

Obtenção de produtos de PCR dos principais fungos causadores de doenças no cacauero visando estudos filogenéticos e taxonômicos

Santos, RMF¹; Lemos, LSL¹; Juca, FF¹; dos Santos, MVO³; Kruschewsky, MC¹; Ganem, RS³; Clement, D^{3,4}; Micheli, F^{2,4}; Gramacho, KP³

¹Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular

²Universidade Estadual de Santa Cruz

³CEPEC/CEPLAC

⁴CIRAD

rogeriomerceres@gmail.com

Palavras-chave: ITS, sequenciamento, *Phytophthora*, *Theobroma cacao*, *Ceratocystis*

Onde é cultivado, o cacauero (*Theobroma cacao* L.) é alvo de várias doenças de grande impacto econômico. Entre estas estão a vassoura-de-bruxa (*Moniliophthora perniciosa*), podridão-parda (*Phytophthora spp.*), monilíase (*Moniliophthora roreri*) e a murcha de *Ceratocystis* (*Ceratocystis cacaofunesta*). O conhecimento da biologia destes fitopatogenos é essencial para estabelecer um manejo eficiente das doenças. As limitações metodológicas para sequenciamento de genes de interesse têm sido a extração do DNA e a amplificação de regiões específicas com qualidade satisfatória, ou seja, que permitam o uso com sucesso dos produtos da amplificação em reações de sequenciamento e em métodos moleculares comparativos. Nesse sentido, nosso objetivo foi determinar as condições ótimas das reações de PCR para amplificação de regiões ribossomais, dentre outras, as quais vêm sendo usadas rotineiramente no FITOMOL no auxílio da taxonomia molecular e filogenia destes fitopatogenos. Isolados de quatro espécies de fungos em estudo (*M. perniciosa*, *Phytophthora spp.*, *M. roreri* e *Ceratocystis cacaofunesta*) tiveram seu DNA extraído segundo protocolos específicos para cada espécie. O DNA foi quantificado e determinado sua qualidade utilizando gel de agarose a 1%. A otimização das condições da PCR foi avaliada segundo dois aspectos: concentração final do DNA *template* na reação (10, 25 e 50 ng/ul) e concentração dos primers (4, 10 e 20 pmol/ul) em reações com volumes finais de 20 ul e 50 ul. Os resultados demonstram que as condições ótimas para amplificação das regiões em estudo é uma reação com volume final de 20 ul, 10 ng/ul de DNA *template* e concentração do *primer* a 4 pmol/ul. Os resultados mostram que uma menor concentração de DNA deve ser utilizada, o que é desejável levando em consideração as dificuldades de obtenção de micélio e extração do DNA em fungos, bem como uma economia em relação aos reagentes utilizados na PCR. Esta abordagem provou ser de sucesso para amplificação de regiões ribossomais utilizados na rotina de identificação e genotipagem de fungos no nosso laboratório. Apoio financeiro: Fapesb, CNPq e CEPLAC