

## Diagnose molecular de fitoplasmas e vírus associados ao couro-de-sapo da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)

**Jocilene dos Santos Pereira<sup>1</sup>, Maria Selma Alves Silva Diamantino<sup>2</sup>, Eder Jorge de Oliveira<sup>3</sup>, Saulo Alves Santos de Oliveira<sup>3</sup>, Emanuel Felipe Medeiros Abreu<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>UFRB -Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, jocilenepereira@outlook.com.br;

<sup>2</sup>CAPES/Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, mariaselmasd@hotmail.com; <sup>3</sup>Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, eder.oliveira@embrapa.br; saulo.oliveira@embrapa.br; emanuel.abreu@embrapa.br

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma das culturas de maior importância socioeconômica no Brasil, com ocorrência em todo território nacional. Contudo, alguns fatores limitam a produção dessa cultura, sobretudo doenças, a exemplo do couro-de-sapo (*Cassava Frog Skin Disease* - CFSD), que tem sido associado a fitoplasmas e complexo viral formado por: *Cassava Torrado-Like Virus* (CsTLV), *Cassava Polero-Like Virus* (CsPLV), *Cassava New Alphaflexivirus* (CsNAV), e *Cassava Frogskin-Associated Virus* (CsFsaV). O couro-de-sapo afeta o desenvolvimento das raízes tuberosas, deixando-as com epiderme corticosa e aspecto enrugado, reduzindo a produtividade de raízes em até 100%, além de reduções expressivas no teor de amido. A parte aérea não apresenta sintomas visuais, impossibilitando o diagnóstico precoce com elevada acurácia. Portanto, é necessário desenvolver métodos de indexação para o diagnóstico de plantas infectadas. Dessa forma o objetivo deste trabalho foi proceder à indexação de plantas com sintomas de couro-de-sapo e outras viroses por meio de técnicas moleculares. Foi realizada extração das amostras de DNA de 24 acessos sabidamente infectados, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Para diagnose de fitoplasmas foi realizada a técnica *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP), que utiliza enzimas de amplificação isotérmica associada a diferentes *primers* e à DNA polimerase *Bst*, que, além de síntese, atua na abertura das fitas de DNA. O resultado da amplificação é visualizado no próprio tubo, por meio de diferenças colorimétricas (amostras positivas na cor azul e negativas cor violeta). Uma grama do material vegetal foi macerado com tampão CTAB, transferindo 20µl do macerado para tubos de 0,2ml. Em seguida foram realizadas diluições seriadas de 10<sup>-1</sup>, coletando-se 2 µl e adicionando o Mix LAMP com os *primers* F3/B3 e BIP/FIP. Para detecção dos vírus CsTLV, CsPLV, CsNAV e CsFsaV utilizou-se a RT-PCR. Além do diagnóstico de fitoplasmas e vírus associados ao couro-de-sapo, foi feito o diagnóstico para o *Cassava Vein Mosaic Virus* (CsVMV) via PCR e *Cassava Common Mosaic Virus* (CsCMV) utilizando o teste ELISA indireto. As análises por meio do LAMP não demonstraram nitidamente a diferença de cores entre negativas e positivas, impossibilitando assim a diagnose molecular do fitoplasma. Os acessos analisados mostraram-se livres do CsCMV. Por outro lado, 20,83% dos acessos analisados estavam infectados com o CsVMV. As reações de RT-PCR não detectaram os vírus CsTLV, CsPLV, CsNAV e CsFsaV nas amostras infectadas com fitoplasma. Em princípio a não amplificação de fragmentos de DNA associados aos vírus CsTLV, CsPLV, CsNAV e CsFsaV indica uma falta de associação destes patógenos com o couro-de-sapo. Por outro lado, considerando que os acessos de mandioca possuem sintomas visuais da doença, isso indica que a diagnose molecular precisa ser aprimorada para uma diagnose mais precisa da doença.

**Significado e impacto do trabalho:** A diagnose molecular do couro-de-sapo da mandioca ainda não está ajustada o suficiente para permitir a identificação precoce da doença, e por isso precisa de estudos moleculares mais elaborados para identificar metodologias rápidas, de fácil implementação laboratorial, e acima de tudo com alta acurácia.