

Identificação e diagnose molecular de patógenos associados ao couro-de-sapo da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)

Jocilene dos Santos Pereira¹; Emanuel Felipe Medeiros Abreu²
 Maria Selma Alves Silva Diamantino³; Saulo Alves Santos de Oliveira⁴; Eder Jorge de Oliveira⁴

¹Estudante de Bacharelado em Biologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bolsista IC do CNPq; ²Analista da Embrapa Mandioca e Fruticultura; ³Pós-doutorado CNPq/ da Embrapa Mandioca e Fruticultura; ⁴Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura. E-mails: jocilenepereira@outlook.com.br, emanuel.abreu@embrapa.br, mariaselmasd@hotmail.com, saulo.oliveira@embrapa.br, eder.oliveira@embrapa.br

Introdução – A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) tem sido cultivada em diversas regiões tropicais e subtropicais, e tanto as raízes quanto a parte aérea são utilizadas para o consumo humano e animal. Por outro lado, várias doenças foram registradas causando prejuízos na produtividade da mandioca, a exemplo do couro-de-sapo (*Cassava Frog Skin Disease* - CFSD) que pode estar associado com fitoplasmas e alguns vírus. Recentemente estudos realizados na Colômbia revelaram a associação de um complexo viral formado por: *Cassava Torrado-Like Virus* (CsTLV), *Cassava Polero-Like Virus* (CsPLV), *Cassava New Alphaflexivirus* (CsNAV), e *Cassava Frogskin-Associated Virus* (CsFsaV) com a doença couro-de-sapo. Essa doença afeta o desenvolvimento das raízes tuberosas reduzindo o rendimento, a quantidade de amido e deixando-as com um aspecto enrugado, apresentando epiderme corticosa, e com isso depreciando seu valor comercial. Os sintomas do couro-de-sapo não são visíveis até o momento da colheita, e por isso o diagnóstico precoce da doença com base em sintomas visuais não pode ser realizado com acurácia. Portanto, é preciso desenvolver métodos de indexação mais acurados, para o diagnóstico de plantas infectadas em campo (screening do BAG-Mandioca) e mesmo aos protocolos de limpeza. **Objetivo** – O objetivo deste trabalho foi proceder a indexação de plantas com sintomas de couro-de-sapo e outras viroses com uso de técnicas moleculares. **Material e Métodos** – Foram extraídas amostras de DNA de folhas de 143 acessos pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG-Mandioca) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, comprovadamente contaminados com couro-de-sapo por meio de inspeção visual dos sintomas nas raízes, sendo (113 do BAG-Mandioca e 30 amostras oriundas de limpeza clonal via cultura de tecidos). Para detecção de fitoplasmas associados ao couro-de-sapo foi realizada Nested-PCR, utilizando-se os *primers*: P1/TINT na primeira reação, e na segunda os *primers*: R16F2 e R16R2, com o produto da primeira PCR como molde para a segunda amplificação. 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 também foi feito o diagnóstico para o *Cassava Vein Mosaic Virus* (CsVMV) via PCR e *Cassava Common Mosaic Virus* (CsCMV) por meio do teste ELISA indireto. **Resultados** – Dos 143 genótipos analisados para diagnóstico de fitoplasma, quinze apresentaram amplificação do fragmento esperado (1200pb), sendo consideradas contaminadas. Para CsVMV e CsCMV 26 e 29 amostras apresentaram resultado positivo, respectivamente. Por outro lado, a diagnose por RT-PCR não detectou os vírus CsTLV, CsPLV, CsNAV e CsFsaV nas amostras contaminadas com couro-de-sapo. **Conclusões** – 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 143 acessos de mandioca possuem sintomas visuais da doença e mesmo assim apenas 10,5% das amostras foram positivas para o fitoplasma, indica que a diagnose molecular ainda precisa de ajustes metodológicos para uma análise mais precoce e acurada da presença do couro-de-sapo em mandioca.

Palavras-chave: Diagnose molecular; fitoplasma; indexação; doença.