

DESENHO DE PROTOCOLOS DE RT-PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO E DIAGNÓSTICO DO *Cowpea severe mosaic virus* EM SEMENTES.

Francis Zanini & Edson Bertolini

Laboratório de Virologia Vegetal, Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia, UFRGS. Av. Bento Gonçalves 7712, 91540-000, Porto Alegre, RS.



INTRODUÇÃO



Figura 1. Sintomas de mosaico em feijão – caupi.

O Brasil possui um intenso comércio nacional e internacional de sementes e grãos. Apesar de não estar demonstrada a transmissão por sementes, análises da presença do vírus *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), que infecta várias espécies de leguminosas, são solicitadas por vários países que importam sementes e grãos do Brasil. Atualmente, uma das técnicas mais utilizadas para detecção de vírus é a RT-PCR em tempo real, a qual permite a amplificação, detecção e quantificação de um patógeno em um único passo porém, não existe nenhum protocolo publicado para detecção do CPSMV. O trabalho teve como objetivos o desenvolvimento e otimização de protocolo de RT-PCR em tempo real e de metodologia de preparação de amostras para a detecção do CPSMV em tecido foliar e diferentes partes da semente de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) assim como, realizar ensaio de transmissão por sementes.

METODOLOGIA

AMOSTRAS: sementes naturalmente infectadas colhidas de plantas sintomáticas em campo. Para a localização do vírus nos tecidos, 50 sementes foram separadas entre tegumento e embrião.

PREPARAÇÃO DO EXTRATO: maceração de 1 grama de sementes em bolsas de plástico utilizando tampão de extração (PBS + 2% PVP + 0.2% DIECA).

EXTRAÇÕES DE RNA: utilizando-se material infectado, foram comparados quatro diferentes kits comerciais e dois métodos diretos de extração de RNA.

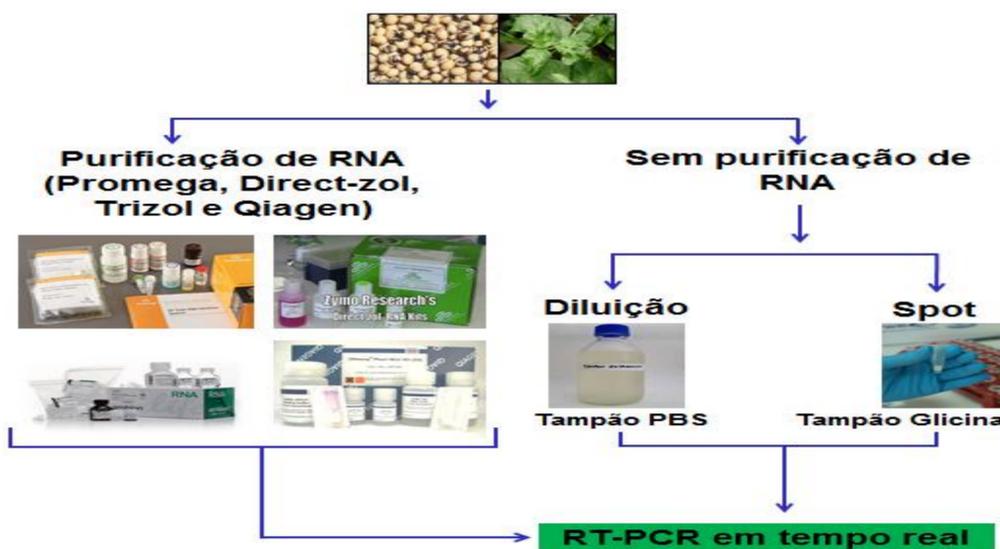


Figura 2. Esquema da preparação de amostras para uso em RT-PCR em tempo real.

RT-PCR EM TEMPO REAL: realizada em volume final de 12 µl, utilizando o master mix AgPath-ID One Step RT-PCR Kit (Thermo Fisher), 0,5µM de cada primer e 0,15µM da sonda.

TRANSMISSÃO: 100 sementes de lote positivo foram semeadas e mantidas em casa de vegetação e as plantas analisadas mensalmente durante 90 dias de cultivo.

RESULTADOS E CONCLUSÕES

Apesar da variabilidade existente, foi possível desenhar primers e sonda TaqMan que amplificam todos os isolados conhecidos do CPSMV e nenhum dos demais vírus testados. As sequências desenhadas são:

- ✓ Primer F: 5'- TGCACGAAGCTTACCACACACT -3'
- ✓ Primer R: 5'- TGGTTGGTATTGAATGTCCCAA -3'
- ✓ Sonda: 5'- FAM - AGGCAACATGTGCCGATAGTGTACCTGC - TAMRA - 3'

A reação de RT-PCR em tempo real foi realizada nas seguintes temperaturas: 48°C - 10min; 95°C - 10min; 45 ciclos de 95°C - 15 seg. e 60°C - 45 seg.

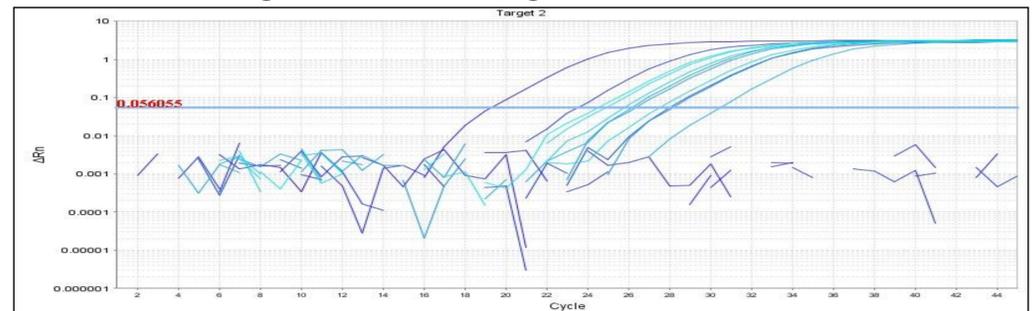


Figura 3. Curvas de amplificação por RT-PCR em tempo real.

Tabela 1. Ciclos de amplificação (Ct) obtidos por RT-PCR em tempo real do CPSMV para as diferentes diluições e métodos de extração de RNA.

Diluição	Métodos de extração de RNA					Diluição
	Promega	Direct-zol	Trizol	Qiagen	Spot	
Extrato Vegetal	30	24	23	21	31	27
Dil. 1:10	34	28	32	31	31	31
Dil. 1:100	37	30	33	29	Indet.	37
Dil. 1:1000	Indet.	34	Indet.	38	Indet.	Indet.

Os resultados obtidos demonstraram a maior sensibilidade dos kits comerciais frente aos métodos diretos, porém, estes são mais econômicos e de fácil utilização permitindo a realização de análises laboratoriais rotineiras sem a purificação de RNA.

Foi comprovado que o vírus está localizado em maior frequência e quantidade no tegumento das sementes, conforme gráfico abaixo.

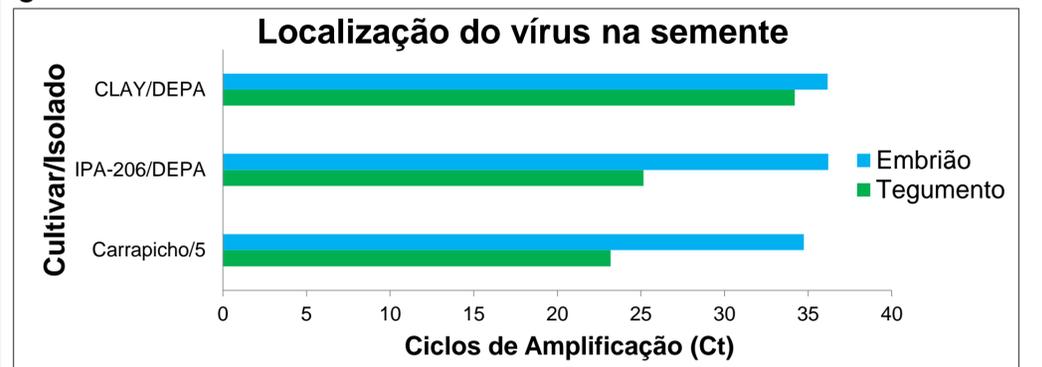


Figura 4. Localização do vírus nos diferentes tecidos das sementes. > Ct = < conc. vírus.

A transmissão de vírus por sementes depende de fatores como o isolado viral e as espécies e cultivares. Com os isolados do CPSMV e as cultivares de feijão-caupi testadas, não houve transmissão do vírus. Novos ensaios com maior quantidade de sementes devem ser realizados para esclarecer a questão da transmissão do CPSMV por sementes de feijão-caupi.

AGRADECIMENTOS

