

# DESENHO DE PROTOCOLOS DE RT-PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO E DIAGNÓSTICO DE COWPEA SEVERE MOSAIC VIRUS E STRAWBERRY LATENT RING SPOT VIRUS EM SEMENTES

Betina Luíza Lerner & 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. Sintoma de CPSMV.

O Brasil possui um intenso comércio internacional de sementes e grãos que podem ser portadores de fitopatógenos. A comercialização de material vegetal e sementes envolve riscos de introdução de pragas. O *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) é quarentenário no Brasil e é transmitido por sementes de diversas espécies, sendo necessário impedir sua introdução no país. O vírus *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) afeta o feijão caupi (*Vigna unguiculata*) causando redução na produtividade da leguminosa que é a principal fonte de proteína das regiões Norte e Nordeste do Brasil. Métodos de detecção e diagnóstico são de fundamental importância para evitar a introdução de pragas em uma região e para adotar medidas de manejo e controle de vírus. O estudo teve como objetivo o desenvolvimento e a aplicação de métodos de detecção baseados em RT-PCR em tempo real para a detecção dos vírus SLRSV e CPSMV.

## MATERIAIS E MÉTODOS

➤ Buscaram-se sequências nucleotídicas dos vírus no banco de dados do Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos EUA (National Center for Biotechnology Information - NCBI). Fez-se uso dos programas BLAST e Geneious para a comparação e localização de regiões conservadas entre os isolados. Para o desenho dos iniciadores e das sondas foi utilizado o programa Primer Express.

➤ Foram utilizados os isolados DEPA, 2 e 5 oriundos das seguintes cultivares: 'carrapicho', de feijão caupi; 'IPA 206', de feijão caupi e 'clay', de feijão caupi e feijão fava, provenientes de Recife e Paudalho – PE.

➤ Os testes com os iniciadores e sondas do SLRSV, com distintos isolados foram realizados no Instituto Valenciano de Investigaciones Agrárias na Espanha.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

➤ Apesar da variabilidade existente entre os diferentes isolados do CPSMV foi possível desenhar primers e sonda que amplificam todos os isolados conhecidos. Devido a grande variabilidade existente entre os isolados de SLRSV, foi necessário o desenho de duas sondas para recolher toda a variabilidade observada (Tabela 1).

➤ Todos os materiais de referência analisados tanto para o CPSMV como para o SLRSV amplificaram com os protocolos de RT-PCR em tempo real desenvolvidos.

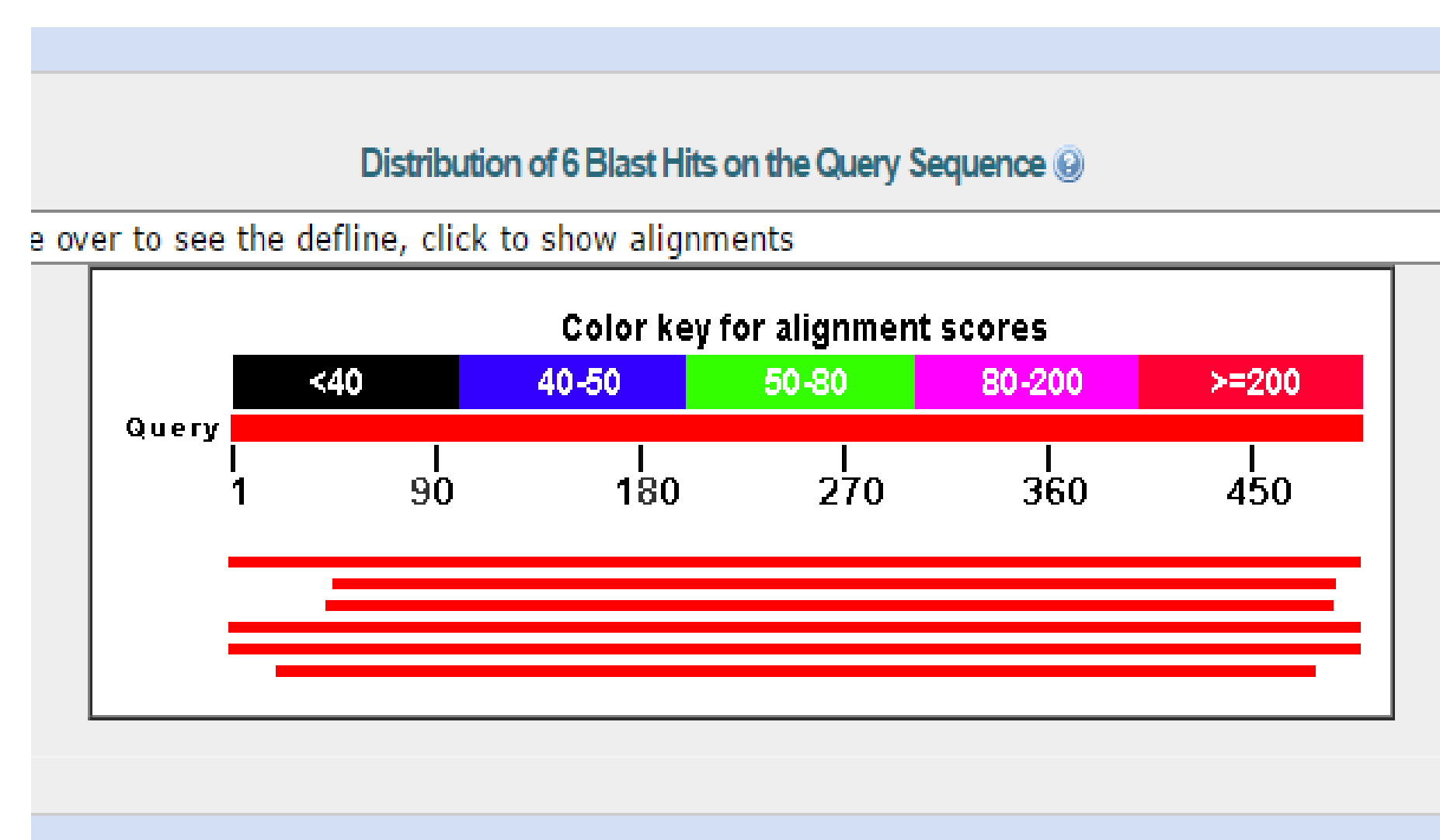


Figura 2. Alinhamento das sequências nucleotídicas de CPSMV.

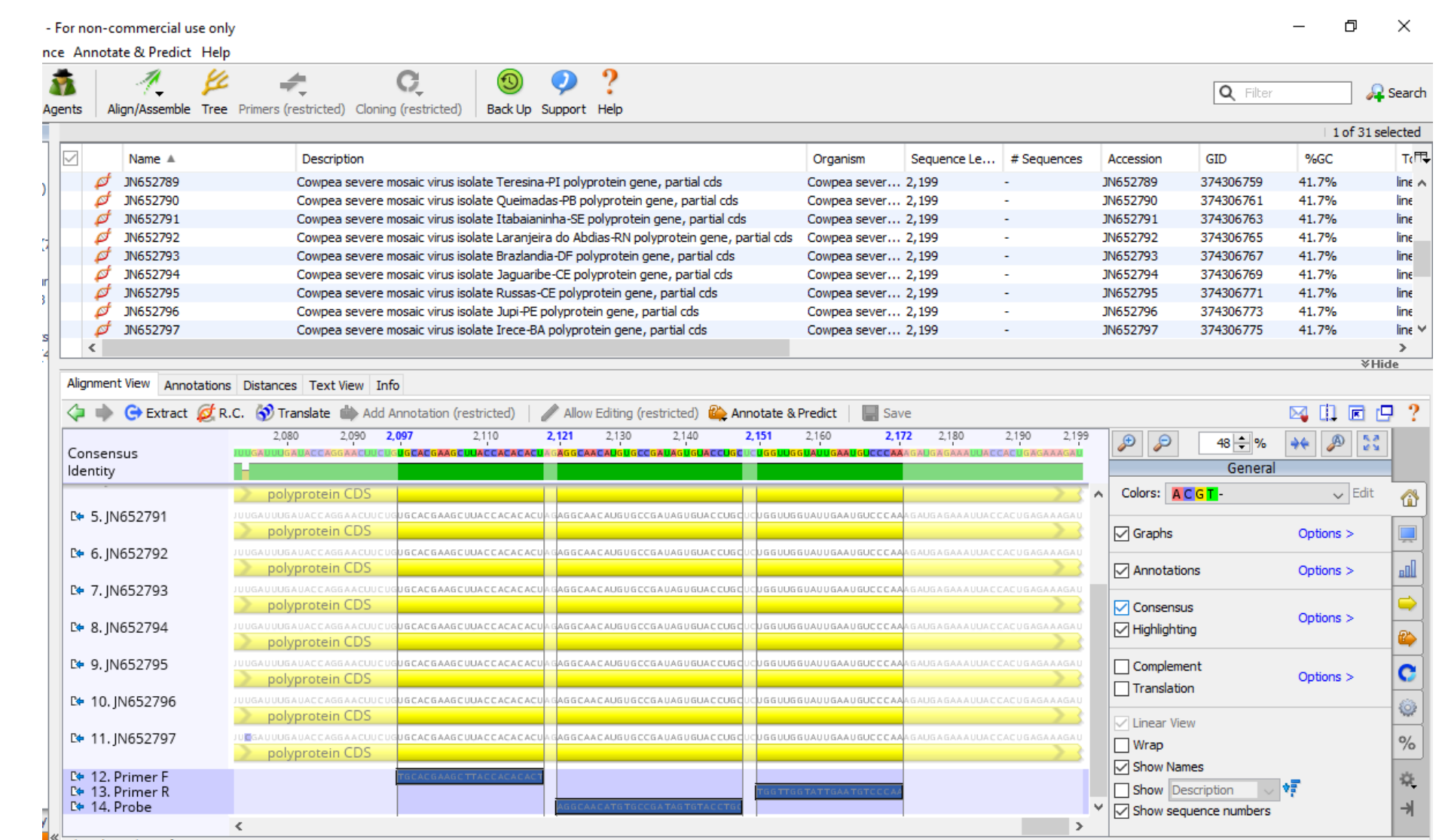


Figura 3. Sequências dos iniciadores e sonda de CPSMV homólogas em todos os isolados brasileiros.

➤ As ampliações por RT-PCR em tempo real foram realizadas em um único passo, utilizando o master mix AgPath-ID™ One Step RT-PCR Kit (Life Technologies), 0,2 μM de cada iniciador e 0,1 μM de sonda em volume final de 12 μL (10 μL master mix, 2 μL RNA). Foram realizadas extrações de RNA de material vegetal e de sementes naturalmente infectadas utilizando kits comerciais de purificação.

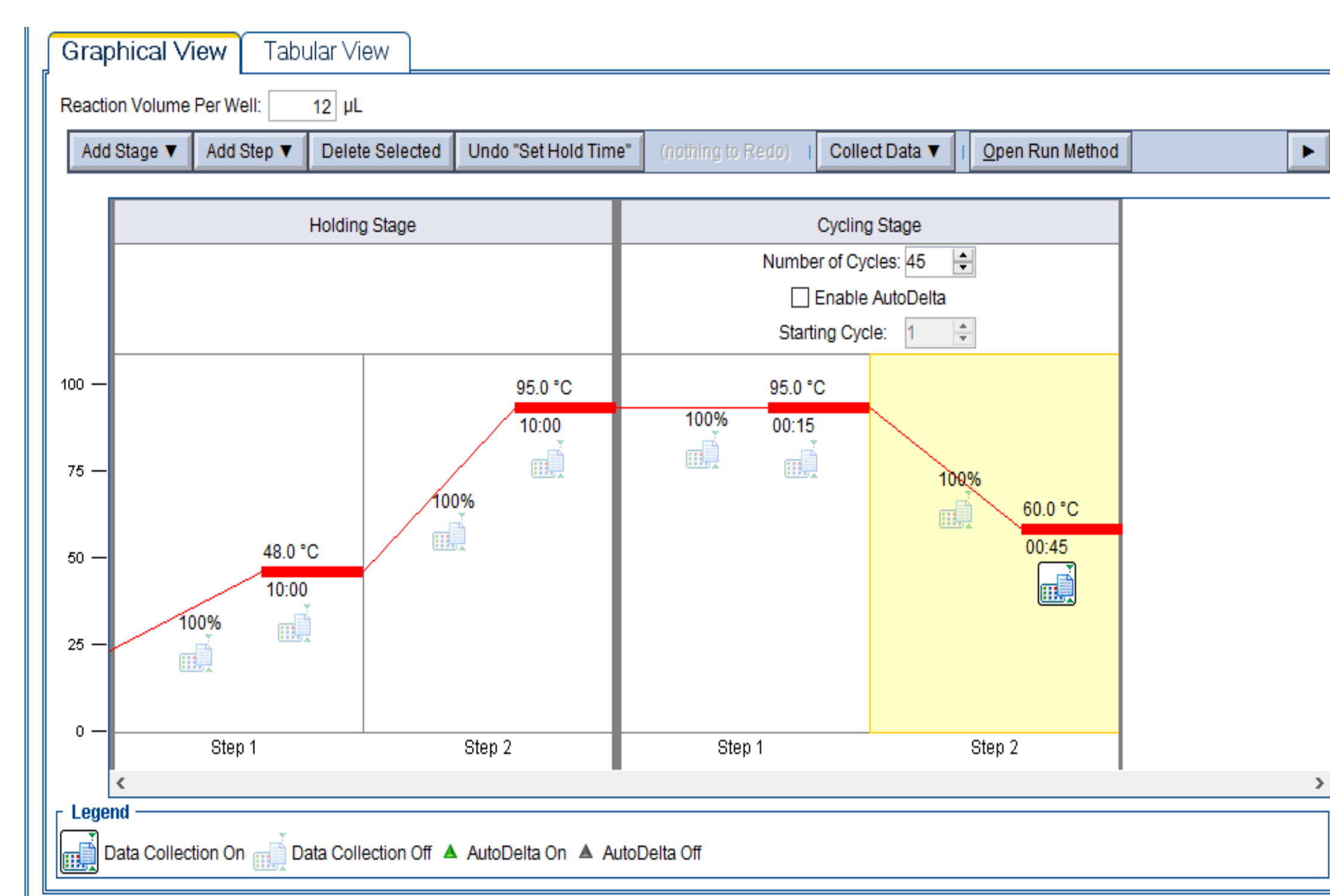


Figura 4. Parâmetros dos ciclos de amplificação por RT-PCR em tempo real.

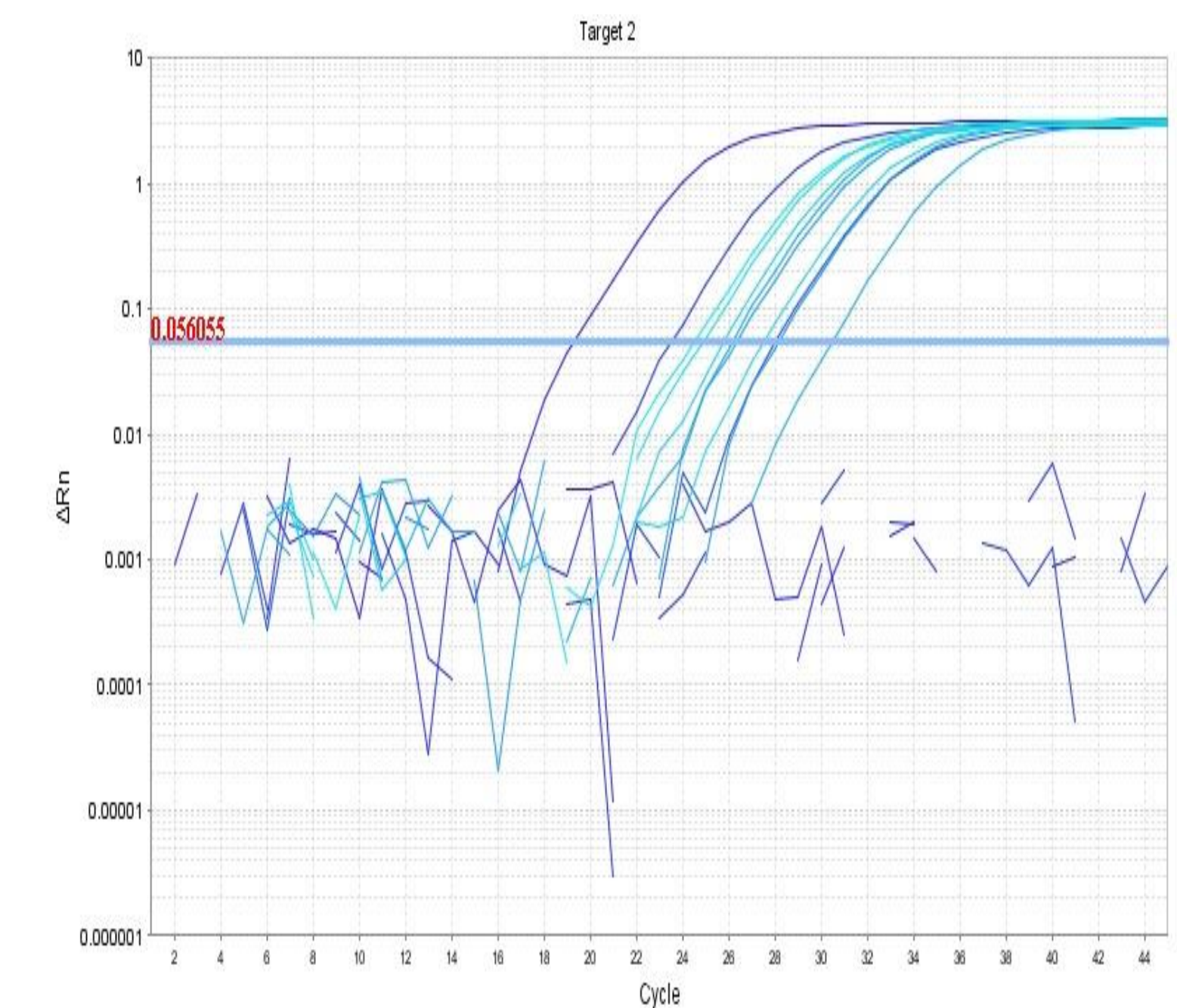


Figura 5. Curvas de amplificação por RT-PCR em tempo real.

Tabela 1. Sequência dos primers e sondas desenhados para os diferentes vírus.

Vírus	Primer F	Sonda	Primer R
CPSMV	5'-TGCACGAAGCTTACCACACACT-3'	5'-FAM- AGGCAACATGTGCCGATAGTGTACCTGC-3'-TAMRA	5'-TGGTTGGTATTGAATGTCCCAA-3'
SLRSV	5'-TTTGCRCCCTCYCCAAA-3'	5'-FAM-CCTTTCACAATCGTGTGGGTG CCC-3'-TAMRA 5'-FAM-CCTTTCATAATAGTGGTGGGTGTCC-3'-TAMRA	5'-TCCGCTCACCAGTATGC-3'

## CONCLUSÃO

➤ Os iniciadores, sondas e os protocolos de RT-PCR em tempo real desenhados, poderão ser utilizados para a detecção de CPSMV e SLRSV e diagnóstico das respectivas doenças por eles causadas. Estes reagentes e protocolos de PCR em tempo real serão testados e validados para uso em protocolos oficiais para evitar a introdução do SLRSV em nosso país e para melhor manejar e controlar o CPSMV nas principais regiões produtoras do Brasil.

Apoio: