



CARATERIZAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS CAUSADORES DE DOENÇA DE TRONCO DA VIDEIRA

Ril, R. D.¹, Almança, M. A. K.², Tonello, J. C.³, Lerin, S.⁴, Deus, C. N.⁵, Stein, D.L.⁶

RESUMO – As doenças de tronco da videira compreendem um grupo de doenças que afetam de forma negativa a qualidade e produtividade vitícola, incluindo as doenças de Petri, Esca, Podridão descendente e Pé-preto. A fim de identificar sua ocorrência e maneiras de minimizar seu efeito na produção, monitoramentos mais precisos devem ser realizados. O objetivo deste projeto foi caracterizar morfológica e molecularmente a diversidade de fungos causadores de doença de tronco em videira, associando com sintomas externos e internos de morte e/ou declínio. As amostras oriundas da micoteca do laboratório de fitopatologia foram cultivadas para produção de biomassa, que seguiu para extração de DNA. A análise molecular consistiu-se em técnicas de extração e amplificação de ácido desoxirribonucleico (DNA), por reação em cadeia da polimerase (PCR) amplificando as regiões ITS (Internal Transcribed Spacer) do RNA ribossomal; e sua visualização em gel a partir de eletroforese. Resultados parciais comparando análises morfológicas e moleculares demonstram grande incidência de *Phaeomoniella chlamydospora* e *Botryosphaeria dothidea* nas cultivares analisadas.

PALAVRAS-CHAVE: Esca, Petri, Podridão descendente, Pé-preto.

¹ Estudante, Curso Tecnologia em Viticultura e Enologia, IFRS Campus Bento Gonçalves, Av. Osvaldo Aranha, 540, CEP 95.700-206, Bento Gonçalves, RS, renataril@yahoo.com.br

² Eng.º Agrônomo, Prof. Doutor, IFRS Campus Bento Gonçalves, Av. Osvaldo Aranha, 540, CEP 95.700-206, Bento Gonçalves, RS. Fone (54) 3455-3200, marcus.almanca@bento.ifrs.edu.br

³ Estudante, Curso Especialização em Viticultura, IFRS Campus Bento Gonçalves, Av. Osvaldo Aranha, 540, CEP 95.700-206, Bento Gonçalves, RS, julio.c.tonello@gmail.com

⁴ Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Fruticultura de Clima Temperado na Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) Av. Osvaldo Aranha, 540, CEP 95.700-206, Bento Gonçalves, RS, sabrinalerin@gmail.com

⁵ Técnico Administrativo do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Av. Osvaldo Aranha, 540, CEP 95.700-206, Bento Gonçalves, RS, cintia.deus@bento.ifrs.edu.br

⁶ Estudante, Curso Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, RS, daiana.istein@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

As doenças de tronco da videira compreendem um grupo de doenças que afetam de forma negativa a qualidade e produtividade vitícola, estas incluem doenças de Petri, Esca, Podridão descendente e Pé-preto, associadas a fungos como *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp., *P. chlamydospora*, *Phaeoacremonium* spp., fungos da família *Botryosphaeriaceae* entre outros.

Devido a seus efeitos na produção, fácil propagação e demanda de custos uma vez instaladas, estas doenças necessitam cada dez mais de um monitoramento mais preciso, a fim de identificar sua ocorrência e conseqüentemente estudar maneiras de minimizar seu efeito na produção.

Seguidas observações e levantamentos de campo, feitos nos últimos anos, principalmente no Rio Grande do Sul, alertam para o preocupante crescimento da incidência dessas doenças nas áreas de produção de uva para mesa e processamento (Rossi et al, 2013).

A combinação de análises morfológicas e moleculares visa a complementação dos resultados, possibilitando uma identificação mais precisa, uma vez que morfológicamente se obtêm apenas o gênero fúngico, assim o conhecimento molecular permite também o conhecimento mais específico da espécie patogênica visto a grande variedade dentro de um mesmo grupo.

Os isolados ficaram armazenados na micoteca do laboratório de fitopatologia sendo adotado o método de castelli para armazenamento. O método Castellani é muito utilizado para preservar fungos fitopatogênicos, onde colônias puras do fungo são colocadas em um pequeno frasco contendo água destilada esterilizada ou solução salina, sendo posteriormente selado e armazenado em temperatura ambiente ou de refrigerador (Bueno, 2006). Na análise molecular foi utilizada a eletroforese em gel de agarose, segundo Lima (2008) é um método simples e eficiente que permite separação, identificação e purificação de moléculas de DNA. As moléculas são separadas através da migração de partículas no gel, com a aplicação de uma diferença de potencial elétrico, onde as moléculas de menor massa migram mais rápido.

O objetivo deste projeto foi caracterizar morfológica e molecularmente a diversidade de fungos causadores de doença de tronco em videira, associando com sintomas externos e internos de morte e/ou declínio, cultivares de videira, Devem ser evitadas divagações. Devem ser utilizadas referências apropriadas para formular os problemas abordados e a justificativa da importância do assunto, deixando claro o(s) objetivo(s) do trabalho.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de Material

Previamente o material oriundo de vinhedos observados com sintomas de doenças de tronco foi levado ao laboratório para isolamento. Os sintomas internos foram registrados em fotografia, armazenados em banco de dados com diferentes sintomas para que pudessem ser correlacionados com os fitopatógenos isolados. O material utilizado para sequenciamento se originou de 14 videiras, onde foram isolados diferentes pontos da planta sendo identificados na sequência: colo (1), topo (2), meio (3), braço (4) e esporão (5) e sintomas encontrados nas amostras, pontuação (A), contorno preto do sintoma (B), contorno preto da amostra (C), escurecimento (D) e soft (E), o último algarismo refere-se ao número da repetição.

Os isolados utilizados para caracterização são oriundos da micoteca do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Campus Bento Gonçalves. Estes estão armazenados na micoteca em frascos com água destilada autoclavada e armazenados em geladeira, sendo dois frascos por isolado, segundo método de Castellani.

Uma vez identificados os sintomas as amostras seguiram para isolamento. Primeiramente as amostras passaram por desinfecção levando em consideração sintoma e parte afetada da videira. As amostras de raiz foram imersas em hipoclorito de sódio 0,35% por 1 minuto e logo após mergulho em água autoclavada e procedido isolamento, para amostras oriundas de tronco, braço, esporão e ramos as amostras foram da imersas na sequência de soluções: etanol 70%, por 30 segundos, hipoclorito de sódio 3,5% por 2 minutos e novamente em etanol 70% por 30 segundos. Após a realização da desinfecção, pequenas seções com sintoma foram removidas com auxílio de um bisturi e colocados 5 seções por placa de Petri contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar) e tetraciclina 0,4%, sendo acompanhadas por período de quatro semanas. Após com o crescimento das colônias de fungos, houve repicagem individual de cada patógeno em novas placas de Petri contendo meio BDA para crescimento e desenvolvimento da colônia.

2.3 Identificação morfológica e molecular dos fungos

A identificação morfológica dos fungos foi baseada nas características morfológicas da colônia levando em consideração tamanho, forma, cor e velocidade de crescimento dos fungos e nas características morfológicas observadas em microscópio, como formato e tamanho do esporo e micélio. A prévia identificação auxiliou na identificação dos *primers* mais específicos a serem utilizados posteriormente na análise molecular.

Para a identificação molecular, foi realizada primeiramente a produção de biomassa sendo cultivado o micélio do fungo em meio líquido, para utilização na extração de DNA. O preparo da biomassa consistiu em cultivar uma fração do isolado, utilizando erlenmeyers de 50mL, previamente esterilizados, com meio líquido BD (batata-dextrose) contendo uma fração transferida de BDA com micélio fúngico, sendo mantidos por agitação por uma semana, em condições escuras, a 25 °C. Após período de incubação, o meio foi filtrado em um sistema a vácuo funil-kitazato, e apenas o micélio fúngico recolhido, identificado e estocado a -20°C. Para técnica de extração de DNA total de micélio, ensaios de PCR e RFLP foram coletados aproximadamente 200 mg do micélio cultivado onde foi utilizado para extração de DNA em solução de fenol:clorofórmio:isoamílico (25:24:1), conforme protocolo de extração e purificação (Sambrook, 1989). As amplificações por PCR do DNA extraído dos isolados foram realizadas usando-se iniciadores ITS1/ITS4, para regiões internas (espaçadores) do DNA associadas a fungos verdadeiros. Amplicons do PCR realizado com iniciadores ITS sobre os DNAs dos isolados estudados foram precipitados em etanol e ressuspensos em 20uL de água destilada. Uma alíquota de 5uL foi retirada e digerida com 10 uM de duas enzimas de restrição: HaeIII e Cfo I, durante 3 horas a 35 °C. Tanto os produtos de PCR, quando produtos de RFLP foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose 5%, com as bandas sendo comparadas a um marcador de DNA 500-3000pb (BRL, MD, USA) inserido em um dos poços no gel.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 29 amostras separadas para caracterização são apresentadas na tabela 1.

Do total de amostras analisadas no presente trabalho 24 ainda aguardam confirmação para sequenciamento. Dos isolados obtidos das amostras já sequenciados 3 tiveram confirmação para *Botryosphaeria*, sendo duas para *Botryosphaeria dothidea*. As plantas números 72 e 22R, ambas como ponto de isolamento o meio e apresentando como sintoma interno escurecimento do sintoma e uma confirmada para *Botryosphaeria parva*, a planta número 19P, tendo como ponto de isolamento também o meio e apresentando escurecimento como sintoma interno. Fungos do gênero *Botryosphaeria* estão relacionados a podridão descendente. A planta número 69 apresentou confirmação para *Phaeoconiella chlamydospora* tendo como ponto de isolamento também o meio e apresentando pontuação como sintoma interno.

Para as plantas 72 e 88 houve disparidade entre a análise morfológica realizada previamente e o sequenciamento, ambas tiveram como ponto de isolamento o colo, sendo na primeira identificada sintoma interno de pontuação e na segunda escurecimento, tal resultado enfatiza a necessidade de uma ampliação nas sequências de bases utilizadas, uma maior especificidade nos *primers* utilizados e uma nova investigação nos resultados que apresentam disparidade com relação até mesmo a contaminações durante o processo.

Tabela 1 – Resultados obtidos nas avaliações morfológicas e moleculares.

Nº da coleção	Morfológica	Molecular PCR/ RFLP	Sequenciamento
72.1.A.1	<i>Phaeomoniella</i>		<i>Botryosphaeria dothidea</i>
19P.3.D.1	<i>Botryosphaeria</i>		<i>Botryosphaeria parva</i>
72.3.B.3.A	<i>Botryosphaeria</i>		<i>Botryosphaeria dothidea</i>
22R.3.B.1	<i>Botryosphaeria</i>		<i>Botryosphaeria dothidea</i>
88.1.D.3	<i>Botryosphaeria</i>		<i>Clonostachys sp.</i>
69.3.A.1	<i>Phaeomoniella</i>		<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
79.1.B.1.B*	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Botryosphaeria sp.</i>	
79.3.B.2.B*	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Botryosphaeria sp.</i>	
69.2.A.2*	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Botryosphaeria sp.</i>	
69.4.B.2.A*	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Botryosphaeria sp.</i>	
69.4.B.2.B*	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Botryosphaeria sp.</i>	
69.1.B.2*	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Botryosphaeria sp.</i>	
69.4.A.2*	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Botryosphaeria sp.</i>	
69.2.A.3*	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Botryosphaeria sp.</i>	
85.1.B.2.B*	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Botryosphaeria sp.</i>	
60.3.D.3.B*	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Botryosphaeria sp.</i>	
52.3.D*	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Botryosphaeria sp.</i>	
60.3.D.3.B*	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Botryosphaeria sp.</i>	
69.3.A.2*	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Botryosphaeria sp.</i>	
87.4.A.2*	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Botryosphaeria sp.</i>	
85.1.B.2.A*	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Botryosphaeria sp.</i>	
57.3.C*	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Botryosphaeria sp.</i>	
68.1.A.1*	<i>Phaeomoniella</i>	<i>Botryosphaeria sp.</i>	
72.1.A.3*	<i>Phaeomoniella</i>	<i>Botryosphaeria sp.</i>	
86.5.A.2*	<i>Phaeomoniella</i>	<i>Botryosphaeria sp.</i>	
84.1.B.2.C*	<i>Phaeomoniella</i>	<i>Botryosphaeria sp.</i>	
88.3.A.1*	<i>Phaeomoniella</i>	<i>Botryosphaeria sp.</i>	
55.1.B*	<i>Phaeomoniella</i>	<i>Botryosphaeria sp.</i>	
88.3.E.1.A*	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Botryosphaeria sp.</i>	

*Isolados com sequenciamento ainda em andamento.

4 CONCLUSÕES

Conclusões parciais demonstram a confirmação dos resultados morfológicos comparados as análises moleculares para *Phaeoconiella chlamydospora* e *Botryosphaeria dothidea* nas cultivares analisadas. Há também necessidade de uma ampliação nas regiões identificadas do DNA ou rDNA dos isolados e uma maior especificidade dos *primers* utilizados a fim de uma confirmação mais precisa para futuros trabalhos.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao fomento interno através do edital PROPPI e ao suporte dado através do Laboratório de Fitopatologia do Centro Nacional de Pesquisa da Uva e do Vinho/Embrapa Uva e Vinho para realização do trabalho.

6 REFERÊNCIAS

BUENO, César Júnior. Pesquisa & Tecnologia, vol. 3, n.2, Jul-Dez 2006. Disponível em: <<http://www.apta regional.sp.gov.br/acesse-os-artigos-pesquisa-e-tecnologia/edicao-2006/2006-julho-dezembro/400-metodos-de-preservacao-para-fungos-fitopatogenicos-habitantes-do-solo/file.html>> Acesso em 16 de set. de 2016.

Cavalcanti, Fábio Rossi. Declínio e morte de plantas de videira / por Fábio Rossi Cavalcanti, César Júnior Bueno e Marcus André Kurtz Almança -- Bento Gonçalves : Embrapa Uva e Vinho, 2013.

LIMA, L.M. de. Conceitos Básicos de Técnicas em Biologia Molecular. EMBRAPA ALGODÃO (Campina Grande, PB), p. 16-17, 2008.

SAMBROOK, J.. Molecular cloning. New York: Cold spring harbor laboratory press, 1989.
Surico, G., Mugnai, L., Marchi, G., 2006. Older and recent observations on esca: a critical overview. Phytopathologia Mediterranea 45, S68-S86.