



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



IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Macrophomina phaseolina* EM FEIJÃO-DE-METRO

Izabel Cristina Alves Batista¹, Alessandra de Jesus Boari², Ayane Fernanda Ferreira Quadros³

¹ Bolsista Embrapa Amazônia Oriental, Universidade Federal Rural da Amazônia, izabel.alvs@hotmail.com

² Pesquisadora Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, ajboari@gmail.com

³ Bolsista Embrapa Amazônia Oriental, Universidade Federal Rural da Amazônia, ayanefernanda@hotmail.com

Resumo: O feijão-de-metro pertencente à família Fabaceae, é uma hortaliça bastante cultivada no Estado do Pará. Segundo a literatura, várias doenças podem comprometer a sua produtividade, entre elas as causadas por fungos. Em cultivo de feijão-de-metro localizado na área experimental da Embrapa, observou-se podridão mole das vagens. O objetivo deste trabalho foi identificar o fungo associado à podridão da vagem de feijão-de-metro. Para isso, realizou-se o isolamento do fungo da vagem em ágar-água e BDA, e posteriormente a identificação por meio do PCR e sequenciamento de DNA utilizando-se primers da região ITS. A sequência de DNA foi avaliada utilizando os programas Blastn, ClustalW e MEGA 7.0. Através do estudo filogenético da sequência, o isolado foi identificado como sendo *Macrophomina phaseolina*. Este é o primeiro relato de *Macrophomina phaseolina* associado à hortaliça feijão-de-metro no Estado do Pará.

Palavras-chave: cultigrupo *sesquipedalis*, hortaliça, PCR, podridão mole

Introdução

O feijão-de-metro (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. ssp. *unguiculata* Verdc. cultigrupo *sesquipedalis* Westphal) é uma hortaliça bastante cultivada nas regiões Norte e Nordeste e explorada principalmente pela agricultura familiar (FEITOSA et al., 2015).

A produção de feijão-de-metro se destaca principalmente pelo aspecto do fruto, sendo utilizado em substituição ao feijão-vagem e obtendo um importante papel na complementação da renda e diversificação de cultivos (FEITOSA et al., 2015).



A instabilidade na produção na região Norte, resulta da variação dos elementos climáticos. O excesso de chuva e altas temperaturas podem favorecer a ocorrência de doenças. No Estado do Amazonas já foram relatados fungos que causam doença em feijão-de-metro, entre eles o *Pythium* spp., *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia* spp. e *Cercospora* spp. (CARDOSO; BARRETO, 1997).

Em um cultivo de feijão-de-metro localizado na área experimental da Embrapa Amazônia Oriental, observou-se podridão mole nas vagens, provocada por fungos. No Estado do Pará, são escassas as informações sobre doenças fúngicas infectando feijão-de-metro. O objetivo deste trabalho foi identificar o fungo associado à vagem de feijão-de-metro com podridão coletada na área experimental da Embrapa Amazônia Oriental localizada em Belém-PA.

Material e Métodos

Durante o mês de junho de 2015, em plantio localizado na área experimental da Embrapa Amazônia Oriental foram observadas vagens de feijão-de-metro com sintomas de podridão e bolor suspeitos de serem causados por fungo. Amostras foram coletadas e analisadas no laboratório. As mesmas passaram por um processo de limpeza e desinfestação superficial com álcool a 70% e hipoclorito de sódio a 2%, para eliminação de possíveis microrganismos saprófitos.

Após a limpeza do material em condições assépticas, tecidos com sintomas da doença foram plaqueados em meio ágar-água para isolamento do fungo. As colônias fúngicas obtidas a partir do isolamento foram repicadas posteriormente em meio BDA (Batata Dextrose Ágar) em placas de Petri e mantidas em BOD a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Foi realizada a extração de ácidos nucleicos a partir da colônia fúngica utilizando o protocolo de Gibbs e Makenzie (1997). A reação de PCR para amplificação da região ITS do DNA foi realizada para um volume final de 50µL, onde foram adicionados 2µL do produto de extração de DNA, 0,5µL de cada primer (ITS 4 e ITS 5), 0,3µL de Taq, 1µL de dNTP, 10µL de tampão 5X, 6µL de MgCl₂ e água ultra-pura para completar o volume.



A amplificação do DNA foi conduzida em termociclador (Mastercycler Gradient - Eppendorf) consistindo em desnaturação inicial de 92°C/5 minutos, seguido de 30 ciclos de 92°C/60 segundos, 54°C/60 segundos e 72°C/90 segundos e finalizando com 72°C/10 minutos. O produto da reação PCR foi visualizado através eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com GelRed, utilizando o marcador 1kb Ladder (Invitrogen). Os fragmentos de PCR do tamanho esperado foram purificados utilizando o Kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), quantificados e enviados para a realização do sequenciamento pela empresa Myleus Biotecnologia. A sequência de DNA obtida do isolado foi comparada com acessos disponíveis no *GenBank* utilizando os programas Blastn, Clustalw e Mega 7.0.

Resultados e Discussão

Foi isolado um fungo a partir da vagem de feijão-de-metro, cuja colônia apresentou coloração cinza escura (Figura 1A). Ao microscópio óptico pode-se observar micélio e microescleródios de *M. phaseolina* escuros e de forma irregular ou oblongo (Figura 1B).

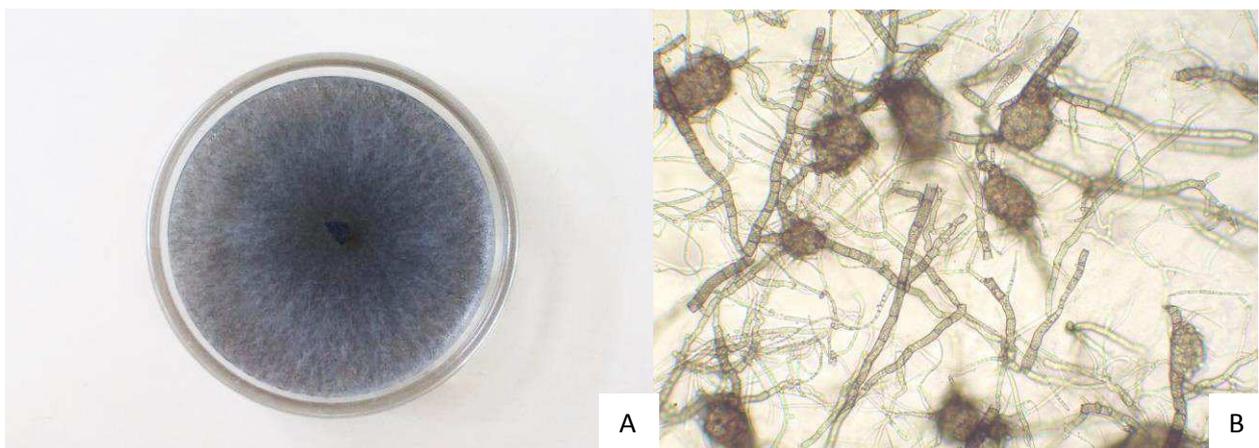


Figura 1. A. Colônia de *Macrophomina phaseolina* em meio de cultura BDA B. Micélio e microescleródios de *M. phaseolina*. Fotos: Izabel C. A. Batista.

Após comparação com as sequências depositadas no banco de dados do NCBI (Figura 2), verificou-se que o isolado da vagem de feijão-de-metro é de *Macrophomina phaseolina*.

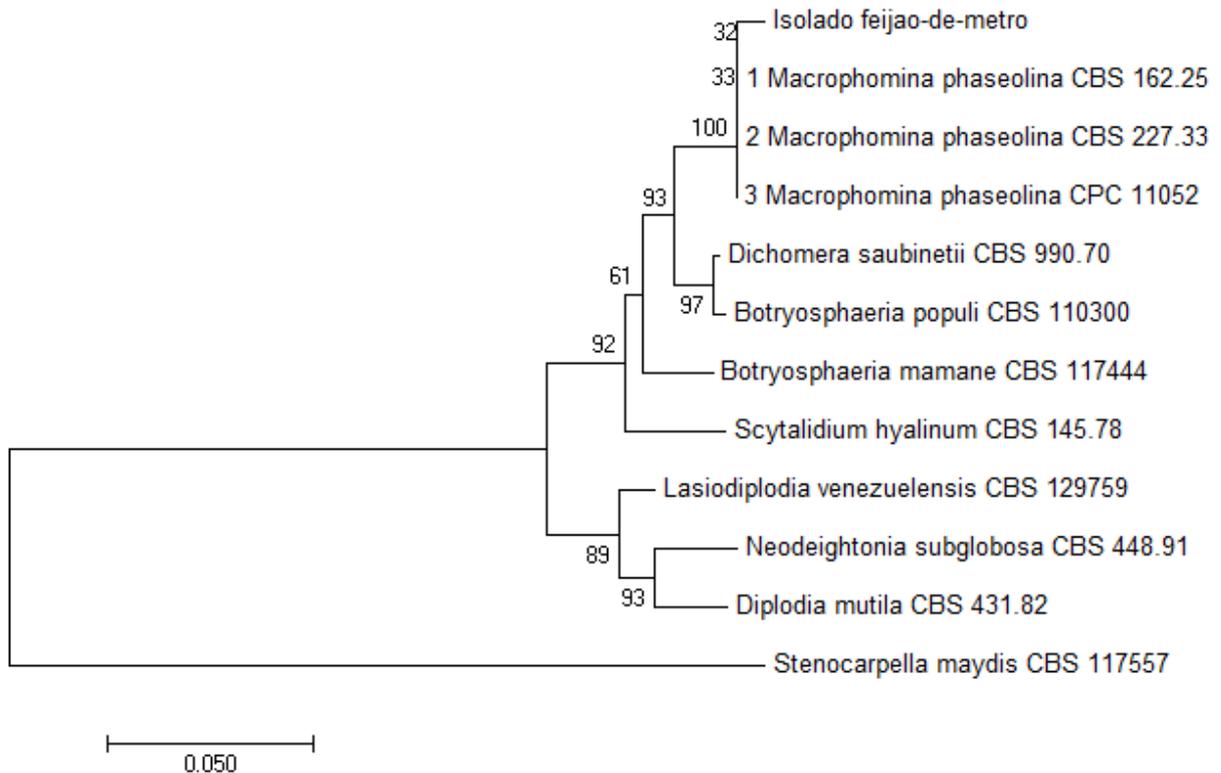


Figura 2. Árvore filogenética utilizando *neighbour-joining* construída baseada no alinhamento das sequências de nucleotídeos da região ITS. A árvore foi gerada utilizando o software MEGA 7, *bootstrap* de 2000 repetições.

Macrophomina phaseolina é a única espécie de fungo do gênero *Macrophomina*. Este fungo pertence ao filo Ascomycota, família Botryosphaeriaceae (NDIAYE, 2007).

No Brasil, o *Macrophomina phaseolina* é um importante fitopatógeno habitante do solo, altamente polífago, capaz de causar problemas sérios em diversas culturas como algodão, fumo, grão-de-bico, mamão, quiabo, sorgo feijão-comum, gergelim, milho, soja, feijão-caupi, entre outras, possuindo ampla distribuição geográfica (KIMATI et al., 2005).

No estado do Pará o fungo *Macrophomina phaseolina* foi relatado infectando plantas de feijão-caupi no final do ciclo da cultura, coincidindo com o período mais seco e comprometendo a qualidade das sementes (POLTRONIERI et al., 1994). Este é o primeiro relato de *Macrophomina phaseolina* associado ao feijão-de-metro no estado do Pará.



Conclusões

O fungo isolado da vagem de feijão-de-metro com podridão é o *Macrophomina phaseolina*.

Referências Bibliográficas

CARDOSO, M. O.; BARRETO, J. F. Feijão-de-metro: (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. ssp. *unguiculata* cv. gr. *sesquipedalis* E. Westphal. In: CARDOSO, M. O. (Coord.). **Hortaliças não-convencionais da Amazônia**. Brasília, DF: Embrapa-SPI; Manaus: Embrapa-CPAA, 1997. p. 21-29.

FEITOSA, F. R. C.; GARITA, S. A.; ARAÚJO, R. B. **Feijão-de-metro é uma hortaliça-leguminosa indicada para climas quentes**. Fortaleza: Revista Campos e Negócios. Universidade Federal do Ceará, 2015. Disponível em: <<http://www.revistacampoenegocios.com.br>> Acesso em: 29 jul. 2016.

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.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; RESENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, 663 p.

NDIAYE, M. **Ecology and management of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) on cowpea in the Sahel**. 2007. 114 f. Thesis (PhD) – University of the Netherlands, Wageningen.

POLTRONIERI, L. S.; TRINDADE, D. R.; SILVA, J. F. de A. F. da. **Principais doenças do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) no Pará e recomendações de controle**. Belém, PA: EMBRAPA CPATU, 1994. 24 p. (EMBRAPA-CPATU. Documentos, 75).