

Detecção de patógenos associados a doenças de tronco da videira no Rio Grande do Sul por técnicas de PCR

Kelly Cordolino¹; João Caetano Fioravanço²; Fábio Rossi Cavalcanti²

As doenças de tronco representam um problema ao setor vitivinícola mundial, em decorrência dos prejuízos gerados pelo declínio e morte de plantas causados por fungos fitopatogênicos. Dentre elas, destacam-se o “chocolate” (*black goo*), a “doença de Petri”, “pé-preto” e as podridões descendentes, causadas por diversos fungos, como: *Phaeoacremonium* spp., *Phaeomoniella chlamydospora*, *Cylindrocarpon/Ilyonectria*, *Neofusicoccum parvum* e fungos da família Botryosphaeriaceae. Muitas vezes, os agentes causadores dessas podridões do tronco da videira estão presentes na mesma amostra de tecido vegetal, dificultando a identificação dos mesmos por metodologias de diagnose clássica. O objetivo deste trabalho foi ajustar e desenvolver métodos de PCR para detecção e identificação de fungos causadores dessas podridões, isolados de amostras infectadas em vinhedos comerciais no Rio Grande do Sul e em material vegetativo infectado. A partir da biomassa micelial, o DNA total do fungo foi extraído por meio do protocolo fenol:clorofórmio:isoamílico. O DNA total vegetal foi extraído por meio do protocolo CTAB em amostras de tecido caulinar infectado. Para detecção específica do DNA do patógeno por PCR foram utilizados os iniciadores específicos CylF/CylR Pch1/Pch2, Pmo1f/2r, Pal1N/Pal2, NPRCA/FAmNpB e BoitsA/BoitsB. O iniciador reverso FAmNpB foi desenhado para detectar isolados de *N. parvum* em conjunto com o iniciador NPRCA. A partir dos ajustes de PCR para esses iniciadores foi possível realizar a detecção simultânea dos fungos *N. parvum* e *P. chlamydospora* pela técnica de PCR duplex. Esses iniciadores também foram usados para detecção do DNA fúngico por Nested-PCR, a partir de sequências-molde da região ITS1/2 obtidas com iniciadores ITS5 e ITS4. Até o presente momento os iniciadores mostram-se específicos para os isolados fitopatogênicos obtidos no RS para uso na detecção específica em reação direta e na detecção por Nested-PCR com os pares de iniciadores CylF/CylR Pch1/Pch2, Pmo1f/2r e Pal1N/Pal2. A partir do ajuste dessa técnica de PCR foi possível realizar a detecção específica do fungo *P. chlamydospora* com o par Pmo1f/Pmo2r em DNA total vegetal. A detecção molecular de patógenos vêm se tornando uma importante estratégia para estudo e controle fitossanitário de materiais propagativos para implantação de novos vinhedos comerciais.

Palavras-chave: diagnose molecular, fungos fitopatogênicos, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Cylindrocarpon*, *Botryosphaeriaceae*, *Phaeoacremonium* spp.

Apoio Financeiro: SEG/Embrapa, CNPq.

¹ Graduanda do IFRS, Av. Osvaldo Aranha, 540, CEP 95700-000 Bento Gonçalves, RS. Bolsista do CNPq. E-mail: kellycordolino@gmail.com.

² Embrapa Uva e Vinho, CEP 95700-000 Bento Gonçalves, RS, Caixa Postal: 130. E-mails: joao.fioravanço@embrapa.br; fabio.cavalcanti@embrapa.br.