

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Oriental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*



19º Seminário de
Iniciação Científica e
3º Seminário de Pós-graduação
da Embrapa Amazônia Oriental

ANNAIS 2015

19 a 20 de agosto

Embrapa Amazônia Oriental
Belém, PA
2015



DETECÇÃO MOLECULAR DE *Colletotrichum siamense* EM MUDAS DE PALMA DE ÓLEO

Ayane Fernanda Ferreira Quadros¹, Alessandra de Jesus Boari², Taise Pereira Carvalho³, Rui Alberto Gomes Junior⁴

¹ Graduanda do curso de Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia; Bolsista da Embrapa Amazônia Oriental, ayanefernanda@hotmail.com

² Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, alessandra.boari@embrapa.br

³ Graduanda do curso de Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia; Bolsista da Embrapa Amazônia Oriental, taise.carvalho@gmail.com

⁴ Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, rui.gomes@embrapa.br

Resumo: A palma de óleo é uma das culturas mais importantes no mundo, encontrando-se em franca expansão no estado do Pará. Muitos fungos têm sido encontrados causando doenças nesta cultura. Durante o monitoramento das plantas do Banco Ativo de Germoplasma de palma de óleo da Embrapa Amazônia Oriental, utilizado no programa de melhoramento, foi observada a presença de mudas com sintomas de necrose foliar onde se observou a presença de conídios característicos do gênero *Colletotrichum*. Assim, o trabalho teve como objetivo identificar a espécie do fungo por meio de PCR, seguido do sequenciamento multilocus do DNA. Para isso, tecidos de folhas das mudas de palma de óleo que apresentavam sintomas de doenças foram plaqueados em ágar-água. Posteriormente, o fungo foi repicado para meio BDA e mantido a temperatura ambiente. Após 10 dias alguns dias foi realizada a extração de DNA para a realização do PCR utilizando os primers ITS4/ITS5 e BT2A/BT2B. O produto do PCR foi sequenciado e avaliado nos programas Blast, ClustalW e Mega 5.2, onde verificou-se que o isolado pertence a espécie *Colletotrichum siamense*. Este foi o primeiro relato de *C. siamense* associado a antracnose foliar de palma de óleo no Brasil.

Palavras-chave: antracnose, *Elaeis guineenses*, filogenia

Introdução

A palma de óleo (*Elaeis guineenses* Jacq.) é originária da África, tendo sido introduzida no Brasil no século XVII. As primeiras implantações industriais ocorreram no início da década de 60 no estado da Bahia e, posteriormente, no Pará e Amazonas. Esta oleaginosa oferece um conjunto de vantagens sociais e ambientais para o estado (DROUVOT; DROUVOT, 2011).



No estado do Pará vários fungos foram isolados de palma entre eles: *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp., *Fusarium* sp., *Fusarium oxysporum* fs. *elaeidis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Thielaviopsis paradoxa*, *Curvularia* sp., *Trichoderma* sp., *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *L. theobromae*, *Thielaviopsis paradoxa* etc. (BOARI et al., 2012; SILVA, 1989).

Em mudas do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de palma de óleo da Embrapa Amazônia Oriental observou-se a presença de necroses foliares que apresentavam conídios característicos do gênero *Colletotrichum*.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo identificar a espécie fúngica associada à necrose foliar das mudas de palma de óleo do BAG da Embrapa Amazônia Oriental por meio do estudo da filogenia da sequência de DNA.

Material e Métodos

Amostras de mudas doentes de palma de óleo provenientes do BAG de palma de óleo localizado na Embrapa Amazônia Oriental, inicialmente foram analisadas com o auxílio do microscópio óptico no laboratório de Fitopatologia, e posteriormente foi realizado o isolamento fúngico.

Fez-se a assepsia dos tecidos doentes utilizando álcool 70% e hipoclorito, e estes foram plaqueados em meio ágar-água. Após dois dias de incubação, o fungo foi repicado para meio BDA (Batata Dextrose Agar) e as placas mantidas em temperatura ambiente.

Em seguida, foi feita a extração do DNA do isolado fúngico, utilizando o protocolo de Gibbs e Makenzie (1997). Para a realização do PCR utilizou-se os pares de primers ITS 4 e ITS 5 e BT2A e BT2B.

O produto do PCR foi avaliado em gel de Agarose 1,0% corado com GelRed. Posteriormente, foi realizada a limpeza do produto do PCR utilizando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega), seguida da quantificação de DNA. Os produtos do PCR das regiões ITS e BT foram sequenciados pela empresa Helixxa base for Life (Paulínia-SP). As sequências foram avaliadas utilizando os programas Blastn, ClustalW e MEGA 6.0.



Resultados e Discussão

Foram amplificados fragmentos de DNA de cerca de 450 pb para o par de primers ITS4/ITS5 e 400 pb para o par de primers BT1A/BT2B. Sequências obtidas a partir do isolado foram comparadas com acessos do gênero *Colletotrichum*, disponíveis no GenBank. Após a análise filogenética foi possível observar na árvore ao se utilizar o método Neighbor-Joining, através de uma análise de bootstrap feita com 2000 repetições, que o isolado formou um clado com os acessos da espécie *Colletotrichum siamense*.

No Brasil, este fungo foi relatado por Bragança (2013) causando doenças em fruteiras como abacateiro (*Persea americana*), goiabeira (*Psidium guajava*), pessegueiro (*Prunus persica*), mangueira (*Mangifera indica*), macieira (*Malus domestica*), videira (*Vitis sp.*) e cajueiro (*Anacardium occidentale*). Segundo o autor a espécie *C. siamense* está frequentemente associada com abacateiro no Brasil, e representa a espécie geneticamente mais variável e menos específica em relação ao hospedeiro nas plantas estudadas.

O fungo *Colletotrichum siamense* pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Ascomycetes, Ordem Phyllachorales, Família Glomerellaceae, Gênero *Glomerella* (*Colletotrichum*) (AGRIOS, 2004).

O isolado identificado foi depositado na coleção de fungos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental para testes posteriores. As sequências de nucleotídeos do isolado identificado foram depositadas no GenBank.

Conclusão

O fungo isolado de mudas de palma de óleo com antracnose é o *Colletotrichum siamense*.



Referências Bibliográficas

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. Flórida: ELSEVIER, 2004. 903 p.

BOARI, A. J.; TEIXEIRA, W. G.; VENTURIERI, A.; MARTORANO, L.; TREMACOLDI, C. R.; CARVALHO, K. B. Avanços nos estudos sobre o amarelecimento fatal da palma de óleo (*Elaeis guinnensis* Jacq.). **Tropical Plant pathology**, Brasília, DF, v. 37, ago. 2012. Suplemento. 1 CD-ROM. Edição dos Resumos do 45 Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Manaus, 2012.

BRAGANÇA, C. A. D. **Molecular characterization of Colletotrichum spp. associated with fruits in Brazil**. 2013. 69 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

DROUVOT, C. M.; DROUVOT, H. O Programa de Produção Sustentável do Dendê na Amazônia: a mobilização dos grupos de interesse no reflorestamento das áreas degradadas. In: CONGRESSO DO INSTITUTO FRANCO-BRASILEIRO DE ADMINISTRAÇÃO DE EMPRESAS, 6., Franca, 2011. **Anais...** São Paulo: Uni-FACEF, 2011.

GIBBS, A.; MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal of virology methods**, v. 63, p. 378-392, 1997.

SILVA, H. M. **Relatório de avaliação dos trabalhos com amarelecimento fatal**. Belém, PA: [s. n.], 1989. 5 p.