

*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



DIVERSIDADE GENÉTICA DE FUNGOS DA FAMÍLIA *Amphisphaeriaceae* NA PALMA DE ÓLEO

Ayane Fernanda Ferreira Quadros¹, Alessandra de Jesus Boari², Taise Pereira Carvalho³,
Clenilda Tolentino Bento da Silva⁴

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

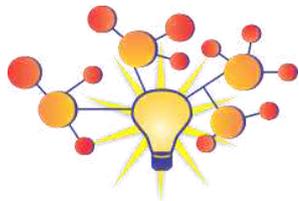
⁴ Técnica da Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, clenilda.tolentino@embrapa.br

Resumo: No mundo, a palma de óleo é uma das culturas de maior importância econômica. Entretanto, muitos fungos têm sido encontrados causando ou não doenças nesta cultura. Durante as inspeções nos plantios de palma de óleos com Amarelecimento Fatal, com suspeitas de Marchitez Letal e do programa de melhoramento da palma de óleo, observou-se lesões características do gênero *Pestalotiopsis*. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo estudar a diversidade dos nove isolados obtidos por filogenia analisando as sequências da região ITS do DNA. Para isso, tecidos de folhas das plantas de palma de óleo que apresentavam sintomas de necrose foram plaqueados em ágar-água. Posteriormente, os fungos foram repicados para meio BDA e mantidos a temperatura ambiente. A partir de colônias típicas de *Pestalotiopsis* foi realizada a extração de DNA de nove isolados para a realização do PCR utilizando o par de primers ITS4 e ITS5. Os produtos dos PCR foram sequenciados e avaliados nos programas Blast, ClustalW e Mega 6.0, onde verificou-se que dos nove isolados estudados há no mínimo 4 espécies diferentes distribuídos entre os gêneros *Neopestalotiopsis*, *Pseudopestalotiopsis* e *Pestalotiopsis*.

Palavras-chave: *Elaeis guineensis*, *Neopestalotiopsis*, *Pestalotiopsis*, *Pseudopestalotiopsis*

Introdução

A palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma palmeira originária da África Ocidental, mais precisamente da região do Golfo da Guiné. Esta cultura chegou ao Brasil, no período colonial



inicialmente no Estado da Bahia, no fim do século XVI. Posteriormente, esta espécie foi introduzida na região amazônica, onde detém atualmente as maiores áreas cultivadas (VENTURIERI et al., 2009).

No Brasil vários fungos foram isolados da palma de óleo, entre eles: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Thielaviopsis paradoxa*, *Curvularia eragrostidis*, *Pestalotiopsis* sp., *Pestalotiopsis theae*, *Pseudallescheria boydii*, *P. boydii*, *Trichoderma* sp., *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Microsphaera olivacea*, *Pythium* sp., *Chaetomium* sp., *Microsphaera olivacea*, *Fusarium* sp., *Fusarium solani*, *F. oxysporum* f.sp. *elaeidis*, *Curvularia pallescens*, *Fusarium oxysporum*, *Graphium* sp., *Dacrylaria* sp., *Mucor racemosus*, *Mycelia sterilia*, *Curvularia hamata*, *Phytophthora* sp., *Thielaviopsis paradoxa*, *Phoma* sp., *Colletotrichum* sp., *Phomopsis* sp., *Gloeosporium* sp., *Bipolaris* sp. e *Meliola melanococcae* (BOARI et al., 2012; SILVA, 1989).

O gênero *Pestalotiopsis* é cosmopolita e já foi relatado em muitos estados brasileiros, porém as publicações nacionais que tratam deste gênero encontram-se muito dispersas. Representantes do gênero podem ser encontrados como sapróbios, fitopatogênicos e endofíticos. Os esporos (conídios) de *Pestalotiopsis* são de fácil disseminação, e penetram nos tecidos vegetais por ferimentos ou aberturas naturais, infectando os mais diversos hospedeiros vegetais (KARAKAYA, 2001).

Durante as inspeções nos plantios de palma de óleos com Amarelecimento Fatal, com suspeitas de Marchitez Letal e do programa de melhoramento da palma de óleo, observou-se lesões características de *Pestalotiopsis*. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo estudar a diversidade dos nove isolados obtidos por filogenia analisando as sequências da região ITS do DNA.

Material e Métodos

Amostras de plantas de palma de óleo com e sem sintoma de necrose nas folhas que apresentavam conídios semelhantes aos do gênero *Pestalotiopsis* e de estipe aparentemente saudáveis, foram coletados nos municípios de Moju-PA e Santa Bárbara-PA, para análise e identificação do fungo. Posteriormente foram levadas para o laboratório de Fitopatologia, onde foi realizado o isolamento para posterior identificação molecular.

Tecidos de folhas doentes foram esterilizados com álcool 70% e hipoclorito, plaqueados em ágar-água e, posteriormente, repicados para meio BDA (Batata Dextrose Agar). As placas foram mantidas em temperatura ambiente para o desenvolvimento da colônia fúngica.



Foi realizada a extração de DNA dos isolados fúngicos, utilizando o protocolo de Gibbs e Makenzie (1997). Para a realização do PCR utilizou-se os primers ITS 4 e ITS 5 para a amplificação da região ITS.

O produto do PCR foi avaliado em gel de Agarose 1,0% e 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 foram sequenciados pela empresa Helixxa base for Life. As sequências foram comparadas com as dos acessos disponíveis no GenBank utilizando-se os programas Blastn, ClustalW e MEGA 6.0.

Resultados e Discussão

Através da eletroforese observou a amplificação de fragmentos de DNA de cerca de 650 pb quando se utilizou o par de primers ITS4 e ITS5. Os isolados sequenciados foram comparados com acessos da família Amphisphaeriaceae, disponíveis no GenBank.

Após a análise filogenética gerada pelo método Neighbor-Joining, através de uma análise de bootstrap feita com 2000 repetições, observou-se que os isolados foram identificados como pertencentes aos gêneros *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiosis*. Por meio da análise da região ITS foi possível a verificar o agrupamento dos isolados com as espécies *Neopestalotiopsis ellipsospora*, *Pestalotiopsis arengae*, *Pseudopestalotiopsis cocos* e *Ps. indica*. Além de ter observado um clado de uma possível nova espécie. Para confirmação das espécies outras regiões do DNA estão sendo sequenciadas.

No Brasil foram isoladas 12 espécies diferentes do gênero *Pestalotiopsis*, são elas: *Pestalotiopsis* cf. *bicolor*, *P. carveri*, *P. clavispora*, *P. maltidae*, *P. mangiferae*, *P. mangifolia*, *P. microspora*, *P. neglecta*, *P. paeoniae*, *P. palmarum*, *P. suffocata* e *P. virgulata*. Na região Nordeste existem 99 relatos de *Pestalotiopsis*, no Sudeste 78, no Centro Oeste 26, e as regiões de Norte e Sul, com 15 e 7 respectivamente (KRUSCHEWSKY, 2010).

Nos plantios de palma de óleo é comum observar a presença de mancha de *Pestalotiopsis* em folhas velhas e feridas, e de plantas estressadas pelo déficit hídrico ou com deficiência nutricional. As manchas de *Pestalotiopsis* ocorrem principalmente folhas mais velhas feridas por insetos ou equipamentos agrícolas, como os tratores acoplados com adubadoras e carretas. Por isso, são



considerados patógenos fracos, pois necessitam de ferimentos para infectar. Além disso, a presença de fungos endolíticos da família Amphisphaeriaceae parece ser comum em palmas de óleo (BOARI et al., 2012).

Os isolados identificados foram depositados na coleção de fungos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazonia Oriental para testes posteriores.

Conclusão

Os fungos isolados de tecidos com e sem necroses na palma de óleo pertencem aos gêneros *Neopestalotiopsis*, *Pseudopestalotiopsis* e *Pestalotiopsis*, da família Amphisphaeriaceae.

Referências Bibliográficas

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.

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.

KARAKAYA, A. First Report of Infection of Kiwifruit by *Pestalotiopsis* sp. in Turkey. **Plant Disease**, v. 85, n. 9, p.1028, 2001.

KRUSCHEWSKY, M. C. **Taxonomia e ecologia do gênero *Pestalotiopsis* no Brasil, com ênfase para a mata atlântica do sul da Bahia**. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus.

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

VENTURIERI, A.; FERNANDES, W. R.; BOARI, A. J.; VASCONCELOS, M. A. Relação entre ocorrência do amarelecimento fatal do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) e variáveis ambientais no Estado do Pará. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 14., 2009, Natal. **Anais...** São José dos Campos: INPE, 2009. p. 523-530.