

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

¹Estudante de Biologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bolsista IC Fapesb; ²Analista da Embrapa Mandioca e Fruticultura. E-mails: lay_anna1@hotmail.com, emanuel.abreu@embrapa.br

Introdução – O abacaxi (*Ananas comosus*) é produzido em todos os países tropicais. A murcha-do-abacaxizeiro, é causada pelo vírus *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaV), em associação com cochonilhas da espécie *Dysmicoccus brevipes*. Atualmente, considera-se o PMWaV um complexo de vírus (PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3, PMWaV-4 e PMWaV-5), que tem o abacaxizeiro como seu único hospedeiro conhecido. A doença causa perdas que podem chegar a 100% na produção de abacaxi. A murcha do abacaxizeiro caracteriza-se por apresentar sintomas que se iniciam pelo ressecamento das raízes, seguidos de murcha e descoloração gradual das folhas, que curvam-se em direção ao solo e secam as pontas. Plantas infectadas frutificam com dificuldade ou podem ter seus frutos atrofiados e murchos, impróprios ao consumo ou à industrialização. **Objetivos** – Desenvolver métodos diagnósticos por RT-PCR e ELISA para detecção e caracterização das espécies virais causadores da murcha do abacaxizeiro. **Material e Métodos** – Para o RT-PCR, inicialmente foi realizada a extração do RNA total, utilizando tecido foliar com o auxílio do reagente Trizol (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. O ‘pellet’ de RNA foi lavado com etanol (70%), seco ao ar e ressuscitado em 20 µL de água livre de nucleases e posteriormente acondicionado no ultra-freezer (-80 °C). Em seguida, as amostras foram submetidas à detecção dos vírus por RT-PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para cada tipo (PMWaV-1, 2 e 3). Para o desenvolvimento do método sorológico ou ELISA, genes da capa proteica das três espécies virais foram sintetizados na empresa Life Tecnologia, USA em vetor PBSKs com a inserção na extremidade 3’ de uma calda de histidina para facilitar a purificação das proteínas expressas em coluna de cromatografia de afinidade. 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 PRset. As amostras contendo os genes CP de ambos os vírus foram sequenciados pela Macrogen Inc.(Seul, Coreia do Sul). Os nucleotídeos e as sequências de aminoácidos foram alinhados usando os programas Blast-n (GenBank) e ClustalW (Software). Os genes CP do PMWaV-1, 2 e 3 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). **Resultados** – Foram identificados os três vírus em plantas infectadas pelo método de RT-PCR. Os ensaios de expressão heteróloga das três proteínas da capa protéica das espécies estudadas foram expressas usando o vetor PRSeT-A clonado em *Escherichia coli*. Após as etapas de expressão da proteína, análises de eletroforese em gel de poliacrilamida revelaram que todas as três proteínas foram expressas em corpus protéicos, ou seja, porção insolúvel do extrato. **Conclusões** – No momento, novos ensaios de expressão estão sendo realizados a fim de produzir uma quantidade satisfatória das proteínas para iniciar a produção de antissoros visando o desenvolvimento de um kit diagnóstico de detecção das três espécies de PMWaV.

Palavras-chave: Murcha do abacaxizeiro; ELISA; RT-PCR; indexação.