA polimerase. As condições de amplificação incluíram desnaturação a 94 °C, anelamento a 50 °C e extensão a 72 °C. O produto das reações foi analisado em gel de agarose a 1%.

Tabela 1 - Pares de oligonucleotídeos utilizados para a PCR

Oligonucleotídeos	Seq do primer (5' - 3')	Temp. de anelamento
<b>Par 1</b> YD281F	ATTTTTCCTGCGTGGTGTG C	50
YD1131R	ACACACTGCTTCGCTGATG A	50
<b>Par 2</b> YD1189F	ACACACTGCTTCGCTGATG A	50
YD2159R	GCTCAACCTTTCCCCCATG A	50
<b>Par 3</b> YD2140F	TCATGGGGGAAAGGTTGA GC	50
YD2705R	TAATGTACCCCAACCTCCC G	50

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes de PCR realizados com os três conjuntos de primers específicos não apresentaram produtos de amplificação para o Yerba Mate-Associated Circular DNA Virus (YMaCV). Resultados semelhantes já foram descritos para outros vírus de DNA circular, em que a PCR demonstrou menor sensibilidade quando comparada à técnica de amplificação por círculo rolante (Rolling Circle Amplification – RCA) (NAITO et al., 2010). Embora a PCR seja amplamente utilizada como ferramenta de diagnóstico molecular de vírus, a técnica apresenta limitações que podem comprometer sua sensibilidade e especificidade. O sucesso da amplificação depende de diversos parâmetros experimentais, como a temperatura de anelamento dos primers, a concentração de cofatores (por exemplo, MgCl<sub>2</sub>) da DNA polimerase, e os tempos de cada etapa do ciclo. Apesar da existência de evidências da presença do YMaCV no Brasil (NUNES ET AL., 2023), a ausência de um controle positivo nesta análise limita a interpretação dos resultados negativos. Dessa forma, não é possível concluir com segurança se os primers utilizados foram ineficazes ou se outros fatores experimentais comprometeram a detecção do vírus.

#### 4. CONCLUSÕES

Os testes de PCR não detectaram o YMaCV nas amostras analisadas, o que pode estar relacionado à baixa sensibilidade dos primers ou à falta de ajustes nos parâmetros da reação. A ausência de controle positivo limita a interpretação dos resultados. Estudos futuros com técnicas mais sensíveis, como RCA, e uso de controles adequados são recomendados para confirmar a presença do vírus.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARÇARI, D. P. et al. Atividade antioxidante e anti-inflamatória da erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 451-456, 2009.

BEJERMAN, N. et al. Yerba mate chlorosis-associated virus, a novel plant rhabdovirus infecting *Ilex paraguariensis*. **Virus Research**, v. 232, p. 11-17, 2017.

BEJERMAN, N. et al. First report of a circular DNA virus associated with *Ilex paraguariensis* (yerba mate). **Virus Research**, v. 249, p. 94-98, 2018.

BEJERMAN, N. et al. Characterization of a novel cytorhabdovirus infecting yerba mate (*Ilex paraguariensis*). **Archives of Virology**, v. 166, p. 1121-1125, 2021.

DEBAT, H. et al. Discovery of a novel endornavirus in *Ilex paraguariensis* (yerba mate). **Virus Research**, v. 180, p. 13-19, 2014.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

NAITO, S. et al. Comparison of methods for detecting circular DNA plant viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 164, p. 147-152, 2010.

PIASSETTA, R. R. L.; MIKOS, A. P.; AUER, C. G. Doenças fúngicas da cultura da erva-mate no Brasil. **BIOFIX Scientific Journal**, v. 6, n. 2, p. 153-159, 2021.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS, V. N. Levantamento do *Yerba mate-associated circular DNA vírus* em plantações de erva-mate no Rio Grande do Sul. 2023. 29 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

SMITH, J.; JONES, L. Next-generation sequencing and viral taxonomy. **Journal of Virology**, v. 94, n. 12, e00430-20, 2020.