Anais



VII Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental







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

Anais da VII Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

Luis Antonio Kioshi Aoki Inoue Regina Caetano Quisen Ronaldo Ribeiro de Morais Cheila de Lima Boijink Editores Técnicos Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Amazônia Ocidental

Rodovia AM-010, km 29, Estrada Manaus/Itacoatiara

Caixa Postal 319, 69010-970, Manaus - AM

Fone: (92) 3303-7800 Fax: (92) 3303-7820 www.cpaa.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: Celso Paulo de Azevedo Secretária: Gleise Maria Teles de Oliveira

Membros: Aparecida das Gracas Claret de Souza

José Ricardo Pupo Gonçalves Lucinda Carneiro Garcia Luis Antonio Kioshi Inoue Maria Augusta Abtibol Brito Maria Perpétua Beleza Pereira Paulo César Teixeira Raimundo Nonato Vieira da Cunha Ricardo Lopes

Revisor de texto: Maria Perpétua Beleza Pereira

Ronaldo Ribeiro de Morais

Normalização bibliográfica: Maria Augusta Abtibol Brito Diagramação e arte: Gleise Maria Teles de Oliveira

1ª edicão

1ª gravação em CD-ROM (2010): 200

Todos os direitos reservados. A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

> CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação. Embrapa Amazônia Ocidental.

Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental (7. : 2010 : Manaus).

Anais... / editores Luis Antonio Kioshi Aoki Inoue, Regina Caetano Quisen, Ronaldo Ribeiro de Morais e Cheila de Lima Boijink. – Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2010.

1 CD-ROM; 4 * pol.

ISBN 978-85-89111-11-9

1. Pesquisa. 2. Desenvolvimento. I. Inoue, Luis Antonio Kioshi Aoki. II. Quisen, Regina Caetano. III. Morais, Ronaldo Ribeiro de. IV. Boijink, Cheila de Lima. V. Título.

CDD 501

Isolamento e diversidade genética de *Moniliophthora* perniciosa oriundos de tecidos infectados de *Theobroma* ssp.

Diogo Matos dos Santos Maria Geralda de Souza Nelcimar Reis Sousa Gilvana Figueira Gualberto Adriana da Costa Gil de Souza Edil Miranda Corrêa Gilvan Ferreira da Silva

Introdução

A contínua expansão dos plantios de cupuaçuzeiro tem gerado uma demanda por tecnologias capazes de elevar a produtividade e a rentabilidade dos pomares. Entre os principais problemas da cultura está a alta incidência da doença vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* (AIME e PHILLIPS-MORA, 2005). A doença é endêmica na região amazônica, e as estratégias de controle incluem manejo e poda fitossanitária, que consiste na remoção dos ramos e frutos doentes, para a redução do inóculo, porém possui custo elevado em mão de obra (OLIVEIRA e LUZ, 2005; LIMA e SOUZA, 1997).

Enquanto as informações sobre o controle químico são resultantes de testes realizados em cacaueiro (BASTOS e EVANS, 1979; BASTOS, 1980), não existem registros para o cultivo do cupuaçu; assim, a seleção de materiais produtivos, resistentes à vassoura-de-bruxa, é de grande interesse para a agricultura e para a indústria. A variação da resistência derivada da diversidade do patógeno, bem como a ausência de métodos consistentes para a avaliação precoce da resistência à *M. perniciosa*, tem limitado a identificação de novas fontes de resistência e, consequentemente, a incorporação de novos genótipos de interesse ao programa de melhoramento.

Os marcadores moleculares são ferramentas úteis na análise de variação genética em populações de fungos fitopatogênicos (McDERMOTT e MCDONALD, 1993; MILGROOM e FRY, 1997). Dentre as ferramentas moleculares disponibilizadas para o estudo de diversidade em fungos, podemos destacar: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), SNPS (Single Nucleotide Polymorphisms), SSR (Simple Sequence Repeats), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), ITS (Internal Transcribed

Spacer) e mais recentemente a técnica baseada em microarray chamada de Diversity Arrays Technology (DArT) entre várias outras ferramentas disponíveis (MaCDONALD et al., 1995; ROSEWICH et al., 1998, 1999; BRAKE et al., 2001; ABRIL e BUCHER, 2007). Os ISSRs (Inter Simple Sequence Repeat) são produtos de PCR obtidos usando primers com repetição de di- tri- tetra ou pentanucleotídeos. Esse marcador, baseado na amplificação entre regiões de microssatélite. vem sendo extensivamente usado nos últimos anos em diferentes organismos, inclusive em vários fungos: Acromyrmex ssp. (ABRIL e BUCHER, 2007), Fusarium pseudograminearum (MISHRA et. al., 2006), Beuveria bassiana (ESTRADA et. al., 2006), entre outros. A análise da diversidade do fungo permite inferências a respeito da capacidade de dispersão do patógeno, taxa de mutações, forma de reprodução, grau de variabilidade genética, tamanho populacional efetivo, potencial de causar epidemia, distribuição dos genes de virulência, entre outras (MaCDONALD e LINDE, 2002). Este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética de isolados de Moniliophthora perniciosa coletados de tecido infectado de Theobroma sp., oriundos de diferentes regiões da Amazônia por meio do marcador ISSR.

Material e Métodos

Obtenção de isolados de *M. perniciosa*

Os isolados de *M. perniciosa* foram obtidos no "vassoureiro", no Campo Experimental da Embrapa Amazônia Ocidental e em outros estados da região Norte (Tabela 1). Para a obtenção de isolados a partir de basidiocarpos (isolamento direto), vassouras secas

foram penduradas sob telado com 50% de luz e temperatura ambiente de 26 °C a 28 °C e submetidas a um período de 8 horas com umidade (período do dia) e 16 horas de seca. Também, sob condições ambientais favoráveis, os basidiocarpos foram coletados no campo. Após a coleta os basidiocarpos foram submetidos à assepsia com solução de estreptomicina a 1% e, posteriormente, fixados com vaselina na tampa de uma placa de petri contendo meio ágar-água, overnight, para liberação dos esporos. Os esporos obtidos foram transferidos para o meio MGLA (malte, glicerol, levedura e ágar) para o desenvolvimento do micélio. Para extração de DNA, os isolados foram transferidos para MGL (malte, glicerol, levedura) sob agitação de 120 rpm por aproximadamente 15 dias para obtenção de massa micelial com o uso da mesa agitadora TC 185 ORBITAL. O micélio foi recuperado por filtração, lavado com água estéril, seco com papel toalha e armazenado em um ultrafrezer a -80 °C para posterior extração do DNA.

Extração e concentração do DNA genômico

As extrações de DNA foram realizadas conforme o protocolo de Doyle e Doyle (1990) CTAB, a partir de micélio dos 46 isolados (Tabela 1). A concentração e qualidade do DNA das amostras foram determinadas em gel de agarose a 0,8%.

Tabela 1. Lista de Isolados de *Moniliophthora perniciosa*.

Identificação	Município	Genótipo	Estado
AG01	Manacapuru	Cupuaçu	AM
AG02	Manaus	Cacau	AM
AG03	Couto	Cupuaçu	RR
AG04	Confiança	Cupuaçu	RR
AG05	Iranduba	Cacau	AM
AG06	Manaus	Spruceanum	AM
AG07	Manaus	Subicanum	AM
AG08	Manaus	Cupuaçu	AM
AG09	Colônia Agrícola do Matupé	Cupuaçu	AP
AG10	Colônia Agrícola do Matupé	Cupuaçu	AP
AG11	Colônia Agrícola do Matupé	Cupuaçu	AP
AG12	Colônia Agrícola do Matupé	Cupuaçu	AP
AG13	Colônia Agrícola do Matupé	Cupuaçu	AP
AG14	Colônia Agrícola do Matupé	Cupuaçu	AP
AG15	Colônia Agrícola do Matupé	Cupuaçu	AP
AG16	Colônia Agrícola do Matupé	Cupuaçu	AP
AG17	Manacapuru	Cupuaçu	AM
AG18	Rio Preto da Eva	Cupuaçu	AM
AG19	Belém	Cupuaçu	PA
AG20	Iranduba	Cupuaçu	AM
AG21	Autazes	Cupuaçu	AM
AG22	Autazes	Cupuaçu	AM
AG23	Careiro Castanho	Cupuaçu	AM
AG24	Careiro Castanho	Cupuaçu	AM
AG25	Manacapuru	Cupuaçu	AM
AG26	Rio Preto da Eva	Cupuaçu	AM
AG27	Rio Branco	Cupuaçu	AC
AG28	Manaus	Cupuaçu	AM
AG29	Autazes	Cupuaçu	AM
AG34	Presidente Figueiredo	Cupuaçu	AM
AG35	Balbina	Cupuaçu	AM
AG36	Presidente Figueiredo	Cupuaçu	AM
AG45	Presidente Figueiredo	Cupuaçu	AM
AG41	Balbina	Cacau	AM
AG43	Silves	Cupuaçu	AM
AG51	Rondônia	Cacau	RR
AG37	Presidente Figueiredo	Cupuaçu	AM
AG44	Silves Km 60	Cupuaçu	AM
AG34	Presidente Figueiredo	Cupuaçu	AM
AG39	Balbina	Cupuaçu	AM
AG45	Novo Airão Km7	Cupuaçu	AM
AG42	Balbina	Cupuaçu	AM
AG47	Novo Airão	Cupuaçu	AM
AG38	Manacapuru	Cupuaçu	AM
AG46	Balbina	Cacau	AM
AG49	Novo Airão	Cupuaçu	AM
AUT3	NOVO Allau		Alvi

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizadas em volume total de 15 μ L com 0,9 μ M de iniciador, 3 ng de DNA, e 0,5 mM de dNTP e 1 U de *Taq polimerase* (Phoneutria). As condições de amplificação foram: um ciclo a: 94 °C por 3 minutos, 40 ciclos a 94 °C 30 s, e anelamento de acordo com cada *primer* por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos, extensão final a 72 °C por 7 minutos, as reações foram realizadas utilizando o termociclador VeritiTM (Applied Biosystems).

Seleção de Primers

A sequência dos *primers* usados para amplificação das regiões ISSR foi baseada na lista set#9 (*primers* 801-900) da *University of British Columbia* (UBC). Para triagem dos *primers* que amplificam bandas com perfil polimórfico em M. perniciosa foi utilizado amostra de DNA. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo 0,5 μ g de brometo de etídio por mL.

Análise de dados

Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose a 1,5% e utilizados na elaboração de uma matriz de similaridade genética, por meio do registro da presença (1) e da ausência (0) de bandas no perfil eletroforético de cada isolado. A similaridade genética foi estimada por meio do coeficiente de Jaccard, e para visualizar a forma de agrupamento dos isolados, foi elaborado o dendograma empregando o método de agrupamento da distância média

(UPGMA- Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), utilizando o programa NTSYSpc versão 2.10 (ROHLF, 2000).

Resultados e Discussão

Análise da diversidade de Moniliophtora perniciosa por meio do marcador ISSR

Neste estudo preliminar foram utilizados cinco iniciadores (quatro dinucleotídeos e um pentanucleotídeo). O número médio de bandas por primer foi 12 e a percentagem de bandas polimórficas foi de 100% para todos os oligonucleotídeos analisados, um total de 43 bandas polimórficas foram obtidas (Tabela 2). O dendrograma construído a partir da matriz de similaridade de Jaccard mostra o relacionamento genético entre os 46 isolados, a menor similaridade genética encontrada foi de 0,21 e a maior foi de 0,80 (AG03 e AG05) (Figura 1). No geral, foi verificada a inexistência de grupos distintos por região geográfica, por exemplo, isolados de municípios muito próximos, como Manaus e Iranduba, foram agrupados em diferentes grupos. Os isolados foram distribuídos em onze grupos, sendo que cinco destes foram unitários contendo isolados apenas do Estado do Amazonas grupos (II, VII, IX e XI) e um que incluiu o isolado do Estado de Rondônia (VI).

O maior grupo foi composto por 19 indivíduos do Estado do Amazonas e dois de Roraima, sendo denominado de grupo I. Os grupos IV e VI apresentaram leve estruturação geográfica por estado, dos quais foram separados os isolados do Amapá e Rondônia, respectivamente. Por outro lado, os isolados do Pará e Acre apresentaram alta similaridade.

Tabela 1. *Primers* de ISSR utilizados para análise da diversidade da população de *Moniliophthora perniciosa*.

Primer	Sequência (5´-3´)	Âncoras	Temperatura de Anelamento (C°)	Nº de bandas amplificadas	N° de bandas polimórficas	Percentual de polimorfismo (%)
UBC 807 UBC 841	(AG) ₈ (GA) ₈	T YC	47.0 48.5	9 10	9 10	100 100
UBC 881	(TGGGG) ₂	GGG- TG	59.3	6	6	100
UBC 885	(GA) ₇	BHB-	48.3	10	10	100
UBC 889	(AC) ₇	DBD-	50.1	8	8	100
Total	-	-	-	43	43	100

DENDOGRAMA

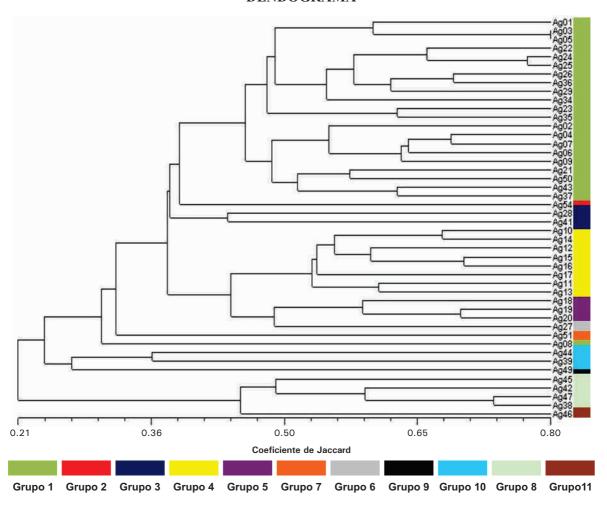


Figura 1. Dendrograma de similaridade genética de isolados de *Moniliophthora perniciosa* provenientes de municípios do Amazonas e de outras localidades do Brasil.

Os isolados do Amazonas estão representados em maior número de localidades de coleta, o que explica a elevada diversidade da estrutura genética constatada pela distribuição desses isolados em nove grupos. Em função do grande número de agrupamento visualizado no dendograma, 11 no total, podemos inferir que os isolados de *M. perniciosa* utilizados na análise reúnem grande diversidade genética.

Agradecimentos

À Deus pela vida, ao CNPq pela concessão da bolsa de pesquisa. À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), pelo apoio logístico e pela infraestrutura. Aos funcionários e Bolsistas do Lab. de Fitopatologia e de Biologia Molecular, especialmente ao Átila, Jefferson, Edil, Gilvana, Gleice, Dayana. Aos técnicos Karina, Salomão e Ricardo. À Dra. Maria Geralda, por acreditar no meu trabalho, e à Dra. Nelcimar Reis, por me ajudar nos resultados, e ao Dr. Gilvan Ferreira, pela paciência e dedicação. Aos meus pais, pelo apoio e dedicação.

Referências

ABRIL, A. B.; BUCHER, E. H.Genetic Diversity of Fungi Occurring in Nests of Three Acromyrmex Leaf-cutting Ant Species from Cordoba, Argentina. **Microb Ecol.** Apr 29. 2007.

AIME, M.C., PHILLIPS-MOURA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cação (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. Mycologia 97 (2005) 1.012-1.022.

BASTOS, C.N, 1980. Influência da temperatura na liberação de basidiocarpos de *Crinipellis perniciosa* (Sthael) Singer. Belém: COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA/DEPARTAMENTO ESPECIAL DA AMAZÔNIA 1980. p. 46-49. (Informe Técnico).

BASTOS, C.N: EVANS, H. C. Hospedeiros da vassoura-de-bruxa (*C. perniciosa*). In: CEPLAC. **Informe Técnico**. Belém, Belém, 1979. 91 p. P. 35-36.

BRAKE, V.M.: IIRWIN, J. A. G.: Park, R. F. Genetic variability in Australian isolates of *Pucccinia coronata* f. sp. *avenae* assessed with molecular and pathogenicity markers. **Australian Plant Pathology**. Collingwood. v.30. p. 259-266,2001.

DOYLE, J.J.T., DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rochester, v.12,n. 1 p 13-15, 1990.

ESTRADA, M.E, CAMACHO, M.V, BENITO, C. The molecular diversity of different isolates of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. as assessed using intermicrosatellites (ISSRs). **Cell Mol Biol Lett.** 2007;12(2):240-52. 2006.

LIMA, M., I.,M., SOUZA A. DAS G. C. de Diagnose das principais doenças do cupuaçuzeiro (*Theobroma gradiflorum*) (Wild ex. Spreng.) e seu controle. 1997. 18p. (Embrapa/CPAA) Documento,9).

MACDONALD, B. A., LINDE, C. The population genetics of pant pathogens and breeding strategies for durable resistence. Euphytica. **Dordrecht.** v. 124. n2. p 163-180, 2002.

MACDONALD, B. A; PETTWAY R. E.; CHEN, R.S. BOERGER, J. M.; MARTINEZ, J.P. The population genetics of Septoria tritici (Telomoph Micosphaerella graminicola.). **Canadian Journal of Botny**. Ottawa, v.73.n.1, p292-301, 1995

MCDERMOTT, J.M. & MCDONALD, B.A. Gene flow in plant pathosystems. **Annual Review of Phytopathology** 31:353-373. 1993

MILGROOM, M. G., AND W. E. FRY. 1997. Contributions of population genetics to plant disease epidemiology and management. Advances in Botanical Research 24:1-30.

MISHRA ,P. K, TEWARI J. P, CLEAR, R. M, TURKINGTON ,T. K. Genetic diversity and recombination within populations of *Fusarium pseudograminearum* from western. Canada. **Int Microbiol**, v. 9, n.1, p.65-8. 2006.

OLIVEIRA, M.L.: LUZ, E. D. M. N. 2005. Identificação e Manejo das principais doenças do cacaueiro no Brasil. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC/SEFIT, 132p.

ROHLF, F. J. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.1. Exeter Software: Setauket, NY. 2000

ROSEWICH, U. L. PETTWAY, R. E. MACDONALD, B. A., DUNCAN, R.R., FREDERIKSEN, R.A. Genetic struture and temporal dynamics os a *Colletotrichum graminicola* population in a sorgum disease nursery. **Phytopathology**. Saint Paul. v. 88, n. 10. p. 1087-1093. 1998.

ROSEWICH, U. L. PETTWAY, R. E. MACDONALD, B. A., KISTLER, H. C. Hight levels of gene flow and heterozygote excess characteri *Rhizoctonia solani* AG-1 1 A (*Thanatephorus cucumeris*) form Texas. **Fungal Genetics and Biology**. San Diego v. 28. n.3 p 148-159.1999