

Anais da I Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental



Documentos 35

Anais da I Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

Levy de Carvalho Gomes
José Jackson Bacelar Nunes Xavier
Marcos Vinícius Bastos Garcia
Eduardo Lleras Pérez
Luadir Gasparotto
Adônis Moreira

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Amazônia Ocidental

Rodovia AM-010, km 29, Estrada Manaus/Itacoatiara

Caixa Postal 319

Fone: (92) 621-0300

Fax: (92) 3621-0320 / 3621-0317

www.cpa.embrapa.br

sac@cpaa.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: José Jackson Bacelar Nunes Xavier

Membros: Adauto Maurício Tavares

Cíntia Rodrigues de Souza

Edsandra Campos Chagas

Francisco Célio Maia Chaves

Gleise Maria Teles de Oliveira

José Clério Rezende Pereira

Maria Augusta Abtibol Brito

Maria Perpétua Beleza Pereira

Paula Cristina da Silva Ângelo

Raimundo Nonato Vieira da Cunha

Sebastião Eudes Lopes da Silva

Revisor de texto: Maria Perpétua Beleza Pereira

Normalização bibliográfica: Maria Augusta Abtibol Brito

Diagramação e arte: Gleise Maria Teles de Oliveira

Capa: Doralice Campos Castro

1ª edição

Todos os direitos reservados.

**A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).**

**Cip-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Amazônia Ocidental.**

Gomes, Levy de Carvalho et al.

Anais da I Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental / (editado por) Levy de Carvalho Gomes et al.

- Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2004.

137 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos; 35).

ISSN 1517-3135

1. Pesquisa. 2. Ciência. I. Título. II. Série.

CDD 501

Variabilidade genética de isolados de *Crinipellis pernicioso*

Thiago do Prado Sotero⁽¹⁾, Maria Geralda de Souza⁽²⁾, Paula Cristina da Silva Angelo⁽²⁾, Karina Priscilla de Araujo Bichara⁽²⁾ e Jeferson Chagas da Cruz⁽²⁾.

⁽¹⁾Bolsista CNPq/Pibic; ⁽²⁾Embrapa Amazônia Ocidental, Rodovia AM 010, km 29, Zona Rural, Caixa Postal 319, 69010-970. Manaus - AM. E-mail: geralda@cpaa.embrapa.br, paula@cpaa.embrapa.br.

Resumo - O fungo *Crinipellis pernicioso*, nativo da Região Amazônica, causa a vassoura-de-bruxa no cupuaçuzeiro, doença que vem limitando a expansão da cultura na região. Com o objetivo de averiguar a eficiência de marcadores moleculares RAPD na detecção da diversidade genética entre isolados de *C. pernicioso*, foi extraído DNA de micélios encontrados em frutos e ramos de cupuaçuzeiros mantidos na Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus (AM), e de micélios isolados de cacauzeiro fornecidos pela Universidade Federal de Lavras (MG). Foi também utilizado um isolado de *Colletotrichum guaranicola*. O DNA de cada isolado foi amplificado utilizando-se 8 "primers" decâmeros de seqüência arbitrária, que geraram 92 bandas, das quais 89 polimórficas com o número médio de 11,5 bandas RAPD por "primer". Os micélios de *C. pernicioso*, isolados de ramos e frutos de cupuaçuzeiro na Embrapa Amazônia Ocidental, apresentaram menor diversidade entre si (0,16667, 0,372555 e 0,36735) do que a que foi calculada entre estes e a mesma espécie do fungo, isolado do cacauzeiro proveniente da Universidade Federal de Lavras (0,50476, 0,54455 e 0,61446). O micélio de *Colletotrichum guaranicola*, inserido na análise como espécie *outside*, apresentou valores entre 0,67213 e 0,71053 para os índices de diversidade de Nei & Li (1979).

Termos para Indexação: cupuaçu, vassoura-de-bruxa, fitopatologia.

Genetic variability of isolated of *Crinipellis pernicioso*

Abstract - *Crinipellis pernicioso* a native fungus from Amazon region, causes witches' broom in cupuaçu trees. That disease has been limiting the development of that culture in the region. Aiming to inquire if RAPD marks would be capable to detect genetic diversity among the isolate of *Crinipellis pernicioso*; DNA was extracted from mycelium found in fruits and branches of cupuaçu maintained in Embrapa Amazônia Ocidental from isolate mycelium from cocoa provided from Federal University of Lavras. It was either used an isolate of *Colletotrichum guaranicola*. The DNA from each isolate was amplified, been used 8 arbitrary sequency "primers", that generated 92 bands, 89 been polymorfic with an average of 11,5 bands per "primer". Mycelim from *Crinipellis pernicioso* isolate from branches and fruits of cupuaçu trees in Embrapa Amazônia Ocidental presented less diversity among themselves (0,16667; 0,372555; and 0,36735) that what was calculated for these ones and the same specie of fungus, isolated from cocoa, from Federal University of Lavras (0,50476; 0,54455 and 0,61446). *Colletotrichum guaranicola*'s mycelium, inserted at the analyses as "outside" specie, presented values among 0,67213 e 0,71053 for tables of diversity by Sorenso/Nei & Li (1979).

Index terms: cupuaçu, witches' broom, phytopathology.

Introdução

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) é uma espécie nativa da Região Amazônica e é bem difundido na região. Graças ao sabor exótico de sua polpa, vem despertando interesse no restante do País e também em outros países, pois é possível se obter suco, creme, sorvete, geléia, torta, etc. Sendo, assim, uma delicadeza na culinária de cidades sul-americanas, onde a demanda ultrapassa o estoque. As amêndoas são utilizadas para a fabricação do cupulate (chocolate de cupuaçu). A colheita dos frutos ocorre nos meses chuvosos de janeiro a abril.

Apesar de ter caráter altamente rentável, o cupuaçuzeiro vem sofrendo sérios danos em plantios, pois a doença vassoura-de-bruxa, provocada pelo fungo *Crinipellis perniciososa*, vem causando perdas em torno de 50% a 60%, podendo chegar, em alguns casos, a 100%. Essa doença afeta órgãos da planta, como brotações, flores e frutos. Nas brotações ocorre sintoma de superbrotamento, característico da doença, e nos frutos há paralisação no crescimento e mumificação (Gasparotto et al., 1998, Lima & Souza, 1997), tendo aí um empecilho na expansão do cultivo e no seu avanço no mercado.

A vassoura-de-bruxa ocorre atualmente em países da América do Sul e Ilhas do Caribe, cujos propágulos infectivos são representados unicamente por basidiósporos (Evans, 1980).

A utilização de clones resistentes é uma das medidas mais eficientes no controle da doença. Nesse processo, o conhecimento da variabilidade genética do fungo representa um fator importante na seleção de materiais resistentes à doença. Para tal existem várias alternativas de caracteres marcadores, sendo que os bioquímicos e moleculares vêm sendo os mais utilizados como instrumentos auxiliares para estes estudos. O marcador molecular RAPD (polimorfismos de DNA amplificado ao acaso) está entre os mais utilizados em associações com estudos de identificação de raças e teste de patogenicidade, visando esclarecer alguns aspectos correlacionados ao patógeno e auxiliando no entendimento da sua evolução no meio ambiente (Otoya, Resrepo e Pastor-

Corales, 1995). Adicionalmente, os marcadores RAPD estão sendo utilizados no estudo da diferenciação e caracterização de raças fisiológicas (Vilarinhos et al., 1995; Alzate-Marin et al., Mesquita et al., 1998).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi obter DNA extraído de diferentes culturas polispóricas de *C. perniciososa* para averiguar a eficiência dos marcadores moleculares RAPD na detecção da diversidade genética entre isolados de *C. perniciososa*, obtidos de frutos e ramos de cupuaçuzeiros mantidos na Embrapa Amazônia Ocidental e de micélios isolados de cacauzeiro fornecidos pela Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

Material e Métodos

O experimento foi realizado nos laboratórios de Fitopatologia e Biologia Molecular/Biotecnologia Vegetal da Embrapa Amazônia Ocidental e financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - Fapeam.

Foram utilizados isolados provenientes do Estado do Amazonas, mais especificamente da Embrapa Amazônia Ocidental, dos quais o isolado 3 foi obtido a partir de isolamento direto do fruto do cupuaçu; o 11, de isolamento indireto do ramo; e o 13.º isolado, a partir do basidiósporo produzido em meio artificial em laboratório; o isolado "cpc" do cacauzeiro, fornecido pela Universidade Federal de Lavras, e, finalmente, o isolado do *Colletotrichum guaranicola*, usado para mostrar a funcionalidade dos primers, foi obtido de guaranzeiro em Maués/AM.

O meio de cultura líquido de Mills, Sreenivasaprasad e Bronn (1994) (Tabela 1), citado por Niella et al. 2000, foi utilizado para obtenção de micélio polispórico de *C. perniciososa*.

Com isso houve produção de material suficiente para extração de DNA, com o cuidado de não submergir o disco de micélio, para garantir o suprimento de oxigênio para seu desenvolvimento. As placas com micélio foram acomodadas em ambiente com temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante) e duração do fotoperíodo (12 horas) controlados, durante 30 dias.

Tabela 1. Meio de cultura líquido de Mills, Sreenivasaprasad e Bronn (1994).

Ingredientes	Quantidades necessárias para 1
Extrato de levedura	5 g
Glicose	10 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1 g
KCL	0,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
CuSO ₄ .7H ₂ O	1 ml(5% P/V)
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1 ml(5% P/V)

O micélio produzido foi macerado em diferentes almofarizes, sendo pesados 3 g de micélio de cada isolado, enquanto úmidos, submersos em nitrogênio líquido. Posteriormente, adicionaram-se 700 ul de tampão de extração a esta quantidade de micélio, após a maceração, (Tabela 2) - Doyle & Doyle (1987), modificado por Ferreira et al. (1998).

Tabela 2. Solução tampão de extração CTAB.

Ingredientes	Quantidades
2% CTAB	2 g
1,4 M NaCl	8,12 g
20 mM EDTA	4 ml de um estoque 0,5 m
100 mM Tris-HCl pH 8,0	10 ml de um estoque 1 m
1,0% polyvinylpyrrolidone	1g água q.s.p 100 ml
0,2% 2-mercaptoetanol	2 ul/ml de tampão
(adicionar antes do uso)	

O precipitado foi ressuspenso em 100 ul de tampão TE pH 8,0 (10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA), contendo 10 ug/ml de RNase e incubados a 37°C por 30 minutos para ingestão de RNA, quantificados por espectrofotometria e em seguida armazenado a 20°C.

Condições de PCR para geração de fragmentos RAPD: As reações de PCR foram preparadas com 0,1% de BSA, 2 mM de MgCl₂, 400 uM de dNTPs, 400 nM de "primer" decâmero, 1,5 U de Taq DNA polimerase e 10 ng de DNA, em 25 ul de volume final de reação. Foram utilizados 8 "primers" de seqüência: 5'-AAT CGG GCT G-3'; 5'-AGG GAA CGA G-3'; 5'-ACT TCG CCA C-3'; 5'-CTT CCG CAG T-3'; 5'-CCA GAT GCA C-3'; 5'-GGT TGT ACC C-3'; 5'-ACT TCG CCA C-3' e 5'-ACC CGA CCT G-3'. O termociclador foi ajustado para: pré-ciclo - 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de - 94 °C por

30 segundos; 33°C por 45 segundos; 72°C por 45 segundos e pós-ciclo - 72°C por 7 minutos. A eletroforese foi realizada a 120 V/250 mA, por 2 horas. Os padrões de RAPD foram registrados utilizando câmera digital Kodak e aplicativos do mesmo fornecedor.

O aplicativo GENES (Cruz, 2001) foi utilizado para o cálculo dos índices de diversidade de Nei e Li/Sorenson.

Resultados e Discussão

Para o estudo da diversidade genética dos isolados de *Crinipellis pernicioso* do cupuaçu, cacau e do *Colletotrichum guaranicola*, utilizaram-se 8 "primers" decâmeros de seqüência arbitrária, os quais geraram 92 bandas, sendo 89 polimórficas e 3 monomórficas, com o número médio de 11,5 marcadores por "primer" (Figura 1), o que está dentro do esperado, pois outros trabalhos realizados com mesma espécie de fungo apresentaram números semelhantes de bandas por "primer" (Niella, 2000).

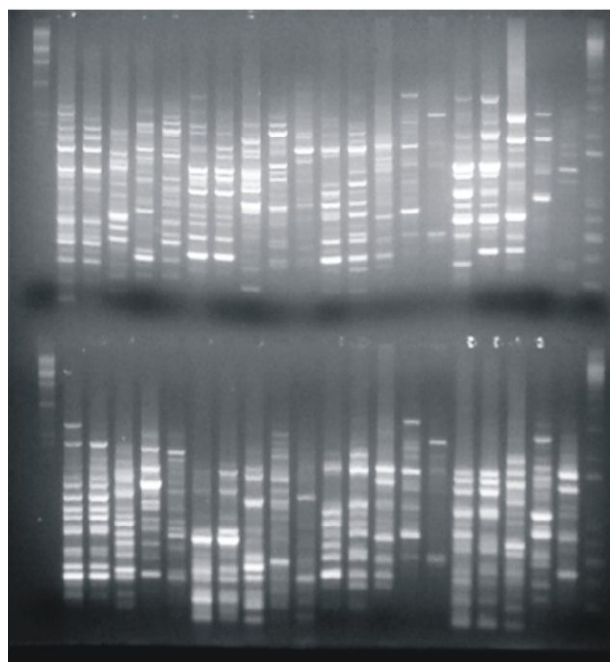


Figura 1. Padrões de RAPD gerados para fungos das espécies *Crinipellis pernicioso* e *Colletotrichum guaranicola*, em géis de agarose 1,5%. 1 a 5: primer 1; 6 a 10: primer 2; 11 a 15: primer 3; 16 a 20: primer 4; 21 a 25: primer 5; 26 a 30: primer 5; 31 a 35: primer 7; 36 a 40: primer 8. 1, 6, 11, 16, 21, 26, 31 e 36: micélio polispórico isolado do fruto do cupuaçuzeiro; 2, 7, 12, 17, 22, 27, 32 e 37: micélio polispórico isolado do ramo do cupuaçuzeiro; 3, 8, 13, 18, 23, 28, 33 e 38: micélio polispórico isolado do basidiocarpo do cupuaçuzeiro; 4, 9, 14, 19, 24, 29, 34 e 39: micélio polispórico isolado na Universidade de Lavras; 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40: micélio de *Colletotrichum guaranicola* (Embrapa Amazônia Ocidental Manaus/2004).

Esses resultados foram transformados em dados binários, tornando, assim, possíveis os cálculos dos índices de dissimilaridade genética entre os genótipos analisados (Tabela 3). O menor valor para índice de dissimilaridade - 0,16607 - foi encontrado entre micélios polispóricos de *Crinipellis perniciosa*, isolados de frutos e ramos de plantas de cupuaçuzeiro na Embrapa Amazônia Ocidental (1 e 2) (Tabela 3). Esses dois isolados divergem igualmente do micélio gerado em laboratório, pela germinação de esporos oriundos de basidiocarpos coletados na mesma área experimental. Entre esses três genótipos, o maior valor para índice de diversidade encontrado foi 0,37255 (genótipos 3) (Tabela 3).


Tabela 3. Índices de Dissimilaridade.

	1	2	3	4	5
2	0,1667				
3	0,37255	0,36735			
4	0,50476	0,54455	0,61446		
5	0,70000	0,71053	0,69966	0,67213	

1 - *Crinipellis* do fruto do cupuaçuzeiro(Embrapa Amazônia Ocidental); 2 - *Crinipellis* do ramo do cupuaçuzeiro(Embrapa Amazônia Ocidental); 3 - *Crinipellis* do ramo do cupuaçuzeiro(Embrapa Amazônia Ocidental), cultivado em laboratório; 4 - *Crinipellis* de Lavras; 5 - *Colletotrichum guaranicola*.

Há mais diversidade, com valores para os índices de dissimilaridade variando de 0,50476 a 0,61446, entre estes três genótipos e um isolado da mesma espécie -*C. perniciosa* - adquirido na fase micelial, na Universidade de Lavras, e cultivado na Embrapa Amazônia Ocidental (genótipos 4, Tabela 3). *Colletotrichum guaranicola* (genótipo 5 da Tabela 3), inserido na análise como espécie *outside*, para aferir o método de trabalho e servir como parâmetro da diversidade genética observada nos experimentos gerou, quando comparado com genótipos de *C. perniciosa*, índices de dissimilaridade com valores entre 0,67213 ate 0,71053.

Conclusão

 Genótipos de *C. perniciosa* - isolados da mesma área de coleta (Embrapa Amazônia Ocidental), apresentaram menor diversidade entre si do que quando comparados com um genótipo do mesmo fungo fornecido pela Universidade de Lavras.

Referências Bibliográficas

ALZATE-MARIN, A. L. et al. Análise da diversidade genética de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões do Brasil por marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 85-88, mar. 1997.

CRUZ, C. D. **Programa GENES**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2001. p. 163-81.

EVANS, H. C. Pleomorphism in *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. **Trasaction of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 74, n. 3, p. 515-523, jun. 1980.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares RPPD e RFLP em análises genéticas**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R.; VÉRAS, S. M. **Poda fitossanitária no controle da vassoura de bruxa**. Manaus: EMBRAPA-CPAA, 1998. 6 p. (EMBRAPA-CPAA. Comunicado Técnico, 12).

LIMA, M. I. P. M., SOUZA, A. G. C. **Diagnose das principais doenças do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*)** (Willd. Ex Spreng.) Shum.) e seu controle. Manaus: EMBRAPA-CPAA, 1998. 18 p. (EMBRAPA-CPAA. Documentos, 9).

NEI, M. L. I. W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms restriction endonucleases. **Proceeding Natland Academic Science, USA**, v. 76, p. 5269-5273, 1979.

NIELLA, G. R. et al. Aperfeiçoamento da metodologia de produção artificial de basidiocarpos de *Crinipellis perniciosa*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 523-527, dez. 2000.

OTOYA, M. M.; RESTREPO, S.; PASTOR-CORRALES, M. A. Amplificación al azar del ADN polimórfico para evaluar la diversidad genética de *Colletotrichum lindemuthianum* en Colombia. **Fitopatol. Colomb.**, v. 19, p. 7-14.

VILARINHOS, A. D. et al. Characterization of races *Colletotrichum lindemuthianum* by the random amplified polymorphic DNA technique. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.