



ISBN 978-85-66836-16-5

PROTÓCOLO DE RT-PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DO *Cowpea severe mosaic virus* EM MATERIAL VEGETATIVO E SEMENTES<sup>1</sup> / Real-time RT-PCR protocol for detection of *Cowpea severe mosaic virus* in vegetative material and seeds. F. ZANINI<sup>2</sup>; B.L. LERNER<sup>2</sup>; J. ZANIN<sup>3</sup>; G. PIO-RIBEIRO<sup>4</sup>; J.A.A. LIMA<sup>5</sup>; E. BERTOLINI<sup>2</sup>. <sup>2</sup>Laboratório de Virologia Vegetal, Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia – UFRGS. Avenida Bento Gonçalves, 7712, 91540-000, Porto Alegre, RS / <sup>3</sup>Agrônoma Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria, Porto Alegre, RS / <sup>4</sup>Área de Fitossanidade, Departamento de Agronomia, UFRPE, Recife, Pernambuco / <sup>5</sup>Laboratório de Virologia Vegetal, Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias, UFC, Fortaleza, CE. E-mail: francis.zanini@ufrgs.br

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, mas 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 CP do vírus e desenhados primers e sonda TaqMan específicos para CPSMV. Foram testados kits comerciais de extração e purificação, com métodos diretos de extração de RNA, utilizando material foliar e sementes obtidas de plantas infectadas. Tegumento e embrião de 50 sementes de plantas infectadas foram analisados para localização do vírus. 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, 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.

**Key words:** Sondas TaqMan; Feijão-caupi; Métodos de preparação de amostras.

<sup>1</sup>Agradecimentos: Ao CNPq, a PROPESQ-UFRGS e ao Laboratório Agrônoma pelo apoio logístico e financeiro.