



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

WALKÍRIA ANDRADE DE AMORIM

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA O
DIAGNÓSTICO DO COMPLEXO DO *PINEAPPLE
MEALYBUG WILT-ASSOCIATED VIRUS***

VITÓRIA – ES

2016



RENORBIO

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA O
DIAGNÓSTICO DO COMPLEXO DO *PINEAPPLE
MEALYBUG WILT-ASSOCIATED VIRUS***

WALKÍRIA ANDRADE DE AMORIM

VITÓRIA – ES

2016

WALKÍRIA ANDRADE DE AMORIM

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA O
DIAGNÓSTICO DO COMPLEXO DO *PINEAPPLE
MEALYBUG WILT-ASSOCIATED VIRUS***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) e Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Aires Ventura

VITÓRIA – ES

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

A524d Amorim, Walkíria Andrade de, 1978 -
Desenvolvimento de um método para o diagnóstico do
complexo do Pineapple mealybug wilt-associated virus / Walkíria
Andrade de Amorim – 2016.
104 f. : il.

Orientador: José Aires Ventura.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Biotecnologia. 2. Ananas. 3. Vírus. 4. Diagnóstico. 5.
Reação em Cadeia da Polimerase. I. Ventura, José Aires.
II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
da Saúde. III. Título.

CDU: 61

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Ponto Espírito Santo - Universidade Federal do Espírito Santo

DEFESA DE TESE

ALUNA: WALKÍRIA ANDRADE DE AMORIM

TÍTULO DO PROJETO: "Desenvolvimento de um Método para Diagnóstico do Complexo do *Pineapple Mealybug Wilt-Associated Virus*".

PROFESSOR ORIENTADOR: José Aires Ventura

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. José Aires Ventura
RENORBIO/UFES (Orientador)

Profª. Drª. Diolina Moura Silva
UFES (Titular)

Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck
UFES (Titular)

Prof. Dr. Francisco Murilo Zerbini Junior
UFV (Titular)

Profª. Drª. Poliane Alfenas Zerbini
UFV (Titular)

CONCEITO

ASSINATURA

SATISFATORIO



SATISFATORIO



SATISFATORIO



SATISFATORIO



SATISFATORIO



TIPO DE SESSÃO: Aberta

DIA: 27 de setembro de 2016

HORÁRIO: 09h00

LOCAL: Universidade Federal do Espírito Santo – Núcleo de Biotecnologia, 2º andar, auditório.

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha família, esposo e filha pelo amor.

A Prof. José Aires Ventura pelo aprendizado.

Aos membros da banca pela contribuição.

Aos colegas do Laboratório pela companhia.

Às instituições de fomento à pesquisa: CNPq e Capes, meu muito obrigada.

Ao meu único Senhor, Jesus Cristo, dedico.

RESUMO

O *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaV) em associação com a cochonilha *Dysmicoccus brevipes* tem sido reportado como a causa da murcha do abacaxizeiro. A disseminação do vírus ocorre principalmente através de material propagativo infectado e assintomático. Neste trabalho foi validada uma metodologia por PCR em tempo real, como estratégia, para o diagnóstico dos vírus: PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3, em abacaxizeiro. Folhas de plantas adultas e mudas de abacaxizeiro das cultivares Smooth Cayenne, Pérola e Vitória foram analisadas por RT-PCR convencional e em tempo real. Cochonilhas *D. brevipes* provenientes de plantas com sintomas de murcha também foram analisadas. Genes específicos para cada vírus foram obtidos em resposta a infecção. Análise *in silico* identificou quatro genes de referência para folhas e material propagativo de abacaxizeiro sob estresse biótico. O vírus PMWaV-3 foi prevalente nas plantas sintomáticas e assintomáticas, enquanto que o PMWaV-2 foi encontrado nos abacaxizeiros assintomáticos, e associado vírus PMWaV-3 nas plantas doentes. O vírus PMWaV-1 não mostrou relação direta com a doença. Observou-se que o estado nutricional da planta interferiu na manifestação dos sintomas e na presença do PMWaV-2. Os três vírus foram detectados em amostras da cochonilha *D. brevipes*. Confirmou-se também a transmissão dos vírus por esta espécie de cochonilhas, porém, não foi vetor eficiente para o PMWaV-1. Com este estudo disponibilizou-se um método de diagnóstico que atende as exigências fitossanitárias para indexação e certificação quarentenária de mudas comerciais. Isso contribui para prevenir a disseminação do vírus em material propagativo para novas áreas e uma ferramenta para estudo epidemiológico da doença. Essa é a primeira validação de um método rápido, sensível e específico, capaz de detectar os três vírus do PMWaV em plantas em abacaxizeiros assintomáticos e sintomáticas.

Palavras chaves: *Ananas comosus* var. *comosus*, material propagativo, PCR tempo real, housekeeping, *Dysmicoccus brevipes*.

ABSTRACT

Pineapple mealybug wilt associated virus species (PMWaV) in association with *Dysmicoccus brevipes* cause mealybug wilt of pineapple. Virus dissemination occurs primarily through infected and asymptomatic propagative material. In this work, we validated a molecular methodology by RT-qPCR, to detect of the PMWaV-1, PMWaV-2 and PMWaV-3 virus in asymptomatic and symptomatic plants. Leaves and tissue culture plantlets from pineapple cultivars Smooth Cayenne, Pérola and Vitória were analysed by conventional RT-PCR and reverse transcription quantitative real-time (qRT-PCR). Mealybugs *D. brevipes* obtained from symptomatic wilt plants were analyzed. A specific genes for each virus of PMWaV was found in response to infection and was not expressed in healthy plant. *In silico* assessment four housekeeping were selected for accurate gene expression analysis in pineapple during biotic stress by RT-qPCR. PMWaV-3 virus was prevalent in symptomatic and asymptomatic plants, and associated with PMWaV-2 virus in the symptomatic wilt plants. PMWaV-1 virus did not exhibited direct relation with the disease. The nutritional status of plants influenced the onset of symptoms and presence of PMWaV-2 virus. The PMWaV-1, PMWaV-2 and PMWaV-3 virus were detected in mealybugs collected from diseased plants. Our results demonstrated transmission of the PMWaV-2 and PMWaV-3 by mealybugs. However, *D. brevipes* was not a good vector of PMWaV-1. This research provided a method for indexing plants for production or certification healthy propagative material. This prevent the spread of virus by propagation material to new crops areas and an important tool for epidemiological study of the mealybug wilt of pineapple. These is the first validation of an accurately method to detect three PMWaVs virus in asymptomatic and symptomatic plants.

Keywords: *Ananas comosus* var. *comosus*, propagative material, qRT-PCR, housekeeping, *Dysmicoccus. Brevipes*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Lista dos primers desenhados para a detecção das espécies do PMWaV por PCR convencional e tempo real.....	45
Tabela 2 Quantificação e análise da pureza realizadas no espectrofotômetro Nanodrop® 2000 de abacaxizeiros submetidos a diferentes tratamentos para lise celular.....	46
Tabela 3 Protocolos de extração do RNA total e amostras utilizadas nas análises.....	48
Tabela 4 Valores de estabilidade para genes de referência estudados.....	55
Tabela 5 Lista dos <i>primers</i> com os valores da eficiência de amplificação, coeficiente de correlação e temperatura de <i>melting</i>	56
Tabela 6 Indexação por PCR tempo real de mudas de abacaxizeiro obtidos da técnica de cultura de tecidos.....	63
Tabela 7 Comparação dos métodos de diagnóstico por PCR convencional e tempo real, em amostras de abacaxizeiro sintomáticas e assintomáticas.....	66

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Cultivares Pérola (A), Smooth Cayenne (B) e Vitória (C). Fonte: VENTURA; ZAMBOLIM (2002)16
- Figura 2 Colônia de cochonilha da espécie *Dysmicoccus brevipes* na base de folhas (A), e nas raízes (B) do abacaxizeiro.17
- Figura 3 Organização dos genomas dos três vírus causador da murcha do abacaxizeiro. É apresentado o tamanho aproximado de PMWaV-3, PMWaV-1 e PMWaV-2. A cor compartilhada indica a semelhança dos produtos proteicos. ORF1a: MTR, região metiltransferase viral; HEL , região de helicase viral; ORF1b: RdRp , RNA dependente de RNA-polimerase; ORF2, pequena proteína hidrofóbica; ORF3: Hsp70h, proteína de choque térmico 70; ORF4 : proteínas p61 ou p46; ORF5: CP, proteína do capsídeo; ORF6, p24 ou CPD, proteína capsidial duplicada; ORF7: proteína p20; ORF8: p22; ORF9: p6. Fonte: SETHER, et al. (2009.....20
- Figura 4 Árvore filogenética construída com sequências de aminoácidos completas do gene HSP70h de membros da família Closteroviridae. Fonte: MARTELLI (2012)20
- Figura 5 Plantação de abacaxizeiro da cultivar Vitória na Fazenda Experimental do Incaper, Sooretama – ES. A área assinalada em vermelho apresenta sintomas de murcha em reboleira.....22
- Figura 6 Transporte de cochonilhas através das formigas25
- Figura 7 Análise *in silico* dos genes específicos e de referência para o preparo dos *primers* para validação da técnica de RT-PCR em tempo real.....32
- Figura 8 Amostras utilizadas para extração do RNA do PMWaV. Plantas sintomáticas e assintomáticas (A); distribuição das folhas do abacaxizeiro de acordo com a idade (B); cochonilhas, *Dysmicoccus brevipes* na raiz da planta hospedeira (C); Folha “D” do abacaxizeiro da cv. Vitória, mostrando a parte aclorofilada e a clorofilada (D); mudas de abacaxizeiro cv. Vitória obtidas de cultura de tecido (E); mudas na planta matriz para propagação de um novo plantio (F); grupos de plantas com sintomatologia variável (G).....33
- Figura 9 Amostras e metodologias utilizadas para as diferentes análises realizadas na pesquisa.....38
- Figura 10 Processo de transmissão viral para mudas por meio das cochonilhas. A) Abacaxizeiro infectado com 3 espécie de vírus. B) Cochonilhas infectadas obtidas das plantas doentes. C) Mudas de cultura de tecido sadias que receberam as cochonilhas para transferência dos vírus.....41

Figura 11 Abacaxizeiros da cv. Pérola agrupados de acordo com a sintomatologia. Da esquerda para direita é observado o agravamento dos sintomas da murcha do abacaxizeiro. As plantas foram coletadas e agrupadas de acordo com sintomas: grau 1 - plantas com ausência de sintomas; grau 2 - plantas com sintomas leve; grau 3 - plantas com sintomas intenso; e grau 4 - plantas com sintomas severo.....42

Figura 12 Detecção do PMWaVs por RT-PCR. (A) PMWaV-1, *amplicon* com 589pb; (B) PMWaV-2, *amplicon* em 609pb; (C) PMWaV-3, *amplicon* em 495pb. Os A1, A2 e A3 são amostras de abacaxizeiros assintomáticos, e S1, S2, S3, S4 e S5, amostras de abacaxizeiros doentes. (M) Marcador de peso molecular 100bp DNA.....49

Figura 13 Análise por RT-PCR de órgãos do abacaxizeiro infectado pelo PMWaV. O *amplicon* em 350pb evidencia a presença do complexo viral da murcha na folha das posições D, aclorofilada (FDA) e clorofilada (FDC), e folha F (FF). Na gema apical (GA), na coroa (CO) e mudas convencionais da planta matriz (MC) também estavam infectadas. As folhas de posição A (FA) não apresentaram banda. Marcador de peso molecular 100bp (M).....51

Figura 14 Curva de amplificação dos genes de referência analisados, mostrando o delta-Ct entre os abacaxizeiros sadio e infectado com PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 para os genes de referência. O delta Ct nos 4 genes de referência testados foi menor que 1.....53

Figura 15 Eletroforese em gel de agarose dos *primers* para detecção das espécies dos vírus PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3, e genes de referência de abacaxizeiro.....54

Figura 16 Curva de dissociação dos diferentes *primers*, mostrando a presença de um único pico na respectiva temperatura de *melting* para os 3 vírus.....55

Figura 17 Curva de dissociação dos diferentes *primers*, mostrando a presença de um único pico na respectiva temperatura de *melting* para os housekeeping selecionados.....57

Figura 18 Desenho experimental de uma placa de PCR tempo real com as amostras utilizadas como controle experimental. O P nas linhas, representa *primers* específicos, sendo CI, o controle interno da reação. A cada letra acompanhada de um número, na coluna, representa uma amostra, sendo o A de planta assintomática, e S de planta sintomática.....58

Figura 19 Expressão gênica do abacaxizeiro sadio e infectado. A actina foi gene de referência para normalizar a qPCR. Foi observado ausência de expressão nas plantas sadias, e infecção pelo PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 nas plantas doentes. As amostras foram apresentadas em duplicata biológica.....59

Figura 20 Expressão gênica do abacaxizeiro sadio e infectado. A actina foi gene de referência para normalizar a qPCR. Foi observado ausência de

expressão nas plantas sadias, e infecção pelo PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 nas plantas doentes. As amostras foram apresentadas em duplicata biológica.....60

Figura 21 A) Dados obtidos a partir do sequenciamento do produto da PCR convencional utilizando primers do PCR tempo real da espécie do PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3. B) Alinhamento das sequências provenientes do sequenciamento ao gene HSP 70 corresponde a cada vírus.....61

Figura 22 Produto do alinhamento das sequências similares, obtidas do alinhamento do resultado sequenciamento com os gene da HSP 70 de cada vírus. A autenticidade as sequências específicas depositadas nos bancos de dados foram de: A) 97% para PMWaV-1(Gene: HE583225.1); B) 98% para PMWaV-2 (Gene: EU016675.1); e 98% para PMWaV-3 (Gene: FJ209047.1).....62

Figura 23 Detecção viral do PMWaV em relação a sintomatologia da murcha do abacaxizeiro na cultivar Pérola. A planta sadia (0), representa o controle negativo. Para cada grupo de plantas foram utilizados triplicata biológica e experimental. Os 4 grupos de plantas foram separados de acordo com os sintomas: ausência (1), pouco (2), muito (3) e sintomas severos (4)69

Figura 24 Detecção viral do PMWaV em relação a sintomatologia da murcha do abacaxizeiro na cultivar Vitória. A planta sadia (0), representa o controle negativo e planta infectada com as 3 espécies (5), controle positivo. Para cada grupo de plantas foram utilizados triplicata biológica e experimental. Os 4 grupos de plantas foram separados de acordo com os sintomas: ausência (1), pouco (2), muito (3) e sintomas severos (4)71

Figura 25 Aquisição dos vírus da murcha do abacaxizeiro pelas cochonilhas *D. brevipis*. (V1) PMWaV-1 (600pb), (V2) PMWaV-2 (609 pb) e (V3) PMWaV-3 (495pb). (M) marcador 100pb.....72

Figura 26 Transmissão do PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 para mudas por meio do vetor. A) Foi detectado por PCR tempo real o PMWaV-2 e PMWaV-3 nas mudas infectadas analisadas, e o PMWaV-1 esteve presente nas amostras: CT12 e CT 14. CN foi muda sadia, e CP, planta matriz da qual foi retirada as cochonilhas para a transmissão viral. B) Na amostra CT14 e na cochonilha que a colonizava, foi detectado por PCR convencional o PMWaV-2 e PMWaV-3.....73

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	
1.1 A IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO ABACAXIZEIRO	15
1.2 O ABACAXIZEIRO	16
1.3 COCHONILHA DO ABACAXIZEIRO	18
1.4 COMPLEXO VIRAL DA MURCHA DO ABACAXIZEIRO.....	19
1.5 A MURCHA DO ABACAXIZEIRO	22
1.5.1 Ocorrência da doença no cenário mundial	24
1.5.2 Disseminação da doença.....	25
1.5.3 Técnicas para detecção do vírus do PMWaV	28
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 OBJETIVO GERAL.....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 COLETA DO MATERIAL UTILIZADO NAS ANÁLISES.....	32
3.2 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS	34
3.3 CONFECÇÃO DOS <i>PRIMERS</i>	36
3.4 CONDIÇÕES PARA A SÍNTESE cDNA E ANÁLISE POR RT-PCR.....	37
3.5 CONDIÇÕES PARA AS ANÁLISES NO PCR EM TEMPO REAL	38
3.6 DISTRIBUIÇÃO DOS VÍRUS PMWAV-1, PMWAV-2 E PMWAV-3 NOS TECIDOS DE ABACAXIZEIRO	39
3.7 SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DA PCR.....	40
3.7.1 Clonagem	40
3.7.2 Transformação da Bactéria <i>Escherichia coli</i> DH5_ com o Plasmídeo Recombinante pGEM-T easy	41
3.7.3 Análise de restrição dos clones obtidos e sequenciamento.....	41
3.8 TRANSMISSÃO DO PMWAV-1, PMWAV-2 E PMWAV-3 POR MEIO DAS COCHONILHAS	42
3.9 PRESENÇA DOS VÍRUS EM DIFERENTES CULTIVARES DE ABACAXIZEIRO	42
4 RESULTADO E DISCUSSÃO	45
4.1 ANÁLISE DOS GENES E PRIMERS SELECIONADOS	45
4.1.1 Genes selecionados.....	45
4.2 DETECÇÃO MOLECULAR DO PMWAV POR PCR CONVENCIONAL	47
4.2.1 Lise celular do material vegetal	47
4.2.2 Métodos de extração.....	48
4.2.3 Seleção plantas doentes e sadias	50
4.3 DISTRIBUIÇÃO DO PMWAV NA PLANTA.....	51
4.4 PADRONIZAÇÃO DO PCR EM TEMPO REAL PARA O DIAGNÓSTICO DO PMWAV-1, PMWAV-2 E PMWAV-3 EM FOLHAS E MUDAS DE ABACAXIZIERO.....	53
4.4.1 Especificidade da técnica.....	53
4.4.2 Seleção dos genes de referência para controle interno e estudo expressão gênica	63

4.4.3 Sensibilidade da técnica	65
4.5 TRANSMISSÃO DOS VÍRUS DO PMWAV PELAS COCHONILHAS	
<i>DYSMICOCCUS BREVIPES</i>	73
4.6 OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DIAGNÓSTICO DE ROTINA	75
5 CONCLUSÕES	77
ANEXO A	88
ANEXO B	90
ANEXO C	93
ANEXO D	96
ANEXO E	99
ANEXO F	101
ANEXO G	103
REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 A IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO ABACAXIZEIRO

O abacaxi é a terceira fruta mais consumida no mundo. É cultivado em todos os países de regiões tropicais e subtropicais. O destaque na produção é para Tailândia, Filipinas e Brasil. De 1,56 milhões de toneladas de frutos brasileiros produzidos, apenas 4% são exportados (FAO, 2015).

No Brasil a Região Nordeste destaca-se com a maior produção nacional de frutos, seguida da Região Sudeste. O agronegócio representa a principal fonte de renda para 84% dos municípios capixabas. A cultura do abacaxizeiro destaca-se na fruticultura, não apenas pela qualidade do fruto, mas principalmente por sua rentabilidade, sendo uma excelente opção para a diversificação agropecuária do Estado que atualmente produz 50 mil toneladas da fruta (IBGE, 2014).

No Brasil as doenças são um risco à produção, com destaque para a fusariose e a murcha (VENTURA et al., 2006, 2009). A murcha do abacaxizeiro é uma doença viral causada pelo *Pineapple mealybug wilt-associated virus* em associação com a cochonilha *Dysmicoccus brevipes* (GAMBLEY et al., 2008; SETHER et al., 2009). A doença afeta a cultura do abacaxizeiro no Hawaii, Cuba, Austrália e Brasil (GUNASINGUE; GERMAN, 1989; VENTURA; ZAMBOLIM, 2002; SUBERE et al., 2011).

Nas regiões produtoras de abacaxi, a murcha consiste num dos problemas mais graves, pois a disseminação do vírus ocorre através do material propagativo, produzido a partir de plantas assintomáticas infectadas (VENTURA; COSTA, 2002; SETHER et al., 2005; GAMBLEY et al., 2008).

Não existe um tratamento eficaz para eliminação do vírus da planta. É realizado o manejo na cultura em relação às cochonilhas e formigas, e a utilização ineficaz de inseticida. Somando-se a isso, falta uma metodologia segura para indexação dos vírus relacionados a doença. As técnicas disponíveis não são sensíveis o suficiente para detectar vírus, o que supostamente ocorre nos abacaxizeiros assintomáticos.

1.2 O ABACAXIZEIRO

O abacaxizeiro, *Ananas comosus* var *comosus*, é uma planta monocotiledônea, herbácea semiperene, que pertence à família Bromeliaceae (BARTHOLOMEW, 2008).

O abacaxizeiro compõe-se de um caule curto e grosso, ao redor do qual crescem as folhas em forma de calhas, estreitas e rígidas, em que se inserem raízes axilares. O sistema radicular é fasciculado, superficial e fibroso, encontrado em geral à profundidade de 0 a 60 cm da superfície do solo (PY et al., 1984).

É uma planta de clima tropical, apresentando ótimo crescimento e melhor qualidade do fruto na faixa de temperatura de 22°C a 32°C. Desenvolve-se melhor em locais com alta incidência de radiação solar. Não tolera sombreamento. A aeração e drenagem do solo são requisitos básicos para o seu cultivo, por favorecerem o desenvolvimento do sistema radicular da planta. Terrenos planos ou de pouca declividade são importantes, pois evitam a erosão (PY et al, 1984).

A adaptação da planta a condições de deficiência hídrica decorre da capacidade de armazenar água na hipoderme das folhas, de coletar água por meio de suas folhas em forma de canaleta e de reduzir as perdas de água na

transpiração. A folha da posição D é a mais importante sob o aspecto do manejo da cultura. Ela é a mais jovem entre as folhas adultas e, metabolicamente, a mais ativa de todas. É considerada como a que melhor representa o estado nutricional da planta (PY et al., 1984).

Estima-se que cerca de 70% da produção mundial de abacaxi provém de 'Smooth Cayenne', enquanto que no Brasil o destaque é para a cv. Pérola. A cultivar Vitória esta em expansão no mercado, por ser resistente à fusariose e apresentar características organolépticas e agronômicas superiores as cultivares S. Cayenne e Pérola (Figura 1). Essa nova cultivar é um híbrido dos parentais cv. Primavera e cv. Smooth Cayenne, desenvolvido no Brasil (VENTURA et al., 2006, 2009).

No Espírito Santo, a abacaxicultura é predominantemente da cultivar Pérola, e está concentrada nos municípios de Marataízes, Presidente Kennedy, Itapemirim, Colatina, Linhares, Sooretama e Pinheiros.

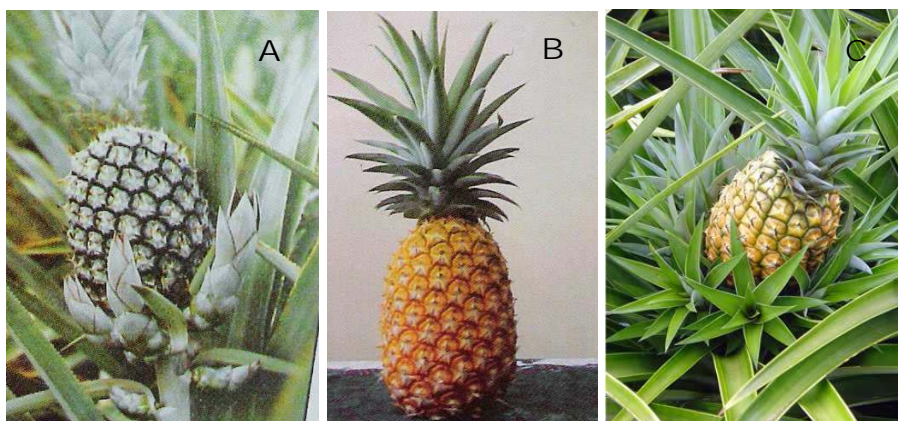


Figura 1 Cultivares Pérola (A), Smooth Cayenne (B) e Vitória (C). Fonte: VENTURA; ZAMBOLIM (2002).

1.3 COCHONILHA DO ABACAXIZEIRO

As cochonilhas (Hemiptera: Coccoidea) são insetos que colonizam o abacaxizeiro sugando a seiva da planta, pertencem a família Pseudococcidae, e as espécies principais associadas à transmissão dos vírus são *Dysmicoccus brevipes* e *Dysmicoccus neobrevipes* (CULIK, 2009). Na Austrália, Tailândia e Brasil tem sido encontrada apenas a *D. brevipes*, e no Havaí, as duas espécies (CULIK; GULLAN, 2005; GAMBLEY, 2008).

As cochonilhas vivem em colônias, nas raízes e nas axilas das folhas do abacaxizeiro (Figura 2). Com o aumento populacional e nos períodos quentes e úmidos, elas passam a infestar também os frutos, as cavidades florais e a parte superior das folhas e mudas. Cada fêmea coloca em média 295 ovos, o período de oviposição varia de 22 dias a 40 dias (SANTA CECÍLIA; REIS, 1985).



Figura 2 Colônia de cochonilha da espécie *Dysmicoccus brevipes* na base de folhas (A), e nas raízes (B) do abacaxizeiro.

São insetos fitófagos que se alimentam exclusivamente de fluidos vegetal. O seu aparelho bucal sugador perfuram e penetram no tecido vegetal, com isso danificam as plantas, reduzindo os fotoassimilados, afetando o crescimento e distribuição de nutrientes na planta (SETHER et al., 2010).

Em relação às cochonilhas existem as práticas culturais adotadas, para a manutenção do plantio livre do vetor. Para evitar a proliferação da cochonilha nas plantações de abacaxi, o produtor deve sempre destruir os restos de cultura anterior que servem de fonte de infestação para o próximo cultivo e efetuar um bom preparo do solo, para destruir seus ninhos (MATOS et al., 2007). Outra tentativa de controle é o uso de inseticida. Entretanto, devido ao hábito das colônias se localizarem nas raízes o produto não consegue atingir os insetos. A ineficácia do tratamento leva ao uso indiscriminado do produto, gerando custos a produção, contaminação do solo.

1.4 COMPLEXO VIRAL DA MURCHA DO ABACAXIZEIRO

A primeira descrição dos sintomas observados na murcha do abacaxizeiro foi no Havaí e estava relacionada a doença com a presença das cochonilhas. Carter (1945c) sugeriu a existência de um fator latente presente no abacaxi. Isso porque a sua presença no abacaxizeiro, na ausência da saliva da cochonilha, parecia não produzir sintomas de murcha, sendo o fator latente conservado e reproduzido vegetativamente para as plantas. Ito (1962) sugeriu que a doença da murcha do abacaxizeiro é uma doença viral transmitida por cochonilhas.

Gunasinghe e German (1989) isolaram viriões filamentosos de RNA de fita simples em abacaxizeiros que apresentavam sintomas da murcha e propuseram definitivamente a etiologia viral da doença, passando a ser conhecida por *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWAV).

A sigla PMWaV tem sido referida ao complexo viral formado pelos vírus PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3, PMWaV-4 e PMWaV-5 que em associação com as cochonilhas podem devastar uma plantação abacaxizeiro. Não

possuem ordem ainda definida, pertencem à família *Closteroviridae* e ao gênero *Ampelovirus* (MELZER et al., 2001; PERON, 2010). O PMWaV tem como hospedeiro relatado apenas o abacaxizeiro (GAMBLEY et al., 2008).

No gênero *Ampelovirus* os vírus são flexíveis e longos, cerca de 1.400-2.200 nm de comprimento e 10-13 nm de diâmetro. As proteínas estruturais da maioria dos membros da família é formado pela principal proteína do capsídeo (CP) e da cauda da proteína capsidial menor (CPM). O RNA é de cadeia simples, linear e de filamento único, de sentido positivo. Os membros da família têm uma dos maiores genomas entre vírus de plantas, até 20 Kb (ICTV, 2015; MELZER et al., 2001).

Os *Ampelovirus* são vírus hospedeiros de planta. O vírion é infeccioso e serve como genoma viral e RNA mensageiro. A replicação ocorre no momento em que o vírus penetra na célula hospedeira. O RNA viral é traduzido, os ssRNAs complementares sentido negativo são sintetizados pelo RNA genômico usado como molde para novos RNAs genômicos e conseqüentemente, novas partículas virais (ICTV, 2015; VIRALZONE, 2011).

Para estudar a filogenia dos vírus envolvidos na etiologia da murcha do abacaxizeiro, o dsRNA de tecidos infectados de abacaxizeiros foi isolado e identificado uma banda de 16Kb. O PMWaV-2 apresenta 10 ORFs e genoma com aproximadamente 14 Kb (MELZER et al., 2001). O PMWaV-1 apresenta genoma com 13,1 Kb e ausência da CPd, característica que está fora do padrão para *Ampelovirus*. Para o PMWaV-3 foi observado genoma de 14 Kb, 7 ORFs e ausência de uma proteína capsical duplicada (MELZER et al., 2001; 2008; SETHER et al., 2009) (Figura 3).

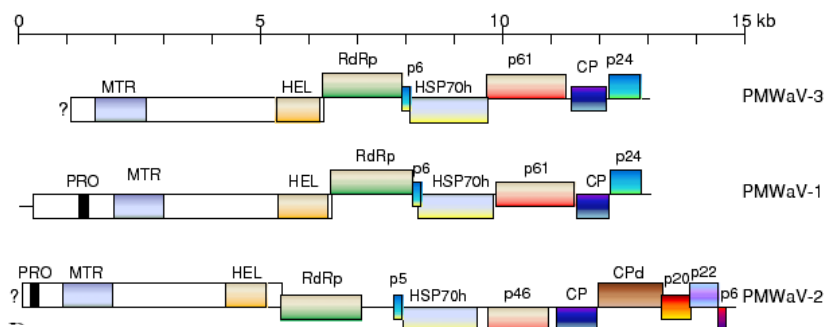


Figura 3 Organização dos genomas dos três vírus causador da murcha do abacaxizeiro. É apresentado o tamanho aproximado de PMWaV-3, PMWaV-1 e PMWaV-2. A cor compartilhada indica a semelhança dos produtos proteicos. ORF1a: MTR, região metiltransferase viral; HEL, região de helicase viral; ORF1b: RdRp, RNA dependente de RNA-polimerase; ORF2, pequena proteína hidrofóbica; ORF3: Hsp70h, proteína de choque térmico 70; ORF4: proteínas p61 ou p46; ORF5: CP, proteína do capsídeo; ORF6, p24 ou CPD, proteína capsidial duplicada; ORF7: proteína p20; ORF8: p22; ORF9: p6. Fonte: SETHER, et al. (2009).

A espécie do PMWaV-2 é a que possui maior semelhança com os membros do gênero *Ampelovirus*. O PMWaV-2 difere filogeneticamente do PMWaV-1 e PMWaV-3, mas todos são membros do gênero *Ampelovirus* e podem ser adquiridos e transmitidos por *Dysmicoccus brevipes* e *Dysmicoccus neobrevipes*. A espécie do PMWaV-3, possui homologia maior com PMWaV-1 (Figura 4) (SETHET et al., 2009; ICTV 2015).

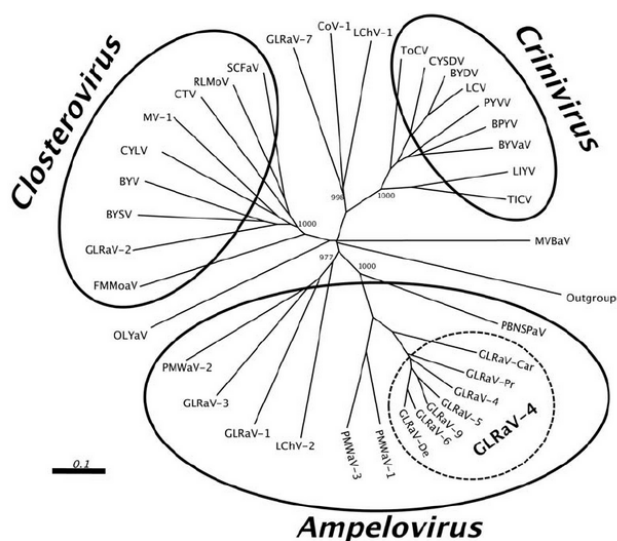


Figura 4. Árvore filogenética construída com seqüências de aminoácidos completas do gene HSP70h de membros da família Closteroviridae. Fonte: MARTELLI (2012)

1.5 A MURCHA DO ABACAXIZEIRO

A murcha do abacaxizeiro é causada pelo *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaV) em associação com a cochonilha *Dysmicoccus brevipes* (VENTURA; COSTA, 2002; VENTURA; ZAMBOLIM, 2002; MELZER et al., 2001, 2008; SETHER et al., 2005, 2009; GAMBLEY et al., 2008; MARTELLI E CANDRESSE, 2010).

Essa doença é a principal causa do fracasso da cultura no Havaí. Na Costa do Marfim e nos países da África, a doença causa até 70% de prejuízos, e em Cuba, a cultivar *Smooth Cayenne* tem perdas de até 40% da produção. Países como Austrália e Tailândia, também tem a cultura afetada pela murcha (PY et al., 1984; BORROTO et al., 2007, GAMBLEY et al., 2008).

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 encurvam 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 (VENTURA; COSTA, 2002; VENTURA; ZAMBOLIM, 2002). A doença é agressiva e raramente reversível; ocorre em pés isolados, na mesma linha ou reboleira de pequena dimensão (Figura 5).



Figura 5 Plantação de abacaxizeiro da cultivar Vitória na Fazenda Experimental do Incaper, Sooretama – ES. A área assinalada em vermelho apresenta sintomas de murcha em reboleira.

Entre a infestação da cochonilha e o aparecimento dos primeiros sintomas da doença, ocorre um período de incubação, que pode ser muito variável a depender da idade da planta, do período alimentar das cochonilhas e do seu número na planta. Normalmente a sintomatologia se evidencia, de dois a três meses após a infecção. No entanto, o desenvolvimento radicular já é afetado aos 42 dias após a infestação pela cochonilha (CUNHA et al., 1994).

No estágio final, as plantas, ao serem retiradas do solo, apresentam o sistema radicular totalmente destruído, embora as raízes mais novas estejam sadias. Nessa fase é rara a presença de cochonilhas, já que estas, por falta de alimento, migram para plantas vizinhas em bom estado vegetativo. O surgimento dos sintomas de murcha e a sua intensidade estão ligados à cochonilha, ao ambiente e a planta: vigor, idade, cultivar (SANTA-CECÍLIA, 2004; MATOS et al., 2007).

Em relação à virose nenhum método de controle é conhecido. Existem relatos de regressão dos sintomas em plantas doentes, após o tratamento com inseticidas, mas sem a confirmação de que a carga viral tenha sido reduzida (SANTA CECÍLIA et al., 2004; SETHER et al., 2009).

1.5.1 Ocorrência da doença no cenário mundial

No Havaí, a etiologia da murcha do abacaxizeiro envolve a alimentação da cochonilha e a presença de PMWaV-2. Embora a incidência de PMWaV-1 em abacaxizeiro havaiano seja superior ao PMWaV-2, a presença somente da cochonilha, ou em combinação com PMWaV-1, não resulta em doença no Havaí (SEThER e HU, 2002a,b; SETHER et al., 2005).

As espécies do PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 foram detectadas na Austrália em abacaxizeiros, junto com um *Ampelovirus* ainda não descrito, o *Pineapple mealybug wilt-associated virus 5*. Análises filogenéticas revelaram que PMWaV-5 é uma espécie distinta e mais estreitamente relacionada com PMWaV-1 (GAMBLEY et al., 2008). Sether e colaboradores (2001) mostraram que o PMWaV-1 foi detectado em um pequeno número de amostras de abacaxizeiros australianos. Com relação ao PMWaV-3, foi demonstrada a transmissão por *D. brevipes* e *D. neobrevipes* na ausência ou presença de PMWaV-1 ou PMWaV-2 (SEThER; HU, 2002).

Dentro de uma mesma região australiana de produção de abacaxi, foi observado uma forte associação entre a murcha e a infecção com PMWaV-2. Porém, PMWaV-1 e PMWaV-3 também foram detectados nas mesmas plantas amostradas, independentemente da severidade da doença. Em outra área, a incidência de PMWaV-2 foi baixa, enquanto que a presença do PMWaV-3 foi fortemente associada a murcha. A espécie do PMWaV-5 não foi associado com a doença nos locais estudados (GAMBLEY et al., 2008).

Os resultados dos estudos na Austrália não fornecem nenhuma associação consistente entre a presença de uma determinada espécie e a murcha. É possível que vários vírus possam contribuir isoladamente ou em combinação,

para a etiologia da doença, ou a interação sinérgica entre espécies diferentes (GAMBLEY et al., 2008; SETHER et al., 2010; DEY et al., 2012).

Estudos em regiões do Havaí e da Austrália confirmaram a presença do vírus PMWaV-1 em plantas assintomáticas, sem a ocorrência da doença, mesmo quando induzidas por seus vetores. Contudo, seu diagnóstico é importante por estar envolvido na redução da produtividade, e para reduzir o risco de efeitos sinérgicos com outros vírus (GAMBLEY et al., 2008).

O agente causal da doença em Cuba foi associada à espécie do PMWaV-2. No entanto, foi relatado que plantas afetadas com a murcha estavam infectadas com ambas as espécies, PMWaV-2 e PMWaV-3 (BORROTO et al., 2007). Nestas pesquisas não foi encontrado o PMWaV-1 nas amostras analisadas (HERNÁNDEZ et al., 2010).

No Brasil, as espécies encontradas foram do PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3. Porém, a relação destes vírus com o hospedeiro no desenvolvimento da doença ainda precisa ser elucidado.

Embora seja relatada a ocorrência de cinco vírus do complexo PMWaV, o PMWaV-4 e o PMWaV-5 não foram diretamente associados ao desenvolvimento dos sintomas, não sendo, portanto, ainda considerados como agentes patogênicos da murcha do abacaxizeiro (GAMBLEY et al., 2008).

1.5.2 Disseminação da doença

A disseminação do vírus da murcha do abacaxizeiro pode ocorrer de duas maneiras: ser transmitido por mudas infectadas e/ ou através de cochonilhas.

O PMWaV tem ocasionado problemas à cultura, principalmente pelo fato de ser disseminado pelo material propagativo e por apresentar diferentes espécies (GAMBLEY et al., 2008; SETHER et al., 2005). Por vezes plantas doentes que

não manifestam sintomas são classificadas como “sadias” apenas com base na avaliação visual dos sintomas. Mudas provenientes dessas plantas assintomáticas são as principais formas de levar a doença para novas áreas (VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

O vírus pode permanecer nos tecidos das plantas durante todo o ciclo da cultura sem manifestar os sintomas de murcha, o que só ocorre quando há presença do PMWaV-2 em associação as cochonilhas (VENTURA; ZAMBOLIM, 2002). Entretanto, há questionamentos sobre a coparticipação das espécies PMWaV-1 e PMWaV-3 em relação a doença.

A associação simbiótica das cochonilhas com as formigas favorece sua movimentação para as plantas vizinhas, surgindo sintomas da murcha em reboleira (Figura 6). Sem as formigas, as populações de cochonilhas são pequenas e lentas, o que reduz o fluxo de infestação e probabilidade de perda da produção (SILVA et al., 1968; MENEZES, 1973; JAHN et al., 2003).

As cochonilhas têm a capacidade de se movimentar na planta, e suas larvas possuem prolongamentos ao redor do corpo que facilitam a dispersão pelo vento, podendo alcançar plantações adjacentes infectando novas plantas com o vírus (SETHER, et al., 1998).

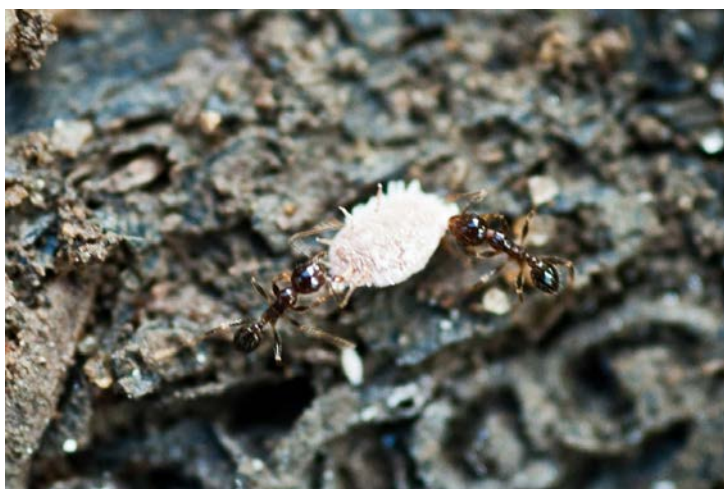


Figura 6 Transporte das cochonilhas pelas das formigas.

No ciclo do abacaxizeiro, a fase da iniciação floral natural é em média de 10 meses, seguido da reprodutiva de 6 meses, e a fase propagativa, entre 4 a 10 meses para mudas do tipo filhote e, de 2 a 6 meses, para mudas do tipo rebentão (REINHARDT et al., 2000). Tais mudas assintomáticas no campo ou obtidas da técnica de cultura de tecidos são outra forma de disseminação do vírus do PMWaV.

Para acelerar a multiplicação e, simultaneamente, diminuir o potencial ou até mesmo evitar a disseminação de pragas e patógenos, técnicas de cultura de tecidos têm sido empregadas para a propagação *in vitro* do abacaxizeiro. A técnica consiste na produção de plântulas por gemas apicais e das axilas das folhas. Em laboratório sob condições de temperatura e luminosidade controladas, são produzidas mudas clonais de abacaxizeiro uniformes.

Desde 1952, a técnica tem sido utilizada para eliminação de patógenos a fim de obter material de propagação com alta qualidade fitossanitária (CRUZ-CRUZ et al., 2013). Sether e colaboradores (2001) mostraram a eliminação do PMWaV-1 em abacaxizeiros por meio da propagação de gemas axilares e apicais. As análises do tratamento foram realizadas por RT-PCR e TBIA. As mudas foram cultivadas no solo por mais de 12 meses, e as plantas mantiveram livre do PMWaV-1.

Mudas de cultura de tecido provenientes de abacaxizeiro assintomáticos, de diferentes genótipos, foram examinadas por PCR convencional. De 20 amostras, três apresentaram infectadas pelo complexo viral causador da murcha do abacaxizeiro (AMORIM 2011). O cultivo *in vitro* de meristemas apicais obtidos de abacaxizeiros infectados também não foi eficiente para limpeza do PMWaV (SANTOS et al., 2012).

A limpeza clonal de abacaxizeiros a partir da técnica de cultura de tecidos no abacaxizeiro deve ser melhor avaliada. A metodologia é uma estratégia para o estabelecimento de estoques de plantas matrizes livres de vírus. Para disso, um método de diagnóstico mais sensível deve ser validado, devido a necessidade de detecção viral em baixos títulos.

Tendo em vista que as mudas são altamente eficientes na dispersão do vírus, as medidas de controle devem ser dirigidas inicialmente para a origem e o aspecto fitossanitário do material de plantio. No País não existe legislação que estabeleça normas específicas para essa doença e os padrões de identidade e qualidade para a produção e a comercialização de mudas de abacaxizeiro (VENTURA; COSTA, 2002; GAMBLEY, 2008; SETHER et al., 2005). Isso está especialmente relacionado a falta de uma metodologia validada confiável para a indexação dos três vírus em mudas e plantas assintomáticas.

1.5.3 Técnicas para detecção do vírus do PMWaV

Metodologias de diagnóstico têm sido empregadas para detecção do PMWaVs, como, ELISA, análise de dsRNA, Tissue Blot Immunoassay (TBIA), Transcriptase Reversa PCR (GUNASINGHE; GERMAN, 1989; SETHER et al., 2001, 2005; BORROTO-FERNANDEZ, 2007). Porém, devido à sensibilidade desses testes, não é possível na maioria das vezes, a detecção da infecção em plantas assintomáticas, que é fonte de mudas para novo plantio. Nos diferentes países em que a murcha do abacaxizeiro afeta a cultura, a detecção das espécies do vírus foi determinado PCR convencional.

Técnicas moleculares mais sensíveis, qPCR, a partir do gene da CP do vírus, estão limitadas para o estudos do PMWaV-2 devido aos relatos da sua associação com a doença (VENTURA; ZAMBOLIM, 2002). No entanto,

existem questionamentos sobre a real participação das espécies PMWaV-1 e PMWaV-3 em relação a doença, exigindo a condição fitossanitária completa do abacaxizeiro para certificação das mudas comerciais.

É de grande importância ter uma técnica sensível e específica para diagnóstico confiável das plantas (JAMES et al., 2006; PALLAS et al., 2009; BUSTIN et al., 2009; DUBIELA et al., 2013; GALLELLI et al., 2014). A análise por quantificação relativa em RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) é uma técnica que atende a esses requisitos, e pode ser aplicável para análise de abacaxizeiros sintomáticos e assintomáticos.

Para análise da expressão do gene alvo por qRT-PCR, é essencial a normalização da técnica para ajustar variações experimentais (NICOT et al., 2005). A quantidade de amostra, a integridade do RNA, qualidade do cDNA, bem como os tecidos ou as atividades celulares, são os fatores que podem afetar a expressão do gene (TESTE et al., 2009).

Geralmente, os normalizadores são genes constitutivos, ou seja, que tem expressão constante na mesma espécie, tecidos, estágios de desenvolvimento e não são afetados por condições experimentais. Um ou vários genes de referência ou Housekeeping podem servir para esse controle interno. A validação prévia de todos os genes de referência deve ser realizada, para confirmar as suas estabilidades de expressão, a fim de evitar a interpretação dos dados imprecisos, e subsequente falsas conclusões (MA et al., 2012; LING et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014).

A avaliação dos genes de referência também pode ser realizadas por softwares específicos. O GeNorm avalia o valor de estabilidade de expressão para cada gene e identifica o melhor par de genes de referência. O NormFinder estima o desvio padrão para cada gene e o compara com a expressão de outros genes. A menor variação entre as comparações intra e inter-grupos é considerado o gene mais estável. BestKeeper é um método baseado no cálculo de um índice

de estabilidade e fornece a indicação mais elevada, porque compara todos os genes em todas as amostras. O método delta Ct comparativo, compara os valores de Ct básico e a expressão relativa de pares de genes com cada amostra (RODRIGUES et al., 2014).

A partir dessas análises é determinado um ou mais genes de referência que normalizam a técnica de quantificação em tempo real, permitindo avaliar a expressão de genes sob diferentes condições experimentais. Para abacaxizeiro sob estresses abiótico, quatro genes de referência já foram analisados (MA et al., 2012). Na condição do abacaxizeiro sob estresse biótico nenhum trabalho ainda foi realizado.

A validação dos genes de referência, e por conseguinte, de uma metodologia para detecção dos três vírus viabiliza o diagnóstico dos vírus nas plantas, levando a produção e a certificação de mudas comerciais sadias. Além disso, o método permite uma melhor compreensão dos fatores relacionados a murcho do abacaxizeiro, a avaliação de técnicas para tratamento da doença, e direciona a estudos para desenvolvimento de genótipos resistentes aos vírus do PMWaV.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método para o diagnóstico do vírus da murcha do abacaxizeiro, por meio da identificação genes específicos, para indexação e certificação de material propagativo de abacaxizeiro livre do complexo do *Pineapple mealybug wilt-associated virus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e validar genes de referência para estudo da expressão gênica em folhas e em mudas de abacaxizeiros infectados pelos vírus do complexo PMWaV;
- Estabelecer uma metodologia por PCR em tempo real capaz de detectar os vírus: PMWaV- 1, PMWaV-2 e PMWaV-3 nas plantas;
- Avaliar a transmissão das três espécies de vírus pela cochonilha *Dysmicoccus brevipes*.
- Analisar a presença dos vírus nas principais cultivares comerciais de abacaxizeiro.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA DO MATERIAL UTILIZADO NAS ANÁLISES

Para análise, plantas das cvs. Smooth Cayenne, Pérola e Vitória, mudas de cultura de tecido da cv. Vitória, e cochonilhas *Dysmicoccus brevipes* foram obtidas na Fazenda Experimental do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), em Sooretama e do Centro Regional de Desenvolvimento Rural-Centro Serrano (CRDR-CS), Domingos Martins, Espírito Santo, Brasil. Todas as plantas foram mantidas em vasos no telado do núcleo de Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo, durante a realização dos experimentos.

A seleção das plantas no campo foi realizada pela análise visual dos sintomas da murcha, coletadas isoladamente ou grupos de plantas com sintomatologia variável (Figura 7).

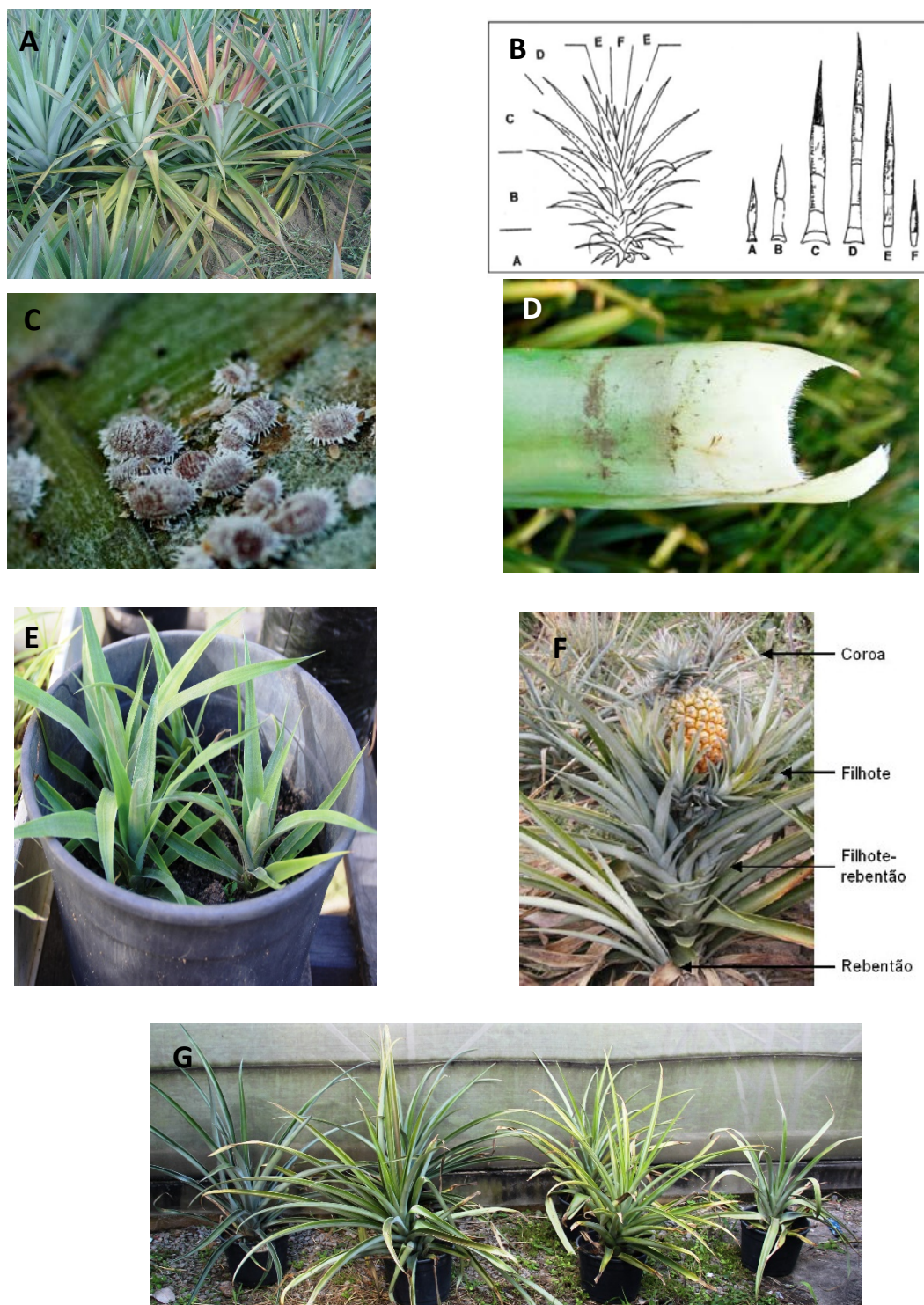


Figura 7 Amostras utilizadas para extração do RNA do PMWaV. Plantas sintomáticas e assintomáticas (A); distribuição das folhas do abacaxizeiro de acordo com a idade (B); cochonilhas, *Dysmicoccus brevipes* na raiz da planta hospedeira (C); Folha "D" do abacaxizeiro da cv. Vitória, mostrando a parte aclorofilada e aclorofilada (D); mudas de abacaxizeiro cv. Vitória obtidas de cultura de tecido (E); mudas na planta matriz para propagação de um novo plantio (F); grupos de plantas com sintomatologia variável (G).

3.2 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS

A extração do RNA foi obtida pelo protocolo do Doyle e Doyle (1990) modificado, método de Gibbs e Mackenzie (1997) adaptado, Reagente Trizol® modificado, RNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN) e PureLink® RNA Mini Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA).

Após a coleta ou retirada do ambiente de conservação, as amostras foram lavadas em água corrente, imersas em solução alcoólica 70%, posteriormente em água destilada, e secas com papel-toalha.

Para o processo de lise celular, pesou-se 100mg de material vegetal, colocou-se no tubo de 2 mL adicionou-se o tampão de extração do Kit comercial e 4 esferas de 5 mm. O tratamento ocorreu em moinho de bolas criogênico (Laarmann, Holanda) a uma frequência de 30/s por 20 segundos. Para os outros protocolos de extração e também para Kits comerciais, a trituração foi realizada em nitrogênio líquido até pó fino, de forma ágil e sem deixar a amostra descongelar. Posteriormente, o pó foi transferido para tubo previamente gelado, e imediatamente pesado 100mg, e acrescentado 600µL tampão ou reagente de extração. Os insetos foram macerados diretamente no tampão ou reagente de extração com bastão de vidro.

Após o preparo da solução com material pulverizado seguiu-se o procedimento de cada protocolo de extração, já que possuem etapas diferentes para obtenção do RNA total.

- Protocolo de Doyle e Doyle modificado

O lisado obtido do tampão de extração CTAB (1% CTAB; 1,4 M NaCl; 20mM EDTA; 100 mM Tris-HCl, pH 6,8; 1% PVP e 0,1% -mercaptoetanol) foi submetido à agitação em vórtex, alternada com imersão em gelo, por 4 vezes, seguida de centrifugação a 12.000 rpm (11.269 G) a 4°C por 15 minutos. Aos sobrenadantes adicionaram-se 200 µL de fenol e 100 µL de clorofórmio, seguida de centrifugação nas mesmas condições citadas acima. Essa etapa foi repetida e ao sobrenadante foram adicionados 300 µL de clorofórmio, seguida de centrifugação nas mesmas condições. Ao novo sobrenadante adicionaram-

se 500 µL de etanol absoluto e 50 µL de acetato de sódio 3 M para precipitação por 12 horas a -20° C. O precipitado foi centrifugado por 50 minutos nas condições acima.

- Protocolo de Gibbs e Mackenzie adaptado

O lisado obtido do tampão de extração CTAB 2% foi incubados a 55°C por 20 minutos. Adicionaram-se 300 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), seguida de centrifugação 14.000 rpm (15.339 G) a 4°C por 5 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para novo tubo e acrescentou-se 0,1 volume de acetato de amônio 7,5 M e 1 volume de isopropanol gelado. Centrifugou-se durante 30 minutos a 14.000 rpm (15.339 G) a 4°C.

- Protocolo do Reagente Trizol® modificado

O lisado obtido do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, EUA) foi incubado por 5 minutos a 30°C. Acrescentaram-se 200 µl de clorofórmio, agitou vigorosamente por 15 segundos e incubou por 3 minutos a 30°C. Em seguida centrifugou a 12.000 rpm (11.269 G) a 4°C por 15 minutos. Transferiu a fase aquosa para novo tubo, adicionaram 500 µl de álcool isopropílico, incubou durante 10 minutos a 30°C e centrifugou nas mesmas condições por 10 minutos.

O *pellet* gelatinoso ficou depositado no fundo do tubo. Desprezou o sobrenadante com cuidado para não perder o *pellet*. Adicionaram-se 1000 µl de álcool etílico 75° e centrifugou a 7.500 rpm (4.402 G) por 5 minutos, a 4°C. Removeu-se o sobrenadante e deixou-se o *pellet* secar, por aproximadamente 10 minutos na câmara de fluxo laminar e ressuspensos em 10 µL de água Mili Q. A quantificação e análise da pureza das amostras foram realizadas no espectrofotômetro Nanodrop® 2000 (Thermo Scientific, Carlsbad, EUA).

Os ácidos nucléicos extraídos com protocolos convencionais foram tratadas com DNase (RQ1 RNase-Free DNase, Promega) de acordo com orientação do fabricante.

- Kits de extração comerciais

Para análises no qPCR, a extração do RNA foi realizada com kits comerciais de acordo com orientação do fabricante. O princípio de ambos os métodos é o mesmo, no entanto, o Kit QIAGEN possui uma etapa de filtragem do lisado. Isso evita que a coluna subsequente, ao qual será selecionado o RNA, não sofra rupturas ou entupimento com resíduos do macerado.

3.3 Confeção dos *primers*

Para determinar os genes de referência e específico, para o abacaxizeiro infectado com PMWaV, foi realizada uma análise *in silico*, considerando dados da literatura e genes que já haviam sido usados para estudo da expressão gênica em abacaxizeiro, e em plantas infectadas por vírus. Através do banco de dados do NCBI foi verificado quais dos genes escolhidos haviam depositados para o abacaxizeiro (NICOT et al., 2005; JAIN, et al., 2006; BUSTIN et al., 2009, MA et al., 2012; LIU et al., 2012; RODRIGUES et al., 2014).

Os genes que codificam a região conservada da proteína de choque térmico, Hsp70h, de cada estirpe, foram selecionados para confecção dos *primers* específicos para amplificação PCR convencional e PCR em tempo real, com base nos estudos de Sether e Hu (2005) e Gambley (2008).

Utilizando software Primer3, os *primers* referentes aos genes candidatos foram desenhados. Através do BLAST e CLUSTAL *multiple sequence alignment* foram realizados o anelamento das sequências, para verificar a especificidade das sequências selecionadas, e posteriormente prosseguiu para a confecção dos *primers* (Figura 8).

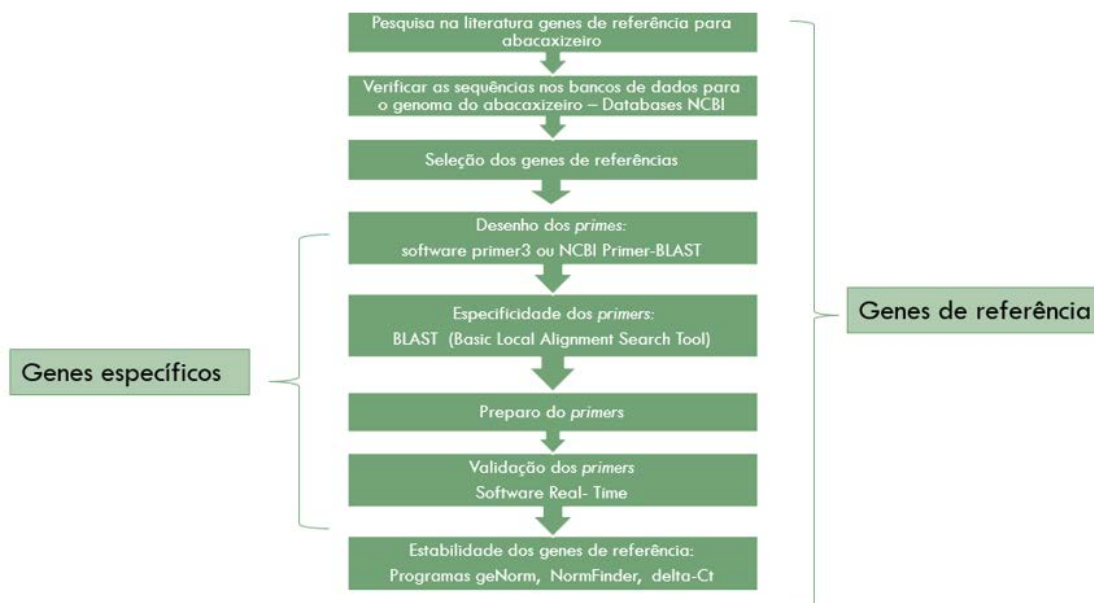


Figura 8 Análise *in silico* dos genes específicos e de referência para o preparo dos *primers* para validação da técnica de RT-PCR em tempo real.

3.4 CONDIÇÕES PARA A SÍNTESE cDNA E ANÁLISE POR RT-PCR

A partir 1µg de RNA foi realizada a síntese do cDNA com *primer* randômico (250 ngµl⁻¹) e kit *M-MLV Reverse Transcriptase* (Promega), de acordo com orientações fabricante.

A partir de 2 µL de cDNA, 1µL mix primer F e R (100 ngµL), utilizando o kit GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega), de acordo com orientação do fabricante, foram realizadas as reações PCR convencional no Termociclador Mastercycler personal (Eppendorf®) com a seguinte ciclagem: 94°C por 1 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 seg, com temperatura de anelamento de 57°C para PMWaV-1 e 51°C para PMWaV-2 e PMWaV-3 por 30 seg, 72°C por 1 min, e 72°C por 3 min.

Os testes foram realizados em duplicada, e os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídeo, e visualizados no sistema de captura de imagem L-HE-Pix/L-Pix IMAGE (Loccus Biotecnologia, Cotia, Brazil). A avaliação da integridade do RNA foi confirmada por RT-PCR com gene da actina. A parte aclorofilada da folha D, coletada no momento da extração, foi usada como controle.

3.5 CONDIÇÕES PARA AS ANÁLISES NO PCR EM TEMPO REAL

Os cDNAs para o experimento no PCR em tempo real foram preparados a partir de 100ng de RNA total com Kit High Capacity cDNA (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA). Para determinar a curva padrão foi feita diluição seriada do RNA total (100 ng, 10 ng, 1 ng, 0,1 ng e 0,01 ng) de um abacaxizeiro infectado com PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3, indexado previamente em RT-PCR convencional. A partir de 10 ng de RNA total foram realizadas as análises subsequentes.

Para um volume final de 20 μ L de reação utilizou-se, 10 μ L SYBR Green PCR kit Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA), 1 μ L mix *primer* F e R, a 50 ng μ L para PMWaV-1; 25 ng μ L para PMWaV-2, GAPDH e 18S; 50 ng μ L para PMWaV-3, ACT e Ef1 α . Essa mistura foi incubada a 95°C por 10 min, seguida por 40 ciclos a 95°C por 15 s e 60°C por 1 min, no equipamento 7500 Fast Real-time PCR (Life Technologies, Carlsbad, EUA). A curva de *melting* foi gerada a 95°C por 15 s e 60°C por 1 min e 95°C por 15 s. Os dados foram analisados usando SDS Software System 7500 versão 2.0.1 (Applied Biosystems).

Após quarenta ciclos de amplificação todas as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação, a fim de validar a ausência de produtos não

específicos e dímeros de iniciadores. Foi avaliada também a eficiência dos *primers*, e em seguida a análise e determinação do controle interno, para uniformidade dos dados (LING et al., 2014). Através do algoritmo NormFinder e GeNorm foi determinado o gene de maior estabilidade (TESTE et al., 2009; MA et al., 2012).

Os resultados foram apresentados a partir dos valores de Ct (cycle threshold) em 3 replicatas biológica e experimental em placas, normalizados com gene de referência mais estável, para planta adulta e mudas. O RNA total de abacaxizeiro sadio foi utilizado como amostra controle. O abacaxizeiro infectado com os 3 vírus, indexados por PCR convencional, foi utilizado como controle positivo.

3.6 DISTRIBUIÇÃO DOS VÍRUS PMWaV-1, PMWaV-2 E PMWaV-3 NOS TECIDOS DE ABACAXIZEIRO

A técnica RT-PCR convencional e método de extração Doyle e Doyle foram utilizados para verificar a distribuição dos vírus nos diferentes tecidos: raízes, folhas velhas (A e B), folhas novas (C, D, E e F), coroa, gemas apicais e laterais e mudas (PY et al., 1986). Da mesma folha foi usada a região clorofilada e aclorofilada. Para o diagnóstico na cochonilha a extração foi realizada pelo método Gibbs e Mackenzie (Figura 9).

Para a padronização da técnica em tempo real a extração do RNA viral foi realizada com kits comerciais e reagente Trizol®. As amostras utilizadas foram região aclorofilada e clorofilada da folha da posição D na planta, e mudas originadas da técnica de cultura de tecidos, infectadas e não-infectadas (Figura 9). Os genes de referências foram padronizados para ambas as amostras.

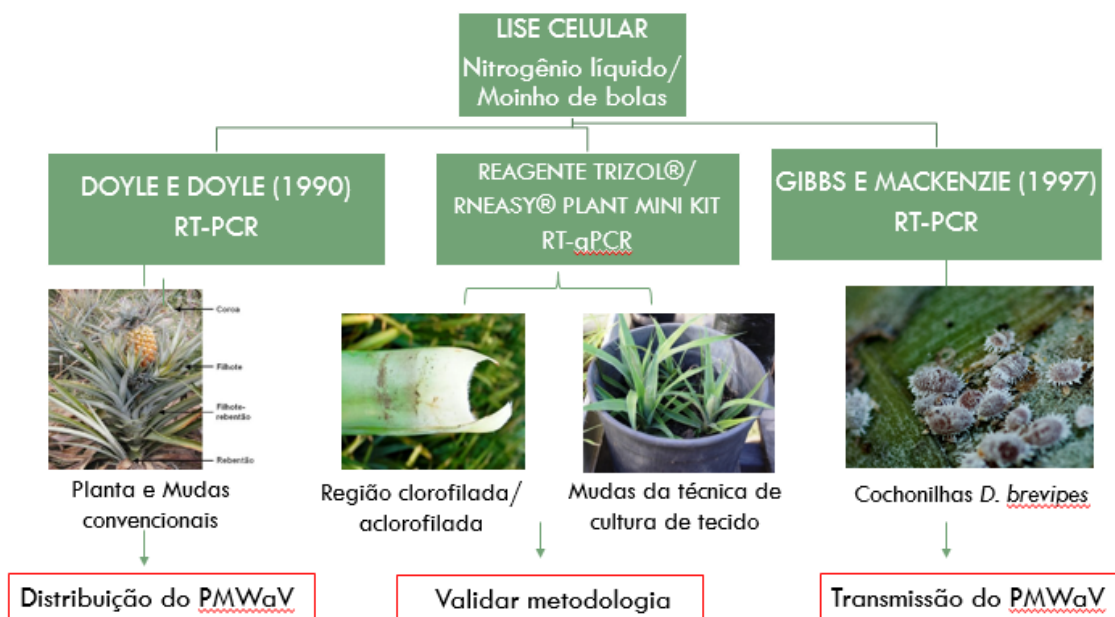


Figura 9 Amostras e metodologias utilizadas para as diferentes análises realizadas na pesquisa.

3.7 SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DA PCR

3.7.1 Clonagem

Para confirmar a especificidade da reação o produto da PCR foi purificado utilizando-se o Kit Pure Link™ Quick PCR Purification (Invitrogen, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. O resultado foi confirmado por eletroforese em gel de agarose 1,2%. O gene de interesse foi inserido no vetor pGEM-T easy® através de uma reação de ligação, de acordo com o fabricante. A mistura de ligação foi preparada empregando-se um volume final de 5 µL constituídos de 1,5 µL produto de PCR, 0,5 µL da enzima T4 DNA ligase (6U), 2,5 µL do tampão de ligação para a enzima T4 DNA ligase (2x) e 0,5 µL da solução contendo o vetor pGEM-T easy a 50 ng/µL. Água Milli-Q foi utilizada para completar o volume total. Esta reação ficou incubada a aproximadamente a 10° C por 18 horas.

3.7.2 Transformação da Bactéria *Escherichia coli* DH5_ com o Plasmídeo Recombinante pGEM-T easy

As suspensões de células competentes DH5_, estocadas a -80° C, preparadas no próprio laboratório, foram mantidas em banho de gelo até completar o seu descongelamento. A cada 100 µL de célula DH5_ foram adicionados 5 µL da reação de ligação. A mistura resultante foi homogeneizada gentilmente. Em seguida, um choque térmico por eletroporação (P1= 1700) foi realizado e as células devolvidas ao gelo. Após este período, 400 µL de meio LB líquido foram adicionados ao tubo contendo a célula transformada e a reação de ligação. A nova mistura foi mantida a 37° C por 1 hora sob agitação em incubadora refrigerada. Após esse período as células foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio seletivo LB sólido (LB: 0,5% extrato de levedura, 1% bacto-triptona, 1% NaCl e 1,5% Agar) suplementado com 20 µL do antibiótico de seleção ampicilina a 50 mg/mL, 100 µL de IPTG 0,1 M e 20 µL de Xgal 50ng/µL, e incubada por 18 horas a 37° C em estufa. Em seguida, um clone de cada amostra foi transferido para meio LB líquido e incubados a 37°C por 12 h. Alíquota de cada clone foi transferida para tubos contendo glicerol 50%, imediatamente congelados e estocados a - 80°C. Das células restantes foi realizada a extração com o Kit Charge Switch® - Pro – Plasmid MiniPrep (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante.

3.7.3 Análise de restrição dos clones obtidos e sequenciamento

A confirmação da clonagem foi realizada através de uma reação de restrição dos plasmídeos isolados utilizando-se as enzimas *ECORI*-3 (Invitrogen) para liberação do inserto. A restrição foi realizada empregando-se um volume final de 10 µL constituídos de 1 µL do DNA plasmidial a 1000 ng/µL, 1 µL da enzima, 1 µL do tampão de enzima (10x). Esta reação foi mantida a 37° C por 1 horas. O produto de digestão foi analisado em gel de agarose 1,2%, corado com solução de brometo de etídio a 1 µg/mL e visualizado sob luz UV. As amostras obtidas da espécie do PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 foram

enviadas para Macrogen Inc. (Seoul, Coréia do Sul) para sequenciamento em Sanger. A identidade das sequências para cada espécie foi determinada utilizando BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.8 TRANSMISSÃO DO PMWaV-1, PMWaV-2 E PMWaV-3 POR MEIO DAS COCHONILHAS

Para avaliar a transmissão do PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 por meio do vetor, abacaxizeiros da cultivar Smooth Cayenne infectado e colonizados por cochonilhas foram selecionados. Amostras de cochonilhas e folhas dessas plantas foram indexadas, por PCR convencional, para a confirmação da presença dos três vírus (Figura 9). Dessa planta foram transferidos dez insetos para cada muda livre de vírus, avaliadas previamente por PCR em tempo real (Figura 10). Após 75 dias, os ensaios foram executados para detectar cada uma das espécies dos vírus nas mudas e cochonilhas presentes.



Figura 10 Processo de transmissão viral para mudas por meio das cochonilhas. A) Abacaxizeiro infectado com 3 espécies de vírus. B) Cochonilhas infectadas obtidas das plantas doentes. C) Mudanças de cultura de tecido saudáveis que receberam as cochonilhas infectadas para avaliar a transferência dos vírus.

As mudas infectadas, obtidas desse processo, foram utilizadas como controle positivo, para padronização da técnica de PCR em tempo real, no material propagativo originado da técnica de cultura de tecido.

3.9 PRESENÇA DOS VÍRUS EM DIFERENTES CULTIVARES DE ABACAXIZEIRO

Para avaliar a presença dos vírus nas cultivares com valor comercial, 'Smooth Cayenne', 'Pérola' e 'Vitória', plantas foram coletadas no campo e mantidas no telado da Universidade por 30 dias para adaptação.

As plantas foram coletadas e agrupadas de acordo com a presença e severidade dos sintomas, considerando a coloração e o nível de encurvamento das folhas. As plantas com sintomas leves apresentavam-se avermelhadas (grupo 2), o que as caracteriza e as diferencia, das plantas assintomáticas (grupo 1), que mantiveram a cor verde. A cor vermelha mais intensa representava os abacaxizeiros com sintomas mais avançados (grupo 4), sendo perceptível que as plantas com sintomas severos, possuíam encurvamento das folhas desde a base até o ápice, enquanto que as plantas com muitos sintomas (grupo 3), as folhas dobravam-se somente na base junto ao caule, e tinham as margens do limbo dobradas para dentro. A queima na ponta das folhas aparecem em todos os estádios da doença (Figura 11).



Figura 11 Abacaxizeiros da cv. Pérola agrupados de acordo com a sintomatologia. Da esquerda para direita é observado o agravamento dos sintomas da murcha do abacaxizeiro. As plantas foram coletadas e agrupadas de acordo com sintomas: grau 1 - plantas com ausência de sintomas; grau 2 - plantas com sintomas leve; grau 3 – plantas com sintomas intenso; e grau 4 – plantas com sintomas severo.

Cada grupo era composto por 6 plantas e foi classificado em: grau 1 - plantas com ausência de sintomas; grau 2 - plantas com sintomas leve; grau 3 – plantas com sintomas intenso; e grau 4 – plantas com sintomas severo.

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE DOS GENES E *PRIMERS* SELECIONADOS

4.1.1 Genes selecionados

Análise de bioinformática para avaliar os genes e desenho dos *primers* é crucial para o sucesso no diagnóstico RT-PCR. Os genes de referência: ACT, Ef1 α , GAPDH e 18S ribossomal foram selecionados para normalização da técnica do PCR em tempo real, com base na revisão de literatura, e depósitos no banco de dados do NCBI (Anexo).

Subere e colaboradores (2009), utilizaram o gene da CP para analisar a carga viral do PMWaV-2, através da quantificação absoluta em PCR tempo real. No nosso estudo, o gene da HSP 70 foi o escolhido, por ser a região conservada de cada espécie do PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3, disponibilizando um método acessível para diagnóstico dos três vírus.

A escolha do gene da HSP 70 também se baseou nos estudos de Melzer e colaboradores 2001. Com *primers* degenerados, que amplificam o gene conservado HSP70, seguidos de clonagem e sequenciamento, foram identificados as espécies virais diferentes, designados como PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 (MELZER et al., 2001). Posteriormente, o diagnóstico por PCR Convencional das espécies, nas regiões onde a doença ocorre, também foram realizadas utilizando tal gene. A existência desses dados, reforçou a seleção desse gene, como teste, para o desenho dos *primers*, e a detecção de forma específica e sensível do RNA dos vírus por PCR tempo real (Tabela 1).

A sequência do gene da HSP 70 para a espécie do PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3, e respectivamente, seus acessos no banco de dados, HE583225.1,

EU01667.5 e FJ209047.1, utilizados para confecção do *primers* foram mostrados no Anexo B.

Tabela 1 Lista dos *primers* desenhados para a detecção das espécies do PMWaV por PCR convencional e tempo real.

Primers	PCR Convencional	PCR Tempo Real
PMWaV-1 R	ACAGGAAGGACAACACTCAC	GCAGGCGGTAGTAAACGAA
PMWaV-1 F	CGCACAAACTTCAAGCAATC	AAGTGCCTCCTCCGAAATC
PMWaV-2 F	CATACGAAGTACTCATACTAG	ACGGTACCAGCCGACTACA
PMWaV-2 R	CCATCCACCAATTTTACTAC	CAGCGGTTCGGTTCATTTAC
PMWaV-3 F	AGTTCACTGTAGATTTTCGGA	TGACGTTGTCGGTGTGTTC
PMWaV-3 R	ATTGATGGATGTGTATCG	ACCACCGCCTGTACGTTTA

Análise *in silico* mostrou a especificidade das sequências desenhadas para o PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3, com o gene da HSP 70 específico, de cada espécie de vírus (Anexo C). Nas análises realizadas, também não foi observado alinhamento das sequências dos *primers* com o abacaxizeiro.

A região em que os *primers* específicos do PCR convencional (letra maiúscula) e PCR em tempo real (letra minúscula) alinham no gene da HSP70 da espécie do PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 são apresentados no Anexo D. O alinhamento do *primer* para PMWaV-1, no gene Hsp70 referente ao PMWaV-2 e -3; do *primer* para PMWaV-2, no gene Hsp70 referente ao PMWaV-1 e PMWaV-3; e do *primer* para PMWaV-3, no gene Hsp70 referente ao PMWaV-1 e PMWaV-2, mostraram a especificidade das sequências desenhadas. Utilizando o programa BLAST no NCBI (SRIVASTAVA et al., 2011) e CLUSTAL multiple sequence alignment by Kalign (2.0)

4.2 DETECÇÃO MOLECULAR DO PMWaV POR PCR CONVENCIONAL

4.2.1 Lise celular do material vegetal

O tratamento de lise celular ao qual foram submetidas às amostras, tanto para folhas de planta adulta, quanto para as mudas, foram eficientes para extração dos ácidos nucleicos e posterior amplificação do RNA viral no PCR convencional e tempo real (Tabela 2). No sistema de moinho de bolas a maceração ocorreu em 20 s, enquanto que, no nitrogênio líquido em grau e pistilo são gastos em torno de 10 min por amostra. A precisão da quantidade de amostra e a maior simplicidade do processo fazem com que o processamento no equipamento seja mais vantajoso, quando comparado ao manual. As chances de contaminação, e conseqüentemente, o custo, também são menores no sistema de moinho de bolas.

Tabela 2 Quantificação e análise da pureza realizadas no espectrofotômetro Nanodrop® 2000 de abacaxizeiros submetidos a diferentes tratamentos para lise celular.

Método para lise celular	Abacaxizeiro	³ Grau de Pureza (A260/A280)	² Grau de Pureza (A230/A260)	¹ Concentração média de RNA total (ng/μl)
Nitrogênio líquido	A	2,01	1,93	174
	B	2,02	1,89	186
	C	1,82	1,60	152
	D	1,86	1,80	129
Moinho bolas	E	2,00	1,60	197
	F	2,10	1,80	263
	G	2,07	1,40	183
	H	2,08	1,60	148

1) O RNA total de todas as amostras foi extraído com RNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN); 2) Absorbâncias A260/A230 (contaminação por polissacarídeos ou polifenóis); 3) Absorbância 3A260/280 (contaminação por proteínas) devem estar entre 1,8 e 2,1.

4.2.2 Métodos de extração

A extração dos ácidos nucléicos foi a etapa determinante. Devido à presença da grande variabilidade e quantidade de compostos secundários em plantas, não existe um método padrão para o isolamento de ácidos nucléicos que possa ser utilizado para todas as espécies (CAMPOS et al., 2010).

Os três métodos de extração selecionados, Doyle e Doyle, Gibbs e Mackenzie e pelo o reagente Trizol[®], apresentaram resultados satisfatórios para obtenção do RNA total. Porém, devido as diversos tipos de amostras utilizados, foi observado particularidades no que se refere à parte da planta e a eficiência de determinado protocolo (Tabela 3).

Tabela 3 Protocolos de extração do RNAtotal e amostras utilizadas nas análises.

Protocolo	Material indicado
Doyle e Doyle	região aclorofilada das folhas, mudas e gemas
Gibbs e Mackenzie	Cochonilha
Trizol [®]	região clorofilada, cultura tecidos, e cochonilha
Kits comerciais	todas as amostras, e raiz

Para extrações da parte clorofilada da planta, assim como, para as mudas de cultura de tecido, recomenda-se o protocolo do Trizol[®]. No primeiro contato com o macerado, a clorofila foi oxidada e, apenas em uma etapa de separação, a fase aquosa, que contém os ácidos nucléicos, ficou límpida, formando um *pellet* incolor e garantindo a amplificação posterior.

A agilidade do protocolo Trizol[®] está no fato de exigir somente uma etapa de separação e não precisar de tempo para precipitação. Além disso, para reduzir custo, o protocolo original sugere 1 mL de reagente nas extrações, no entanto, metade da quantidade é o suficiente. O protocolo também sugere incubação do *pellet* ressuspenso a 60°C por dez minutos, entretanto essa

etapa não foi realizada, sem prejuízos para o resultado. O método do Trizol® é o mais aplicado atualmente na extração de RNA de plantas.

A eficiência do Trizol® pode ser explicada pelo contato direto do material vegetal clorofilado com o fenol. Este separa o RNA das proteínas e o clorofórmio age na retirada do fenol e contaminantes, além de solubilizar lipídeos (CAMPOS et al., 2010). Também se deve ressaltar, a eficiência do isocianato guanidina, usado para inibir a atividade de RNAses em todas as etapas do processo.

Tecidos ricos em polifenóis ou polissacarídeos impõe uma maior dificuldade para extração. O CTAB tem a capacidade de separar os polissacarídeos dos ácidos nucleicos. Possivelmente esse foi o fator determinante para a eficiência do isolamento do RNA pelo método de Doyle e Doyle, devido ao predomínio da região aclorofilada por polissacarídeo, em relação a região clorofilada.

É muito importante para o sucesso do isolamento de RNA que os polifenóis e polissacarídeos, não se liguem aos ácidos nucleicos interferindo na quantidade, qualidade e integridade da amostra (SUZUKI et al., 2005; ZAMBONI et al., 2008; CAMPOS et al., 2010). Provavelmente essa é a explicação para a inviabilidade do reagente Trizol® para a extração da região aclorofilada. As amostras extraídas com esse reagente ficaram com pellet esbranquiçado.

Para extrações de cochonilhas, o método de Gibbs e Mackenzie foi eficiente, simples, rápido e baixo custo em relação aos outros métodos utilizados. Ao utilizar até 3 insetos, não houve interferentes no extrato para inibir reação de PCR (AMORIM, 2011). Esse método de extração foi utilizado para detecção do vírus da videira nas plantas e cochonilha *Pseudococcus longispinus* (KUNIYKI et al., 2006). Para extração de material vegetal de abacaxizeiro foi inviável, provavelmente devido ao tecido fibroso e/ ou por não utilizar fenol.

O isolamento do RNA para análise no PCR em tempo real deve ser realizado com Kit comercial, apesar de mais oneroso. Para técnicas moleculares mais sensíveis, como estudos de expressão gênica, é necessário o isolamento do RNA com alta qualidade (CAMPOS et al., 2010). Métodos convencionais podem ser usados para extração, no entanto, é necessária a purificação das amostras com Kit comercial.

4.2.3 Seleção plantas doentes e sadias

Por meio da PCR convencional, plantas doentes infectadas com os três vírus, e amostras de plantas assintomáticas foram selecionadas para padronização da técnica em PCR tempo real. A presença do PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 foi evidenciada nas plantas doentes caracterizados aos *amplicons* com 589pb, 609pb e 495pb, respectivamente (Figura 12).

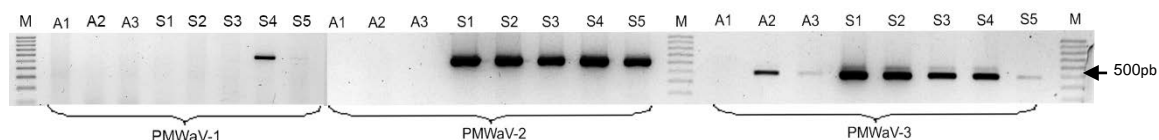


Figura 12 Detecção do PMWaVs por RT-PCR. (A) PMWaV- 1, *amplicon* com 589pb; (B) PMWaV-2, *amplicon* em 609pb; (C) PMWaV-3, *amplicon* em 495pb. Os A1, A2 e A3 são amostras de abacaxizeiros assintomáticos, e S1, S2, S3, S4 e S5, amostras de abacaxizeiros doentes. (M) Marcador de peso molecular 100bp DNA.

Das 68 plantas analisadas, 46 abacaxizeiros eram assintomáticos, sendo 20 infectados com o vírus do PMWaV-3, e 26 plantas selecionadas para a pesquisa com resultado negativo, na avaliação por PCR tempo real.

Observou-se para plantas sintomáticas a ocorrência dos vírus PMWaV-2 e PMWaV-3, para cvs. Pérola e Vitória. Na cultivar Smooth Cayenne, os vírus PMWaV-2 e PMWaV-3 ou PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 predominaram tanto nas plantas com sintomas, quanto nas assintomáticas.

4.3 DISTRIBUIÇÃO DO PMWaV NA PLANTA

Os resultados das análises na planta adulta mostraram que é muito escasso a presença de plantas sadias no campo. Na expectativa de encontrar alguma parte da planta não infectada, para obtenção de mudas sadias, outras regiões do abacaxizeiro foram analisadas.

Para a extração do RNA viral, a escolha da região basal da folha D (FD), foi baseado na disponibilidade de nutrientes, e por ser o local em que as cochonilhas se encontram sugando o abacaxizeiro. Por meio da PCR convencional, com *primer* degenerado foi observado que todas as folhas, exceto a da posição A (FA), não havia vírus (Figura 15). Essas folhas estavam presentes nas mudas na ocasião do plantio, sendo um local desfavorável aos patógenos (PY et al., 1984).

Havia uma perspectiva de encontrar gemas laterais ou mudas tipos rebentão, próximas as folhas velhas, A e B, sem vírus. Entretanto, estas amostras também estavam infectadas (Figura 13). Deve-se considerar a presença das cochonilhas na base das folhas e nas raízes das plantas, garantindo a infecção nesta área.

Na região clorofilada da folha D (FDC), do mesmo modo, foi encontrado PMWaV. A parte clorofilada da folha, quando comparado a aclorofilada, parece ser mais favorável a manutenção da viabilidade viral, fator importante para o transporte e armazenamento das folhas pré-diagnóstico (AMORIM, 2011). No entanto, amostra da região clorofilada deve ser coletada o mais próximo possível da aclorofilada, pois, observou-se por PCR em tempo real, que o título viral diminui em direção a ponta das folhas (SUBERE et al., 2012).

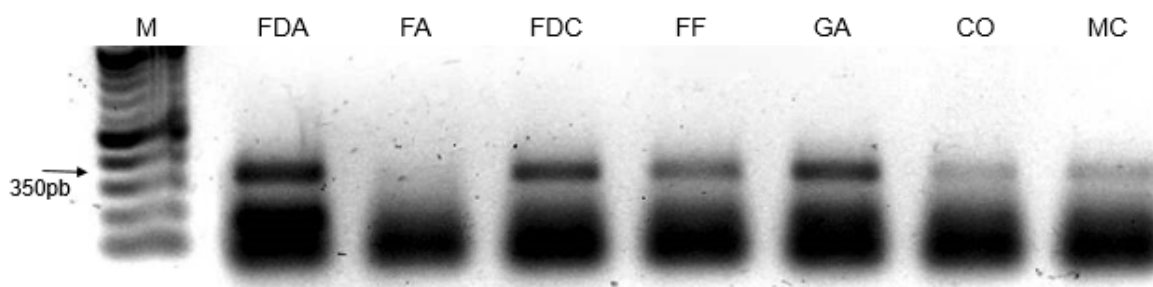


Figura 13 Análise por RT-PCR de órgãos do abacaxizeiro infectado pelo PMWaV. O *amplificon* em 350pb, característico dos *primers* degenerados, evidencia a presença do complexo viral da murcha na folha da posições D, aclorofilada (FDA) e clorofilada (FDC), e folha F (FF). Na gema apical (GA), na coroa (CO) e mudas convencionais da planta matriz (MC) também estavam infectadas. As folhas de posição A (FA) não apresentaram banda. Marcador de peso molecular 100bp (M).

Gemas apicais (GA) da cv. Smooth Cayenne sintomáticas, antes da frutificação, e as folhas F (FF) e a coroa (CO) da mesma cultivar, pós-frutificação, passaram por análises. Foi verificado a presença do PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 nas 3 amostras (Figura 13). A freqüência de uma consistente banda do vírus para as gemas apicais mostrou ser um fator preocupante. Essa região é utilizada como fonte de explante na técnica de cultura de tecidos, com intuito de produzir mudas livre de patógenos. Além disso, era esperado que os tecidos do fruto pudessem impedir a passagem do vírus até a coroa, podendo esta vir a ser uma fonte de explante (gemas) livres dos vírus.

Além desses testes, 16 mudas convencionais de diferentes posições (MC), obtidas de abacaxizeiros cvs. Vitória e Pérola assintomáticas, foram analisadas. Todas as amostras apresentavam infectadas pelo vírus do PMWaV-3, assim como na planta matriz. Vale ressaltar que, esse é frequentemente o material, utilizado no campo, para propagação da cultura.

Os resultados mostram pela primeira vez a infecção pelo PMWaV em folhas jovens, nas gemas, coroas e mudas de abacaxizeiro. Aliados a isso, pode-se

afirmar que o complexo viral está distribuído pela planta, exceto nas folhas velhas.

Mudas obtidas de cultura de tecido também foram avaliadas. As análises por PCR convencional mostraram que, 20 amostras obtidas ao acaso de 200 clones, provenientes de matriz de abacaxizeiro assintomático, não houve amplificação dos vírus. Foi esse resultado que sugeriu a avaliação dessas amostras por PCR em tempo real, para verificar se de fato, ocorre a limpeza clonal através da técnica de cultura de tecidos, e disponibiliza metodologia para certificação de mudas comerciais.

4.4 PADRONIZAÇÃO DO PCR EM TEMPO REAL PARA O DIAGNÓSTICO DO PMWaV-1, PMWaV-2 E PMWaV-3 EM FOLHAS E MUDAS DE ABACAXIZIERO

4.4.1 Especificidade da técnica

Na análise dos *primers* desenhados, para detecção das espécies dos vírus PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3, e genes de referência, a eletroforese em gel de agarose, mostrou fragmentos individuais do tamanho esperado (Figura 14).

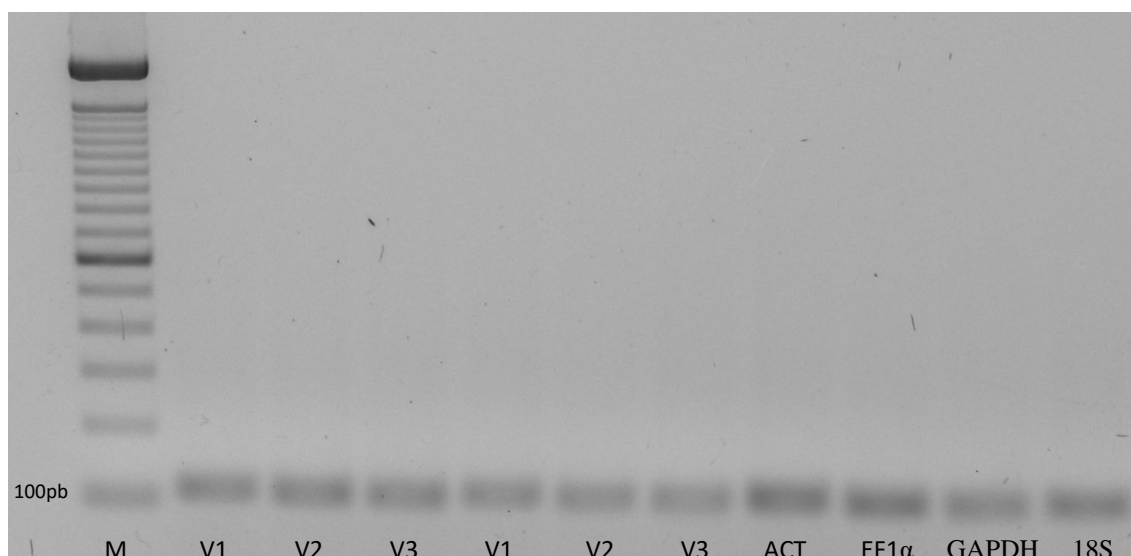


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose dos *primers* para detecção das espécies dos vírus PMWaV-1 (V1), PMWaV-2 (V2) e PMWaV-3 (V3), e genes de referência de abacaxizeiro candidatos.

As curvas de amplificação foram geradas a partir da diluição seriada da amostra controle, planta infectada com os vírus PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3, indexada por PCR convencional. A curva de dissociação mostrou amplificação específica para cada gene, confirmada pela presença de um único pico na respectiva temperatura de *melting* (Figura 15 e 16). Na tabela 5 encontra-se os valores da temperatura de *melting* de cada par de *primer* específico e controle endógeno.

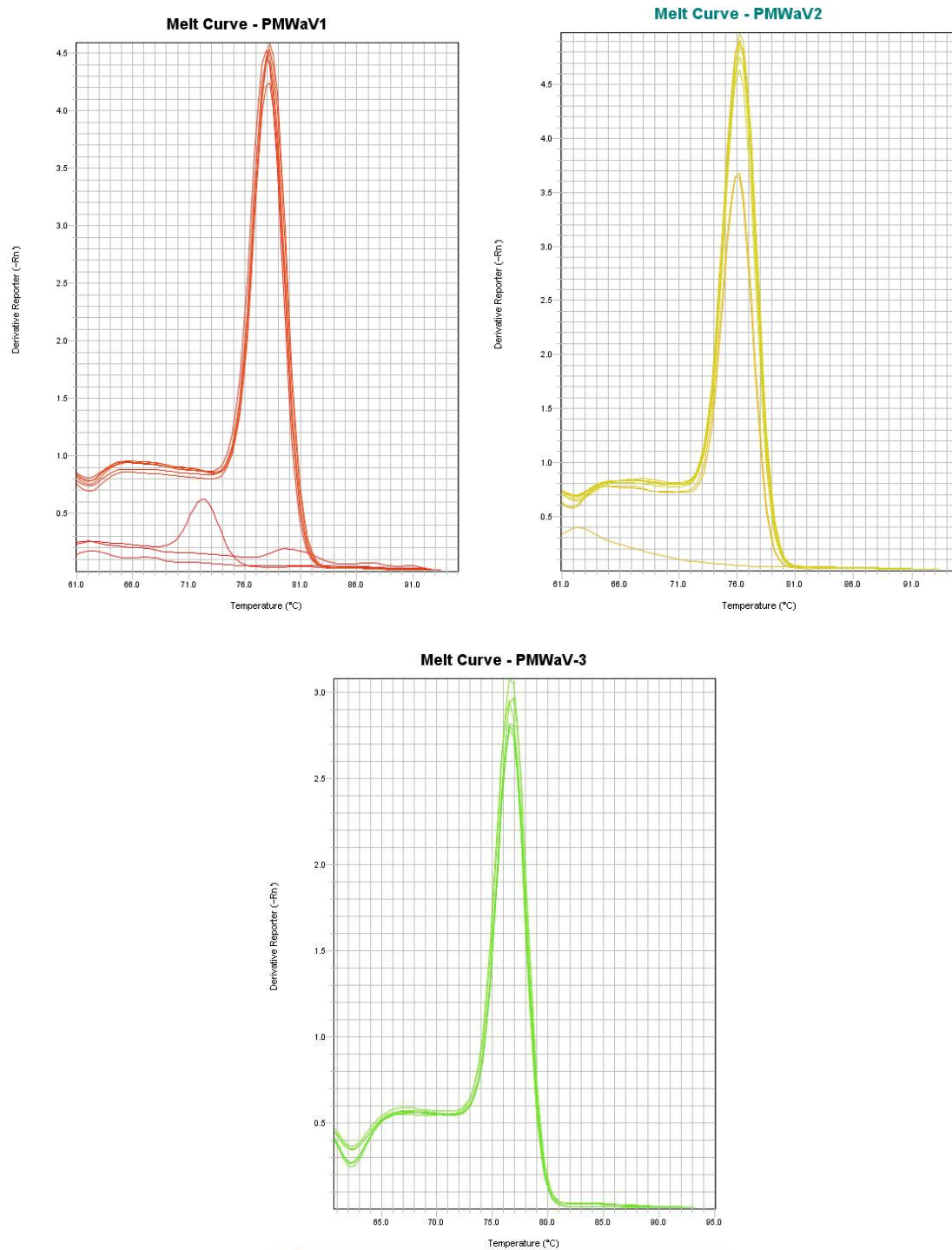


Figura 15 Curva de dissociação dos diferentes *primers*, mostrando a presença de um único pico na respectiva temperatura de *melting* para os 3 vírus.

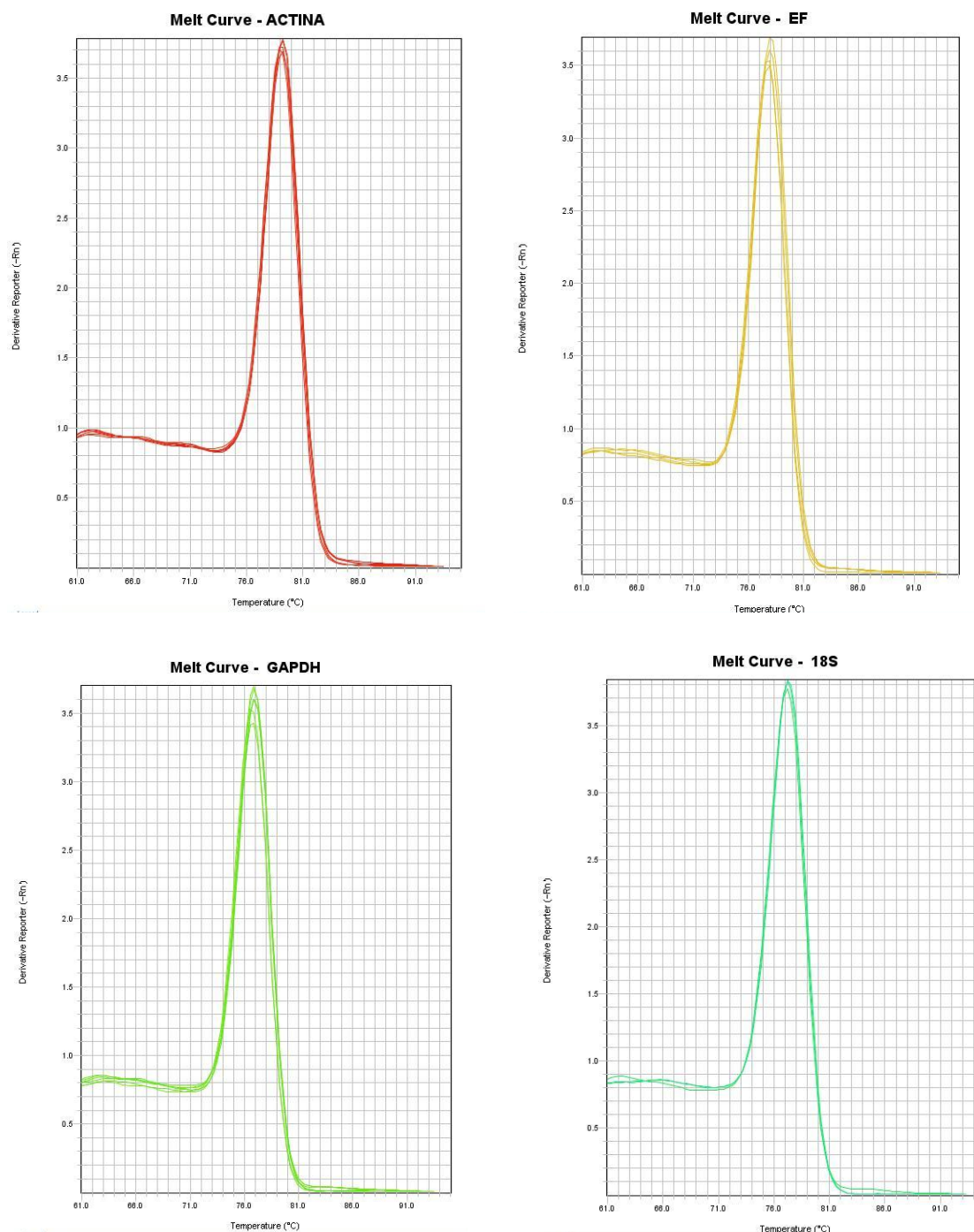


Figura 16 Curva de dissociação dos diferentes *primers* desenhados para genes de referência em abacaxizeiro infectado por vírus, para normalização da técnica de qPCR.

Os resultados da PCR em tempo real, de acordo com a curva padrão, apresentaram *primers* com coeficiente de determinação (R^2) em torno de 0,998 e *slope* de -3,528, revelando uma eficiência de amplificação de aproximadamente 100%, mostrando-se confiável para a detecção dos vírus do

PMWaV (Tabela 5), tal como sugerido na literatura (LIU et al., 2012; DEY et al., 2012; CHENG et al., 2013).

Tabela 5 Lista dos *primers* com os valores da eficiência de amplificação, coeficiente de correlação e temperatura de *melting*.

<i>Primers</i> *	Eficiência de amplificação (%)	**R ²	Temperatura de <i>melting</i> (°C)
PMWaV-1 F TR	91.27	0,972	77
PMWaV-1 R TR			
PMWaV- 2 F TR	94.55	0,985	76
PMWaV-2 R TR			
PMWaV-3 F TR	101.52	0,921	76,5
PMWaV-3 R TR			
ACT F TR	100.59	0,999	79
ACT R TR			
EF1 α F TR	101.21	0,998	78
EF1 α R TR			
18S F TR	101.35	0,976	77
18S R TR			
GAPDH F TR	100.33	0,998	77
GAPDH R TR			

*TR = Tempo Real

**R² = Coeficiente de correlação

A amostra usada para gerar as curvas de amplificação foi obtida da folha da posição D, do abacaxizeiro adulto sintomático, amostra S4, indexada no PCR convencional. Em uma análise com 40 ciclos no PCR tempo real, foram encontrados valores de Ct igual a 25 para o PMWaV-1(1), Ct de 21 para o PMWaV-2 (2), e Ct de 19 para o PMWaV-3 (3). Não houve amplificação (região 4) para abacaxizeiro sadio, amostra A1 e para o NTC (Figura 17). Para muda

infectada foi encontrada curva de amplificação com mesmo padrão para os 3 vírus.

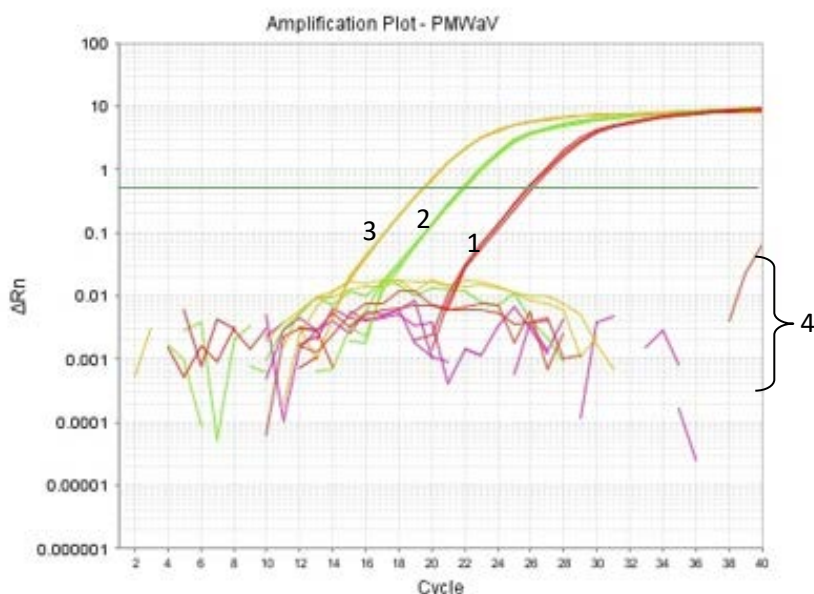


Figura 17 Curva de amplificação do abacaxizeiro infectado pelos três vírus (S4). PMWaV-1(1), PMWaV-2 (2) e PMWaV-3 (3). Ausência de amplificação para abacaxizeiro sadio (A1) e o NTC (4).

A especificidade dos *primers* foi avaliada em relação ao abacaxizeiro, e a cada gene da HSP 70 das diferentes espécies do vírus. Na figura 18 está apresentado o desenho experimental de uma placa de PCR tempo real com as amostras utilizadas como controle experimental. O P nas linhas, representa *primers* específicos, sendo CI, o controle interno da reação. A cada letra acompanhada de um número, na coluna, representa uma amostra, sendo o A de planta assintomática, e S de planta sintomática. É importante observar que todas as amostras foram avaliadas com o controle interno, validando a reação.

Na figura 20 a planta A1, o controle negativo da reação, esteve em contato com os três *primers*, e não ocorreu amplificação. Esta planta encontrava-se com característica assintomática no campo, e não apresentou banda específica para nenhum dos três vírus, no PCR convencional, utilizando *primers* específicos do gene HSP 70, validados em diversos trabalhos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1 C1	P1 C1	P1 C1	P1 S11	P1 S11	P1 S11				P1 C-	P1 C-	P1 C-
B	P2 C1	P2 C1	P2 C1	P2 S11	P2 S11	P2 S11				P2 C-	P2 C-	P2 C-
C	P3 C1	P3 C1	P3 C1	P3 S11	P3 S11	P3 S11				P3 C-	P3 C-	P3 C-
D	CI C1	CI C1	CI C1	CI S11	CI S11	CI S11						
E	P1 A3	P1 A3	P1 A3	P1 S2	P1 S2	P1 S2				P1 C+	P1 C+	P1 C+
F	P2 A3	P2 A3	P2 A3	P2 S2	P2 S2	P2 S2				P2 C+	P2 C+	P2 C+
G	P3 A3	P3 A3	P3 A3	P3 S2	P3 S2	P3 S2				P3 C+	P3 C+	P3 C+
H	CI A3	CI A3	CI A3	CI S2	CI S2	CI S2						

Figura 18 Desenho experimental de uma placa de PCR tempo real com as amostras utilizadas como controle experimental. O P nas linhas, representa *primers* específicos, sendo CI, o controle interno da reação. A cada letra acompanhada de um número, na coluna, representa uma amostra, sendo o A de planta assintomática, e S de planta sintomática.

Na figura 19 a amostra infectada com a espécie do PMWaV-3 (A3) e a amostra infectada com a espécie do PMWaV-2 (C1), não amplificou *primer* do PMWaV-1 e PMWaV-2, e não amplificou PMWaV-1 e PMWaV-3, respectivamente, mostrando a especificidade do *primer* 2 e 3, corroborando com dados de bioinformática. O *primer* desenhado para o PMWaV-1 não anela na HSP 70 do PMWaV-2 e PMWaV-3; o *primer* do PMWaV-2 não anela no gene do PMWaV-3; e o *primer* do PMWaV-3 não anela no gene da HSP 70 do PMWaV-2. Considerando a amostra infectada com PMWaV-1 e PMWaV-3 (S11), excluiu-se a possibilidade de anelamento com *primer* para PMWaV-2.

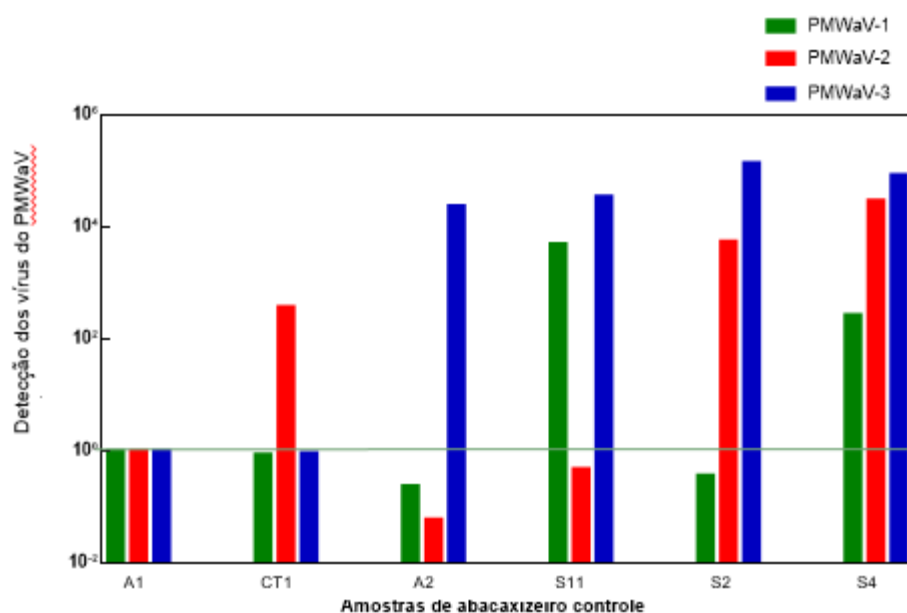


Figura 19 Expressão gênica do abacaxizeiro sadio e infectado. A actina foi gene de referência para normalizar a qPCR. Foi observado ausência de expressão nas plantas sadias, e infecção pelo PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 nas plantas doentes. As amostras foram apresentadas em duplicata biológica.

Nas análises realizadas por PCR convencional e tempo real não foi encontrado nenhuma planta controle somente com a espécie do PMWaV-1 ou com PMWaV-1 e PMWaV-2, mostrando experimentalmente a especificidade do primer 3, já que existe a possibilidade do *primer* do PMWaV-3 anelar no gene do PMWaV-1, gerando resultado falso positivo para a espécie do PMWaV-3.

As sequências similares, obtidas do alinhamento do resultado sequenciamento com os gene da HSP 70 de cada vírus, foram submetidos a uma pesquisa BLAST, e mostraram autenticidade as sequências específicas depositadas (Figura 20).

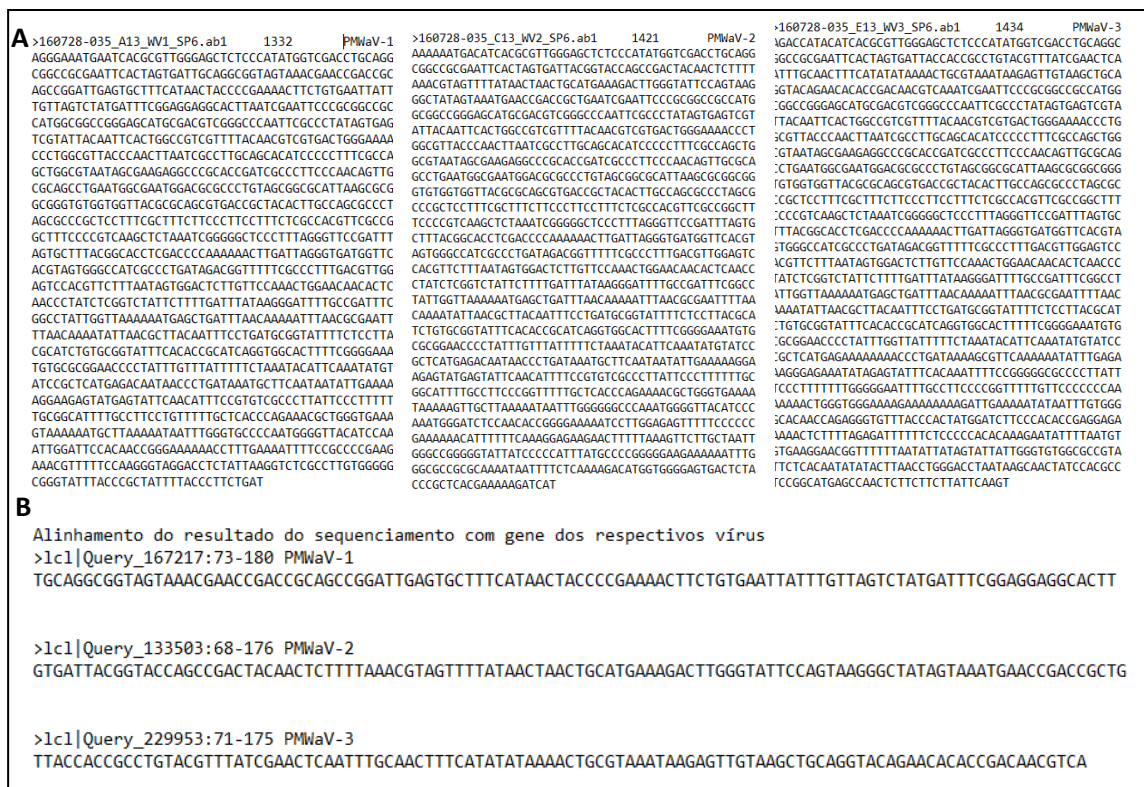


Figura 20 A) Dados obtidos a partir do sequenciamento do produto da PCR convencional utilizando primers do PCR tempo real da espécie do PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3. B) Alinhamento das seqüências provenientes do sequenciamento ao gene HSP 70 corresponde a cada vírus.

O grau de identidade das amostras do produto da PCR, as seqüências específicas depositadas, usadas para desenhos do *primers*, foram de 97% para PMWaV-1 (Gene: HE583225.1), 98% para PMWaV-2 (Gene: EU016675.1) e 98% para PMWaV-3 (Gene: FJ209047.1). Não houve alinhamento com outros vírus ou com genes do abacaxizeiro (Figura 21). Tais dados corroboraram com análise *in silico*.

O resultado da clonagem seguido do sequenciamento reafirmam a especificidade do *primers* para detecção do PMWaV-1, PMWaV2 e PMWaV-3, e assim seu uso para o diagnóstico dos vírus em plantas sintomáticas e assintomáticas.

Sequences producing significant alignments:

Select: **All** None Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 isolate PB1-120v heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	195	195	100%	2e-46	99%	KT321163.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 isolate CHP1-178v heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	195	195	100%	2e-46	99%	KT321167.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 partial HSP70 gene for heat shock protein 70 homologous, isolate TK7	195	195	100%	2e-46	99%	H5849514.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 isolate PB1-350v heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	189	189	100%	9e-45	96%	KT321168.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 isolate CHP1-236v heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	183	183	100%	4e-43	97%	KT321169.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 isolate RY1-1M02 heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	183	183	100%	4e-43	97%	KT321189.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 isolate RB1-220v heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	183	183	100%	4e-43	97%	KT321193.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 isolate RY1-2M02 heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	183	183	100%	4e-43	97%	KT321217.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 isolate CB1-123v heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	183	183	100%	4e-43	97%	KT321256.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 isolate RY1-125v heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	183	183	100%	4e-43	97%	KT321257.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 isolate X81-120v heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	183	183	100%	4e-43	97%	KT321261.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 isolate X81-120v heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	183	183	100%	4e-43	97%	KT321262.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 isolate X81-120v heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	183	183	100%	4e-43	97%	KT321263.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 isolate X81-120v heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	183	183	100%	4e-43	97%	KT321264.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 isolate CU1-LH-ER heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	183	183	100%	4e-43	97%	JX545771.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 partial hsp70 gene for heat shock protein 70, isolate 10, genomic RNA	183	183	100%	4e-43	97%	HE583225.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 isolate Cuba L14 heat shock 70-like protein (hsp70h) gene, partial cds	183	183	100%	4e-43	97%	H512993.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 isolate PT1 heat shock protein 70-like protein (HSP70h) gene, partial cds	183	183	100%	4e-43	97%	EJ189113.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 clone pF530m1/2 helicase and RNA dependent RNA polymerase genes, partial cds, unknown protein gene, complete cds, and heat shock 70-like protein gene, partial cds	183	183	100%	4e-43	97%	AF419291.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 complete genome	183	183	100%	4e-43	97%	AF141119.3
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 isolate P13 heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	183	183	100%	4e-43	97%	EF207102.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 isolate CB1-120v heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	178	178	100%	2e-41	96%	KT321265.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 isolate PB1-120v heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	178	178	100%	2e-41	96%	KT321266.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 isolate PB1-120v heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	178	178	100%	2e-41	96%	KO307141.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 isolate PB1-120v heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	172	172	100%	9e-40	95%	KT321267.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 isolate PB1-120v heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	172	172	100%	9e-40	95%	KT321268.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 isolate PB1-120v heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	172	172	100%	9e-40	95%	KJ572484.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 clone pF530m1/3 helicase and RNA dependent RNA polymerase genes, partial cds, unknown protein gene, complete cds, and heat shock 70-like protein gene, partial cds	150	150	100%	4e-33	92%	EF457691.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 clone pF530m1/2 heat shock 70-like protein gene, partial cds	137	137	76%	2e-29	96%	EF488783.1

B

Sequences producing significant alignments:

Select: **All** None Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate RY heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	191	191	100%	2e-45	98%	KT322187.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate CR heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	191	191	100%	2e-45	98%	KT322188.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate RB heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	191	191	100%	2e-45	98%	KT322189.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate PB heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	191	191	100%	2e-45	98%	KT322194.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 partial HSP70 gene for heat shock protein 70 homologous, isolate TK7	191	191	100%	2e-45	98%	H5849515.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate CU Hq Bp heat shock protein 70 (Hsp70h) gene, partial cds	191	191	100%	2e-45	98%	JX545773.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate CU CA MD2 L24 heat shock 70-like protein (hsp70h) gene, partial cds	191	191	100%	2e-45	98%	JX508337.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 partial hsp70 gene for heat shock protein 70, isolate 10, genomic RNA	191	191	100%	2e-45	98%	HE583226.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 partial hsp70h gene for heat shock 70-like protein, isolate Cuba L107, genomic RNA	191	191	100%	2e-45	98%	FJ282979.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate PT2 heat shock protein 70-like protein (HSP70h) gene, partial cds	191	191	100%	2e-45	98%	EU1769115.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate P13 heat shock protein 70 (HSP70) gene, partial cds	191	191	100%	2e-45	98%	EU192875.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate CU LH ER heat shock protein 70 (Hsp70h) gene, partial cds	185	185	100%	1e-43	97%	JX545772.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 polyprotein (ORF1a) and RNA-dependent RNA polymerase genes, partial cds, and hydrophobic protein p5, heat shock protein 70, p45, coat protein, diverged coat protein, p20, p27, and p6 gene	183	183	96%	4e-43	98%	AF283103.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 strain B Laop-131 heat shock 70-like protein (hsp70h) gene, partial cds	159	159	84%	7e-36	98%	KM870780.1

C

Sequences producing significant alignments:

Select: **All** None Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 3 isolate PT3 heat shock protein 70-like protein (HSP70h) gene, partial cds	183	183	100%	4e-43	98%	FJ209047.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 3 clone pB13P4P36 RNA polymerase gene, partial cds, unknown protein gene, complete cds, and heat shock 70-like protein gene, partial cds	183	183	100%	4e-43	98%	EF467918.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 3 isolate L01 heat shock 70-like protein (hsp70h) gene, partial cds	180	180	98%	5e-42	98%	GU1563497.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 3 ORF1a and RNA dependent RNA polymerase (RdRp) genes, partial cds, p6 gene, complete sequence, and mall hydrophobic 5.65 kDa protein, heat shock 70:	180	180	98%	5e-42	98%	DQ3399259.2
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 3 isolate CU CA MD2 L17 heat shock 70-like protein (hsp70h) gene, partial cds	174	174	98%	2e-40	97%	JX508336.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 3 clone pF530m1/5 heat shock 70-like protein gene, partial cds	174	174	98%	2e-40	97%	EF488785.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 3 strain B Laop-138 heat shock 70-like protein (hsp70h) gene, partial cds	141	141	83%	2e-30	95%	KM870779.1
<input type="checkbox"/> Pineapple mealybug wilt-associated virus 3 clone pF530m1/8 heat shock 70-like protein gene, partial cds	111	111	94%	2e-21	87%	EF488784.1

Figura 21 Produto do alinhamento das seqüências similares, obtidas do alinhamento do resultado sequenciamento com os gene da HSP 70 de cada vírus. A autenticidade as seqüências específicas depositadas nos bancos de dados foram de: A) 97% para PMWaV-1(Gene: HE583225.1); B) 98% para PMWaV-2 (Gene: EU016675.1); e 98% para PMWaV-3 (Gene: FJ209047.1).

4.4.2 Seleção dos genes de referência para controle interno e estudo expressão gênica

Para avaliar com precisão os níveis de expressão de genes é essencial normalizar os dados da PCR quantitativa em tempo real com genes de referência adequados (JAIN et al., 2006; FAN et al., 2013). Neste estudo, examinaram-se os genes candidatos: ACT, Ef1 α , GAPDH e 18S. Através do delta-Ct observou-se que, a diferença entre os abacaxizeiros sadio e infectado foi de Ct até 1 para os quatro genes (Figura 22). Esse resultado apresenta-se dentro dos valores estabelecidos, permitindo a normalização da técnica nas folhas da planta adulta e mudas utilizando um dos 4 housekeeping.

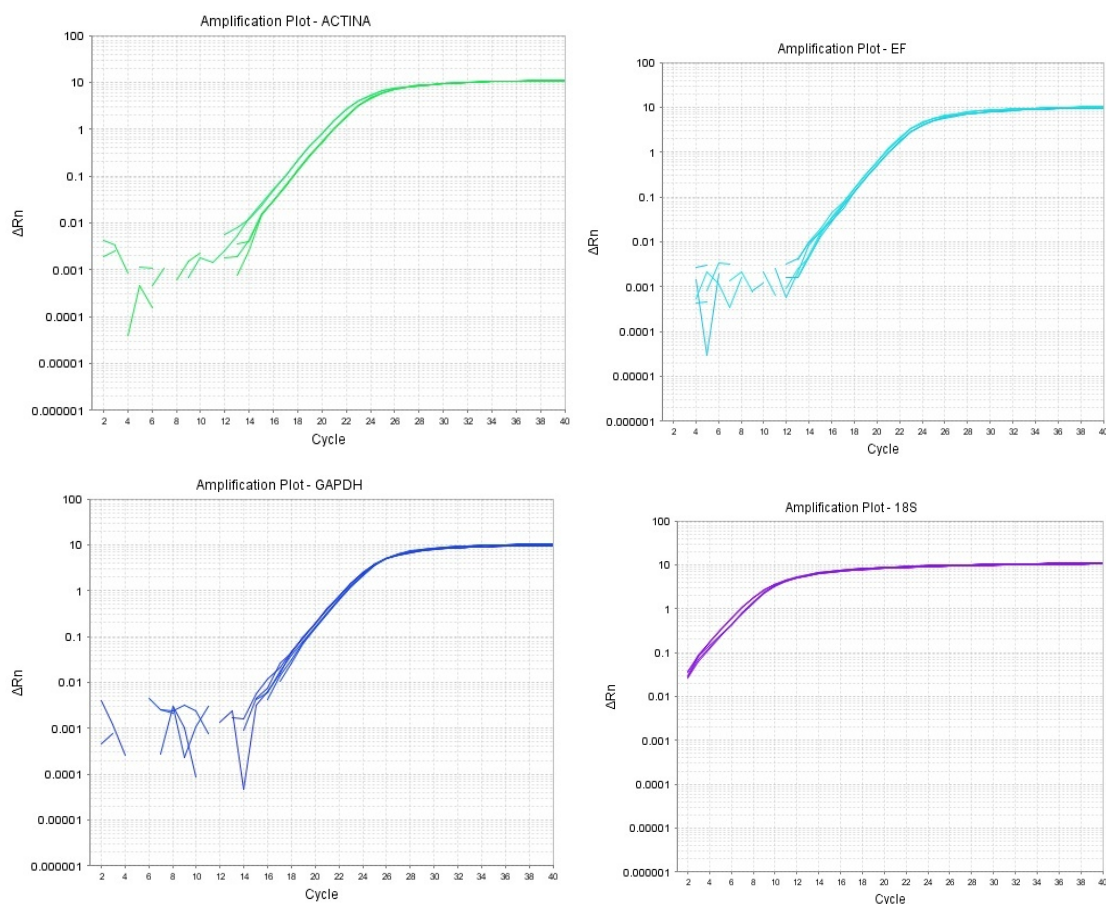


Figura 22 Curva de amplificação dos genes de referência analisados, mostrando o delta-Ct entre os abacaxizeiros sadio e infectado com PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 para os genes de referência. O delta Ct nos 4 genes de referência testados foi menor que 1.

A estabilidade dos genes de referência foram realizadas por meio do GeNorm e NormFinder, revelando para folhas o gene da actina como o mais estável dentre os estudados, enquanto nas mudas foi o Ef-1 α (Tabela 6). Coincidentemente, a actina também foi considerada o melhor gene de referência para análise do abacaxizeiro sob estresse abiótico (MA et al., 2012).

Tabela 6 Valores de estabilidade para genes de referência estudados.

Gene	Mudas		Folhas	
	NormFinder	GeNorm	NormFinder	GeNorm
actin	0,014	0,17	0,257	0,025
EF-1α	0,014	0,163	0,246	0,031
GAPDH	0,461	0,217	1,376	0,378
18S rRNA	0,654	0,441	0,593	0,020

NormFinder: M<1.5 GeNorm: M< 0.5

Com a determinação dos genes de referência, tornou-se possível a normalização da técnica para o diagnóstico dos vírus relacionados com a murcha, e a quantificação de genes no hospedeiro infectado. Este é o primeiro relato da padronização de genes de referência para análise de perfis de expressão de transcritos com a tecnologia de RT-qPCR em abacaxizeiro infectado.

4.4.3 Sensibilidade da técnica

A técnica de PCR em tempo real, permitiu a detecção, ciclo a ciclo, considerando a intensidade de fluorescência emitida em decorrência da amplificação da sequência de alvo, logo no início da fase exponencial. Na PCR convencional a detecção ocorre na fase do platô, e a análise é baseada no produto final da reação.

A sensibilidade da técnica de qPCR é dependente de vários fatores, como, o uso de controle interno para cada amostra, validado nesse estudo, e a otimização da técnica. A curva de diluição foi utilizada para determinar a concentração dos *primers*, e do RNA para execução das análises. A planta sadia foi importante para determinar o limite de corte do Ct, e inclusive para padronizar a concentração ideal dos *primers*, não haver formação de dímeros, que deveria corroborar com o resultado apresentando nas amostras do branco.

A eficiência *primers* é uma ferramenta que está intimamente ligada a sensibilidade da reação, no PCR em tempo real. O desenho das sequências é primordial para o sucesso na detecção. Um valor de eficiência dos *primers* próximo a 100%, como ocorreu nos dados deste trabalho, permite a amplificação do alvo com valor de Ct o mais real possível na fase exponencial da reação.

A propagação vegetativa do abacaxizeiro favorece a disseminação do vírus através de plantas assintomáticas infectadas. Estudos realizados mostraram que plantas sem sintomas que apresentaram resultado negativo na PCR convencional, foram detectadas como positivas por PCR tempo real (GALLELLI et al., 2014). Estudo de Dey e colaboradores (2012), mostrou que 90% dos

abacaxizeiros com resultado inconclusivo para PMWaV-2, indexados por PCR convencional, apresentaram títulos virais na análise por quantificação absoluta em PCR tempo real.

Existem relatos na literatura de amostra com valor de Ct maior que 35 considerado resultado negativo fiável, inconclusivo, ou ainda, amplificação tardia para qPCR com 40 ciclos (KOKKINOS E CLARK, 2006; ABREU et al., 2012, LIU et al., 2012, GALLELLI et al., 2014). Nesse estudo, para o diagnóstico das plantas, foi determinado abacaxizeiro livre de vírus, a que não apresentou amplificação e quando o valor de Ct foi indeterminado, acusado pelo software. Amostras em que a curva de amplificação era duvidosa e com valores altos de Ct, igual ou superior a 34, foi considerado indeterminado.

Na rotina dos laboratórios de diagnóstico, amostras com Ct duvidoso é sempre realizado reanálises para garantir o resultado. Nos testes realizados nesse trabalho, especialmente nas mudas e para determinar amostra sadia da planta adulta, foram realizadas várias repetições.

Ao avaliar clones de abacaxizeiros produzidos a partir da técnica de cultura de tecidos, observou-se que não houve amplificação, por PCR convencional, em 20 mudas, escolhidas ao acaso de 200 clones. Na análise por PCR em tempo real os valores de Ct dessas amostras foram altos (Tabela 7). Ao comparar os dois métodos, observou-se que as amostras, de mudas e de folhas, consideradas como indeterminadas, coincidiram com resultado negativo no gel de agarose.

Tabela 7 Indexação por PCR tempo real de mudas de abacaxizeiro obtidos da técnica de cultura de tecidos.

Mudas de cultura de tecido	PMWaV-1	PMWaV-2	PMWaV-3
CT1	39,4	28	
CT2	39,8	35,2	33,
CT3	33,8	34,2	33,0
CT4		33,8	
CT5		32,4	
CT7	38,3	34,0	35,3
CT9	36,7	34,2	
CT10	35,6	33,4	38,5
CT11			
CT12			
CT13		33,9	37,0
CT14	37,1	35,2	35,2
CT15		38,4	
CT16	33,1	31,7	38,2
CT17		33,9	
CT18		33,5	
CT19	38,6	35,8	
CT20		34,6	
Branco			
Controle negativo	36,0	37,5	37,9
Controle positivo	27,3	20,8	23,3

(|) Ct com valor indeterminado ou ausência de amplificação

(CT) Cultura de tecido

Aproximadamente 70 abacaxizeiros foram selecionados, indexados por PCR convencional e em tempo real para detecção dos vírus PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3. Na tabela 8 é apresentado os distintos resultados encontrados, considerando plantas adultas sintomáticas e assintomáticas, e alguns exemplos de amostras, considerando a sensibilidade das técnicas.

O resultado falso negativo, por meio da PCR convencional, para as folhas e mudas: CT16, A7, S6, S7, S12 para vírus 1; CT1, CT5, CT10, CT16, A5, A7 E S13 para vírus 2; e CT2, CT3, S7 para o vírus 3, comprova a sensibilidade da técnica do PCR em tempo real (Tabelas 7 e 8).

Tabela 8 Comparação dos métodos de diagnóstico por PCR convencional e tempo real, em amostras de abacaxizeiro sintomáticas e assintomáticas

Grupo de plantas	Código	PCR convencional ¹			qPCR ^{2,3}		
		PMWaV-1	PMWaV-2	PMWaV-3	PMWaV-1	PMWaV-2	PMWaV-3
Assintomáticas	A4	-	-	-	I/ N	I/ N	I/ N
	A5	-	-	+	I/ N	30/ S	32/ S
	A6	-	-	+	35/ N	35/ N	20/ S
	A7	-	-	+	29/ S	29/ S	28/ S
	A8	+	+	+	22/ S	21/ S	19/ S
	A9	+	+	+	27/ S	22/ S	21/ S
	S6	-	+	+	33/ S	19/ S	20/ S
	S7	-	+	-	32/ S	21/ S	32/ S
	S8	-	+	+	36/ N	22/ S	21/ S
Sintomáticas	S9	+	+	+	27/ S	23/ S	21/ S
	S10	+	+	+	20/ S	18/ S	20/ S
	S11	+	-	+	21/ S	33/ N	22/ S
	S12	-	-	+	29/ S	32/ N	21/ S
	S13	-	-	+	I/ N	30/ S	20/ S

¹ Presença amplicon: (+) e (-) ausência;

²(I) Ct com valor indeterminado ou ausência de amplificação

³) Detecção do vírus : sim (S) e não (N)

Os dados também confirmam a disseminação do vírus PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3, por meio de mudas assintomáticas infectadas. Com o decorrer do tempo, a replicação viral e/ ou a presença do vetor levam ao surgimento dos sintomas, acometendo o desenvolvimento e produtividade do abacaxizeiro. Dey e colaboradores (2012), mostraram a influência das cochonilhas na manutenção da carga viral da espécie do PMWaV-2.

Em muitas regiões produtoras de abacaxizeiro as espécies do PMWaV-1 e PMWaV-3 não estão relacionadas com sintomas da murcha do abacaxizeiro, no entanto, no nosso resultado foram apontadas seis plantas apresentaram infecção associada a essas duas espécies.

Em relação a etiologia da doença observou-se a prevalência do PMWaV-3 nas plantas assintomáticas e sintomáticas. Esse é um fator preocupante, já que expõe a cultura a risco. O acúmulo de diferentes vírus, a distinta sensibilidade das cultivares em resposta à infecção e as condições ambientais podem contribuir para a etiologia da doença, ou contribuir para a severidade dos sintomas (GAMBLEY et al., 2008; BASSO et al., 2010). Os resultados refletem a importância de conhecer o estado fitossanitário da planta, independente da manifestação ou não dos sintomas.

Existem viroses que não produzem sintomas visualmente perceptíveis ou facilmente distinguíveis, entretanto, podem afetar a cultura. O PMWaV-1 não está associado diretamente ao desenvolvimento dos sintomas na Austrália e Havaii, no entanto, há relatos da sua influência na queda da produtividade do abacaxizeiro (GAMBLEY et al., 2008). Muitas vezes a baixa produtividade das lavouras é associada a deficiências nutricionais ou estresses abióticos, passando despercebida a presença do vírus nas plantas.

Considerando ainda, a análise feita em relação a etiologia da murcha, ficou exposto que, não pode ser feita nenhuma relação entre as características visuais dos sintomas do abacaxizeiro, com a presença de determinado vírus. Testes considerando a sintomatologia das plantas e a presença dos vírus, em genótipos comerciais, reafirmam esses dados (Figura 23). Talvez essa seja a explicação para a divergência nos diversos estudos, em relação as espécies do PMWaV que estão relacionadas com a doença. A coleta do material é fator subjetivo, que pode influenciar no resultado.

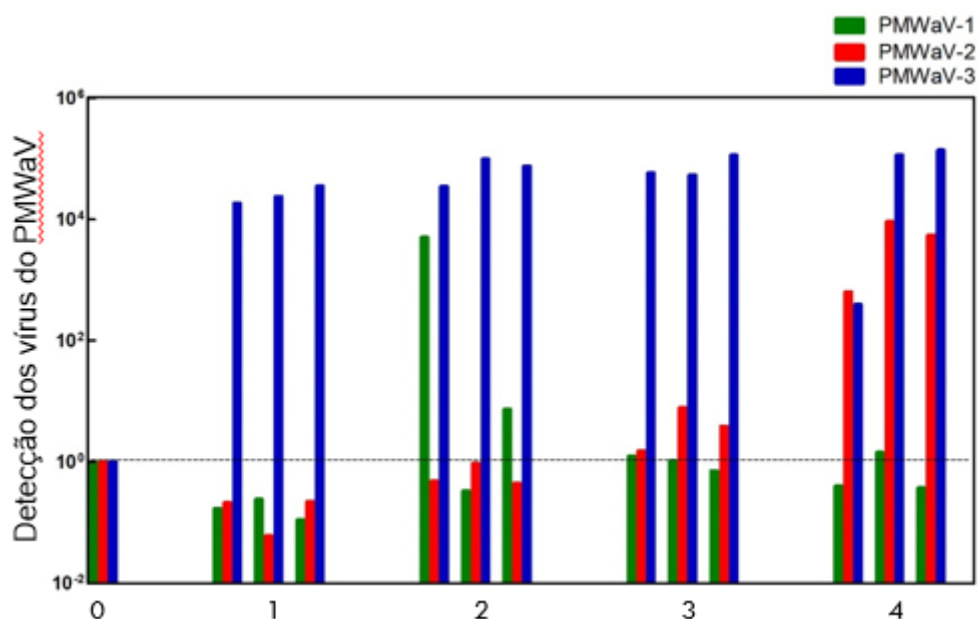


Figura 23 Detecção viral do PMWaV em relação a sintomatologia da murcha do abacaxizeiro na cultivar Pérola. A planta sadia (0), representa o controle negativo. Para cada grupo de plantas foram utilizados triplicata biológica e experimental. Os 4 grupos de plantas foram separados de acordo com os sintomas: ausência de sintomas (1), pouco sintomas (2), muito sintomas (3) e sintomas severos (4).

A análise da cultivar Pérola mostrou que o surgimento e severidade dos sintomas está relacionada com o aparecimento das diferentes espécies. No grupo de plantas com ausência de sintomas, a espécie do PMWaV-3 predominou. A espécie do PMWaV-1 apareceu em um número pequeno de plantas doentes, e em 6 abacaxizeiros.

Para a espécie do PMWaV-2, a detecção ocorreu nas plantas com muito sintomas e sintomas severos da doença. Em diversas regiões produtoras de abacaxizeiro, o PMWaV-2 está diretamente relacionado com desencadeamento dos sintomas quando associado as cochonilhas, *Dysmicoccus brevipes* (HU et al., 2012). O fato curioso na análise deste experimento nas condições brasileiras foi a ausência de detecção do PMWaV-2 nas plantas com poucos sintomas (grupo 1).

A explicação pode estar na regressão dos sintomas nesse grupo de plantas, devido ao suporte nutricional recebido com adubação e tratamento com

inseticidas, em meses anteriores. Já foi relatado para outros genótipos, o retorno do vigor das plantas com sintomas da murcha do abacaxizeiro no campo, após a nutrição da planta e eliminação das cochonilhas. Sether (2009) propôs que, plantas afetadas com murcha podem recuperar-se de sintomas de murcha, mas permanecem infectadas com o complexo viral.

Os sintomas da murcha frequentemente aparecem em reboleiras, devido ao transporte das cochonilhas pelas formigas e a preferência do inseto por plantas com vitalidade. No período da coleta essa característica na plantação foi pouco observada devido ao estágio avançado da doença. Havia um forte comprometimento das raízes das plantas sintomáticas, que se apresentavam secas, grande parte mortas, e com pequeno número de insetos. A presença de formigas, a procedência do material de plantio, as condições fisiológicas das plantas e do solo, a alta temperatura ambiente e períodos de precipitação, contribuem para elevar o nível populacional da praga (LACERDA, 2009).

De acordo com Basso e colaboradores (2010) a propagação vegetativa favorece infecções virais múltiplas, com expressão diferencial de sintomas em função da combinação da hospedeira com a espécie viral. As particularidades de cada cultivar devem ser definidas, pois, influenciam no manejo da cultura e apontam características para o desenvolvimento de uma planta resistente.

Baseado nisso, plantas da cv. Vitória, com as mesmas características da cv. Pérola, foram coletadas no campo no período pós adubação e chuvas. Contrariamente ao esperado, foi revelado a amplificação das 3 espécies do PMWaV em todos os grupos, independente da existência ou severidade dos sintomas. Coincidentemente, plantas da cv. Smooth Cayenne do campo, e mantidas no telado, assim como da cv. Pérola anteriormente analisadas, após irrigação e adubação, apresentaram o mesmo resultado (Figura 24).

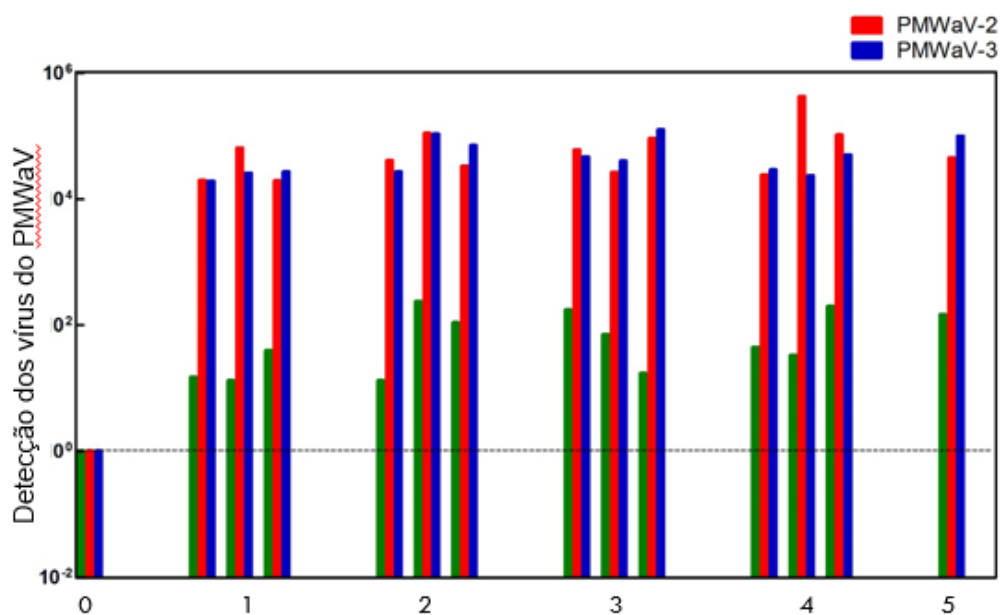


Figura 24 Detecção viral do PMWaV em relação a sintomatologia da murcha do abacaxizeiro na cultivar Vitória. A planta sadia (0), representa o controle negativo e planta infectada com as 3 espécies. Para cada grupo de plantas foram utilizados triplicata biológica e experimental. Os 4 grupos de plantas foram separados de acordo com os sintomas: ausência sintomas (1), pouco sintomas (2), muito sintomas (3) e sintomas muito severos (4) e (5), controle positivo.

Pode ser sugerido que as variáveis clima, genótipo e nutrição da planta justificam tais resultados. Além disso, os dados reforçam que a classificação visual dos sintomas, em relação a presença ou ausência de determinada espécie do PMWaV é falha.

Os resultados demonstraram a sensibilidade e especificidade da técnica para o diagnóstico em PCR tempo real das espécies do PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 em abacaxizeiros. Com validação do método de diagnóstico é possível selecionar a planta sadia para produção das mudas. Contribui também para entender melhor a murcha do abacaxizeiro, e para validar um método para controle da doença.

A escassez de abacaxizeiro livre de vírus no campo, favoreceu a validação da metodologia nas mudas, disponibilizando uma ferramenta para certificação de material propagativo que atende as recomendações fitossanitárias para

produção de material propagativo livre de vírus. A Portaria nº 47 de 02 março/2009 do Ministério da Agricultura, exige que os Laboratórios comercializem mudas de abacaxizeiros com nível zero de tolerância aos vírus PMWaV.

A metodologia por PCR tempo real utilizando mudas, permite confirmar a limpeza clonal originada da técnica de cultura de tecidos. Por meio da técnica do PCR convencional, Sether e Hu (2002) relataram que o PMWaV-1 pode ser eliminado por meio do uso de gemas da cultura de tecido. Cheong e colaboradores (2012) também mostraram a eliminação de cinco vírus, a partir de cultura de tecidos da gema apical da cana. Amorim (2011) relatou que de 20 mudas de cultura de tecido de diferentes genótipos, três mudas estavam infectadas pelo PMWaV.

4.5 TRANSMISSÃO DOS VÍRUS DO PMWaV PELAS COCHONILHAS *Dysmicoccus brevipes*

Para obter clones infectados, para padronização da técnica do PCR em tempo real, foi necessário fazer a transmissão dos vírus, de uma planta matriz, por meio de cochonilhas, para as mudas. Antes de realizar a transferência foi confirmado, por PCR convencional, a presença das três espécies na planta e a aquisição dos vírus pelas cochonilhas que a colonizavam (Figura 25). As mudas sadias foram selecionadas por PCR em tempo real.

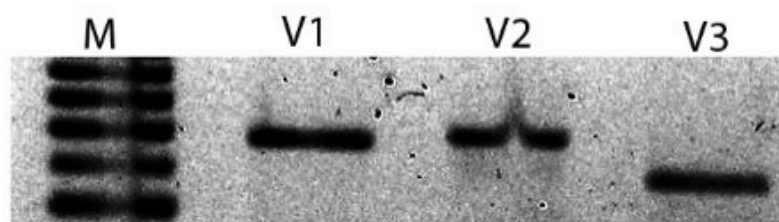


Figura 25 Aquisição dos vírus da murcha do abacaxizeiro pelas cochonilhas *D. brevipes*. (V1) PMWaV-1 (600pb), (V2) PMWaV-2 (609 pb) e (V3) PMWaV-3 (495pb). (M) marcador 100pb.

Após 75 dias foi verificado a transmissão viral nas mudas, nas cochonilhas presentes nas mudas infectadas, e na planta matriz. Fato curioso foi ausência da transmissão do vírus do PMWaV-1 pela cochonilhas, *D. brevipes*. Nos insetos que colonizavam as mudas, também não foi detectado esse vírus (Figura 26 A).

A detecção do PMWaV-2 e PMWaV-3 foi observada na amostra CT14 e na cochonilha que a colonizava e confirmada através do tempo real, e em outras cinco mudas para qual foram transferidas as cochonilhas. Contudo, observou-se que o vetor não um bom transmissor do PMWaV-1 (Figura 26 A e B).

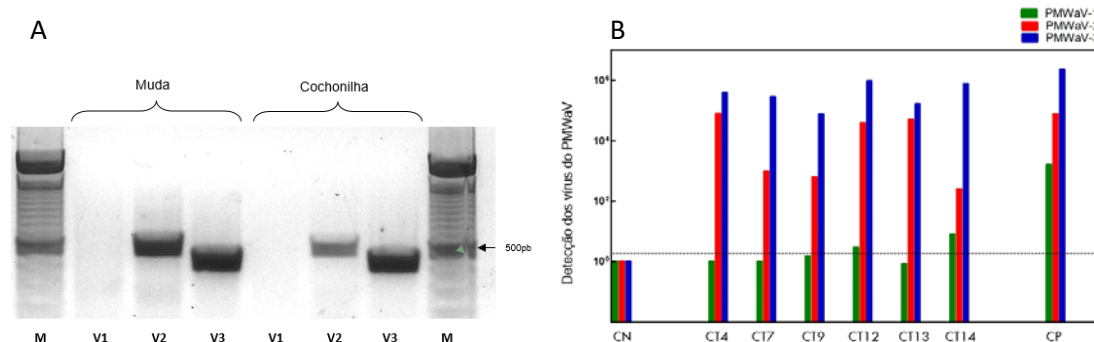


Figura 26 Transmissão do PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 para mudas pelo vetor. A) Na amostra CT14 e na cochonilha que a colonizava, foi detectado por PCR convencional o PMWaV-2 (V2) e PMWaV-3 (V3). B) Foi detectado por PCR tempo real o PMWaV-2 e PMWaV-3 nas mudas infectadas analisadas, e o PMWaV-1 esteve presente nas amostras: CT12 e CT 14. CN foi muda sadia, e CP, planta matriz da qual foi retirada as cochonilhas para a transmissão viral.

Outro fato considerado foi a espécie da cochonilha. A transmissão viral pode ocorrer pelas cochonilhas *Dysmicoccus brevipes* e *Dysmicoccus neobrevipes* (SETHAR et al., 1998; MARTELLI et al., 2010). Somando-se a isso, as cochonilhas da fauna do Espírito Santo são pouco conhecidas (CULIK et al., 2007). Assim, a especificidade entre o vetor e cada estirpe do PMWaV, devem ser verificados com cautela, pois implicam diretamente no sucesso do manejo da cultura.

Sether e colaboradores (2005), mostrou que para a transmissão do vírus PMWaV-3, reinoculações frequentes de cochonilhas foram realizadas para a indução da doença. No nosso estudo, cada muda foi inoculada com 10 insetos, e não ocorreu a transmissão do PMWaV-1 de forma eficiente.

Há relatos de que o PMWaV-3 pode ser transmitido por *D. brevipes* e *D. neobrevipes* na ausência ou presença de PMWaV-1 ou PMWaV-2; porém outros estudos mostram que a *D. brevipes* reduziu a eficiência da transmissão PMWaV-3. As características fisiológicas ou comportamentais do vetor ainda são desconhecidas (SETHER, 2005). A região em que a doença ocorre também pode influenciar na relação da estirpe com transmissor.

4.6 OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DIAGNÓSTICO DE ROTINA

O diagnóstico molecular dos vírus do PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3, através da PCR tempo real utilizando kit de extração comercial é mais sensível, confiável e ágil, quando comparado a PCR convencional. Na rotina atende as exigências para a indexação de plantas sob quarentena, em que as despesas com os frutos estacados é incomparável com o valor da análise.

Laboratórios podem investir ainda, no sistema TaqMan em multiplex. A técnica permite aumento da especificidade, sensibilidade e redução do valor por análise (DUBIELLA et al., 2013). A partir dos *primers* validados nesse trabalho, basta confeccionar as sondas específicas com fluorófluros distinto, para detecção de cada vírus.

A produção de mudas comerciais com valor acessível é crucial para cultura. No nosso trabalho foram realizados testes para otimizar a metodologia. Amorim (2011) mostrou que folhas de abacaxizeiro podem ficar armazenadas por 30

dias a temperatura inferior a 20°C, viabilizando processamento de várias amostras no mesmo período. A pulverização das amostras em moinho de bolas e extração do RNA com reagente Trizol® associado ao emprego da PCR convencional, para indexação das plantas assintomáticas, e confirmação dos resultados falso negativo com PCR em tempo real, propiciam reduzir o valor de produção por muda.

A partir de um abacaxizeiro livre de vírus podem ser propagadas em torno de 8 mudas convencionas, ou aproximadamente 20 gemas para cultura de tecido, que originam em 18 meses, aproximadamente 50.000 mudas (VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

Sem dúvida, propagação clonal de material infectado tem contribuído para a prevalência deste vírus na cultura do abacaxi em todo o mundo. Isso é agravado, pois a sintomatologia é insuficiente para determinar a ausência de PMWaV, pois no abacaxizeiro, plantas podem hospedar o vírus sem manifestar sintomas de murcha. No entanto, com a metodologia validada ficou possível a aquisição de mudas comerciais sadias para o plantio, que podem originar mudas convencionais para os próximos cultivos, ou aquisição de mudas comerciais certificadas.

5 CONCLUSÕES

Foi validado um método molecular, específico, sensível e rápido para a detecção dos vírus PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 por meio do PCR em tempo real, em folhas de abacaxizeiro e mudas.

Quatro genes de referência, para abacaxizeiro na fase adulta e mudas obtidas de cultura de tecido infectado com PMWaVs foram padronizados, permitindo análise da expressão gênica de transcritos nessas condições.

A metodologia contribuiu para a compreensão da doença: o PMWaV-1 não exibiu relação direta com a doença. O PMWaV-3 foi prevalente nas plantas sintomáticas e assintomáticas. As plantas assintomáticas sempre estavam infectadas, mostrando a real influência na disseminação do vírus. A distribuição de cada vírus, independente do genótipo, mostrou ser diferente de acordo com estado nutricional da planta. O *Dysmicoccus brevipes* adquire os três vírus, porém, não foi um vetor eficiente para o PMWaV-1.

Foi validado um método de diagnóstico que permite selecionar plantas matrizes sadias que deverão ser usadas para produção de mudas, e como recomendação para análise de amostras nos processos de fiscalização fitossanitária e de quarentena.

A padronização do método de detecção viral nas mudas viabiliza uma alternativa para os laboratórios e viveiristas fazerem a certificação e a comercialização do material propagativo de abacaxi livre de vírus. Isso soluciona os atuais problemas de defesa fitossanitária na cultura do abacaxizeiro, garantindo o cumprimento das normativas do MAPA para a produção de material propagativo sadio.

Com o uso de mudas livres de vírus, o método de detecção proposto possibilita fazer o monitoramento da população de cochonilhas nas áreas de novos plantios e contribuir com as estratégias para o controle dos vetores e redução da incidência das doenças, com conseqüente aumento da produtividade e qualidade do abacaxi.

REFERÊNCIAS

ABREU, P.M.V.; PICCIN, J.G.; BUSS, D.S.; VENTURA, J.A.; FERNANDES, P.M.B. Molecular diagnosis of *Papaya meleira virus* (PMeV) from leaf samples of *Carica papaya* L. using conventional and real-time RT-PCR. **Journal Virological Methods**, v.180, p.11-17, 2012.

Ampelovirus. ViralZone.

Disponível em:<http://viralzone.expasy.org/all_by_species/285.html>. Acesso em: 100 fev. 2015.

AMORIM, W.A. Detecção molecular do complexo viral da Murcha do Abacaxizeiro em plantas e no inseto vetor. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2011.

BARTHOLOMEW. The Biology of *Ananas comosus var. comosus* (Pineapple). Australia, 2008.

BASSO M.F.; FAJARDO T.V.M.; EIRAS M.; AYUB R.A.; NICKEL O. Detecção e identificação molecular de vírus associados a videiras sintomáticas e assintomáticas. **Ciência Rural**, v.40, p. 2249-2255, 2010.

BORROTO-FERNANDEZ, J.A.; COSTA, T.A.; LAIMER, M. RT-PCR detection and protein-protein interaction of viral components of *Pineapple mealybug wilt associated virus 2* in Cuba. **J. Plant Pathology**, v. 89, p. 435-439, 2007.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C.T. The MIQE Guidelines: Minimum

Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments *Clinical Chemistry*, v.55, p. 4611–622, 2009.

CAMPOS, N.A.; ALVES, J.D.; PORTO, B.N.; SOUZA, K.R.D.; SANTOS, M.; SILVEIRA, H.R.; MAGALHÃES, M.M. Otimização de protocolos de extração de RNA de raiz de milho (*Zea mays*) visando estudos moleculares de alta sensibilidade. XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Goiânia, 2010.

CARTER, W. Some etiological aspects of mealybugs wilt. **Phytopathology**, v. 35, p. 305-315, 1945.

CHAN, P.L.; ROSE, R.J.; ABDUL MURAD, A.M.; ZAINAL, Z.; LESLIE LOW, E.T. Evaluation of Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR in Oil Palm Elite Planting Materials Propagated by Tissue Culture. **Plos One**, v. 9, p. 6, 2014.

CHENG, D.; ZHANG, Z.; HE, X.; LIANG, G. Validation of Reference Genes in *Solenopsis invicta* in Different Developmental Stages, Castes and Tissues. **Plos One**, v. 8, p. 2, 2013.

CRUZ-CRUZ, C.A.; GONZÁLEZ-ARNAO, M.T.; ENGELMANN, F. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity. **Resources**, v. 2, p. 73-95, 2013.

CULIK, M.P.; PENNY J.; GULLAN, J.P. A new pest of tomato and other records of mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) from Espírito Santo, Brazil. **Zootaxa**, v. 964, p. 1–8, 2005.

CULIK, M.P.; VENTURA, J.A. Scale insects (Hemiptera: Coccoidea) of pineapple in the State of Espírito Santo, Brazil. **Acta Horticulturae**, v. 822, p. 215-218, 2009.

CUNHA, G.A.P.; MATOS, A.P.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F.S.; SANCHES, N.F.; REINHARDT, D.H.R.C. Abacaxi para exportação: aspectos técnicos da produção. Brasília: Embrapa, 1994. 41p.

DEY, K.K.; LINB, H.; BORTHA, W.B.; MELZERA, M.J.; HUA, J.S. A highly sensitive single-tube nested PCR assay for the detection of Pineapple mealybug wilt associated virus-2 (PMWaV-2). **Journal of Virological Methods**, v. 183, p. 215-218, 2012.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

DUBIELA, C.R.; FAJARDO, T.V.M.; SOUTO, E.R.; NICKEL, O.; EIRAS, M.; REVERS, L.F. Simultaneous detection of Brazilian isolates of grapevine viruses by TaqMan real-time RT-PCR. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, p. 158-165, 2013.

FAN, C.; MA, J.; GUO, Q.; LI, X.; WANG, H. Selection of Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR in Bamboo (*Phyllostachys edulis*). **Plos One**, v. 8, p. 2, 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Agricultural statistics database. Rome: World Agricultural Information Center, 2015. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: jan 2015.

GALLELLI, A.; TALOCCI, S.; PILOTTI, M.†; LORETI, S. Real-time and qualitative PCR for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolates causing recent outbreaks of kiwifruit bacterial canker. **Plant Pathology**, v. 63, p. 264-276, 2014.

GAMBLEY, C.F.; STEELE, V.; GEERING, A.D.W.; HOMAS, J.E. The genetic diversity of ampeloviruses in Australian pineapples and their association with mealybug wilt disease. **Australian Plant Pathology**, v. 37, p. 95-105, 2008a.

GUNASINGHE, U.B.; GERMAN, T.L. Purification and partial characterization of a virus from pineapple. **Phytopathology**, v. 79, p.1337-1341, 1989.

HERNÁNDEZ,, L.P.L.; RAMOS, RODRÍGUEZ, M.I.; PEÑA, J.M. PÉREZ. First report of *Pineapple mealybug wilt associated virus-3* infecting pineapple in Cuba. **New Disease Reports**, v. 22, p. 18, 2010.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Rio de Janeiro: IBGE. V. 25, p. 1-88, 2014.

ICTV. International Committee Taxonomy of Viruses, 2015. Disponível em:<
http://ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode_id=20152371";"ICTVonline=
20152371. Acesso em: jul. 2016.

ITO, K. Additional immunological evidence supporting the vírus nature of mealybugs wilt. **Pineapple Reserch Institute News**, v. 10, p. 158-162, 1962.

JANH, C.G.; BEARDSLEY, J. W.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, H. A Review of the Association of Ants with Mealybug Wilt Disease of Pineapple. **Proceedings of the Hawaiian Entomological Society**, v.36, p.9-28, 2003.

JAIN M.; NIJHAWAN, A.; TYAGI, A.K.; KHURANA, J.P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, p. 646–651, 2006.

JAMES D.; VARGA A.; PALLAS V.; CANDRESSE T. Strategies for simultaneous detection of multiple plant viruses. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 28, p. 16-29, 2006.

KOKKINOS, C.D.; CLARK, C.A. Real-time PCR assays for detection and quantification of sweetpotato viruses. *Plant Disease*, v. 90, p. 783-788, 2006.

KUNIYUKI, H.; GIORIA, R.; REZENDE, J.A.M.; WILLINK, C.G.; NOVO, J.P.S.; YUK, V.A. Transmissão experimental do Grapevine vírus B pela cochonilha *Pseudococcus longispinus* Targioni-Tozzetti (Hemiptera: Pseudococcidae). *Summa Phytopathologia.*, v.32, 2006.

LACERDA, J.T.; CARVALHO, R.A.; OLIVEIRA, E.F. Cochonilhas *Dysmicoccus brevipes*: a praga cosmopolita da abacaxicultura. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v.3, p.15-21, 2009.

LING, H.; WU, Q.; GUO, J.; XU, L.; QUE, Y. Comprehensive selection of reference genes for gene expression normalization in sugarcane by real time quantitative RT-PCR. **Plos One**, v. 9, p.5, 2014.

LIU, D.; SHI L.; HAN, C.; YU, J.; LI, D. Validation of Reference Genes for Gene Expression Studies in Virus-Infected *Nicotiana benthamiana* Using Quantitative Real-Time PCR. **Plos One**, v.7, p. 9, 2012.

MA, J.; HE, Y.; WU, C.; LIU, H.; HU, Z. Cloning and selection of reference genes for gene expression studies in *Ananas comosus*. **African Journal of Biotechnology**, v. 29, p. 7424-7433, 2005.

MARTELLI, G.P.; CANDRESSE, T. Closteroviridae. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, 2010.

MARTELLI G. P., AGRANOVSKY A. A., AL RWAHNIH M., DOLJA V. V., DOVAS C. I., FUCHS M. Taxonomic revision of the family Closteroviridae with special reference to the grapevine leafroll-associated members of the genus

Ampelovirus and the putative species unassigned to the family. **Journal Plant Pathology**, v.94, p.7–19, 2012.

MACKENZIE, A.; GIBBS, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 63, p. 9-16, 1997.

MATOS, A.P.; SANCHES, N.F.; SOUZA, L.F. S; ELIAS JÚNIOR, E.; TEIXEIRA, F.A.; GOMES, D.C.; CORDEIRO, D. G. Proposta de um sistema de produção integrada para a cultura do abacaxi. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, 2007.

MELZER, M.J.; KARASEV, A.V; SETHER, D.M.; HU, J.S. Nucleotide sequence, genome organization and phylogenetic analysis of pineapple mealybug wilt associated virus-2. **Journal of General Virology**, V. 82, p. 1–7, 2001.

MELZER, M.J.; SETHER, D.M.; KARASEV, A.V.; BORTH, W; HU, J.S. Complete nucleotide sequence and genome organization of pineapple mealybug wilt associated virus-1. **Archives of Virology Methods**, v. 153, p. 707-714, 2008.

MENEZES, E.B. Bioecologia e controle de cochonilha-farinhosa do abacaxi, *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell, 1893) Ferris, 1950. Piracicaba. ESALQ-USP, 1973. 69p.

NICOT, N.; HAUSMAN, J.F.; HOFFMANN, L.; EVERS, D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 2907–2914, 2005.

PALLAS, V.; SANCHEZ-NAVARRO, J.; VARGA, A.; APARICIO, F.; JAMES, D. Multiplex polymerase chain reaction (PCR) and real-time multiplex PCR for the simultaneous detection of plant viruses. **Methods in Molecular Biology**, v. 508, p. 193-208, 2009.

PERON, F.N.; FERNANDES, P.M.B.; VENTURA, J.A. Detecção de PMWAV-1 e PMWaV-2 em abacaxizeiros no Estado do Espírito Santo. **Tropical Plant Pathology**. 34 (suplemento), 268, 2010.

PY, C.; LACOEUILHE, J.J.; TEISSON, C. L'ananas, sa culture, ses produits. 526, 1984.

RODRIGUES, T. B.; KHAJURIA, C.; WANG, H.; MATZ, N.; CARDOSO, D. C.; VALICENTE, F. H.; ZHOU, X.; SIEGFRIED, P. Validation of Reference Housekeeping Genes for Gene Expression Studies in Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). **Plos One**, v. 9, p. 10, 2014.

SANTA CECÍLIA, L.V.C.; REIS, P.R. A cochonilha e a murcha do abacaxizeiro. **Informe Agropecuário**, v.130, p.37-41, 1985.

SANTA-CECÍLIA, L.V. C; BUENO, V.H.P.; PRADO, E. Desenvolvimento de *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) (Hemiptera: Pseudococcidae) em duas cultivares de abacaxi. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, p.1015-1020, 2004.

SETHER, D.M.; BORTH, W.B.; MELZER M.J.; HU, J. Spatial and temporal incidences of Pineapple mealybug wilt-associated viruses in pineapple planting blocks. **Plant Disease**, v. 94, p.196-200, 2010.

SETHER, D., M.; HU, J.S. Closterovirus Infection and Mealybug Exposure Are Necessary for the Development of Mealybug Wilt of Pineapple Disease. **Phytopathology**, v. 92, p. 928-935, 2002.

SETHER, D.M.; ULLMAN, D.M.; HU, J.S. Transmission of Pineapple Mealybug Wilt-Associated Virus by Two Species of Mealybug (*Dysmicoccus* spp.). **Phytopathology**, v. 88, 1998.

SETHER, D.M.; KARASEV, A.V.; OKUMURA, C.; ARAKAWA, C.; ZEE, F.; KISLAN, M.M.; BUSTO, J.L.; HU, J.S. Differentiation, Distribution, and Elimination of Two Different Pineapple mealybug wilt-associated viruses Found in Pineapple. **Plant Disease**, v. 85, p. 856-864, 2001.

SETHER, D.M.; HU, J.S. Closterovirus Infection and Mealybug Exposure Are Necessary for the Development of Mealybug Wilt of Pineapple Disease. **Phytopathology**, v. 92, p. 928-935, 2002.

SETHER, D.M.; MELZER, M.J.; BUSTO, J. Diversity and Mealybug Transmissibility of Ampeloviruses in Pineapple. **Plant Disease**, v. 89, p. 450-456, 2005.

SETHER, D.M.; MELZER, M.J.; BORTH, W.B.B.; HU, J.S. Genome organization and phylogenetic relationship of Pineapple mealybug wilt associated virus-3 with family Closteroviridae members. **Virus Genes**, v. 38, p. 414, 2009.

SILVA, A.G.A.; GONÇALVES, C.R.; GALVÃO, R.M.; GONÇALVES, A.J.L.; GOMES, J.; SILVA, M.N.; SIMONI, L. Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil, seus parasitas e predadores. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura - Serviço de Defesa Sanitária Vegetal, 1968.

SRIVASTAVA, P.; MEHROTRA, S.; TIWARY, P.; CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Diagnosis of Indian Visceral Leishmaniasis by Nucleic Acid Detection Using PCR. **Plos One**, v. 6, p. 4, 2011 .

SUBERE, C.V.Q.; SETHER, D.M.; BORTH, W.B.; MELZER, M.J.; HU, J.S. Detection and Absolute Quantification of *Pineapple mealybug wilt-associated virus-2* in Pineapple Using Real-Time RT-PCR (TaqMan®) Assays. **Acta Horticulturae.**, v. 902, 2011.

SUZUKI, M.; KETTERLING, M.G.; MCCARTY, D.R. Quantitative statistical analysis of *cis*-regulatory sequences in ABA/VP1- and CBF/DREB1-regulated genes of arabidopsis. **Plant Physiology Review**, v. 139, p. 437-447, 2005.

TESTE †, M.A.; DUQUENNE, M.†; FRANÇOIS, J.M.; PARROU, J. L. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Molecular Biology**, v.10, p. 99, 2009.

VENTURA, J. A.; CABRAL, J.R.S.; MATOS, A.P.; COSTA, H. "Vitória": nova cultivar de abacaxi resistente a fusariose. **Incaper**, 4 p. (Documentos, 148), 2006.

VENTURA, J.A.; CABRAL, J.R.S.; MATOS, A.P.; COSTA, H. 'Vitória': new pineapple cultivar resistant to fusariose. **Acta Horticulturae**, v. 822, p. 51-54, 2009.

VENTURA, J.A.; ZAMBOLIM, L. Controle das doenças do abacaxizeiro. In: Zambolim, L. et al. Controle de doenças de plantas fruteiras, v.2, p. 445-487, 2002.

VENTURA, J.A., H. COSTA. Manejo integrado das doenças de fruteiras tropicais: Abacaxi, banana e mamão. In L. Zambolim (ed.) Manejo integrado; fruteiras tropicais - doenças e pragas, v. 672, p. 279-352, 2002.

ZAMBONI, A.; PIERANTONI, L.; FRANCESCHI, P. Total RNA extraction from strawberry tree (*Arbutus unedo*) and several other woody-plants. **Journal of Biogeosciences and Forestry, Bologna**, v.1, p.122-125, 2008.

ANEXO A

Genes de abacaxizeiro selecionados para a confecção dos *primers* como housekeeping, para normalização da técnica de real time para quantificação relativa: Actina, EF-1 α , GAPDH e 18S ribossomal.

Ananas comosus actin (Act) mRNA, complete cds

GenBank: HQ148720.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>gi|319998244|gb|HQ148720.1| Ananas comosus actin (Act) mRNA, complete cds
GCTCTCTTAGGATCCATAAAAAATGGCCGATGCTGAGGATATCCAGCCTCTCGTTTGGACAATGGAACT
GGAAATGGTCAAGGCTGGCTTCGCCGGAGATGATGCACCGAGAGCGGTCTTCCCCAGCATTGTGGGTGCTC
CCCCCACACTGGTGTGATGGTGGGCATGGGGCAGAAGGATGCCATATGTGGGCGATGAGGCCAGTCCAA
GAGGGGTATCCTCACCCCTCAAGTACCCAATTGAGCACGGCATTGTGAGCAACTGGGATGACATGGAGAAG
ATCTGGCACCACACCTTCTACAACGAGCTCCGTGTTGCTCCTGAGGAGCACCCCTGTCTTGCTCACTGAAG
CCCCCTCTCAACCCCAAGGCCAACAGAGAGAGGATGACCCAATCATGTTTGAGACCTTTAATGTCCCTGC
CATGTACGTTGCCATCCAGGCTGTGCTCTCCCTCTATGCTAGCGGTCCGTACCCTGGTATCGTGTGGAT
TCTGGTGTGGTGTGAGCCACACTGTCCCATCTATGAAGGCTATGCCCTCCCCACGCCATCCTCCGTC
TGGACCTTGCCGGCCGTGATCTCACCGACTACCTGATGAAGATCCTCACTGAAAGAGGTTACTCTTTTAC
CACCCTGCTGAACGGGAAATTGTAAAGGACATGAAGGAAAAGCTGGCCTACGTGGCACTTGACTTTGAG
CAGGAGCTCGAGACTGCCAAGAGCAGCTCCTCTGTTGAGAAGACCTACEAGCTGCTGATGGCCAGGTCA
TCACCATTGGAGCTGAAAGGTTCCGCTGCCAGAAAGTGCCTTTCCAGCCATCTCTCATTGGTATGGAAGC
TGGGGTATTACGAGACCCTTACGACTCCATCATGAAGTGGGATGTGGATATCAGGAAGGACCTGTAC
GGTAACATCGTCTCAGTGGTGGTACGACTATGTTCCCTGGTATTGCTGATCGTATGAGCAAGGAGATCA
CTGCTCTTCTCCGAGCAGCATGAAGATCAAGGTGCTCGCCCCGCTGAGCGCAAGTACAGTGTCTGGAT
TGGGGGTCCATCCTCGCTTCCCTAAGCACTTCCAGCAGATGTGGATTTCAAAGGGTGGATATGATGAA
TCCGGCCCTCCATTGTTCAACGGAAAGTGTCTTAAATTTCTTGGATG
```

JBW098E02.b_008.abi Pineapple root tip cDNA library Ananas comosus cDNA clone JBW098E02 similar to elongation factor 1-alpha, mRNA sequence

GenBank: DT339483.1

[EST](#) [GenBank](#)

```
>gi|73689375|gb|DT339483.1|DT339483 JBW098E02.b_008.abi Pineapple root tip cDNA
library Ananas comosus cDNA clone JBW098E02 similar to elongation factor 1-alpha,
mRNA sequence
AAATTGTTAAGGAAGTTTCATCCTACCTCAAGAAGGTTGGATACAACCCCGATAAGATCCCTTCGTCCC
CATCTCCGGCTTTGAAGGTGACAACATGATTGAGAGGTCAACCAACCTCGACTGGTACAAGGGGCCGACC
CTTCTTGAGGCCCTCGACTTGATTGAGGAGCCAAAGAGGCCACCGACAAGCCTCTCCGCTTCCCTTC
AGGACGCTACAAGATTGGTGGTATCGGCACCTGTCCCTGTGGGTGCTGTTGAAACCGGTGTCTCAAGCC
CGGTATGGTGGTCACTTTGGGCCACTGGGCTGACCACTGAGGTCAGTCTGTGGAGATGCACCACGAG
GCCCTTCAGGAGGCCCTTACCTGGTGATAACGTTGGCTTCAACGTTAAGAACGTCGCCGTCAAGGATCTCA
AACGTGGTTTCGTGCGCTCCAACTCGAAGGAAGATCCTGCAAGGAGGCCGCTAGCTTCACTTCTCAGGT
TATCATCATGAACCAACCCCGACAGATTGGCAATGGCTATGCTCCCGTACTCGACTGCCACACCTCCAC
ATCGCTGTTAAGTTTGTGAGATCCTCACCAGATTGATCGCCGCTCTGGCAAGGAGCTCGAGAAGGAGC
CCAAGTTCTTGAAGAACGTTGATCGGGCTTTGTTAAGATGATTCCGACCAAGCCCATGGTTGTTGAGAC
CTTCTCCGAGTACCCGCCCTTGGCCGTTTTGCGGTCCGTGACATGAGGCAGACCGTTGCTGTGCGAGTG
ATCAAGAGTGTGAGAGAAGGATCCCACTGGCGCCAAAGGTCACCAAGGCCCGCCGGAAGAAGAGTGAA
AGATAATTATTTAAATGGTTGAGTCCTAA
```

Ananas comosus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA, partial cds

GenBank: HM104185.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>gi|306415492|gb|HM104185.1| Ananas comosus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
(GAPDH) mRNA, partial cds
TACCGATTACATGACTTAYATGTTCAAGTATGATACYGTGCACGGACAGTGGGAAGCACCATGATATTAAG
GTGAAGGATTCTAAGACCCCTTCTCTTTGGCCGAGAAGGCAGTCACTGTTTTTGGAAATCAGGAACCCCTGAGG
AGATCCCCTGGGGTGAAGCCGGTCTGAGTATGTTGTGGAGTCAACTGGTGTCTTCACTGACAAGGACAA
GGCTGCTGCTCATCTGAAGGGTGGCCGGAAGAAGGTCATCAITTTCTGCTCCTAGTAAGGATGCCCCGATG
TTTGTGTTGGTGTGAATGAGAAGGAATACAAGCCTGACATTGACATTGTCTCCAATGCTAGCTGCACCA
CTAACTGTTTGGCACCTCTAGCTAAGGTCATCCATGATAGGTTTGGTATTATTGAGGGCTTAATGACCAC
AGTGCACTCTATTACAGCTACACAGAAGACTGTTGATGTTCCATCAAGCAAGGACTGGAGGGTGGAAAG
```

Ananas comosus gene for 18S rRNA

GenBank: D29786.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>gi|2346999|dbj|D29786.1| Ananas comosus gene for 18S rRNA
TCAAAGATTAAGCCATGCATGTGCAAGTATGAACAACTCAAACCTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAA
TCAATTATAGTTTTGTTGATGGTAACTACTACTCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCAC
CGAACCCCGACTTCTGGAAAGGATGCATTTATTAGATAAAAGGTCAATGCGGGCTCTGCCCGTTGCTTTG
ATGATTCATGATAACTTGACCGATCGCAAGGCCATCGTCCCGGCGACGCATCAITTCAAATTTCTGCCCTA
TCAACTTTTCCATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTGGTGCACGGGTGACGGAGAATTAGGGTTCCGATTCC
GGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCAATCCAAAGGAAGGCAGCGCGCAAAATTACCCAATCCTGA
CACGGGGAGGTAGTGACATAAATAACAATACCGGGCTCTTCGAGTTTGGTAATTGGAAATGAGTACAATC
TAAATCCCTTAAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCACGCGCCGCGTAATTCCAGCTCCAAT
AGCGTATATTTAAGTTGTTGCAAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGACCTTGGGTTGTGTCCGTTGGTCCGCC
ACTGGGTGTGCACCTGCCGGCTCGTCCCTTCTGCCGGTACTCTCTCCTGGCCTAATTGGCCGGGTGGT
GCCTCCGGCGCTGTTACTTTGAAGAAATTAGAGTGTCTCAAAGCAAGCCCAAGCTCTGCATACATTAGCAT
GGGATAACATCACAGGATTTCCGTCTATTGTGTTGCCCTTCGGGATCGGAGTAATGATTAAGAGGGACA
GTCCGGGGCATTTCGATTTTCATAGTCAGAGGTGAAATTTCTGGATTTATGAAAGACGAACAACCTGCGAAA
GCATTTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGCTCGAAGACGATCAGATACCGTCC
TAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACCAGGGATCGGCGGATGTTGCTTTAAGGACTCCGCTGGCACCTTA
TGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGAGTATGGTCCCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGA
AGGGCACCAACAGGAGTGGAGCCTGCCGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTTACCAGGTCCAGACA
TAGTAAGGATTGACAGACTGATAGCTCTTTCGAGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTG
GTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCGGTTAACGAAACGAGACCTCAGCCTGCTAACTAGCTATGCCGAGGC
GACCTTCCGTGGCCAGCTTCTTAGAGGACTATGGCCCATAGGCCACGGAAGTTTGAAGCAATAACAGG
TCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGACGCGCGCTACACTGATGTATTCAACGAGTCTATAACCTT
GGCCGATAGGCCCGGTAATCTTTGAAAATTTCAATCGTGATGGGGATAGATCAATTGCAATTGTTGGTCTT
CAACGAGGAATTCCTAGTAAGCCGCAAGTCATCAGCTCCGCTTGAAGTACGTCCTTCCCTTTGTACACACC
GCCCGTCCCTCCTACCGATTGAATGGTCCGGTGAAGTGTCTCGGATCGCGCGATGTGGCCGTTTTGCCGC
CTGTGACGTCTGTGAGAAGTCCACTGAACCTTATCATTAGAGGAAGGAGAAG
```

ANEXO B

Sequências dos genes da HSP 70 para a espécie do PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3, e respectivamente, seus acessos no banco de dados, HE583225.1, EU01667.5 e [FJ209047.1](#), utilizados para confecção do *primers*.

```

LOCUS       HE583225                590 bp    RNA     linear   VRL 22-AUG-2011
DEFINITION  Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 partial hsp70 gene for
             heat shock protein 70, isolate 10, genomic RNA.
ACCESSION   HE583225
VERSION     HE583225.1  GI:344029983
KEYWORDS    .
SOURCE      Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 (PMWaV-1)
  ORGANISM  Pineapple mealybug wilt-associated virus 1
            Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA
            stage; Closteroviridae; Ampelovirus.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Koohapitagtam,M. and Hongprayoon,R.
  TITLE     Detection of pineapple ampelovirus by using RT-PCR method
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 590)
  AUTHORS   Koohapitagtam,M.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (11-AUG-2011) to the INSDC. Koohapitagtam M., Pest
            Management, Natural Resources, 90110, 90110, THAILAND
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..590
                     /organism="Pineapple mealybug wilt-associated virus 1"
                     /mol_type="genomic RNA"
                     /isolate="10"
                     /host="Ananas comosus"
                     /db_xref="taxon:180903"
                     /country="Thailand:Prachuabkirikhan"
                     /collected_by="Maneerat Koohapitagtam"
                     /identified_by="Maneerat Koohapitagtam"
     gene              <1..>590
                     /gene="hsp70"
     CDS                <1..>590
                     /gene="hsp70"
                     /codon_start=3
                     /product="heat shock protein 70"
                     /protein_id="CCD30532.1"
                     /db_xref="GI:344029984"
                     /translation="RKDNTHAIGLGALLEKDLEVYRDIKRYFGLNKFNKDVYLDKLP
TIEVVVDNWGCSIGPVDGARGKAKSVLTLASDFITGLVQLAIKMTNQVSVSVCSVPA
AYNSYQRGFIFESCKLSSINVQAVVNEPTAAGLSAFITTPKASVNYLLVYDFGGGTFD
SLLLVGPAYVGVLDMSGDNYLGGRDVDNRLLEVCA"
ORIGIN
  1 acaggaagga caaacctcac gccataggt tgggggcact gttggaaaa gacttagagg
  61 tttatcgtga tataaaaagg tatttcggac tcaacaagt caacaaagat gtgtatctcg
 121 ataaattgaa acccacaatc gaggtagtgg ttgacaactg gggttgttct ataggaccag
 181 tagacggtgc gagagggaaa gccaaatcag ttctcacttt agcctctgat ttataacgg
 241 gattggtaca actagcgatc aagatgacga atcaacaagt atctgtgtct gttgttcag
 301 taccagcagc ttacaattct tatcaaaagg gttttatttt tgaagttgt aagttgagct
 361 ctataaatgt gcaggcggta gtaaacgaac cgaccgcagc tggattgagt gctttcataa
 421 ctaccccgaa agcttctgtg aattatttgt tagtctacga tttcggagga ggcacttttg
 481 atagttcctt actcgtggtt ggacctgcgt acgtgggagt actggattcg atgggagata
 541 actatctggg aggcagggac gtagataaca gattgcttga agtttgtgcg

```

//

LOCUS EU016675 610 bp RNA linear VRL 31-JUL-2007
 DEFINITION Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate PJ3 heat shock protein 70 (HSP70) gene, partial cds.
 ACCESSION EU016675
 VERSION EU016675.1 GI:154000873
 KEYWORDS .
 SOURCE Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 (PMWaV-2)
 ORGANISM [Pineapple mealybug wilt-associated virus 2](#)
 Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; Closteroviridae; Ampelovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 610)
 AUTHORS Chiemsombat,P. and Maneechote,P.
 TITLE PCR method for the detection of pineapple closteroviruses
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 610)
 AUTHORS Chiemsombat,P., Maneechote,P. and Wongsuwan,P.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (05-JUL-2007) Plant Pathology, Kasetsart University, Malaiman Road, Kamphaengsaen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

FEATURES
 Location/Qualifiers
 source 1..610
 /organism="Pineapple mealybug wilt-associated virus 2"
 /mol_type="genomic RNA"
 /serotype="PMWaV-2"
 /isolate="PJ3"
 /isolation_source="infected pineapple leaves"
 /host="pineapple"
 /db_xref="taxon:136234"
 /country="Thailand"
 /PCR_primers="fwd_seq: catacgaactagactcatac, rev_seq: ccatccaccaattttactac"
 gene <1..>610
 /gene="HSP70"
 CDS <1..>610
 /gene="HSP70"
 /codon_start=3
 /product="heat shock protein 70"
 /protein_id="ABS57005.1"
 /db_xref="GI:154000874"
 /translation="YELDSYVLKLPVHRVEVFKDGSVMLGGIGEGPDRTVSVTDIIS LFSKALIKEAEQSTGLRVTGAVVTPADYNSFKRSFITNCMKDLGIPVRAIVNEPTAA ALYLSLILQEKDLFLSVDFGGGTFDVSVVRKLGDDVVCVLFVSGDNFLGGRDIDRAVA AEVKARVGESIDTATLSLFAASIKEEVTNEPRAKTHVVKLVGDG"

ORIGIN
 1 catacgaact agactcatac gtgctaaaat taaaaccagt gcacagagtg gaagtgttca
 61 aggacgggtc ggtaatgcta ggggggtattg gtgaaggccc tgataggaca gtctctgtaa
 121 cggatatcat atcccttttt tctaaagcac ttataaagga agcggaaacag tctactggac
 181 tacgcgtaac gggtagcgtg gtaacggtag cagccgacta caactctttt aaacgtagtt
 241 ttataactaa ctgcatgaaa gacttgggta ttccagtaag ggctatagta aatgaaccga
 301 ccgctgcagc gttatattct ttatctatat tacaagaaaa ggatttattt ctgtctgttt
 361 ttgactttgg tggaggggacg tttgatgtgt cttttgtag aaaactcggg gatgtggtag
 421 gcgtactggt tagcgttggc gataactttt tagggggaag ggatatcgac agggcggtag
 481 cagctgaggt gaaggcaaga gtgggcgaat ctattgatac agctacattg tcattatttg
 541 cagcgtccat taaagaggag gtgactaatg agccgagggc aaagacgcac gtagtaaaat
 601 tggatggatgg

LOCUS FJ209047 499 bp ss-RNA linear VRL 26-AUG-2010
 DEFINITION Pineapple mealybug wilt-associated virus 3 isolate PT3 heat shock protein 70-like protein (HSP70h) gene, partial cds.
 ACCESSION FJ209047
 VERSION FJ209047.1 GI:207667269
 KEYWORDS .
 SOURCE Pineapple mealybug wilt-associated virus 3 (PMWaV-3)
 ORGANISM [Pineapple mealybug wilt-associated virus 3](#)
 Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; Closteroviridae; Ampelovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 499)
 AUTHORS Shen,B.-N., Zheng,Y.-X., Chen,W.-H., Chang,T.-Y., Ku,H.-M. and Jan,F.-J.
 TITLE Occurrence and Molecular Characterization of Three Pineapple Mealybug Wilt-Associated Viruses in Pineapple in Taiwan
 JOURNAL Plant Dis. 93 (2), 196 (2009)
 REFERENCE 2 (bases 1 to 499)
 AUTHORS Jan,F.-J.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (12-SEP-2008) Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, 250 Kuo-Kuang Road, Taichung 40227, Taiwan
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..499
 /organism="Pineapple mealybug wilt-associated virus 3"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="PT3"
 /host="Ananas comosus (pineapple cultivar Tainung No. 17)"
 /db_xref="taxon:[373861](#)"
 /country="Taiwan"
 /collection_date="Nov-2007"
 /note="acronym: PMWaV-3"
 gene <1..>499
 /gene="HSP70h"
 CDS <1..>499
 /gene="HSP70h"
 /codon_start=1
 /product="heat shock protein 70-like protein"
 /protein_id="[ACI25095.1](#)"
 /db_xref="GI:207667270"
 /translation="IDGCVSESGTIYVPTVVGVRTDGTFAIGLGALLERNLTVYRDIK RYFGLNKFNKDITYTSKLNKSEVEVVDDWTCKIGPVDGSKGKARSVIALASDFVTGLCA IAVKMTGQPVTLSVCSVPAAYNSYLRSFIYESCKLSSINQAVVNEPTAAGLSAFIDI PKSTVN"
 ORIGIN
 1 attgatggat gtgtatcgga aagcggatca atatacgtac ccactgtcgt aggttacaga
 61 accgacggta ctttcgcat cggtttgga gcactactcg aacgtaactt aacagtttac
 121 cgcgatatta aacggatatt cgggttgaac aaatttaaca aagatactta cacttcaaaa
 181 ctcaaatcag aagtggaggt agtcgttgat gactggacgt gtaaaatcgg tcccgttgat
 241 ggatcgaag gaaaggcacg atcagttatt gctctagcat cagattttgt gacaggtcct
 301 tgtgctatag ctgttaaaat gacgggacaa ccggtgacgt tgtcgggtgt ttctgtacct
 361 gcagcttaca actccttatt acgcagcttt atatatgaaa gttgtaaatt gagttcgata
 421 aacgtacagg cggtggtaaa tgaaccaact gcagcaggcc tcagtgcgtt tatagatatt
 481 ccgaaatcta cagtgaact

//

ANEXO C

Especificidade das seqüências desenhadas, *primer F primer R*, para o PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3, com o gene da HSP 70 específico, de cada espécie de vírus.

PMWaV-1

PCR TEMPO REAL - Especificidade do *Primer F*

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected 0

Alignments Download v. GenBank Statistics Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate PB1-1Ph heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322163.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate CB1-4Ph heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322162.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate RV1-1MG2 heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322159.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate RB1-2Ph heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322158.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate RV1-2MG2 heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322157.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate RV1-3Ph heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322155.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate Pr1-1Ph heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322154.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate KR1-2Ph heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322153.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate PB1-4Ph heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322152.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate Pr1-3Ph heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322151.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate PB1-1Ph heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322150.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate PB1-3Ph heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322149.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate KR1-4Ph heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322148.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate CH1-73ve heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322147.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate Human, complete genome	38.2	38.2	100%	0.76	100%	K087494.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 partial HSP70 gene for heat shock protein 70 homologue, isolate TK7	38.2	38.2	100%	0.76	100%	H0940514.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate PMWaV-1/Mexico heat shock 70-like protein (hsp70h) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	K080714.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate CU LHER heat shock protein 70 (hsp70h) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	J0645771.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 partial hsp70 gene for heat shock protein 70, isolate 10, genomic RNA	38.2	38.2	100%	0.76	100%	H638325.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate Cuba L14 heat shock 70-like protein (hsp70h) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	H0129930.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate PT1 heat shock protein 70-like protein (HSP70h) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	EJ789113.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 clone pF53pmv18 helicase and RNA dependent RNA polymerase genes, partial cds, unknown protein c	38.2	38.2	100%	0.76	100%	E1467925.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1, complete genome	38.2	38.2	100%	0.76	100%	AF14119.3
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate FJ3 heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	EF62074.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: Phoenix dactylifera peroxidase 1-like (LOC10315379). mRNA	36.2	36.2	94%	3.0	100%	XM_008802996.1
<input type="checkbox"/>	Fusarium fulvum IM 58289 draft genome, chromosome FF11, chr02	36.2	36.2	94%	3.0	100%	HE73024.1
<input type="checkbox"/>	Vigna unguiculata var. unguiculata DNA, chromosome 7, almost complete sequence, cultivar Shuman	34.2	92.7	100%	12	100%	AP015040.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: Telfaira rubripes methylbenzoyl co-factor synthase (mcsoc1) mRNA	34.2	34.2	89%	12	100%	XM_003963711.2

PMWaV-1

PCR TEMPO REAL - Especificidade do *Primer R*

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected 0

Alignments Download v. GenBank Statistics Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate PB1-1Ph heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322163.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate CB1-4Ph heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322162.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate RV1-1MG2 heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322159.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate RB1-2Ph heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322158.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate RV1-2MG2 heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322157.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate RV1-3Ph heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322155.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate Pr1-1Ph heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322154.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate KR1-2Ph heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322153.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate PB1-4Ph heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322152.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate Pr1-3Ph heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322151.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate PB1-1Ph heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322150.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate PB1-3Ph heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322149.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate KR1-4Ph heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322148.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate CH1-73ve heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KJ322147.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate Human, complete genome	38.2	38.2	100%	0.76	100%	K087494.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 partial HSP70 gene for heat shock protein 70 homologue, isolate TK7	38.2	38.2	100%	0.76	100%	H0940514.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate PMWaV-1/Mexico heat shock 70-like protein (hsp70h) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	K080714.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate CU LHER heat shock protein 70 (hsp70h) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	J0645771.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 partial hsp70 gene for heat shock protein 70, isolate 10, genomic RNA	38.2	38.2	100%	0.76	100%	H638325.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate Cuba L14 heat shock 70-like protein (hsp70h) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	H0129930.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate PT1 heat shock protein 70-like protein (HSP70h) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	EJ789113.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 clone pF53pmv18 helicase and RNA dependent RNA polymerase genes, partial cds, unknown protein c	38.2	38.2	100%	0.76	100%	E1467925.1
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1, complete genome	38.2	38.2	100%	0.76	100%	AF14119.3
<input type="checkbox"/>	Pineapple mealybug vif-associated virus 1 isolate FJ3 heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	EF62074.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: Phoenix dactylifera peroxidase 1-like (LOC10315379). mRNA	36.2	36.2	94%	3.0	100%	XM_008802996.1
<input type="checkbox"/>	Fusarium fulvum IM 58289 draft genome, chromosome FF11, chr02	36.2	36.2	94%	3.0	100%	HE73024.1
<input type="checkbox"/>	Vigna unguiculata var. unguiculata DNA, chromosome 7, almost complete sequence, cultivar Shuman	34.2	92.7	100%	12	100%	AP015040.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: Telfaira rubripes methylbenzoyl co-factor synthase (mcsoc1) mRNA	34.2	34.2	89%	12	100%	XM_003963711.2
<input type="checkbox"/>	Hemeroschus placid genome assembly H. placid_Mh01_scaffold_HPLM_scaffold0001302	34.2	34.2	89%	12	100%	LM584108.1
<input type="checkbox"/>	Sobolotryma bakeri genome assembly S. bakeri_Dat_tanad_scaffold_S042_scaffold0009279	34.2	34.2	89%	12	100%	LM119836.1

PMWaV-2

PCR TEMPO REAL - Especificidade do *Primer F*

Sequences producing significant alignments:

Select All None Selected 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate RY heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KT322167.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate CB heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KT322166.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate RB heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KT322165.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate PB heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KT322164.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 strain B.L.ac-191 heat shock 70-like protein (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KM870780.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 partial HSP70 gene for heat shock protein 70 homologue, isolate TK7	38.2	38.2	100%	0.76	100%	HG949515.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate CU Ha Bp heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	JX645773.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate CULHER heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	JX645772.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate CU CA MD2 L24 heat shock 70-like protein (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	JX508637.1
Grapevine leafroll-associated virus 3m isolate 139, complete genome	38.2	38.2	100%	0.76	100%	JX266782.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 partial hsp70 gene for heat shock protein 70, isolate 10, genomic RNA	38.2	38.2	100%	0.76	100%	HE583226.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 partial hsp70 gene for heat shock 70-like protein, isolate Cuba L07, genomic RNA	38.2	38.2	100%	0.76	100%	FN825676.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate PT2 heat shock protein 70-like protein (HSP70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	EU769115.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate PJJ heat shock protein 70 (HSP70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	EU016675.1
Grapevine leafroll-associated virus 3 clone WC-HSP-10 heat shock protein 70-like protein gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	EF103904.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 polyprotein (ORF 1a) and RNA-dependent RNA polymerase genes, partial cds; and hydrophobic protein	38.2	38.2	100%	0.76	100%	AF283103.1
Prunus persica hypothetical protein (PRUPE_ppa026550m) mRNA, complete cds	34.2	34.2	89%	12	100%	XM_007207704.1
Prunus persica hypothetical protein (PRUPE_ppa025119m) mRNA, complete cds	34.2	34.2	89%	12	100%	XM_007207645.1
Prunus persica hypothetical protein (PRUPE_ppa027083m) mRNA, complete cds	34.2	34.2	89%	12	100%	XM_007206787.1
Prunus persica hypothetical protein (PRUPE_ppa021245m) mRNA, complete cds	34.2	34.2	89%	12	100%	XM_007206579.1
Selasinella moellendorffi hypothetical protein, mRNA	34.2	34.2	89%	12	100%	XM_002969977.1
Maraca fascicularis complete genome, chromosome chr1	32.2	32.2	84%	47	100%	LT160000.1
Pseudomonas sp. BsoQ0108, complete genome	32.2	32.2	84%	47	100%	CP013138.1
Piscirickettsia salmonis strain PM15972A1, complete genome	32.2	32.2	84%	47	100%	CP017413.1
Aureobasidium subglaciale EXF-2481 hypothetical protein, mRNA	32.2	32.2	84%	47	100%	XM_013490883.1
Pseudomonas destructans 20531-21 hypothetical protein, partial mRNA	32.2	32.2	84%	47	100%	XM_012883147.1
PREDICTED: Clupea harengus CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 4 (cmtd4), partial mRNA	32.2	32.2	84%	47	100%	XM_012835309.1
Verticillium dahliae VdLs17 chromosome 4, complete sequence	32.2	32.2	84%	47	100%	CP010983.1

PMWaV-2

PCR TEMPO REAL - Especificidade do *Primer R*

Sequences producing significant alignments:

Select All None Selected 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate RY heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KT322167.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate CB heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KT322166.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate RB heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KT322165.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate PB heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	KT322164.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 partial HSP70 gene for heat shock protein 70 homologue, isolate TK7	38.2	38.2	100%	0.76	100%	HG949515.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate CU Ha Bp heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	JX645773.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate CULHER heat shock protein 70 (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	JX645772.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate CU CA MD2 L24 heat shock 70-like protein (hsp70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	JX508637.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 partial hsp70 gene for heat shock protein 70, isolate 10, genomic RNA	38.2	38.2	100%	0.76	100%	HE583226.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 partial hsp70 gene for heat shock 70-like protein, isolate Cuba L07, genomic RNA	38.2	38.2	100%	0.76	100%	FN825676.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate PT2 heat shock protein 70-like protein (HSP70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	EU769115.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 isolate PJJ heat shock protein 70 (HSP70) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	EU016675.1
Pincta collyris palmuxa strain CF32, genome	36.2	36.2	94%	3.0	100%	CP006969.1
Pincta collyris palmuxa SOR-21, complete genome	36.2	36.2	94%	3.0	100%	CP006872.1
PREDICTED: Bombyx mori kinesin-like protein a (IMCA), transcript variant X1, mRNA	34.2	34.2	89%	12	100%	XM_012088413.1
Helicoverpa zea polyvirus genome assembly H. bakeri, Edinburgh, scaffold HBFE_scaffold000882	34.2	34.2	89%	12	100%	LL189261.1
Dracunculus medinensis genome assembly D. medinensis_Ghana_scaffold DME_cont000089	34.2	34.2	89%	12	100%	L6978357.1
Dracunculus medinensis genome assembly D. medinensis_Ghana_scaffold DME_cont000085	34.2	34.2	89%	12	100%	L6978222.1
Dracunculus medinensis genome assembly D. medinensis_Ghana_scaffold DME_cont0000214	34.2	34.2	89%	12	100%	L6978651.1
Bombyx mori mRNA, clone hsp70BMT	34.2	34.2	89%	12	100%	AK378460.1
PREDICTED: Sineoclethra anabulensis DNA (coding:5)-methyltransferase 3A like (LOC107697204), transcript variant X6, mRNA	32.2	32.2	84%	47	100%	XM_016467880.1

PMWaV-3

PCR TEMPO REAL - Especificidade do *Primer F*

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Pineapple mealybug wilt-associated virus 3 isolate CU CA MD2 L17 heat shock 70-like protein (hsp70h) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	JX598536.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 3 isolate L91 heat shock 70-like protein (HSP70h) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	GU563497.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 3 ORF1a and RNA dependent RNA polymerase (RdRp) genes, partial cds; c6 gene, complete sequence, pineapple mealybug wilt-associated virus 3 isolate PT3 heat shock protein 70-like protein (HSP70h) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	DQ209259.2
Pineapple mealybug wilt-associated virus 3 isolate PT3 heat shock protein 70-like protein (HSP70h) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	FJ209947.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 3 clone phsianNP15 heat shock 70-like protein gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	EF488755.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 3 clone pB13P4P36 RNA dependant RNA polymerase gene, partial cds; unknown protein gene, complete genome	38.2	38.2	100%	0.76	100%	EF497918.1
Mycobacterium phage Dynami, complete genome	36.2	36.2	94%	3.0	100%	KT629047.1
Mycobacterium phage Pari, complete genome	36.2	66.4	100%	3.0	100%	KT438500.1
Mycobacterium phage Tun99, complete genome	36.2	36.2	94%	3.0	100%	KT388014.1
Mycobacterium phage Rufus, complete genome	36.2	36.2	94%	3.0	100%	KT299047.1
Mycobacterium phage Tasp14, complete genome	36.2	36.2	94%	3.0	100%	KT26768.1
Mycobacterium phage Nhonho, complete genome	36.2	36.2	94%	3.0	100%	KR997834.1
Mycobacterium phage flarisa, complete genome	36.2	36.2	94%	3.0	100%	KR997829.1
Mycobacterium phage Nenuay, complete genome	36.2	36.2	94%	3.0	100%	KR986201.1
Mycobacterium phage Avin, complete genome	36.2	36.2	94%	3.0	100%	KP027205.1
Mycobacterium phage Thor, complete genome	36.2	36.2	94%	3.0	100%	KP027204.1
Mycobacterium phage Tredde, complete genome	36.2	36.2	94%	3.0	100%	KP027203.1
Mycobacterium phage Edherson, complete genome	36.2	36.2	94%	3.0	100%	KP027198.1
Mycobacterium phage Abrogate, complete genome	36.2	36.2	94%	3.0	100%	KM597531.1
Taxocara canis genome assembly_T. canis_Ecuador_scaffold TCNE_scaffold0000123	36.2	36.2	94%	3.0	100%	LM025873.1
Mycobacterium phage Lamina13, complete genome	36.2	36.2	94%	3.0	100%	KJ499096.1

PMWaV-3

PCR TEMPO REAL - Especificidade do *Primer R*

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Pineapple mealybug wilt-associated virus 3 isolate CU CA MD2 L17 heat shock 70-like protein (hsp70h) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	JX598536.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 3 isolate L91 heat shock 70-like protein (HSP70h) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	GU563497.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 3 ORF1a and RNA dependent RNA polymerase (RdRp) genes, partial cds; c6 gene, complete sequence, pineapple mealybug wilt-associated virus 3 isolate PT3 heat shock protein 70-like protein (HSP70h) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	DQ209259.2
Pineapple mealybug wilt-associated virus 3 isolate PT3 heat shock protein 70-like protein (HSP70h) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	FJ209947.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 3 clone phsianNP15 heat shock 70-like protein gene, partial cds	38.2	38.2	100%	0.76	100%	EF488755.1
Pineapple mealybug wilt-associated virus 3 clone pB13P4P36 RNA dependant RNA polymerase gene, partial cds; unknown protein gene, complete genome	38.2	38.2	100%	0.76	100%	EF497918.1
Spirometra erinaceieuropaei genome assembly_S. erinaceieuropaei_scaffold SPER_scaffold0070884	36.2	36.2	94%	3.0	100%	LM073602.1
Haemaphysalis placent genome assembly_H. placenti_Mi901_scaffold HPLM_scaffold0000155	36.2	36.2	94%	3.0	100%	LM583210.1
Citharomomas calidresea T49 complete genome	36.2	36.2	94%	3.0	100%	HW951689.1
Himeno bacter sp. PANC 28554, complete genome	34.2	34.2	89%	12	100%	CP014771.1
Sehansoroma arctica vP810 hypothetical protein mRNA	34.2	34.2	89%	12	100%	XM_014300859.1
Paenibacillus sp. FSL H7-0737, complete genome	34.2	34.2	89%	12	100%	CP009279.1
Nosestonquius brasiliensis genome assembly_N. brasiliensis_RM07_v1_5_4_scaffold NBR_scaffold0002911	34.2	34.2	89%	12	100%	LM436446.1
Hymenolepis nana genome assembly_H. nana_Japan_scaffold HNAJ_scaffold0001703	34.2	34.2	89%	12	100%	LM398710.1
Heliothela robusta hypothetical protein mRNA	34.2	34.2	89%	12	100%	XM_009025208.1
Chaetomium thermophilum var. thermophilum DSM 1495 hypothetical protein (CTHT_0070010), partial mRNA	34.2	34.2	89%	12	100%	XM_006697216.1
Saccharomycetaceae sp. 'Ashbya acerii' chromosome I, complete sequence	34.2	34.2	89%	12	100%	CP006029.1
Dvella thooivandans strain ATSR10, complete genome	32.2	32.2	84%	47	100%	CP014841.1
Citrobacter freundii strain P10159, complete genome	32.2	60.5	84%	47	100%	CP012554.1
Monoraphidium neglectum hypothetical protein mRNA	32.2	32.2	84%	47	100%	XM_014038802.1
Burkholderia contaminans strain M914 chromosome 2, complete sequence	32.2	32.2	84%	47	100%	CP009744.1

ANEXO D

Região em que os *primers* específicos do PCR convencional (letra maiúscula) e PCR em tempo real (letra minúscula), alinham no gene da HSP70 das espécies do PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3.

PHNaV-1	ACA SSA AG SACA CAACTCAC CC ATA GT TT GGGG CACT GT GG AAAA AGACTT AG AG GG
p1fr	-----
p1rr	-----
p1fc	ACA SSA AG SACA CAACTCAC-----
p1rc	-----
PHNaV-1	TTTATCGTGATATA AAAA AGTATTT CG SACTCAACAAGTTCAACAAGATGTGTATCTCG
p1fr	-----
p1rr	-----
p1fc	-----
p1rc	-----
PHNaV-1	ATAAATTGAAACCCACAATCGAGTAGTGGTTGACAACCTGGGGTTGTTCTATAGGACCAG
p1fr	-----
p1rr	-----
p1fc	-----
p1rc	-----
PHNaV-1	TAGACGGTGCGAGAGGGAAAGCCAAATCAGTTCTCACTTTAGCCTCTGATTTTATAACGG
p1fr	-----
p1rr	-----
p1fc	-----
p1rc	-----
PHNaV-1	GATTGGTACAACCTAGCGATCAAGATGACGAATCAACAAGTATCTGTGTCTGTTTGTTCAG
p1fr	-----
p1rr	-----
p1fc	-----
p1rc	-----
PHNaV-1	TACCAGCAGCTTACAATTCTTATCAAAGGGSTTTATTTTTGAAAAGTTGTAAGTTGAGCT
p1fr	-----
p1rr	-----
p1fc	-----
p1rc	-----
PHNaV-1	CTATAAATGTgcaggcggtagtaaacgaaCCGACCBCAGCTGGATTGAGTGCTTTCATAA
p1fr	-----gcaggcggtagtaaacgaa-----
p1rr	-----
p1fc	-----
p1rc	-----
PHNaV-1	CTACCCCGAAAGCTTCTGTGAATTATTTGTTAGTCTACgatttcggaggaggcacttTTG
p1fr	-----
p1rr	-----gatttcggaggaggcactt---
p1fc	-----
p1rc	-----
PHNaV-1	ATAGTTCCTTACTCGTGGTTGSACCTGCGTACGTGGGAGTACTGGATTGATGGGAGATA
p1fr	-----
p1rr	-----
p1fc	-----
p1rc	-----
PHNaV-1	ACTATCTGSSAGGSCAGGGACGTAGATAACAGATTGCTTGAAGTTTGTGCG
p1fr	-----
p1rr	-----
p1fc	-----
p1rc	-----GATTGCTTGAAGTTTGTGCG

Pf16aV-2	CATACGAACTAGACTCATACGTCTAAAATTAACCACGTGCACAGAGTGGAAATGTTCA
p2fc	CATACGAACTAGACTCATACG-----
p2nc	-----
p2rf	-----
p2rr	-----
Pf16aV-2	AGGACGGGTCGGTAAATGCTAGGGGATTGGTGAAGGGCCCTGATAGGACAGTCTCTGTAA
p2fc	-----
p2nc	-----
p2rf	-----
p2rr	-----
Pf16aV-2	CGSATATCATATCCCTTTTTCTAAAGCACTTATAAAGGAAGCGGAACAGTCTACTGGAC
p2fc	-----
p2nc	-----
p2rf	-----
p2rr	-----
Pf16aV-2	TACGCGTAACGGGTGCGGTGGTAACGGTACCAAGCCGACTACAACCTCTTTAAACGTAGTT
p2fc	-----
p2nc	-----
p2rf	-----acggtaccagccgactaca-----
p2rr	-----
Pf16aV-2	TTATAACTAACTGCATGAAAGACTTGGGTATTCCAGTAAGGGCTATAGTAAATGAACCGA
p2fc	-----
p2nc	-----
p2rf	-----
p2rr	-----gtaaatgaaccga
Pf16aV-2	CCGCTGCAGCGTTATATCTTTATCTATATTACAAGAAAAGGATTATTTCTGTCTGTTT
p2fc	-----
p2nc	-----
p2rf	-----
p2rr	ccgctg-----
Pf16aV-2	TTGACTTTGGTGGAGGGACGTTTGATGTCTTTGTTAGAAAACCGGAGATGTGTAT
p2fc	-----
p2nc	-----
p2rf	-----
p2rr	-----
Pf16aV-2	GCCTACTGTTTAGCGTTGGCATAAATTTTTAGGGGGAAGGGATATCGACAGGGCGGTAG
p2fc	-----
p2nc	-----
p2rf	-----
p2rr	-----
Pf16aV-2	CAGCTGAGSTGAAGGCAAGAGTGGGCGAATCTATTGATACAGCTACATTGTATTATTTG
p2fc	-----
p2nc	-----
p2rf	-----
p2rr	-----
Pf16aV-2	CAGCGTCCATTAAGAGGAGGTGACTAATGAGCCGAGGGCAAGAGCAGCTAGTAAAAAT
p2fc	-----
p2nc	-----
p2rf	-----GTAGTAAAAAT
p2rr	-----
Pf16aV-2	TGGTGGATGG
p2fc	-----
p2nc	TGGTGGATGG
p2rf	-----
p2rr	-----

PMMaV-3	ATTGATGGATGTGTATCGGAAAGCGGTACAATATACGTACCCACTGTCGTAGGTTACAGA
p3fr	-----
p3rf	-----
p3fc	ATTGATGGATGTGTATCG-----
p3rc	-----
PMMaV-3	ACCGACGGTACTTTCGCCATCGGTTTGGGAGCACTACTCGAACGTAACCTAACAGTTTAC
p3fr	-----
p3rf	-----
p3fc	-----
p3rc	-----
PMMaV-3	CGCGATATTAACGGTATTTCCGGTTGAACAAATTTAACAAAGATACTTACACTTCAAAA
p3fr	-----
p3rf	-----
p3fc	-----
p3rc	-----
PMMaV-3	CTCAAATCAGAAGTGGAGGTAGTCGTTGATGACTGGACGTGTAATAATCGGTCCCCTTGAT
p3fr	-----
p3rf	-----
p3fc	-----
p3rc	-----
PMMaV-3	GGATCGAAAGGAAAGGCACGATCAGTTATTGCTCTAGCATCAGATTTTGTGACAGGCTCT
p3fr	-----
p3rf	-----
p3fc	-----
p3rc	-----
PMMaV-3	TGTGCTATAGCTGTTAAATGACGGGACAACCGGTGACGTTGTCGGTGTGTTCTGTACCT
p3fr	-----tgacgttgctcggtgtgctc-----
p3rf	-----
p3fc	-----
p3rc	-----
PMMaV-3	GCAGCTTACAACCTTTATTTACGCAGCTTTATATATGAAAGTTGTAATTGAGTTCGATA
p3fr	-----
p3rf	-----ta
p3fc	-----
p3rc	-----
PMMaV-3	AACGTACAGGCGGTGGTAAATGAACCAACTGCAGCAGGCCTCAGTGCCTTATAGATATT
p3fr	-----
p3rf	aacgtacagcggtggt-----
p3fc	-----
p3rc	-----T
PMMaV-3	CCGAAATCTACAGTGAAC
p3fr	-----
p3rf	-----
p3fc	-----
p3rc	CCGAAATCTACAGTGAAC

ANEXO E

A ausência de alinhamento do *primer* referente ao PMWaV-2 (pf2 e pr2) e PMWaV-3 (pf3 e pr3), no gene Hsp70 do PMWaV-1.

CLUSTAL multiple sequence alignment by Kalign (2.0)

```

PMWaV-1   ACAAGGAAAGSACAACACTCACGCCATAGGTTGGGGCACTGTTGAAAAAGACTTAGAGG
p2f       -----
PMWaV-1   TTTATCGTGATATAAAAAGSTATTTCCGACTCAACAAGTTCAACAAAGATGTGTATCTCG
p2f       -----
PMWaV-1   ATAAATTGAAACCCACAATCGAGGTAGTGGTTGACCACTGGGGTTGTTCTATAGSACCAG
p2f       -----
PMWaV-1   TAGACGGTGCAGAGGGGAAAGCCAAATCAGTTCTCACTTACCTCTGATTTTATAACGG
p2f       -----
PMWaV-1   GATTGGTACAACATAGCGATCAAGATGACGAATCAACAAGTATCTGTGTCTGTTTGTTCAG
p2f       -----
PMWaV-1   TACCAGCAGCTTACAATTCTTATCAAAGGGSTTTATTTTTGAAAGTTGTAAGTTGAGCT
p2f       -----
PMWaV-1   CTATAAATGTGCAGGCGGTAGTAAACGAACCGACCGAGCTGSATTGAGTCTTTATAAA
p2f       -----acggta-----ccagccgactaca-----
PMWaV-1   CTACCCCGAAAGCTTCTGTGAATTATTTGTTAGTCTACGATTTCCGAGGAGGCACTTTTG
p2f       -----
PMWaV-1   ATAGTTCCTTACTCGTGGTTGGACCTGCGTACGTGGGAGTACTGGATTGATGGGAGATA
p2f       -----
PMWaV-1   ACTATCTGGGAGGCAAGGACGTAGATAACAGATTGCTTGAAGTTTGTGCG
p2f       -----

```

CLUSTAL multiple sequence alignment by Kalign (2.0)

```

PMWaV-1   ACAAGGAAAGSACAACACTCACGCCATAGGTTGGGGCACTGTTGAAAAAGACTTAGAGG
p3r       -----ac--cac--cgcc-----tgt-----ac-----g
PMWaV-1   TTTATCGTGATATAAAAAGSTATTTCCGACTCAACAAGTTCAACAAAGATGTGTATCTCG
p3r       tttta-----
PMWaV-1   ATAAATTGAAACCCACAATCGAGGTAGTGGTTGACCACTGGGGTTGTTCTATAGSACCAG
p3r       -----
PMWaV-1   TAGACGGTGCAGAGGGGAAAGCCAAATCAGTTCTCACTTACCTCTGATTTTATAACGG
p3r       -----
PMWaV-1   GATTGGTACAACATAGCGATCAAGATGACGAATCAACAAGTATCTGTGTCTGTTTGTTCAG
p3r       -----
PMWaV-1   TACCAGCAGCTTACAATTCTTATCAAAGGGSTTTATTTTTGAAAGTTGTAAGTTGAGCT
p3r       -----
PMWaV-1   CTATAAATGTGCAGGCGGTAGTAAACGAACCGACCGAGCTGSATTGAGTCTTTATAAA
p3r       -----
PMWaV-1   CTACCCCGAAAGCTTCTGTGAATTATTTGTTAGTCTACGATTTCCGAGGAGGCACTTTTG
p3r       -----
PMWaV-1   ATAGTTCCTTACTCGTGGTTGGACCTGCGTACGTGGGAGTACTGGATTGATGGGAGATA
p3r       -----
PMWaV-1   ACTATCTGGGAGGCAAGGACGTAGATAACAGATTGCTTGAAGTTTGTGCG
p3r       -----

```

CLUSTAL multiple sequence alignment by Kalign (2.0)

```

PHlaV-1  ACAGGAAGGACAACACTCACGCCATAGGTTTGGGGCACTGTTGSAAAAAGACTTAGAGG
p3f      -----
PHlaV-1  TTTATCGTGATATAAAAAGSTATTTTCGGACTCAACAAGTTCAACAAAGATGTGTATCTCG
p3f      -----
PHlaV-1  ATAAATTGAAACCCACAATCGAGGTAGTGGTTGACAACTGGGGTTGTTCTATAGGACCAG
p3f      -----tgac-----gttgt-----
PHlaV-1  TAGACGGTGCAGAGGGGAAAGCCAAATCAGTTCTCACTTTAGCCTCTGATTTTATAACGG
p3f      ----cggtg-----t--gttc-----
PHlaV-1  GATTGGTACAAC TAGCGATCAAGATGACGAATCAACAAGTATCTGTGTCTGTTTGTTCAG
p3f      -----
PHlaV-1  TACCAGCAGCTTACAATTCTTATCAAAGGGSTTTATTTTGAAGTTGTAAGTTGAGCT
p3f      -----
PHlaV-1  CTATAAATGTGCAGGCGGTAGTAAACGAACCGACCGCAGCTGGATTGAGTGCTTTCATAA
p3f      -----
PHlaV-1  CTACCCCGAAAAGCTTCTGTGAATTATTTGTTAGTCTACGATTTGAGGAGGACACTTTTG
p3f      -----
PHlaV-1  ATAGTTCCTTACTCGTGGTTGGACCTGCGTACGTGGGAGTACTGGATTGATGGGAGATA
p3f      -----
PHlaV-1  ACTATCTGGGAGGCAGGACGTAGATAACAGATTGCTTGAAGTTTGTGCG
p3f      -----

```

CLUSTAL multiple sequence alignment by Kalign (2.0)

```

PHlaV-1  ACAGGAAGGACAACACTCACGCCATAGGTTTGGGGCACTGTTGSAAAAAGACTTAGAGG
p2r      -----
PHlaV-1  TTTATCGTGATATAAAAAGSTATTTTCGGACTCAACAAGTTCAACAAAGATGTGTATCTCG
p2r      -----
PHlaV-1  ATAAATTGAAACCCACAATCGAGGTAGTGGTTGACAACTGGGGTTGTTCTATAGGACCAG
p2r      -----
PHlaV-1  TAGACGGTGCAGAGGGGAAAGCCAAATCAGTTCTCACTTTAGCCTCTGATTTTATAACGG
p2r      -----
PHlaV-1  GATTGGTACAAC TAGCGATCAAGATGACGAATCAACAAGTATCTGTGTCTGTTTGTTCAG
p2r      -----
PHlaV-1  TACCAGCAGCTTACAATTCTTATCAAAGGGSTTTATTTTGAAGTTGTAAGTTGAGCT
p2r      -----
PHlaV-1  CTATAAATGTGCAGGCGGTAGTAAA-CGAACCGACCGCAGCTGGATTGAGTGCTTTCATA
p2r      -----gtaaatc-aaccgacc---gctg-----
PHlaV-1  ACTACCCCGAAAAGCTTCTGTGAATTATTTGTTAGTCTACGATTTGAGGAGGACACTTTT
p2r      -----
PHlaV-1  GATAGTTCCTTACTCGTGGTTGGACCTGCGTACGTGGGAGTACTGGATTGATGGGAGAT
p2r      -----
PHlaV-1  AACTATCTGGGAGGCAGGACGTAGATAACAGATTGCTTGAAGTTTGTGCG
p2r      -----

```

ANEXO F

A ausência de alinhamento do *primer* referente ao PMWaV-1 (pf1 e pr1) e PMWaV-3 (pf3 e pr3), no gene Hsp70 do PMWaV-2.

CLUSTAL multiple sequence alignment by Kalign (2.0)

```

PMWaV-2   CATACGAACTAGACTCATACGTGCTAAAAATTAACCAGTGCACAGAGTGGAAAGTGTTC
p1f       -----

PMWaV-2   AGSACGGSTCGTAATGCTAGGGGGTATTGGTGAAGGCCCTGATAGGACAGTCTCTGTAA
p1f       -----

PMWaV-2   CGSATATCATATCCCTTTTTCTAAAGCACTTATAAAGGAAGCGAACAGTCTACTGGAC
p1f       -----

PMWaV-2   TACGCGTAACGGGTGCGGTGTAACGGTACCAGCCGACTACAACCTCTTTAAACGTAGTT
p1f       -----

PMWaV-2   TTATAACTAACTGCATGAAAGACTTGGGTATTCCAGTAAGGGCTATAGTAAATGAACCGA
p1f       -----

PMWaV-2   CCGCTGCAGCGTTATATTCTTTATCTATATTACAAGAAAAGGATTTATTCTGTCTGTTT
p1f       -----

PMWaV-2   TTGACTTTGGTGGAGGGACGTTTGATGTGCTTTTGTAGAAAACTCGGAGATGTGGTAT
p1f       -----

PMWaV-2   GCCTACTGTTTAGCGTTGGCGATAACTTTTTAGGGGSAAGGGATATCGACAGGGCGGTAG
p1f       -----gca-ggaggtag

PMWaV-2   CAGCTGAGGTGAAGGCAAGAGTGGGCGAATCTATTGATACAGCTACATTGTCTATTG
p1f       -----taaa-----cga-----

PMWaV-2   CAGCGTCCATTAAAGAGGAGGTGACTAATGAGCCGAGGGCAAAAGACGCACGTAGTAAAA
p1f       -----

PMWaV-2   TGGTGGATGG
p1f       -----

```

CLUSTAL multiple sequence alignment by Kalign (2.0)

```

PMWaV-2   CATACGAACTAGACTCATACGTGCTAAAAATTAACCAGTGCACAGAGTGGAAAGTGTTC
p1r       -----

PMWaV-2   AGSACGGSTCGTAATGCTAGGGGGTATTGGTGAAGGCCCTGATAGGACAGTCTCTGTAA
p1r       -----

PMWaV-2   CGSATATCATATCCCTTTTTCTAAAGCACTTATAAAGGAAGCGAACAGTCTACTGGAC
p1r       -----

PMWaV-2   TACGCGTAACGGGTGCGGTGTAACGGTACCAGCCGACTACAACCTCTTTAAACGTAGTT
p1r       -----

PMWaV-2   TTATAACTAACTGCATGAAAGACTTGGGTATTCCAGTAAGGGCTATAGTAAATGAACCGA
p1r       -----

PMWaV-2   CCGCTGCAGCGTTATATTCTTTATCTATATTACAAGAAAAGGATTTATTCTGTCTGTTT
p1r       -----

PMWaV-2   TTGACTTTGGTGGAGGGACGTTTGATGTGCTTTTGTAGAAAACTCGGAGATGTGGTAT
p1r       -----

PMWaV-2   GCCTACTGTTTAGCGTTGGCGATAACTTTTTAGGGGSAAGGGATATCGACAGGGCGGTAG
p1r       -----gatttcg-----

PMWaV-2   CAGCTGAGGTGAAGGCAAGAGTGGGCGAATCTATTGATACAGCTACATTGTCTATTG
p1r       -----gagg--aggca-----ct-t-----

PMWaV-2   CAGCGTCCATTAAAGAGGAGGTGACTAATGAGCCGAGGGCAAAAGACGCACGTAGTAAAA
p1r       -----

PMWaV-2   TGGTGGATGG
p1r       -----

```

CLUSTAL multiple sequence alignment by Kalign (2.0)

```

PIInaV-2   CATACGAACTAGACTCATACGTGCTAAAATAAAACCAAGTGCACAGAGTGGAAAGTGTTC
p3f        -----
PIInaV-2   AGSACGGGTCGGTAATGCTAGGGGGTATTGSGTAAGGCCCTGATAGSACAGTCTCTGTAA
p3f        -----
PIInaV-2   CGSATATCATATCCCTTTTTCTAAAGCACTTATAAAGGAAGCGGAACAGTCTACTGGAC
p3f        -----
PIInaV-2   TACGCGTAACGGGTGCGGTGTAACGTAACGCTACCAGCCGACTACAACCTTTTTAAACGTAGT
p3f        -----
PIInaV-2   TTATAACTAACTGCATGAAAGACTTGGGTATTCCAGTAAGGGCTATAGTAAATGAACCGA
p3f        -----
PIInaV-2   CCGCTGCAGCGTTATATTCTTTATCTATTACAAGAAAAGGATTATTTCTGTCTGTTT
p3f        -----
PIInaV-2   TTGACTTTGGTGGAGGGACGTTTGATGTGCTTTTGTAGAAAACCGAGATGTGGTAT
p3f        -----tgcg-----ttg-----tcg-----gtg-----
PIInaV-2   GCGTACTGTTTAGCGTTGGCGATAACTTTTTAGGGGGAAGGGATATCGACAGGGCGGTAG
p3f        -----tgttc-----
PIInaV-2   CAGCTGAGGTGAAGGCAAGAGTGGGCGAATCTATTGATACAGCTACATTGTCATTATTTG
p3f        -----
PIInaV-2   CAGCGTCCATTAAGAGGAGGTGACTAATGAGCCGAGGGCAAAGACGCACGTAGTAAAAT
p3f        -----
PIInaV-2   TGGTGGATGG
p3f        -----

```

CLUSTAL multiple sequence alignment by Kalign (2.0)

```

PIInaV-2   CATACGAACTAGACTCATACGTGCTAAAATAAAACCAAGTGCACAGAGTGGAAAGTGTTC
p3r        -----
PIInaV-2   AGSACGGGTCGGTAATGCTAGGGGGTATTGSGTAAGGCCCTGATAGSACAGTCTCTGTAA
p3r        -----
PIInaV-2   CGSATATCATATCCCTTTTTCTAAAGCACTTATAAAGGAAGCGGAACAGTCTACTGGAC
p3r        -----taaa-----
PIInaV-2   TACGCGTAACGGGTGCGGTGTAACGTAACGCTACCAGCCGACTACAACCTTTTTAAACGTAGT
p3r        -----cgta-cagg--cggtagt-----
PIInaV-2   TTATAACTAACTGCATGAAAGACTTGGGTATTCCAGTAAGGGCTATAGTAAATGAACCGA
p3r        -----
PIInaV-2   CCGCTGCAGCGTTATATTCTTTATCTATTACAAGAAAAGGATTATTTCTGTCTGTTT
p3r        -----
PIInaV-2   TTGACTTTGGTGGAGGGACGTTTGATGTGCTTTTGTAGAAAACCGAGATGTGGTAT
p3r        -----
PIInaV-2   GCGTACTGTTTAGCGTTGGCGATAACTTTTTAGGGGGAAGGGATATCGACAGGGCGGTAG
p3r        -----
PIInaV-2   CAGCTGAGGTGAAGGCAAGAGTGGGCGAATCTATTGATACAGCTACATTGTCATTATTTG
p3r        -----
PIInaV-2   CAGCGTCCATTAAGAGGAGGTGACTAATGAGCCGAGGGCAAAGACGCACGTAGTAAAAT
p3r        -----
PIInaV-2   TGGTGGATGG
p3r        -----

```

ANEXO G

Ausência de alinhamento dos *primers* referente ao PMWaV-1 (pf1 e pr1) e PMWaV -2 (pf2 e pr2), no gene Hsp70 para PMWaV-3.

CLUSTAL multiple sequence alignment by Kalign (2.0)

```

PMWaV-3   ATTGATGGATGTGTATCGSAAAGCGGTACAATATACGTACCCACTGTCGTAGGTTACAGA
pf1       -----

PMWaV-3   ACCGACGGTACTTTCGCCATCGGTTTGGGAGCACTACTCGAACGTAACCTAACAGTTTAC
pf1       -----

PMWaV-3   CGCGATTTAAACGGTATTTTCGGGTTGAACAAATTTAACAAAGATACTTACACTTCAAAA
pf1       -----

PMWaV-3   CTCAAATCAGAAAGTGGAGGTAGTCGTTGATGACTGGACGTGTAATAATCGGTCCCCTTGAT
pf1       -----

PMWaV-3   GGATCGAAAGGAAAGGCACGATCAGTTATTGCTCTAGCATCAGATTTTGTGACAGGTCTT
pf1       -----

PMWaV-3   TGTGCTATAGCTGTTAAAATGACGGGACAACCGGTGACGTTGTCGGTGTGTTCTGTACCT
pf1       -----

PMWaV-3   GCAGCTTACAACCTCTTATTTACGCAGCTTTATATATGAAAGTTGTAATGAGTTCGATA
pf1       -----

PMWaV-3   AACGTACAGGCGGTGGTAAATGAACCAACTGCAGCAGGCTCAGTGCCTTATAGATATT
pf1       ---g--caggcggtagtaaacgaa-----

PMWaV-3   CCGAAATCTACAGTGAAC
pf1       -----

```

CLUSTAL multiple sequence alignment by Kalign (2.0)

```

PMWaV-3   ATTGATGGATGTGTATCGSAAAGCGGTACAATATACGTACCCACTGTCGTAGGTTACAGA
pr1       -----

PMWaV-3   ACCGACGGTACTTTCGCCATCGGTTTGGGAGCACTACTCGAACGTAACCTAACAGTTTAC
pr1       -----

PMWaV-3   CGCGATTTAAACGGTATTTTCGGGTTGAACAAATTTAACAAAGATACTTACACTTCAAAA
pr1       -----

PMWaV-3   CTCAAATCAGAAAGTGGAGGTAGTCGTTGATGACTGGACGTGTAATAATCGGTCCCCTTGAT
pr1       -----gatt-----tcgg-----

PMWaV-3   GGATCGAAAGGAAAGGCACGATCAGTTATTGCTCTAGCATCAGATTTTGTGACAGGTCTT
pr1       -----agg--aggcac-----tt-----

PMWaV-3   TGTGCTATAGCTGTTAAAATGACGGGACAACCGGTGACGTTGTCGGTGTGTTCTGTACCT
pr1       -----

PMWaV-3   GCAGCTTACAACCTCTTATTTACGCAGCTTTATATATGAAAGTTGTAATGAGTTCGATA
pr1       -----

PMWaV-3   AACGTACAGGCGGTGGTAAATGAACCAACTGCAGCAGGCTCAGTGCCTTATAGATATT
pr1       -----

PMWaV-3   CCGAAATCTACAGTGAAC
pr1       -----

```


CLUSTAL multiple sequence alignment by Kalign (2.0)

```

PMNaV-3   ATTGATGGATGTGTATCGGAAAGCGGTACAATATACGTACCCACTGTCGTAGGTTACAGA
p2f       -----
PMNaV-3   ACCGACGGTACTTTGCCATCGGTTGGGAGCACTACTCGAACGTAACCTAACAGTTTAC
p2f       ---acgggtac-----c-----agc-----cg--act--aca-----
PMNaV-3   CGCGATATTAACCGGTATTTGCGGTTGAACAAATTTAACAAAGATACTTACACTTCAAAA
p2f       -----
PMNaV-3   CTCAAATCAGAAGTGGAGGTAGTCGTTGATGACTGSACGTGTAATAATCGGTCCTCGTTGAT
p2f       -----
PMNaV-3   GGATCGAAAGGAAAGGCACGATCAGTTATTGCTCTAGCATCAGATTTTGTGACAGGTCTT
p2f       -----
PMNaV-3   TGTGCTATAGCTGTTAAAATGACGGGACAACCGGTGACGTTGTCGGTGTGTTCTGTACCT
p2f       -----
PMNaV-3   GCAGCTTACAACCTCTTATTTACGCAGCTTTATATGAAAAGTTGTAATTTGAGTTCGATA
p2f       -----
PMNaV-3   AACGTACAGGCGGTGGTAAATGAACCAACTGCAGCAGGCCTCAGTGCCTTATAGATATT
p2f       -----
PMNaV-3   CCGAAATCTACAGTGAAC
p2f       -----

```

CLUSTAL multiple sequence alignment by Kalign (2.0)

```

PMNaV-3   ATTGATGGATGTGTATCGGAAAGCGGTACAATATACGTACCCACTGTCGTAGGTTACAGA
p2r       -----
PMNaV-3   ACCGACGGTACTTTGCCATCGGTTGGGAGCACTACTCGAACGTAACCTAACAGTTTAC
p2r       -----
PMNaV-3   CGCGATATTAACCGGTATTTGCGGTTGAACAAATTTAACAAAGATACTTACACTTCAAAA
p2r       -----
PMNaV-3   CTCAAATCAGAAGTGGAGGTAGTCGTTGATGACTGSACGTGTAATAATCGGTCCTCGTTGAT
p2r       -----
PMNaV-3   GGATCGAAAGGAAAGGCACGATCAGTTATTGCTCTAGCATCAGATTTTGTGACAGGTCTT
p2r       -----
PMNaV-3   TGTGCTATAGCTGTTAAAATGACGGGACAACCGGTGACGTTGTCGGTGTGTTCTGTACCT
p2r       -----gt--aaat-----caacc---gac---cg-----ctg-----
PMNaV-3   GCAGCTTACAACCTCTTATTTACGCAGCTTTATATGAAAAGTTGTAATTTGAGTTCGATA
p2r       -----
PMNaV-3   AACGTACAGGCGGTGGTAAATGAACCAACTGCAGCAGGCCTCAGTGCCTTATAGATATT
p2r       -----
PMNaV-3   CCGAAATCTACAGTGAAC
p2r       -----

```