Resumo 15

DOI: 10.31368/1980-6221c00152020

DESENVOLVIMENTO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DO CAULIFLOWER MOSAIC VIRUS. OLIVEIRA, L.A.¹; EIRAS, M.² Faculdade Integral Cantareira. Rua Marcos Arruda, 729, Belenzinho, CEP 03020-000, São Paulo, SP, Brasil. Instituto Biológico, Centro de Pesquisa de Sanidade Vegetal, Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia, Avenida Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-900, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: marcelo.eiras@sp.gov.br. ***Development of primers for molecular diagnosis and characterization of cauliflower mosaic virus isolates.***

O cauliflower mosaic virus (CaMV), pertencente ao gênero Caulimovirus, família Caulimoviridae, possui partículas isométricas com aproximadamente 50nm de diâmetro, e genoma constituído de um DNA circular de fita dupla com cerca de 8.000 pares de bases (pb). A gama de hospedeiros do CaMV restringe-se a espécies pertencentes à família Brassicaceae, tais como: Brassica oleracea (brócolis, couve, couve-flor, repolho), B. juncea (mostarda), B. rapa (couve-chinesa), Raphanus sativus (rabanete), R. raphanistrum (nabiça). Há, porém, estirpes que infectam solanáceas. A transmissão do CaMV, no campo, é realizada de modo não circulativo por afídeos (Myzus persicae e Brevicoryne brassicae) e, experimentalmente, pode ser transmitido por inoculação mecânica. Nas plantas infectadas, o CaMV pode induzir clorose, mosaico, clareamento de nervuras e nanismo, sendo considerado um patógeno importante para os cultivos de brássicas por causar danos e, consequentemente, perdas econômicas. O objetivo deste trabalho foi selecionar e avaliar um conjunto de pares de oligonucleotídeos específicos para a detecção do CaMV via PCR convencional, e que os fragmentos de DNA amplificados permitissem uma cobertura de todo o genoma do vírus. A busca por sequências de genomas completos do CaMV de diferentes origens geográficas (Alemanha, Austrália, Brasil, China, Estados Unidos, França, Irã, Japão e República Tcheca), depositadas no GenBank, foi feita com o auxílio da ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Vinte e sete sequências de nucleotídeos foram alinhadas, utilizando o programa BioEdit 7.2.6, a fim de se determinar regiões conservadas do genoma do vírus para o desenho de oligonucleotídeos específicos, mas com um caráter universal. Os possíveis pares de oligonucleotídeos foram avaliados, inicialmente, in silico quanto à temperatura de desnaturação, tamanho e percentual de bases nitrogenadas (guaninas e citosinas), formação de primer-dimer, estruturas secundárias e tamanho dos fragmentos de DNA amplificados. Seis pares de oligonucleotídeos foram enviados para a síntese e, posteriormente, avaliados por PCR, a partir de DNA total extraído de plantas de couve-flor infectadas experimentalmente por um isolado brasileiro de CaMV, resultando na amplificação de fragmentos de DNA de tamanho esperado (1.200 a 1.500 pb). Não houve amplificações de fragmentos inespecíficos. Os fragmentos de DNA amplificados foram sequenciados (Sanger), o que confirmou a identidade do vírus, além de possibilitar uma cobertura total do genoma viral. Portanto, esses novos pares de oligonucleotídeos, além de serem úteis para o diagnóstico do vírus por PCR convencional, poderão ser utilizados em conjunto para a obtenção de sequências completas de genomas de isolados de CaMV, que auxiliará os estudos de epidemiologia e variabilidade genética das populações virais.