

# 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.

E-mail: franciszanini@hotmail.com

## INTRODUÇÃO



Figura 1: Sintoma de CPSMV.

O feijão caupi (*Vigna unguiculata*) é a principal fonte de proteína das regiões Norte e Nordeste do Brasil. O vírus *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) afeta diretamente a produção dessa leguminosa, causando redução na produtividade. A comercialização de material vegetal e sementes contaminadas envolve riscos de introdução e dispersão de pragas. Atualmente, uma das técnicas mais utilizadas para detecção de vírus é a PCR em tempo real, a qual permite a amplificação, detecção e quantificação de um patógeno em um único passo e tem sido amplamente empregada para detecção de vírus em sementes. O estudo teve como objetivo a otimização e validação de metodologia de preparação de amostras para a aplicação em RT-PCR em tempo real na detecção do vírus em sementes.

## MATERIAIS E MÉTODOS

- ✓ **AMOSTRAS:** Sementes naturalmente infectadas colhidas de plantas sintomáticas em campo.
- ✓ **PREPARAÇÃO DO EXTRATO:** 1 grama de sementes foram maceradas em bolsas de plástico com o auxílio de martelo, utilizando tampão de extração (PBS + 2% PVP + 0.2% DIECA).
- ✓ **EXTRAÇÕES DE RNA:**
  - **Kits comerciais:** 100 µl do extrato realizado foi utilizado seguindo o protocolo recomendado para cada kit. Foram testados os seguintes kits: i) RNease plant mini kit (Qiagen), ii) SV total RNA isolation system (Promega), iii) Trizol (Thermo Fisher Scientific) e iv) Direct-zol (Zymo Research).
  - **Métodos diretos:**
    - ❖ **Spot:** 5 µl do extrato realizado foram depositados em uma membrana de papel Whatman de 5 mm de Ø dentro de um tubo Eppendorf. Foram adicionados 100 µl de tampão glicina (0,1M glicina; 0,05 M NaCl; 1mM EDTA) e agitado em vortex. Foram recuperados 2 µl do extrato e utilizados diretamente na reação de RT-PCR em tempo real.
    - ❖ **Diluição:** o extrato realizado foi diluído em tampão de extração nas proporções 1:10, 1:100 e 1:1000. Foram recuperados 2 µl do extrato e utilizados diretamente na reação de RT-PCR em tempo real.
- ✓ **AMPLIFICAÇÃO POR RT-PCR EM TEMPO REAL:** A RT-PCR em tempo real, foi realizada em volume final de 12 µl, utilizando o master mix AgPath-IDTM One Step RT-PCR Kit (Life Technologies). Os primers e sonda utilizados foram:
  - Primer F: 5' TGCACGAAGCTTACCACACACT 3'
  - Primer R: 5' TGGTTGGTATTGAATGTCCCAA 3'
  - Sonda: 5'- FAM AGGCAACATGTGCCGATAGTGTACCTGC TAMRA - 3'



## RESULTADOS

Tabela 1: Ciclos de amplificação (Ct) por RT-PCR em tempo real do RNA de CPSMV extraído com os diferentes métodos.

Diluição	Método de extração de RNA					
	Promega	Direct-zol	TRizol	Qiagen	Spot	Direto
Extrato vegetal	30	24	23	21	31	27
1:10	34	28	32	31	31	31
1:100	37	30	33	29	Indet.	37
1:1000	Indet.	34	Indet.	38	Indet.	Indet.

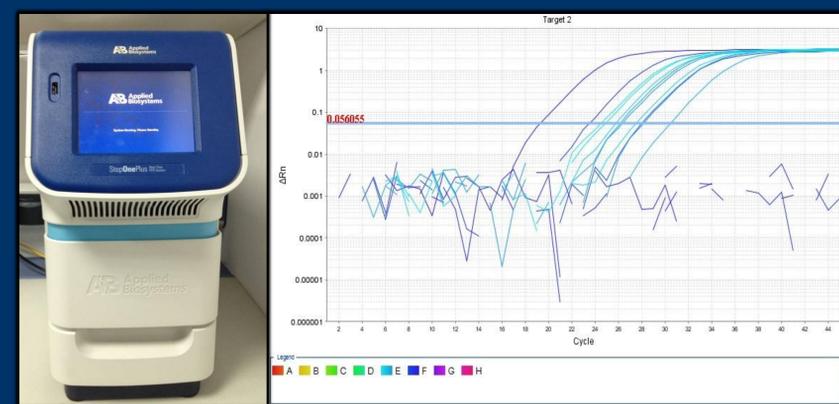


Figura 2: Termociclador e curvas de amplificação via RT-PCR em tempo real.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos evidenciaram uma maior sensibilidade dos kits comerciais frente aos métodos diretos, porém, estes foram mais econômicos e de fácil utilização, demonstrando que podem ser empregados em análises laboratoriais rotineiras para detecção deste vírus por RT-PCR em tempo real em material vegetal e sementes.