RESUMO - VIROLOGIA VEGETAL

USO DA PCR TOUCHDOWN PARA CONFIRMAÇÃO DE MUTAÇÕES EM CLONES INFECCIOSOS DE CUCURBIT WHITEFLY-BORNE YELLOWS VIRUS

Lucas Oliveira Mesquita (lucas.oliv.mesq@gmail.com)

Caterynne Melo Kauffmann (caterynne.kauffmann@hotmail.com)

Bruno Arcanjo (bruno.arcanjo@aluno.unb.br)

Júlia Baratela Neto (jubaratela2005@gmail.com)

Juliana Gomes E Silva Ilha (jujusilha@gmail.com)

Priscila Rayane De Menezes Silva Machado (prirmsm@gmail.com)

Saulo Sousa Alves (saulosousaalves@gmail.com)

Felipe Ribeiro Kehagias (phirkk@gmail.com)

Márcio Pereira De Barros Júnior (marciojr.biologia@gmail.com)

Tatsuya Nagata (tatsuya@unb.br)

Reação em cadeia de polimerase (PCR) é uma técnica utilizada em biologia molecular baseada na replicação cíclica de fragmentos de DNA. Entre suas variações, destaca-se a PCR Touchdown, que consiste na utilização inicial de

temperaturas de anelamento mais elevadas, com reduções graduais ao longo dos ciclos. Essa estratégia aumenta a especificidade da reação, reduzindo amplificações inespecíficas, permitindo a discriminação de sequências que diferem por poucos nucleotídeos. Nesse estudo, o objetivo foi avaliar a eficiência da PCR touchdown na confirmação de mutações introduzidas por mutagênese sítio-dirigida no clone infeccioso de cucurbit whitefly-borne yellow virus (CWBYV) utilizando primers específicos que reconhecem exclusivamente as sequências mutantes ou selvagens. Foram analisadas oito amostras, sendo realizadas duas reações independentes para cada uma delas: uma contendo primers específicos para a sequência selvagem e outra contendo primers específicos para a sequência mutante. Esperava-se que apenas uma das reações apresentasse amplificação, permitindo a identificação correta do genótipo de cada amostra . Em cinco das oito amostras, a identificação foi realizada de forma direta e conclusiva. Em duas amostras observou-se amplificação em ambas as reações, entretanto, diferenças visuais na intensidade dos amplicons permitiram a determinação do genótipo correto. Uma amostra não apresentou amplificação em nenhuma das reações. Análises complementares indicaram a ausência do inserto viral, justificando esse resultado. Os resultados demonstraram que a PCR Touchdown com uso de primers específicos é uma ferramenta de triagem de clones contendo mutações pontuais, permitindo reduzir as amostras submetidas ao sequenciamento, os custos e o tempo na seleção de construções de mutantes.

Palavras-chave: pcr touchdown; mutagênese sitio dirigida; confirmação de mutações.