



20º Seminário de
Iniciação Científica e
4º Seminário de Pós-graduação
da Embrapa Amazônia Oriental

ANNAIS 2016

21 a 23 de setembro

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



20º Seminário de
Iniciação Científica e
4º Seminário de Pós-graduação
da Embrapa Amazônia Oriental

ANNAIS 2016

21 a 23 de setembro

Embrapa Amazônia Oriental
Belém, PA
2016



FUNGOS ASSOCIADOS AO ESCURECIMENTO DA MADEIRA EM PARICÁ

Renata de Almeida Palheta¹, Alessandra de Jesus Boari²; Ayane Fernanda Ferreira Quadros³; Izabel Cristina Alves Batista⁴; Alcir Tadeu Oliveira Brandão⁵

¹ Graduanda do curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal Rural da Amazônia; Bolsista da Embrapa Amazônia Oriental. E-mail: renataa195@gmail.com.

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

³ Graduanda do curso de Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia; Bolsista da Embrapa Amazônia Oriental. E-mail: ayanefernanda@hotmail.com.

⁴ Graduanda do curso de Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia; Bolsista da Embrapa Amazônia Oriental. E-mail: izabel.alvs@hotmail.com.

⁵ Professor do curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal Rural da Amazônia; E-mail: alcir.brandao@ufra.edu.br

Resumo: O paricá (*Schizolobium parahyba var. amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby) é uma espécie de potencial madeireiro e alternativa para reflorestamento de recuperação de áreas degradadas. Sua ocorrência é restrita à Bacia Amazônica, no Brasil, Bolívia e Venezuela. No Brasil, ocorre em mata primária e secundária de terra-firme e várzea alta. Muitos fungos têm sido relatados causando doenças nesta cultura. Em amostras de madeira provenientes de plantios do município de Vigia-PA observou-se a presença de manchas escurecidas associadas à fungos. Assim, o trabalho teve como objetivo identificar os fungos associados ao escurecimento da madeira de paricá por meio de PCR, seguido do sequenciamento do DNA. Para isso, amostras de tecido doente de paricá foram plaqueados em ágar-água. Posteriormente, os fungos foram repicados para meio BDA e mantidos a temperatura ambiente. Foi realizada a extração de DNA para a realização do PCR utilizando os primers ITS4 e ITS5 e posteriormente o sequenciamento nucleotídico. Os produtos do PCR foram avaliados utilizando o programa Blastn, onde foi permitido apenas a identificação dos gêneros dos fungos *Lasiodiplodia* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp. e *Rhizoctonia* sp. Outros dois fungos não foram identificados.

Palavras-chave: *Schizolobium parahyba var. amazonicum*, ITS, identificação.



Introdução

O paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby) é uma árvore caducifólia da família Fabaceae de potencial madeireiro na Região Amazônica, sendo uma espécie alternativa para reflorestamento de recuperação de áreas degradadas. Tem sua ocorrência restrita à Bacia Amazônica, no Brasil, Bolívia e Venezuela. No Brasil, ocorre em mata primária e secundária de terra-firme e várzea alta. Tem como característica rápido crescimento e pode alcançar 20 a 30 m de altura e diâmetro de até 1,2 m (ROSSI et al., 2001). Sua madeira é utilizada na fabricação de compensados, celulose e laminados.

Trindade et al. (1999) relataram a primeira ocorrência do fungo *Phyllachora schizolobiicola* ssp. *schizolobiicola*, que causa lesões nos folíolos produzidas por um tipo de crosta de cor escura, com diâmetro variando de 1 a 2 mm. Tremacoldi et al. (2009) em um estudo feito com os fungos *Lasiodiplodia theobromae* e *Pestalotiopsis* sp. associados a outros fungos como *Fusarium oxysporum*, *Alternaria* sp. e *Basidiomycetes*, verificaram que *L. theobromae* provocou cancro.

Em 2015, a clínica de fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental recebeu amostras de madeira de paricá com manchas escurecidas provenientes plantios do município de Vigia-PA. Deste modo, este trabalho teve como objetivo identificar os fungos associados ao escurecimento da madeira de paricá por meio de PCR, seguido do sequenciamento do DNA.

Material e Métodos

Inicialmente foi realizado o isolamento de fungos de amostras de madeira de paricá escurecida. Para isso, foi realizada a assepsia dos tecidos doentes utilizando álcool 70% e hipoclorito à 20%, seguido do seu plaquamento em meio ágar-água. Após dois dias de incubação, os fungos foram repicados para meio BDA (Batata Dextrose Agar) e as placas mantidas em temperatura ambiente.

Dez dias após o isolamento, foram feitas as extrações do DNA de 6 isolados fúngicos utilizando o protocolo de Gibbs e Makenzie (1997). Para a realização do PCR utilizou-se os pares de *primers* ITS4 e ITS5 (WHITE et al., 1990). Para isso, foram utilizados 2µl do DNA, 5µL do tampão de reação 5X, 3 µL



de $MgCl_2$ (25 mM), 0,5 μ L de dNTP (10mM), 0,15 μ L da Taq DNA Polimerase, 0,25 μ L dos *primers* (ITS4 e ITS5) e 13,85 μ L de água ultra-pura. O ciclo utilizado para o par de *primers* consistiu de desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguida de 40 ciclos a 94 °C por 30 s, 52 °C por 30 s e 72 °C por 30 s, com uma extensão final de 5 min a 72 °C.

Os produtos do PCR foram avaliados em gel de agarose à 1,0% corado com GelRed. Posteriormente, foi realizada a limpeza dos produtos do PCR utilizando o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System* (Promega), seguida da quantificação de DNA. Os produtos do PCR da região ITS foram sequenciados pela empresa Myleus Biotecnologia (Belo Horizonte – MG). As sequências foram avaliadas utilizando o programa Blastn.

Resultados e Discussão

A partir dos isolados fúngicos foram amplificados fragmentos de DNA de cerca de 450 pb utilizando o par de *primers* ITS4 e ITS5. As sequências obtidas a partir dos isolados permitiram apenas a identificação dos gêneros de fungos associados às amostras de madeira de paricá apresentando escurecimento. Outras regiões do DNA estão sendo sequenciadas para permitir a identificação das espécies fúngicas de acordo com o gênero identificado. A partir da avaliação das sequências obtidas no programa Blastn foi possível a identificação de 4 isolados fúngicos, os mesmos pertenciam aos gêneros *Lasiodiplodia* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp. e *Rhizoctonias* sp. Não foi possível a identificação do gênero de dois isolados via seqüenciamento da região ITS. Serão sequenciadas e analisadas outras regiões do DNA dos isolados fúngicos para identificação das suas espécies.

Conclusões

As amostras da madeira de paricá provenientes de plantios do município de Vigia-PA permitiram apenas a identificação dos gêneros dos fungos *Lasiodiplodia* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp. e *Rhizoctonia* sp. Outros dois fungos não foram identificados.



Referências Bibliográficas

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, n. 1/2, p. 378-392, Jan. 1997.

ROSSI, L.; QUISEN, R.; AZEVEDO, C.; VIEIRA, A. Aspectos silviculturais e socioeconômicos de uma espécie de uso múltiplo: o caso de *Schizolobium amazonicum* (Hub.) Ducke. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL, 8., 2000, Nova Prata. **Anais...** Nova Prata: Prefeitura Municipal de Nova Prata : UFSM, 2000. p. 271-279.

TREMACOLDI, C. R.; LUNZ, A. M.; COSTA, F. R. de S. Cancro em Paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum*) no Estado do Pará. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 59, p. 69-73, jul./dez. 2009.

TRINDADE, D. R.; POLTRONIERI, L. S.; ALBUQUERQUE, F. C. de; POLTRONIERI, M. C.; BENCHIMOL, R. L. **Crosta negra causada por *Phyllachora schizolobiicola* subsp. *schizolobiicola* em paricá, no estado do Pará**. Belém, PA: EMBRAPA-CPATU, 1999. 2 p. (EMBRAPA-CPATU. Comunicado técnico, 98).

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplication and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, Y. J. (Ed.). **PCR Protocols: a guide to methods and application**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.