



OPTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DA PCR CONVENCIONAL PARA O ESTABELECIMENTO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO VÍRUS DO TOPO EM LEQUE DA BANANA

Autora: Delfa Inácio Nheuane

Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências, Universidade Eduardo Mondlane

1. INTRODUÇÃO

• A presença do BBTV em campo de produção, constitui um motivo de grande preocupação para o país, por ser fácil de disseminar em plantas saudáveis, bem como por representar uma ameaça constante na produção da banana. Tornando necessária a otimização da técnica da PCR para o diagnóstico molecular preciso do BBTV por forma a ajudar na tomada de decisão mais atempada, nas medidas de erradicação e no controlo desta virose no País [1].

2. PROBLEMA E JUSTIFICATIVA

- O BBTV é a praga quarentenária que representa um sério perigo para a plantação da banana em Moçambique;
- O sintoma da infecção por BBTV limita a inserção da banana no mercado internacional;
- Há escassez de variedades de bananeira tolerantes ao BBTV, a falta de um teste laboratorial para o diagnóstico do BBTV, torna necessário a otimização da PCR Convencional para o diagnóstico mais preciso do BBTV. surge à questão, **será possível otimizar a técnica de PCR para amplificar os genes da Capa proteica BBTV (CP) de modo a estabelecer um diagnóstico molecular mais preciso do vírus do topo em leque da banana?**

3. OBJECTIVOS

Geral:

• Contribuir no Controlo do Vírus do Topo em Leque da Banana com base no melhoramento da PCR convencional para o Diagnóstico Molecular em Moçambique.

Específicos:

- Otimizar as condições da PCR convencional para estabelecer diagnóstico molecular do vírus do topo em leque da banana;
- Identificar a presença do Vírus do Topo em Leque da Banana em diferentes órgãos da Bananeira;
- Sequenciar os produtos obtidos durante amplificação do gene da capa proteica (CP) do vírus do topo em leque da banana.

4. ÁREA DE ESTUDO

- A colheita das amostras foi por conveniência no distrito de Chókwé, no local onde havia mais reportagem da expansão do BBTV.
- A otimização do protocolo da PCR convencional foi realizada no Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane (CB-UEM).

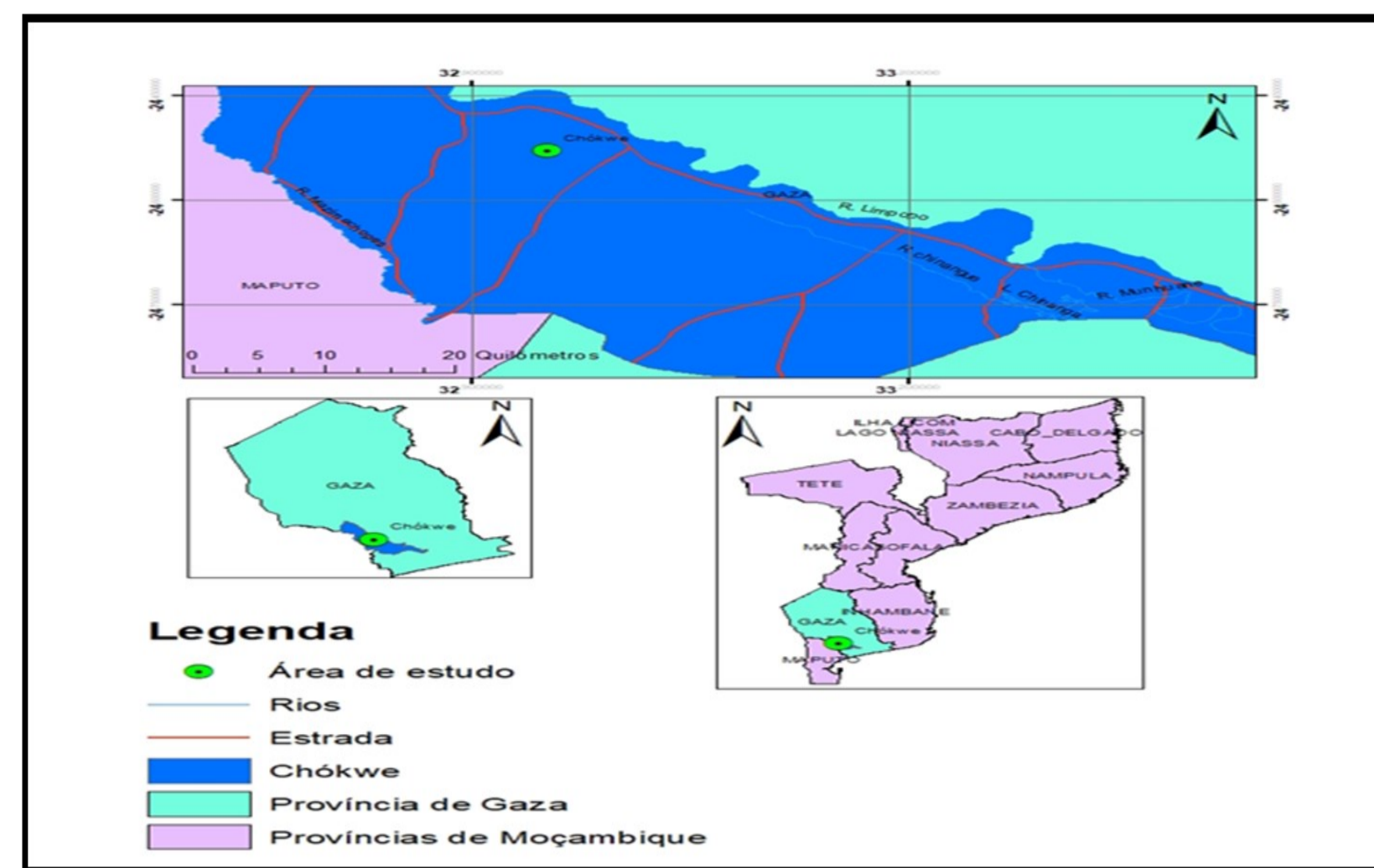
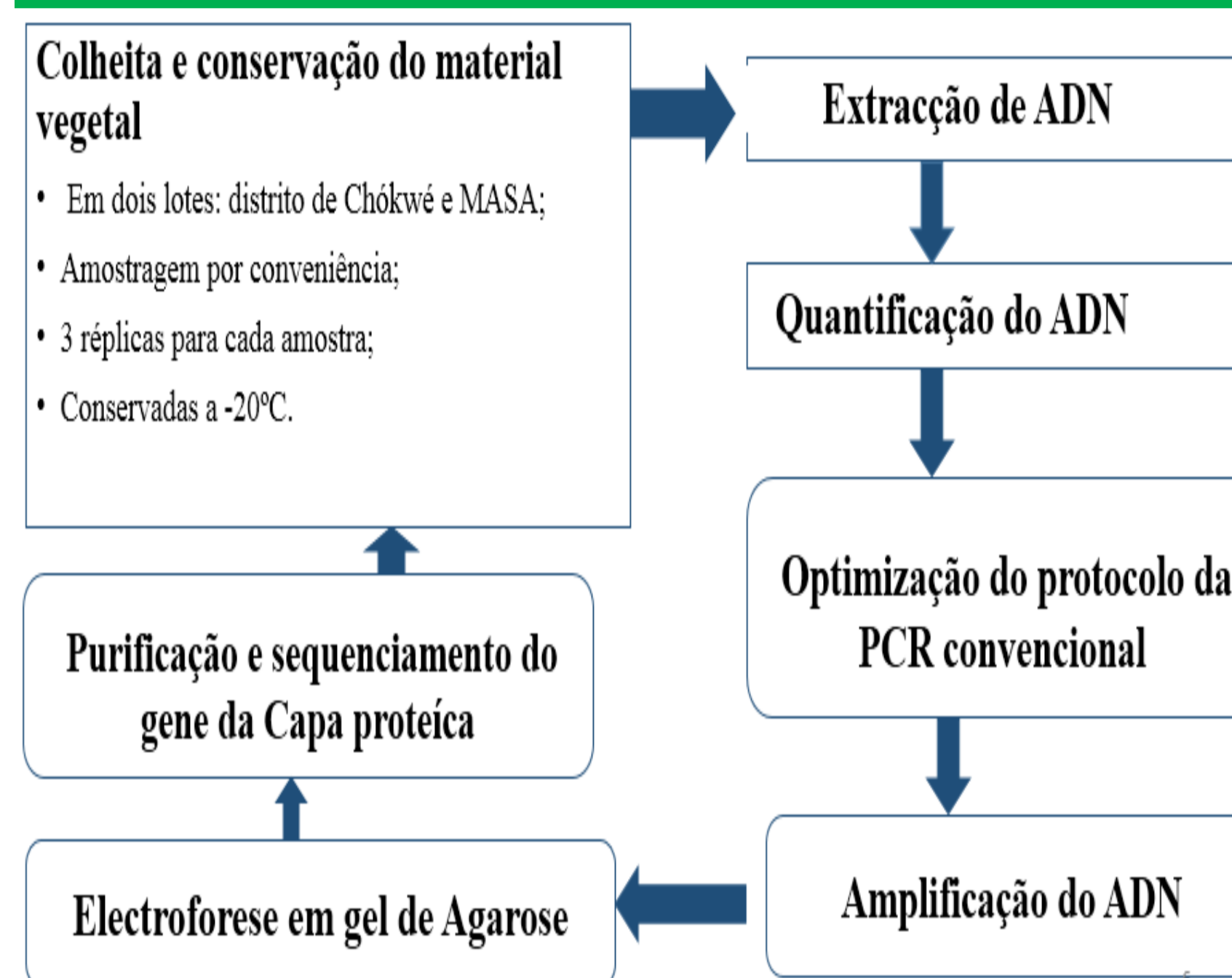


Figura 1: Mapa com a localização do distrito de Chókwé na província de Gaza (local de colheita das amostras).

5. METODOLOGIA



6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Optimização do protocolo da PCR Convencional

Os melhores resultados para amplificação do ADN do BBTV foram obtidos quando optimizou-se os reagentes da reacção da PCR padrão.

Tabela 1: Representação de mistura dos reagentes da reacção de PCR-padrão e reacção de PCR-optimizada.

Reagentes	Reacção de PCR padrão (Qiagen car kit)	Reacção de PCR Optimizada
10x PCR Buffer	1X	1X
5x Q. Solution	0.5X	0.5 X
dNTP'S (10 mM)	0.5 mM	0.2 mM
Primer CPF (10 µM)	0.5 µM	0.2 µM
Primer CPR (µM)	0.5 µM	0.2 µM
Taq polimerase (5 U/µl)	0.5 µl	1 µl
DNA (50 ng/µl)	1 ng/µl	2 ng/µl
Água destilada	44.5 µl	44.5 µl
BSA	0.2 µM	2 µM

Tabela 2: Condições da Amplificação da reacção da PCR padrão e reacção da PCR optimizada.

	Condições da Amplificação da Reacção de PCR padrão e Reacção de PCR optimizada					Ciclos
	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final	
Padrão	94 °C (30 s)	94 °C (1 min)	47 °C (1 min)	65°C (45s)	65 °C (10 min)	35 °C
Optimizada	95 °C (5 min)	94 °C (3 min)	60 °C (30 s)	72°C (1min)	72 °C (10 min)	39 °C

6.2. Amplificação do ADN do BBTV

Nas condições optimizadas foram amplificadas 15 amostras, sendo que amplificação foi feita com sucesso usando os pares de iniciadores da capa proteica, figura representativa.

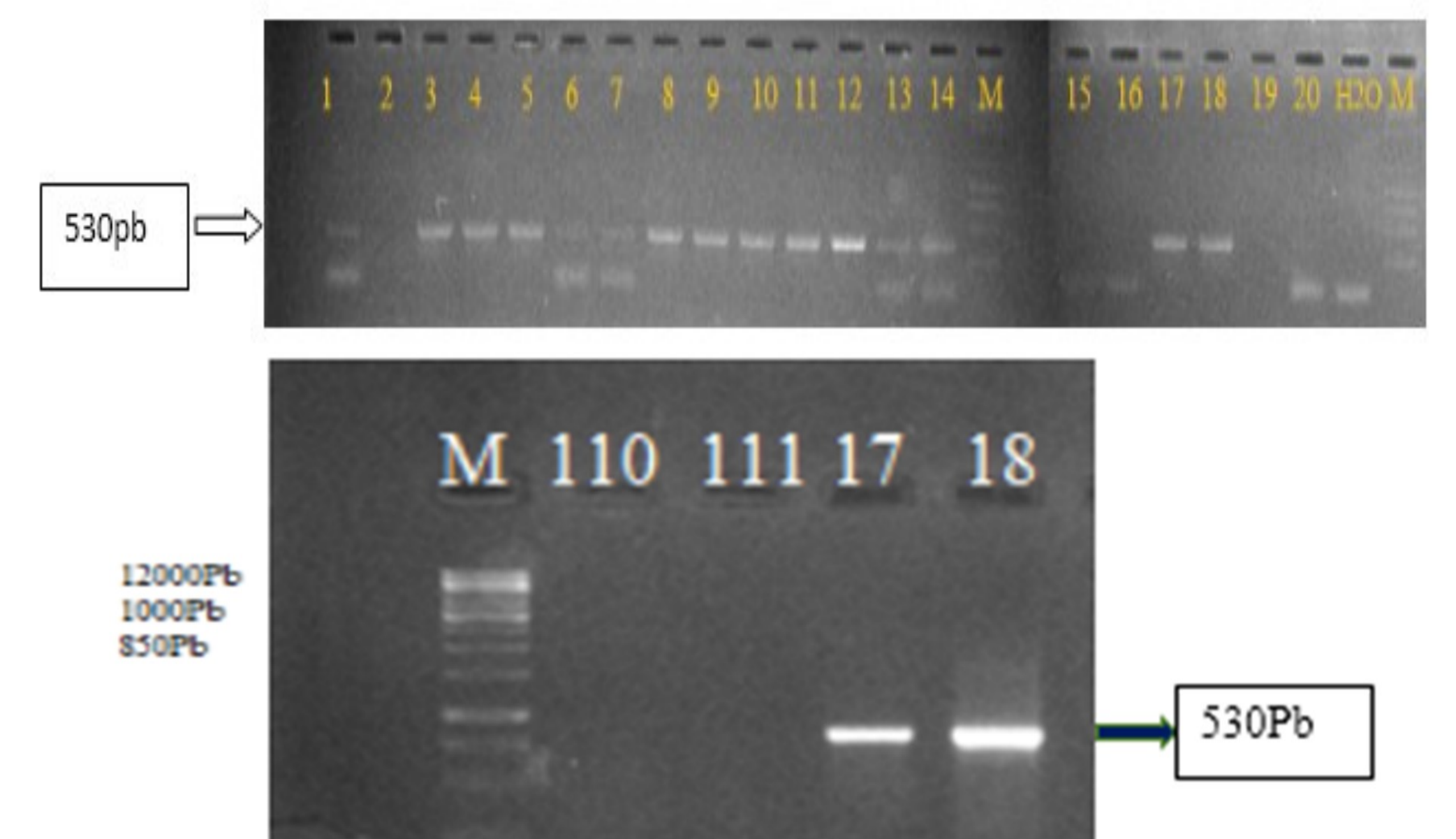


Figura 2: Electroforese em gel de agarose de 1.5% ilustrando o produto da PCR usando pares de iniciadores da CPF e CPR. Onde: M-marcador de peso molecular (Gene Ruler 1Kb DNA Ladder), 1-20 amostras de ADN, "C-"_controle negativo (H2O), "C+"_controle positivo, com tamanho de produto esperado de 530 pb.

6.3. Sequenciamento das Amostras do BBTV

Tabela 3: Resultado do Sequenciamento de Produtos da PCR

Espécie de Referência	País de Origem	Código de acesso no GenBank	Percentagem de Identidade
coat protein [Banana Bunchy top virus]	Taiwan	ABK96868.1	100

As bananeiras sintomáticas do BBTV testaram positivas para gene que codificam regiões conservada da capa proteica, com tamanho esperadas de 530 pb e as amostras negativas a BBTV não mostraram nenhum sinal confirmado [2].

7. CONCLUSÃO

- ❖ Optimizada as condições da PCR convencional para o diagnóstico do vírus do topo em leque da banana, passou a detectar correctamente no gene que codificam regiões conservadas da capa proteica e com tamanho esperado de 530 pb;
- ❖ Durante amplificação foi possível identificar o vírus nas folhas, flôres, brácteas e frutos;
- ❖ Sequenciamento das amostras positivas para vírus do topo em leque da banana revelaram 100% de identidade com o [coat protein Banana bunchy top]. virus].

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] MASA (Ministério da Agricultura e Segurança Alimentar) 2019 "Banana Bunchy Top Virus".
- [2] S. R. Mahadev, S. K. Thamilarasan e A. Kathithachalam, 2013 "PCR Detection of Banana Bunchy Top Virus (BBTV) at Tissue Culture Level for the Production of Virus-free Planting Materials".