

Análise de curvas de dissociação de alta resolução da RT-PCR em tempo real para detectar e diferenciar variantes de vírus da videira

Caio Antoniette Peres⁽¹⁾, Thor Vinícius Martins Fajardo⁽²⁾ e Osmar Nickel⁽³⁾

⁽¹⁾ Bolsista, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. ⁽²⁾ Pesquisador, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. ⁽³⁾ Pesquisador aposentado, Embrapa Uva e Vinho, RS.

Resumo – A RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) é utilizada para detectar vírus de plantas, sendo um método de detecção rápido e quantitativo. A análise da curva de dissociação de alta resolução (HRM), uma extensão da RT-qPCR, conhecida por RT-qPCR-HRM, com reação realizada em tubo único, apresenta alto rendimento e permite discriminar variantes virais. O objetivo do trabalho foi analisar as curvas de dissociação de alta resolução geradas pela RT-qPCR para detectar e diferenciar variantes do *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3) e do *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) em 74 e 10 videiras infectadas, respectivamente. Uma única curva de amplificação foi gerada por amostra na RT-qPCR. Considerando os fragmentos amplificados para GLRaV-3 (230 nucleotídeos, nt, na ORF HSP70) e GFLV (152 nt na ORF da proteína capsial), foi possível identificar diferentes variantes desses vírus, que apresentaram diferentes valores de temperatura de dissociação, refletindo diferenças nas sequências de nt dos fragmentos de DNA. Isolados de GLRaV-3 apresentaram diferentes curvas de dissociação, com valores de T_m variando de 82,01 a 84,39 °C. Para os isolados de GFLV, os valores de T_m apresentaram menor variação, entre 79,03 e 80,60 °C. Para GLRaV-3, a variante com T_m 84,10 °C foi prevalente (23 isolados), seguida pelas variantes com T_m 83,95; 84,24; 84,09 e 82,99 °C com 17, 8, 6 e 5 isolados, respectivamente. Para GFLV, a variante com T_m 80,52 °C foi prevalente (2 isolados). A análise HRM foi validada pelo sequenciamento de nt de isolados de GLRaV-3 e GFLV. As sequências de nt alinhadas permitiram comprovar a variabilidade (alterações de nt por posição) das variantes virais.

Termos para indexação: GLRaV-3, GFLV, variante de sequência.