

Diversidade Microbiana da Amazônia

Vol. 3

ORGANIZADORES

LUIZ ANTONIO DE OLIVEIRA, JULIANA GOMES DE SOUZA OLIVEIRA,
LUADIR GASPAROTTO, MARIA APARECIDA DE JESUS, LILIANE COELHO DA ROCHA,
JANIA LILIA DA SILVA BENTES, LARISSA DE SOUZA KIRSCH, SUANNI LEMOS DE ANDRADE



PRESIDENTE DA REPÚBLICA
Jair Messias Bolsonaro

MINISTRO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
Marcos César Pontes

DIRETORA DO INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
Antonia Maria Ramos Franco Pereira

Diversidade Microbiana da Amazônia

Vol. 3

ORGANIZADORES

LUIZ ANTONIO DE OLIVEIRA, JULIANA GOMES DE SOUZA OLIVEIRA,
LUADIR GASPAROTTO, MARIA APARECIDA DE JESUS, LILIANE COELHO DA ROCHA,
JANIA LILIA DA SILVA BENTES, LARISSA DE SOUZA KIRSCH, SUANNI LEMOS DE ANDRADE



Manaus
2019

Copyright © 2019, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Capa

Tito Fernandes e Rodrigo Verçosa

Projeto gráfico e editoração eletrônica

Rodrigo Verçosa

EDITORA INPA

Editor-chefe

Mario Cohn-Haft.

Produção editorial

Rodrigo Verçosa, Shirley Ribeiro Cavalcante, Tito Fernandes

FICHA CATALOGRÁFICA

D618 Diversidade microbiana da Amazônia / Organizador Luiz Antonio de Oliveira... [et.al].--

Manaus: Editora INPA, 2019.

35 mb, v. 3: il. color.

ISBN 978-65-5633-000-6

1. Microbiologia - Amazônia. 2. Diversidade. I. Oliveira, L. A.

CDD 576.9811



Editora do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Av. André Araújo, 2936, Petrópolis

Cep : 69067-375 Manaus – AM, Brasil

Tel : 55 (92) 3643-3223

www.inpa.gov.br e-mail: editora@inpa.gov.br

Isolamento e caracterização do agente causal da mancha zonada em *Rollinia mucosa*

Aricléia de Moraes Catarino^{1,2*}, Cláudia Afras de Queiroz^{2,3}, Thiago Fernandes Sousa^{2,4}, Luadir Gasparotto², Rogério Eiji Hanada¹, Gilvan Ferreira da Silva^{2*}

¹ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

² Embrapa Amazônia Ocidental

³ Universidade Federal do Amazonas

⁴ Universidade do Estado do Amazonas

*Emails: amoraescatarino@gmail.com, gilvan.silva@embrapa.br

Resumo

A Amazônia possui inúmeras espécies frutíferas, dentre as quais se destaca o biribazeiro (*Rollinia mucosa*), pertencente à família das Anonáceas. A mancha zonada, causada por *Sclerotium coffeicola*, é uma doença comum na região Norte e a mais importante para a gravioleira (*Annona muricata*), também pertencente a essa família. O objetivo desse trabalho foi avaliar as características morfológicas e moleculares de *S. coffeicola* infectando plantas de biribazeiro no município de Manaus-AM. A partir de folhas com sintomas típicos de mancha zonada foi realizado o isolamento direto do patógeno, através da transferência de propágulos vegetativos presentes sobre as lesões. A caracterização morfológica foi realizada com base nas características da colônia e dos escleródios. Para a análise molecular, utilizou-se a região LSU domínios D1/D2 da subunidade 28S do rDNA e o teste de patogenicidade, em folhas sadias de ramos destacados de biribazeiro, foi realizado colocando-se os escleródios diretamente sobre a face adaxial das folhas com e sem prévio ferimento. O fungo apresentou micélio branco, ramificado e crescimento rápido. Sobre a superfície das colônias observou-se a formação de escleródios globosos, isolados e agrupados, de coloração inicial branca e posteriormente alaranjada. A análise filogenética da região LSU identificou com alto suporte de bootstrap, o isolado BIR 010 como sendo *S. coffeicola*. No teste de patogenicidade foi possível observar os primeiros sintomas característicos de mancha zonada quatro dias após a inoculação. As análises morfológicas, a caracterização molecular e o teste de patogenicidade confirmaram que a mancha foliar observada em biribazeiro é causada por *S. coffeicola*.

Palavras-chave: Anonaceae, biribazeiro, *Sclerotium coffeicola*.

Introdução

A família das anonáceas é composta por cerca de 40 gêneros e de mais de 2.000 espécies, porém as comestíveis estão distribuídas nos gêneros *Annona*, *Rollinia*, *Duguetia*, *Uvaria* e *Asimira*, e apenas os dois primeiros apresentam espécies de importância econômica (Nogueira *et al.*, 2005). A Amazônia possui inúmeras espécies frutíferas, dentre as quais se destaca o biribazeiro (*Rollinia mucosa* [Jacq.] Baill) que apresenta uma ampla distribuição geográfica e produz um fruto conhecido vulgarmente como “biribá”, “biribá-do-pará”, “fruta-da-condessa”, “biribá-de-Pernambuco”, “pinha”, “anona” e “jaca-de-pobre”, o qual tem grande aceitação popular, sendo na maioria das vezes comercializado e consumido *in natura* (Costa e Muler, 1995).

A mancha zonada, causada por *Sclerotium coffeicola* Bull, é uma doença comum na região Norte, porém não causa danos expressivos (Souza *et al.*, 2012). Apesar disso, na Amazônia, essa doença é a mais relevante para a cultura da graviola (*Annona muricata* L.), também pertencente à família das Anonáceas (Spósito *et al.*, 2016).

A primeira descrição desse patógeno foi em folhas de cafeeiro no Suriname (Stahel, 1921). Em 1957, foi descrito nessa mesma cultura na África do Sul (Saccas, 1957) e em 1965 em cafeeiro e mangueira na Costa do Marfim (Boisson *et al.*, 1965). No Brasil, foi descrito em gravioleira como *Sclerotinia* sp. no estado do Pará (Tabosa *et al.*, 1983), entretanto sua identificação ficou hipotética e só foi formalmente

identificado como *S. coffeicolum* em 1986, atacando gravioleira no município de Manaus, confirmando assim a presença da doença na Amazônia (Lourd e Alves, 1986). O patógeno afeta as folhas, causando lesões necróticas circulares, com centro marrom-claro, bordas bem definidas de coloração marrom escura com diâmetro de aproximadamente 4 mm. Essas lesões com o tempo tornam-se irregulares, formando linhas concêntricas, claras e escuras de 1 a 2 mm de largura, podendo coalescer. Pode haver perfuração no centro da lesão, em certos casos. A olho nu, se observa uma massa de hifas espessas (2-5 mm de comprimento), de coloração branca na face abaxial das folhas. A alta incidência dessa doença ocasiona a queda precoce das folhas e o desfolhamento ascendente da planta, que pode ser total, em condições de clima favorável, culminando com a redução da produção de frutos (Spósito *et al.*, 2016).

A ocorrência da mancha zonada em folhas de biribazeiro foi relatada em 1999 no município de Manaus-AM (Gasparotto e Veras, 1999), porém sem a caracterização do patógeno, agente causal da doença nessa cultura. Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar as características morfológicas e moleculares de *S. coffeicola* infectando plantas de biribazeiro.

Material e Métodos

No primeiro semestre de 2017, numa área reservada ao estudo de frutíferas localizado no campo experimental da Embrapa Amazônia Ocidental no município de Manaus-AM, foram observadas e coletadas folhas infectadas de biribazeiro apresentando sintomas típicos de manchas necróticas circulares de coloração castanha, de bordos mais escuros, medindo aproximadamente 1,5 a 3,1 cm de diâmetro, distribuídas no limbo foliar.

Isolamento direto a partir dos propágulos vegetativos de *S. coffeicola* sobre as lesões foi realizado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (200 g/L de batata, 10g/L de dextrose e 15g/L de ágar). Após o crescimento do fungo e da produção de escleródios no meio-de-cultura, um único escleródio foi colocado por placa para a obtenção da cultura pura do patógeno.

A massa micelial para extração de DNA total foi a partir das culturas puras, crescidas em meio BD (200 g/L de batata, 10 g/L de dextrose, 2 g/L de extrato de levedura, 2g/L de peptona e 1,5 g/L de caseína). A extração de DNA de quatro isolados foi realizada segundo o protocolo CTAB (Doyle e Doyle, 1987) e quantificado em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo).

Visando determinar os genótipos dos isolados obtidos nas amostras foliares, utilizou-se o marcador molecular ERIC-PCR por meio dos *primers* ERIC 1R 5'-ATGTAAGCTCCTGGGATTCAC-3' e ERIC F-5'-AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG-3'. As reações de PCR foram realizadas com: 1X de tampão (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.4, 1% de Triton), 1,5 mM de cloreto de magnésio, 0,5 mM de dNTP, 50 ng de DNA, 0,2 µM de cada *primer* e 1U de enzima Taq DNA polimerase (*Karpa*). As condições das reações foram: desnaturação inicial de 94 °C por 5 min, 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 48 °C por 1 min, 65 °C por 5 min, seguido pela extensão final de 65 °C por 16 minutos e o perfil de bandas visualizado em gel de agarose 1,5%.

Os caracteres morfológicos analisados foram os aspectos da colônia e formato, tipo, coloração e tamanho dos escleródios. Um isolado foi escolhido para sequenciamento com base na morfologia e dados de ERIC-PCR, com as regiões Espaçadores Internos Transcritos (ITS) e região LSU domínios D1/D2 da subunidade 28S do rDNA utilizando os *primers* ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' (White *et al.*, 1990) e NL4-5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3' (Carbone e Kohn, 1999), os quais amplificam aproximadamente 1100 pb.

Os fragmentos de PCR foram sequenciados no 3500 Genetic Analyser (Thermo Fisher) e a árvore filogenética foi construída a partir de um alinhamento da região LSU utilizando a ferramenta ClustalW e a topologia da árvore foi obtida por meio do método maximum likelihood no programa MEGA 7.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0) com 1,000 replicatas utilizando o parâmetro de deleção parcial com limite de corte de 95%. O suporte dos ramos foi dado em bootstrap (Tamura *et al.*, 2013).

O teste de patogenicidade foi realizado em folhas sadias de ramos destacados de plantas de biribá, colocando-se os escleródios diretamente sobre a face adaxial das folhas com e sem prévio ferimento. Após a inoculação, as folhas foram submetidas à câmara úmida por 48 h.

Resultados e discussão

Conforme os caracteres morfológicos, o fungo apresentou micélio branco, pouco ramificado e crescimento rápido. Sobre a superfície das colônias de coloração inicial branca, entre o 3º e o 5º dias de crescimento e, posteriormente, alaranjada entre o 9º e o 12º dias de incubação a 25 °C formaram-se escleródios globosos, isolados e agrupados, medindo de 3 a 5 mm de diâmetro (Figura 1).

Assis *et al.* (2007) descreveram morfológicamente o fungo *S. coffeicola* em mogno, apresentando micélio branco, pouca ramificação e rápido crescimento. Os escleródios globosos mediam de 2 a 5 mm de diâmetro e apresentavam coloração inicial branca – creme, entre o 3º e o 5º dias de incubação e, posteriormente alaranjada entre o 8º e 10º dias de incubação. Mais recentemente, Pérez-Vera *et al.* (2017) observaram que, a colônia de *S. coffeicola* no 6º dia de idade apresentava micélio branco com pouca ramificação e escleródios esféricos ou globosos, de aparência parda e com diâmetro médio de 1,99 mm. Entre o 10º e o 15º dias, os escleródios atingiram diâmetro médio de 4,43 mm, cuja coloração mudou de amarelo cremoso para laranja e no 21º dia, os escleródios tornaram-se globosos a subglobosos e atingiram diâmetro de 5,9 mm. Essas características são semelhantes às observadas no presente estudo.

O fingerprint obtido pelo marcador ERIC-PCR indicou que o isolado BIR 010 e BIR 013 apresentam o mesmo perfil de bandas, sendo possível distinguir três genótipos a partir dos quatro isolados analisados (Figura 2). Esta técnica tem sido utilizada em outros fungos fitopatogênicos devido a sua eficiência na diferenciação entre isolados, reduzindo assim o sequenciamento de clones (Queiroz *et al.*, 2015; Sousa *et al.*, 2017).

A análise filogenética da região LSU pelo método Maximum Likelihood (ML) com base na sequência de 35 isolados de *Sclerotium* spp. distribuídos em 9 táxons identificou com alto suporte de bootstrap, o isolado BIR 010 como sendo *Sclerotium coffeicola* (Figura 3).

A relação filogenética de espécies dentro do gênero *Sclerotium*, foram determinadas por Xu *et al.* (2010) utilizando-se as regiões ITS e LSU. Estas também foram capazes de resolver as relações filogenéticas entre *S. coffeicola* e *S. rolfsii* (Xu, 2008). Contudo neste trabalho apenas a região LSU foi suficiente para identificação de *S. coffeicola*.

No teste de patogenicidade, foi possível observar os primeiros sintomas característicos de mancha zonada quatro dias após a inoculação em folhas sadias de *R. mucosa* (Figura 4). As etapas do postulado de Koch foram concluídas após o reisolamento do fungo em meio de cultura BDA e a confirmação através das características morfológicas do fungo.

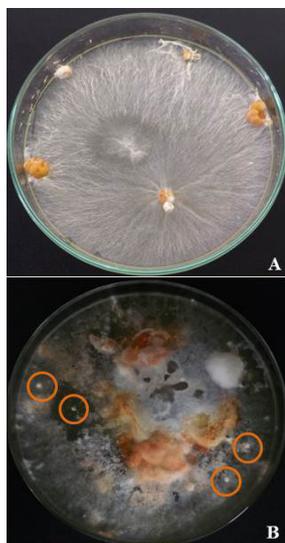


Figura 1. Colônia branca (A) e alaranjada (B) contendo escleródios de *Sclerotium coffeicola* em meio BDA.

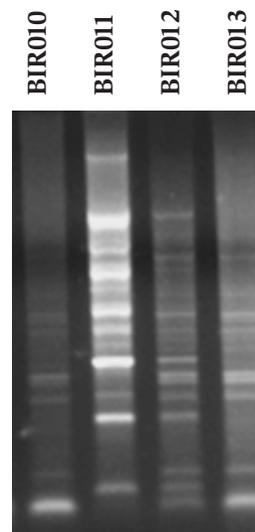


Figura 2. Perfil de bandas obtidas pelo marcador ERIC-PCR com base em quatro isolados de *Sclerotium coffeicola*.

Segundo Ferreira (1989), *S. coffeicola* é um dos patógenos mais agressivos em inoculações artificiais. No estado do Amazonas, além de *R. mucosa* essa doença já foi relatada em *Poraqueiba sericea* Tul., *P. acuminata* Miers, *Ceiba pentandra* (L.) Gaertn., *Khaya ivorensis* A. Chev., *Alibertia edulis* (Rich.) A.Rich., *Genipa americana* L., *Couma macrocarpa* Barb. Rodr., *Mespilus germânica* L., *Dioscorea cayenensis* Lam., *Anona senegalensis* Pers., *Averrhoa carambola* L. (Gasparotto e Veras, 1999) e *Swietenia macrophylla* King. (Bastos, 1998, Assis *et al.*, 2007), *Nauclea diderichii* Wild. e *Gmelina arborea* L. (Hodges *et al.*, 1975), (*Mangifera indica* L.) (Boisson *et al.*, 1965), *Bauhinia* sp. (Ferreira, 1989). Recentemente foi relatado em mogno africano (*S. macrophylla*) no México (Pérez-Vera *et al.*, 2017) e em graviolinha (*A. montana*) no Panamá (Kirschner *et al.*, 2018).

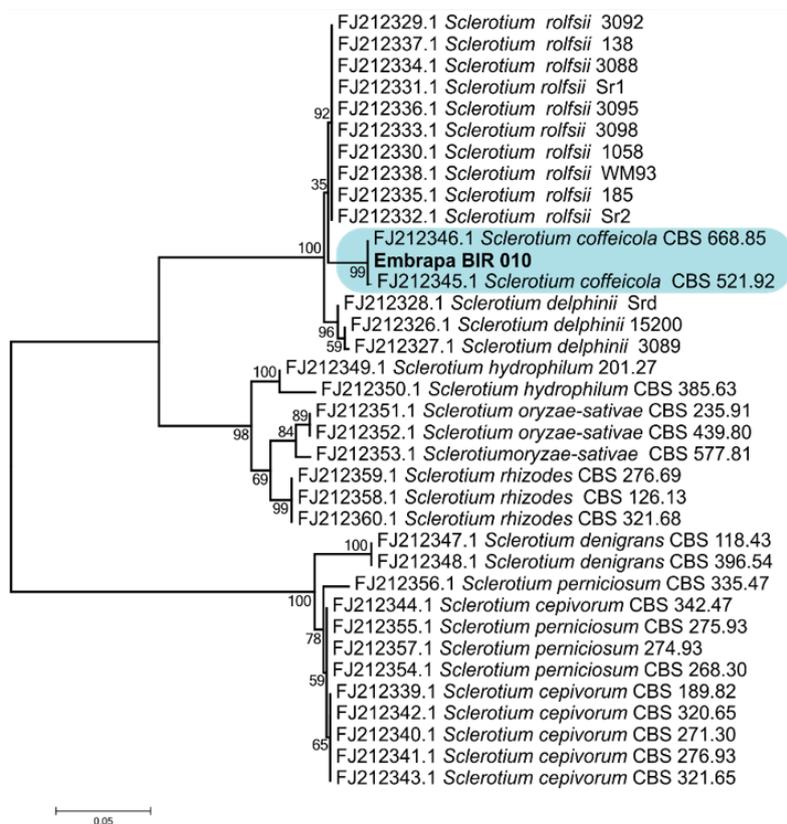


Figura 3. Inferência filogenética pelo método Maximum Likelihood com base na região LSU de 9 táxons de *Sclerotium*. O isolado BIR 010 é destacado em negro.



Figura 4. Lesões naturais causadas por em folhas de *Rollinia mucosa* por *Sclerotium coffeicola* (A) e inoculação artificial de *S. coffeicola* com escleródios (B).

Conclusão

De acordo com as características morfológicas, análise filogenética e o teste de patogenicidade, os isolados obtidos causando a mancha zonada em folhas de biribazeiro foi identificado como *S. coffeicola* Bull.

Referências

- Assis LAG de, Coelho Netto RA, Barbosa AP 2007. Ocorrência de mancha foliar em mogno causada por *Sclerotium coffeicola* no estado do Amazonas. *Summa Phytopathologica*, 33(1):99.
- Bastos CN 1998. Mancha foliar em mogno (*Switenia macrophylla*) causada por *Sclerotium coffeicolum* Stahel. *Agrotropica*, Ilhéus, 10(1):41-42.
- Boisson C, Frossard P 1965. Note sur deux maladies à sclérotos des feuilles de manguier et de caféier excelsa em Côte d'Ivoire. *Fruits*, 10:565-569.
- Carbone I, Kohn LM 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91:553-556.
- Costa JPC, Müller CH 1995. Fruticultura tropical: o biribazeiro *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. Documentos, 84:1-36.
- Ferreira FA 1989. Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil. Sociedade de Investigações Florestais, Viçosa, 570p.
- Gasparotto L, Veras SM 1999. Hosts of *Sclerotium coffeicola* in the state of Amazonas, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 24(1):93.
- Hodges CS; Ferreira FA, Reis MS 1975. *Dois fungos na região amazônica que produzem propágulos vegetativos*. VIII Congresso da Sociedade Brasileira de Fitopatologia. Mossoró, RN. 2p.
- Kirschner R, Cáceres O, Piepenbring M (2018). Three new records of plant parasitic phyllosphere fungi from Panama: *Annelophora phoenicis*, *Cercospora corniculatae*, and *Sclerotium coffeicola*. *Check List*, 14 (1):93–100.
- Lourd M, Alves MLB 1986. A mancha zonada da gravioleira (*Annona muricata* L.) causada por *Sclerotium coffeicolum*, nova doença na região de Manaus. *Fitopatologia Brasileira*, 11(4):1015-1017.
- Nogueira EA, Mello NTC, Maia ML 2005. Produção e comercialização de anonáceas em São Paulo e Brasil. *Informações Econômicas*, 35(2):51-54.
- Okabe I, Arakawa M, Masumoto N 2001. ITS polymorphism within a single strain of *Sclerotium rolfsii*. *Mycoscience*, 42:107-113.
- Pérez-Vera OA, Cibrián-Tovar D, T-Hanlin R 2017. Primera descripción de *Sclerotium coffeicola* en caoba africana en México. *Revista Argentina de Microbiología*. 1-4.
- Queiroz CA, Silva AF, Cruz JC, Silva GF, Sousa NR, Matos KS, Hanada RE 2015. *Caracterização de Fusarium decemcellulare isolado de guaranazeiro (Paullinia cupana var. sorbilis) por meio de ERIC-PCR*. 2015. 5º Congresso sobre Diversidade Microbiana da Amazônia. Manaus, Amazonas. 9p.
- Saccas AM 1957. La maladie des taches zonées de Coffea excelsa en Oubangui-Chari, due à *Sclerotium coffeicolum* Stah. *Revue de Mycologie*. 22:65-84.
- Souza MF de, Martins MQ, Silva MFO, Coelho RI 2012. Omissão de macronutrientes em mudas de biribazeiro (*Rollinia mucosa* [Jacq.] Baill) cultivadas em solução nutritiva. *Agronomía Colombiana*, 30(1):41-45.
- Sousa TF, Queiroz CA, Sousa SB, Silva GF 2017 *Diferenciação genética entre as formas homotéticas e heterotéticas de Fusarium decemcellulare por meio de marcadores moleculares*. 2017. 6º Congresso sobre Diversidade Microbiana da Amazônia. Manaus, Amazonas. 7p.
- Spósito MB, Lopez AMQ, Belasque Junior J 2016. Doenças das Anonáceas e do Urucuzeiro. In: Amorim L., Rezende JAM, Bergamim Filho A, Camargo LEA (ed.). Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas. Agronômica Ceres, São Paulo, p.83-86.
- Stahel G. 1921. *De Sclerotium - Ziekte van de Liberica Koffie in Surinam*. Bull. Dept. van den Landbouw, Surinam, 42p.
- Tabosa SAS, Santos ABC 1983. Mancha zonada da folha de graviola (*Annona muricata* L.) no Estado do Pará. *Fitopatologia Brasileira*, 8:584.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S 2013 MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30:2725-2729.

- Templeton MD, Rikkerink EHA, Solon SL, Crowhurst RN 1992. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. *Gene*, 122:225-230.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J 1990. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, p.315-322.
- Xu Z 2008. Overwinter survival of *Sclerotium rolfsii* and *S. rolfsii* var. *delphinii*, screening hosta for resistance to *S. rolfsii* var. *delphinii*, and phylogenetic relationships among *Sclerotium* species. Ames, Iowa. (Master Dissertation. Iowa State University. ISU). 124p.
- Xu Z, Harrington TC, Gleason ML, Batzer JC 2010. Phylogenetic placement of plant pathogenic *Sclerotium* species among teleomorph genera. *Mycologia*, 102(2):337 – 346.