



Preservação de controles positivos do gênero *Tobamovirus* para análises em quarentena vegetal

Martha Maria Passador¹, Roberta Pierry Uzzo¹, Julio Massaharu Marubayashi², Valdir Atsushi Yuki² e Christina Dudienas¹

¹Instituto Agrônomo (IAC), Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade, Núcleo Quarentenário, Campinas, SP, Brasil; ²Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas (FCA-UNESP), Departamento de Produção Vegetal. Botucatu, SP, Brasil. E-mail: quarentenario.labmol@gmail.com

Para que os resultados de análises por PCR sejam mais consistentes, é importante o uso de controles positivos para evitar a ocorrência de falsos positivos ou falsos negativos. O objetivo do presente estudo foi demonstrar a manutenção do RNA de dois isolados virais do gênero *Tobamovirus* utilizados para controles positivos em reações de RT-PCR. Foram utilizados dois isolados, *Tobacco mosaic virus* (TMV) e *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV), mantidos em plantas de *Nicotiana tabacum*, em casa de vegetação do setor de Virologia Vegetal do Instituto Agrônomo (Campinas, SP). As extrações do RNA viral foram realizadas no mês de março de 2017, com o kit comercial Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp.), a partir de fragmentos de folhas das referidas plantas, com sintomas de mosaico. Os produtos das extrações foram armazenados em ultrafreezer a -80 °C, em microtubos de 1,5 mL (DNase e RNase free) e avaliados a cada 60 dias, quanto à integridade e por RT-PCR com oligonucleotídeos universais para esse grupo de vírus, e os resultados confirmados por eletroforese em gel de agarose (1,2%). Para evitar os descongelamentos sucessivos das mesmas amostras, elas foram divididas em 10 amostras para cada isolado, e a cada verificação, uma amostra diferente foi testada. A concentração e qualidade do ácido nucleico foi determinada em equipamento QIAxpert® System (Qiagen). Os materiais se mantiveram íntegros e viáveis até o final das avaliações. A concentração e qualidade dos ácidos nucleicos demonstraram-se satisfatórias (razão 260/280: 1,8 - 2,15). Os produtos das reações de RT-PCR foram submetidos a sequenciamento, e as sequências estão depositadas no NCBI/GenBank (MH006893.1; MH006892.1). O estudo realizado permitiu verificar e confirmar a manutenção da viabilidade dos RNAs virais extraídos e armazenados por um período de 5 anos, para utilização em experimentos, análises e outras aplicações, como por exemplo, controles positivos em reações de RT-PCR no Quarentenário IAC.

Palavras-chave: Diagnóstico, RT-PCR, Viabilidade.