

C. Ciências Biológicas - 8. Genética - 4. Genética Molecular

INCIDÊNCIA DO Pineapple mealybug wilt associated virus, PMWaV NO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DE ABACAXI *in vitro* DA EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL.

Keilla Cidreira dos Santos ¹

Adriana Fiuzza dos Santos ²

Eduardo Chumbinho de Andrade ³

1. Graduada em Biomedicina- FAMAM
2. Graduada em Engenharia Agrônômica- UFRB
3. Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical- CNPMF

INTRODUÇÃO:

O abacaxi (*Ananas comosus* var. *comosus*) é uma das frutas tropicais mais apreciadas no mundo. O Brasil, como um dos centros de origem e diversidade genética, tem se preocupado com a conservação de germoplasma desta importante fruteira. O abacaxizeiro por ser de propagação vegetativa, possui a vantagem da multiplicação clonal do material de plantio, entretanto, esta prática favorece a disseminação de doenças como as viroses. O PMWaV (*Pineapple mealybug wilt-associated virus*) é um vírus que infecta o abacaxi causando a doença denominada popularmente de "Murcha do abacaxi". O vírus é transmitido pela cochonilha *Dysmicoccus brevipes*, e atualmente, acredita-se que a doença seja causada por um complexo viral, denominados PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3, que se diferem pela sequência e organização do genoma. O PMWV pertence a família *Closteroviridae*, gênero *Ampelovirus*, possui partícula alongada flexuosa e genoma de RNA fita simples com aproximadamente

1 4 K b . Além dos danos diretos na produção da planta, a contaminação dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma -BAG é um fator preocupante. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi a avaliar a incidência do PMWaV-1,2,3 nos acesso do BAG *in vitro* da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical.

METODOLOGIA:

O trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia, avaliou um total de 134 acessos do BAG mantidos *in vitro*. O procedimento para a detecção viral se iniciou com a extração de RNA total utilizado Trizol, seguindo as recomendações do fabricante. Para a síntese do cDNA, utilizou-se 5ug de RNA total, 2 pmol do oligonucleotídeo reverso, 0,5mM de dNTPs, tampão da reação, 250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂, 0,1M DTT, e 200U da enzima transcriptase reversa. Na reação da PCR foram utilizados 2,5uL do cDNA, 0,2 pmoles dos oligonucleotídeos, 0,2mM de dNTPs, 5,0uL do tampão da reação, 200mM Tris-HCl, pH 8,4, 500mM KCl, 30mM de MgCl₂, e 1U da Taq DNA polimerase. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,5%. As amostras positivas foram novamente testadas utilizando na PCR a combinação do oligonucleotídeo degenerado reverso com os específicos de cada tipo viral.

RESULTADOS:

Os acessos de abacaxi provenientes do Banco ativo de Germoplasma *in vitro* do CNPMF não apresentavam sintomas da infecção por PMWaV, situação já esperada, visto que a indução de sintomas só ocorre quando uma planta infectada também esta sendo colonizada pela cochonilha vetora .

O primeiro teste de detecção foi realizado utilizando oligonucleotídeos degenerados capazes de detectar indiscriminadamente a presença dos três tipos de PMWaV. Este teste nos mostrou que dos 134 acessos do BAG, 11 estavam contaminados com o PMWaV, sem indicar qual(is) tipo(s) de vírus estão presentes. Posteriormente, para saber quais tipos virais estavam presentes nestes acessos, foram realizadas novas reações de PCR utilizando o cDNA sintetizado com o oligonucleotídeo degenerado, mas combinando o oligonucleotídeo degenerado reverso com cada um dos específicos *forward*. Utilizando esta estratégia foi possível saber que os três tipos virais estavam presentes, inclusive formando infecções mistas

CONCLUSÃO:

Os três tipos de PMWaV estão presentes nos acessos BAG de Abacaxi *in vitro* da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical e frequentemente presente em infecções mistas.

Instituição de Fomento: EMPRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL

Palavras-chave: RT-PCR, Vírus da Murcha, PMWaV.