

Caracterização molecular de fungos causadores de doenças de tronco da videira

Danton Magri¹, Cíntia Nietske Soares de Deus¹, Jéssica Tascheto Berlatto¹, Fábio Rossi Cavalcanti², Marcus André Kurtz Almança^{1*}
*Orientador

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS) -
Campus Bento Gonçalves. Bento Gonçalves, RS

²Embrapa Uva e Vinho - CNPq. Bento Gonçalves, RS, Brasil

As doenças de tronco da videira (DTV's) vêm causando prejuízos enormes à viticultura mundial. Elas ocasionam grandes perdas econômicas aos países vitivinícolas devido ao declínio e morte de plantas. Este complexo de doenças abrange o declínio de Eutypa ou eutipiose, a doença de Petri, a Esca, a podridão descendente e o pé preto. Essas doenças são alvo de linhas de pesquisas do mundo todo, entretanto são ainda pouco pesquisadas no Brasil. O objetivo deste trabalho é caracterizar com técnicas moleculares fungos causadores de DTV's oriundos de plantas sintomáticas e armazenados na Micoteca do Laboratório de Fitopatologia do IFRS/Campus Bento Gonçalves. Realizou-se o cultivo dos isolados fúngicos em placas de petri com meio batata-dextrose-ágar (BDA) e, posteriormente em meio líquido batata-dextrose (BD) para obtenção de biomassa micelial. Este micélio foi utilizado para extração de DNA total pelo protocolo fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e submetido à PCR (Reação em cadeia da polimerase) para amplificação, utilizando primers disponíveis mundialmente de três regiões do DNA conservadas em fungos: ITS (*internal transcribed spacer*), β -tubulina e fator de alongação. Os amplicons derivados da PCR foram transferidos para um gel de agarose, submetidos à eletroforese para separação dos fragmentos de DNA e posterior coloração com brometo de etídio seguida de revelação sob luz UV. As bandas obtidas no gel foram comparadas para identificação da região amplificada. Também foi realizada a técnica RFLP (Polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA), caracterizada por realizar cortes em sítios específicos do DNA, fragmentando-o com enzimas de restrição (Hae e Cfo). Os resultados também foram visualizados em gel de agarose, podendo-se observar várias bandas de um mesmo isolado, indicando os vários fragmentos clivados pelas enzimas e arrastados na eletroforese. Posteriormente os amplicons de cada região e de cada patógeno foram enviados para sequenciamento do DNA em uma empresa terceirizada. As sequências recebidas foram comparadas com genomas do mundo inteiro no sistema BLASTn da NCBI (National Center for Biotechnology Information), possibilitando a confirmação da espécie do fungo e apontando, inclusive diferenças no código genético de espécies iguais originárias de lugares diferentes. Já foram identificados isolados de espécies como *Phaeomoniella chlamydospora*, *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum* e *Lasiodiplodia theobromae*. As sequências destes isolados foram depositadas no banco de genomas GenBank. Conhecer a diversidade genética destes fungos causadores de DTV's abre possibilidades para várias linhas de pesquisa. Já se está trabalhando na criação de primers específicos para cada espécie, aumentando a sensibilidade de detecção.

Palavras-chave: Esca. Podridão descendente. Viticultura.