

### Reações inespecíficas na avaliação de fitoplasmas em videiras por nested-PCR

Caroline Zanardi dos Santos<sup>1</sup>; Thor Vinícius Martins Fajardo<sup>2</sup>; Marcelo Eiras<sup>3</sup>; Osmar Nickel<sup>2</sup>

A videira (*Vitis* spp.) é acometida por doenças que afetam a produção, causando prejuízos econômicos, com destaque para o "amarelo da videira", induzido por fitoplasmas (Mollicutes), que ocorrem em diversas regiões vitícolas do mundo. No Brasil, há relatos da ocorrência desse patógeno infectando videiras nos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (Santos et al. Phytopathogenic Mollicutes 7:86-90. 2017), cujos vetores são cigarrinhas (Cicadellidae). Os sintomas dos fitoplasmas em videira são: superbrotamento, encurtamento dos entrenós, alteração de coloração do limbo foliar (avermelhamento/clorose), enrolamento dos bordos foliares, encarquilhamento das folhas, necrose de nervuras e definhamento das plantas. Plantas com esses sintomas são observadas em vinhedos locais, mas devido à semelhança com viroses, essa doença pode não estar sendo corretamente diagnosticada. O objetivo deste trabalho foi investigar a presença de fitoplasmas associados a videiras. Amostras foram colhidas de 28 plantas, expressando sintomas semelhantes da doença em vinhedos experimentais e casa de vegetação. Nervuras e tecidos floemáticos de ramos verdes foram triturados em nitrogênio líquido e o DNA total extraído pelo método de Doyle & Doyle (1987). Utilizou-se nested-PCR (dupla amplificação) com oligonucleotídeos específicos para a amplificação do 16S rDNA (P1/P7 e R16F2n/R16R2). Os fragmentos de DNA amplificados de tamanho esperado (cerca de 1,2 kb) foram clonados e cinco plasmídeos recombinantes foram sequenciados. As sequências de nucleotídeos (nt) obtidas foram comparadas entre si e com sequências disponíveis no GenBank utilizando-se o Blastn. Duas plantas sintomáticas avaliadas foram consideradas positivas na nested-PCR, com amplicons de tamanho esperado, que apresentaram altas porcentagens de identidade de nt entre si (99%), porém apenas 75% de identidade com sequências correspondentes a fitoplasmas. As maiores identidades de nt obtidas (até 99%) foram com sequências de bactérias endofíticas e do filoplano. A presença de fitoplasmas nas amostras não foi confirmada, porém, considerando-se a dificuldade de detecção destes patógenos, que apresentam baixa concentração e distribuição irregular nas plantas, será necessário realizar ajustes metodológicos para reavaliar as amostras. Devido à proximidade genética entre bactérias e fitoplasmas, reações de amplificação inespecíficas podem ocorrer mesmo com a utilização dos oligonucleotídeos recomendados para a amplificação de fitoplasmas, conforme já relatado (de Souza et al. Plant Dis. 98:771-779. 2014). Portanto, deve-se ter prudência na interpretação dos resultados. A prevenção é um método de manejo viável desta doença, sendo importante implementar uma técnica de detecção confiável para a indexação das plantas.

Apoio financeiro: Embrapa-SEG, MP2, Projeto 02.13.14.012.00.03.005  
Registro SISGEN: A9463AC

<sup>1</sup>Graduanda em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, RS. Bolsista de Iniciação Tecnológica - PIBITI CNPq. E-mail: carolineeus@hotmail.com

<sup>2</sup>Embrapa Uva e Vinho, CP 130, CEP 95701-008, Bento Gonçalves, RS, E-mail: thor.fajardo@embrapa.br, osmar.nickel@embrapa.br

<sup>3</sup>Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia, Centro de Pesquisa de Sanidade Vegetal, Instituto Biológico, CEP 04014-002, São Paulo, SP. E-mail: eiras@biologico.sp.gov.br