



## VIROLOGIA

345

### **Detecção de oito vírus em videiras por meio de RT-PCR em tempo real** (Detection of eight virus in grapevines by Real Time RT-PCR)

**Dubiela, C.R.<sup>1,2</sup>; Fajardo, T.V.M.<sup>1</sup>; Revers, L.F.<sup>1</sup>; Souto, E.R.<sup>2</sup>; Nickel, O.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS; <sup>2</sup>UEM, Maringá, PR. E-mail: [thor@cnpuv.embrapa.br](mailto:thor@cnpuv.embrapa.br)

A PCR em Tempo Real utilizando sondas específicas marcadas com fluoróforos (TaqMan) vem ganhando espaço no diagnóstico viral em função das vantagens sobre a PCR convencional. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da RT-PCR em Tempo Real para a detecção de oito espécies virais que infectam a videira: *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV-1, -2, -3), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine fleck virus* (GFkV) e *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV), individualmente ou duas a duas em uma única reação (duplex). Os oligonucleotídeos, as sondas e as reações de RT-PCR em Tempo Real foram descritos por Osman et al. (J.V.Methods 141:22-29.2007, J.V.M. 149:292-299.2008, J.V.M. 154:69-75.2008). RNA total de videiras sadias e comprovadamente infectadas com estes vírus foi utilizado em ensaios tipo presença/ausência utilizando-se o kit “TaqMan Master Mix One-Step RT-PCR”. Para indexação, também foi extraído RNA total de 36 acessos de videiras recuperadas após tratamentos de termoterapia e cultura de tecidos. Foi possível detectar de maneira muito sensível todos os vírus supra-citados (8) em amostras infectadas. Também foi possível detectar em ensaios “duplex” GVA, RSPaV, GLRaV-2 e GLRaV-3 (fluoróforo VIC, “quencher” TAMRA) combinados com GVB, GFLV e GFkV (fluoróforo FAM). Na indexação dos 36 acessos, a quase totalidade das infecções constatadas foi com RSPaV (13/36) devido a altíssima sensibilidade do teste. Em amostras com ampliações positivas por PCR em Tempo Real, a RT-PCR convencional não reproduziu os resultados. A PCR em Tempo Real permitiu significativo incremento na qualidade da indexação de patógenos virais em videira.

Hospedeiro: *Vitis* spp., videira

Patógeno: *Grapevine leafroll-associated virus 1, 2, 3* (GLRaV-1, -2, -3), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV)

Doença: Enrolamento da folha, lenho rugoso, degenerescência e mancha das nervuras

Área: Virologia

Apoio: CNPq/Processo 472017/2010-1