

MECANISMO DE INOCULAÇÃO MECÂNICA DE VÍRUS EM PLANTA E EXTRAÇÃO DO RNA VEGETAL

Tailan Fróes*
Pâmela Santana Daltro**
Andréia Iraci Tumelero***
Renata Pereira Bitencourt****

A inoculação de vírus vegetal de forma mecânica em plantas é utilizada com frequência na pesquisa em estudos da interação patógeno-hospedeiro. Espontaneamente no meio ambiente também ocorre a inoculação mecânica pelo contato de uma planta infectada com uma sadia, através de ranhuras provocadas entre as suas folhas podendo dessa forma transmitir o vírus entre elas. Dentre as técnicas moleculares mais utilizadas para análises de RNA total de tecidos vegetais, o de primeira escolha é o RT-PCR, possibilitando chegar ao diagnóstico das plantas infectadas e sadias. O trabalho teve como objetivo realizar a inoculação mecânica do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) em plantas de maracujá (*Passiflora edulis*) e extrair o RNA total das plantas infectadas. O inoculo para a transmissão mecânica foi preparado por meio da maceração do material foliar infectado com o CABMV, na proporção de 0,6 g de tecido (folha) para 15 mL de solução tampão (fosfato de potássio 0,1 M e sulfato de sódio 0,1 M). Em seguida, foi adicionada pequena quantidade de “celite” (abrasivo) ao extrato obtido. As inoculações foram realizadas friccionando-se o extrato vegetal infectado, com o auxílio de um pistilo de porcelana sobre a superfície das folhas basais das plantas de *P. edulis*. As plantas foram lavadas com água e mantidas em casa de vegetação. Após a observação dos sintomas foi realizada a extração do RNA total das amostras, onde pesou-se 100 mg de tecido vegetal, em seguida o mesmo foi macerado em nitrogênio líquido e adicionado 1 mL de Trizol, obedecendo a proporção de 100 mg de tecido macerado para 1 mL de Trizol. Posteriormente, adicionou-se 200 µL de Clorofórmio homogeneizando vigorosamente por 15 segundos com o auxílio de um vortex. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g, temperatura de 4 °C, após 15 minutos coletou-se a fase aquosa, volume de 600 µL, que foi transferido para um novo tubo Eppendorf acrescentado 500µL de Isopropanol. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 10 minutos a 4 °C e centrifugadas a 12.000 g por 10 min. O sobrenadante foi removido e o pellet, contendo o RNA, foi lavado com etanol 75%. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 7.500 g/ 5 minutos a 4 °C e o mesmo ressuspensionado em água RNase free. Para a confirmação da qualidade da extração do RNA, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose a 1%. Conclui-se que a extração do RNA total em tecido vegetal é necessária para o diagnóstico de viroses em plantas por técnicas de RT-PCR e a inoculação mecânica de vírus em espécies de plantas é de extrema importância na área da pesquisa trazendo grandes resultados e levando informações essenciais aos agricultores, como formas eficientes de manejo das culturas, melhorando assim a produção e qualidade do fruto.

Palavras-chave: RNA. Extração. Vírus.

* Graduando em Biomedicina na Faculdade Maria Milza. taifroes12@gmail.com

** Mestre em Biotecnologia pela UEFS. Professora da Faculdade Maria Milza. ps.daltro@yahoo.com.br

*** Bolsista DCR FAPESB/CNPq/Embrapa. tumeleroai@gmail.com

**** Graduando em Biomedicina na Faculdade Maria Milza. renatabitencourt@live.com