

Desenvolvimento de métodos diagnósticos para os vírus causadores da murcha do abacaxizeiro (PMWaV -1, 2 e 3)

Layanna Rebouças de Santana Cerqueira¹; Emanuel Felipe Medeiros Abreu²; Eduardo Chumbinho de Andrade³

¹Estudante de Biologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia; ²Analista da Embrapa Mandioca e Fruticultura; ³Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura. E-mails: lay_anna1@hotmail.com, emmanuel.abreu@embrapa.br, eduardo.andrade@embrapa.br

O Brasil é atualmente um dos maiores produtores de abacaxi (*Ananas comosus* var. *comosus*) do mundo. O principal estado produtor no país é Minas Gerais, seguido do Pará e da Paraíba. Juntos, os três estados correspondem por cerca de 53% da produção nacional. Um fator que contribui para um baixo rendimento na produção do abacaxi é a infecção pelo complexo de vírus associado à murcha (*Pineapple mealybug wilt-associated virus*, PMWaV), transmitido pela cochonilha *Dysmicoccus brevipes*. Este trabalho tem como objetivo desenvolver métodos de diagnósticos para detecção do vírus da murcha do abacaxizeiro (PMWaV-1, 2 e 3). Plantas de abacaxizeiro com sintomas de murcha foram identificadas e plantadas em vasos em casa de vegetação e nelas realizada a extração do RNA total. O procedimento foi realizado em tecido foliar com o auxílio do reagente Trizol (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. O 'pellet' de RNA foi lavado com etanol (70%), seco a temperatura ambiente e ressuspenso em 20 µL de água livre de nucleases e, posteriormente, acondicionado no ultra-freezer (-80 °C). Após a extração, as amostras foram submetidas à detecção dos vírus por RT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para cada tipo (PMWaV-1, 2 e 3). Foram desenhados oligonucleotídeos específicos para a amplificação do gene do capsídeo (CP) de cada um dos três vírus. Em cada oligonucleotídeo, na sua extremidade 5' foi inserido um sítio para uma enzima de restrição de modo a possibilitar a clonagem do inserto no vetor de expressão, ORF em frame de leitura. As amostras contendo os genes CP de ambos os vírus foram sequenciados pela MacroGen Inc. (Seul, Coreia do Sul), para caracterização e confirmação da sequência desses genes. As sequências parciais de RNA obtidas foram depositadas no GenBank. Os nucleotídeos e as sequências de aminoácidos foram alinhados usando o programa ClustalW. Os genes CP do PMWaV-1 e 2 foram clonados em pGEM-Teasy (Promega). Posteriormente, o inserto foi retirado do plasmídeo por digestão com a enzima de restrição apropriada, purificado e utilizado para a reação de ligação no vetor de expressão pRSET-A (Invitrogen). Os três vetores contendo os genes da CP do PMWaV-1, 2 e 3, respectivamente, foram clonados por eletroporação na cepa de *E. coli* DH5α. Até o momento, observou-se que as proteínas da CP das três espécies de PMWaV foram expressas de acordo com os tamanhos esperados e com qualidade desejável. Novas induções de expressão das proteínas de CP estão sendo realizadas para posterior purificação e produção de antissoro específico. Como perspectivas futuras testes sorológicos serão realizados para confirmação da funcionalidade dessas proteínas expressas.

Palavras-chave: PMWaV; oligonucleotídeo; diagnose molecular e sorologia