

SALÃO DE
INICIAÇÃO CIENTÍFICA
XXIX SIC
**UFRGS**
PROPESQ



múltipla 
UNIVERSIDADE
inovadora  inspiradora

Evento	Salão UFRGS 2017: SIC - XXIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2017
Local	Campus do Vale
Título	DESENHO DE PROTOCOLOS DE RT-PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO E DIAGNÓSTICO DO COWPEA SEVERE MOSAIC VIRUS EM SEMENTES
Autor	FRANCIS ZANINI
Orientador	EDSON BERTOLINI

DESENHO DE PROTOCOLOS DE RT-PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO E DIAGNÓSTICO DO *COWPEA SEVERE MOSAIC VIRUS* EM SEMENTES

Francis Zanini, Edson Bertolini (orientador) – UFRGS

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 estudo teve como objetivos o desenvolvimento 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. Foram comparadas sequências nucleotídicas da região da proteína do capsídeo do vírus e com o auxílio do Programa Primer Express foram desenhados primers e sonda TaqMan específicos para CPSMV. Ainda, foram comparados kits comerciais de extração e purificação, com métodos diretos de extração de RNA utilizando material foliar e sementes obtidas de plantas infectadas. Nesta etapa, as purificações de RNA através dos kits comerciais: i) RNease plant mini kit (Quiagen), ii) SV total RNA isolation system (Promega), iii) Trizol (Thermo Fisher Scientific) e iv) Direct-zol (Zymo Research), bem como, os métodos diretos de extração de RNA (spot e diluição), foram submetidos à diluições seriadas para comparação da sensibilidade e qualidade do RNA através da análise de RT-PCR em tempo real. Para identificação da localização do vírus, 50 sementes foram separadas entre tegumento e embrião. Posteriormente, para o ensaio de transmissão, 100 sementes de plantas infectadas foram semeadas e as plantas periodicamente analisadas durante 90 dias de cultivo. Os resultados obtidos demonstraram: o correto funcionamento dos primers e da sonda TaqMan, a possibilidade de análise de amostras sem purificação de RNA, a localização do vírus em ambos tecidos da semente, em maior frequência e quantidade no tegumento e a não transmissibilidade do vírus por sementes infectadas. O protocolo de RT-PCR em tempo real desenvolvido pode ser empregado em análises laboratoriais rotineiras para detecção do CPSMV em material vegetativo e sementes.

Apoio: BIC-UFRGS.