

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 Moraes
Cheila de Lima Boijink
Editores Técnicos*

*Embrapa Amazônia Ocidental
Manaus, AM
2010*

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.cpa.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Celso Paulo de Azevedo*
Secretária: *Gleise Maria Teles de Oliveira*
Membros: *Aparecida das Graças 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
Ronaldo Ribeiro de Moraes

Revisor de texto: *Maria Perpétua Beleza Pereira*

Normalização bibliográfica: *Maria Augusta Abtibol Brito*

Diagramação e arte: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

1ª edição

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 Moraes e Cheila de Lima Boijink. – Manaus: Embrapa Amazônia
Occidental, 2010.
1 CD-ROM; 4^{ks} pol.

ISBN 978-85-89111-11-9

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

CDD 501

Diversidade Genética de *Mycosphaerella fijiensis* Revelada por Marcador ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) di e tri- Nucleotídeos

Rodrigo Fernandes de Souza
Luadir Gasparotto
Rogério Eiji Hannada
Nelcimar Reis Sousa
Gilvan Ferreira da Silva

Introdução

A banana é cultivada predominantemente em pequenas propriedades, sendo de grande importância social para a fixação do homem no campo e para a geração de empregos rurais, especialmente para os produtores de menor acesso à tecnologia. A bananicultura é uma das atividades agrícolas mais importantes do Brasil, ocupando o segundo lugar em volume de frutas produzidas, aproximadamente seis milhões de toneladas, perdendo apenas para a laranja (PEREIRA, 2000). No entanto, existem vários fatores que limitam a produtividade da bananeira, como o manejo e cultivo inadequado e a ação de fitopatógenos, destacando-se o fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Este é o agente etiológico da sigatoka-negra, principal doença da cultura da bananeira em todas as regiões produtoras do mundo. A análise da diversidade do patógeno é considerada crucial para a determinação da estrutura genética da população e para direcionar as estratégias de melhoramento e até mesmo o manejo de fungicida em agroecossistemas (MACDONALDS e LINDE, 2002). Desse modo o objetivo do trabalho foi estudar a diversidade de 188 isolados de *M. fijiensis* por meio do marcador molecular ISSR-Inter simple sequence repeat.

Material e Métodos

Microrganismos e condições de cultivo

Os isolados de *M. fijiensis* foram obtidos da coleção da Embrapa Amazônia Ocidental e mantidos em DBA enriquecido. Para extração de DNA, os isolados foram crescidos em BD líquido sob agitação de 120 rpm para obtenção de massa micelial. O micélio foi recuperado por filtração, lavado com água autoclavada, seco com papel toalha e armazenado a -80 °C para a extração.

Extração do DNA genômico

As extrações de DNA foram feitas conforme as condições estabelecidas no protocolo Doyle & Doyle (1990). A quantificação foi realizada com o auxílio do espectrofotômetro (NanoDrop-Thermo) e em gel de agarose 0,8% para análise da qualidade. Para a análise da diversidade foram utilizados 188 isolados de diferentes localidades do Brasil.

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). Os *primers* utilizados para análise da população de *M. fijiensis* foram previamente selecionados por Pereira et al. (2010).

Reação em Cadeia da Polimerase

As reações de PCR foram previamente padronizadas para *M. fijiensis* por Pereira et al. (2008) e realizadas em

volume total de 15 μ L com 0,3 μ M de iniciador, 50 ng de DNA, 2 mM de MgCl₂ e 0,5 mM de dNTP e 1 U de *Taq*-DNA polimerase (Phoneutria). As condições de amplificação foram: 1 ciclo a: 94 °C por 3 minutos; 40 ciclos a 94 °C por 30 s, e anelamento de acordo com cada *primer* por 1 min e 72 °C por 2 min, extensão final a 72 °C por 7 min, as reações foram realizadas utilizando o termociclador Veriti™ (Applied Biosystems).

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).

Resultados e Discussão

Os *primers* utilizados para a análise populacional de *M. fijiensis* foram 2 dinucleotídeos e 2 trinucleotídeos. Os *primers* 861 e 864 amplificaram 9 bandas, com 100% de polimorfismo. Das bandas 13 e 19 obtidas com os *primers* 807 e 885, o percentual de polimorfismo foi de 100% e 84,21%, respectivamente (Tabela1).

Tabela 1. Resultados de quatro *primers* utilizados para análise de polimorfismo da população de *M. fijiensis*.

Primer	Sequência (5´-3´)	Âncoras	Temperatura de Anelamento (C°)	Número de bandas amplificadas	Número de bandas polimórficas	Polimorfismo (%)
UBC 807	(AG) ₈	T	47.0	13	13	100,00
UBC 861	(ACC) ₆	-	60.6	9	9	100,00
UBC 864	(ATG) ₆	-	43.6	9	9	100,00
UBC 885	(GA) ₇	BHB-	48.3	19	16	84,21
Total	-	-	-	50	47	-

No total foram obtidas 50 bandas a partir dos quatro *primers* utilizados, das quais 47 (94%) foram polimórficas, representando uma média de 11,75 bandas polimórficas por *primer*. Dos quatro *primers* analisados, apenas o 885 apresentou três bandas monomórficas. Todos os *primers* utilizados apresentaram alto grau de polimorfismo, demonstrando a alta variabilidade genética existente entre os isolados de *M. fijiensis* e a eficiência do marcador ISSR em detectá-la.

A análise de similaridade obtida a partir da matriz de Jaccard mostra as relações genéticas entre 188 isolados de *M. fijiensis* (Figura 1). O dendrograma mostra a formação de 9 grupos, denominados de A, B, C, D, E, F, G, H e I, compostos por isolados de diferentes estados. O grupo B reuniu 50 isolados sendo: 4 de Rio Branco (AC); 8 de Presidente Figueiredo, 3 de Manaus, 12 de Manacapuru, 2 de Rio Preto da Eva, 1 de Tabatinga, 9 de Iranduba, 1 de Itacoatiara, 2 do Careiro Castanho e 1 de Atalaia do Norte (todos do Amazonas); 1 de Benevides, 1 de Belém e 1 de Marituba (PA); e 1 de Jangada e 3 de Cáceres (MT).

Destaca-se ainda a formação de dois pequenos grupos compostos por dois isolados cada. O grupo A com os isolados 1 de Presidente Figueiredo e 155

de Autazes, e o grupo I composto pelos isolados 32 de Rio Preto da Eva e 190 de Itacoatiara. Demonstrando que esses grupos possuem diferenças genéticas entre si e os demais. Os dados indicam que não ocorreu nenhuma aparente correlação entre local de coleta e similaridade genética.

A diferenciação genética entre populações pode ser atribuída às barreiras topográficas e de vegetação, às diferenças climáticas existentes entre países, às barreiras genéticas seguidas de eventos de colonização do fungo ou à combinação desses fatores, influenciando no fluxo gênico. Desse modo, a análise molecular da diversidade é crucial para a determinação da estrutura genética da população e para direcionar as estratégias de melhoramento e até mesmo o manejo de fungicida em agroecossistemas (MCDONALDS e LINDE, 2002).

O marcador molecular ISSR apresentou alto nível de polimorfismo demonstrando que os *primers* foram informativos e eficazes para estudo da diversidade genética da população *M. fijiensis*. Resultados de outros estudos confirmam a utilidade dessa técnica para análise de diversidade em fungos (ABRIL e BUCHER, 2007; MISHRA et al., 2006).

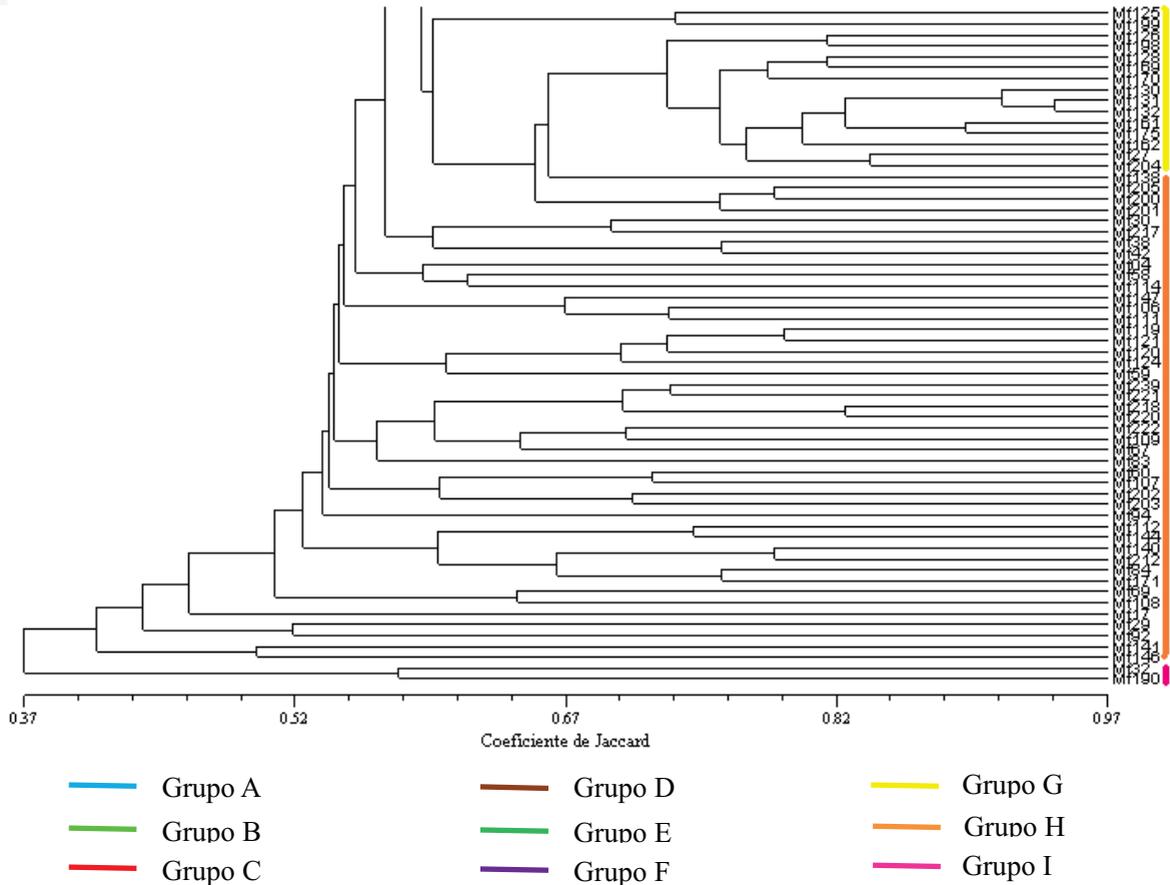


Figura 1. Dendrograma de similaridade genética de isolados de *M. fijiensis* provenientes de sete estados do Brasil.

Possivelmente, devido à recente introdução de *M. fijiensis* no Brasil, detectada inicialmente em 1998 (GASPAROTTO et al., 2006), não foi encontrado padrão de estruturação geográfica na população. Análise com mais de cem (100) bandas polimórficas em isolados de *M. fijiensis* do Estado do Amazonas (PEREIRA et al., 2010) tem mostrado resultado semelhante ao obtido neste trabalho. Contudo maior número de loci precisa ser analisado para confirmar esse resultado preliminar.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro e concessão da

bolsa de pesquisa. À Embrapa Amazônia Ocidental, em especial aos pesquisadores Gilvan Ferreira e Lúadir Gasparotto, pelo apoio e incentivo. Também aos Laboratórios de Biologia Molecular e de Fitologia, pela infraestrutura.

Referências

- ABRIL, A. B.; BUCHER, E. H. 2007. Genetic Diversity of Fungi Occurring in Nests of Three Acromyrmex Leaf-cutting Ant Species from Cordoba, Argentina. *Microb Ecol.* Apr 29.
- DOYLE, J.J.T.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, Rochester, v.12, n. 1 p 13-15, 1990.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. 2002. Pathogen population genetics, Evolutionary Potential, and durable resistance, **Ann. Rev**, v. 40, p. 349-379.

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.

PEREIRA J. C. R.; GASPAROTTO, L.; COELHO, A. F. S.; VÉRAS, S. M. 2000. Doenças da bananeira no Estado do Amazonas. Circular Técnica, 7, **Embrapa – Centro de Pesquisa Agroflorestral da Amazônia Ocidental**, p. 1-27.

PEREIRA, A. T. B.; Paixao, R. V.; Eiji, R. H.; Gasparotto, L.; Sousa, N. R. ; SILVA, G. F. . DIVERSIDADE GENÉTICA DA POPULAÇÃO DE *Mycosphaerella fijiensis* NO ESTADO DO AMAZONAS. In: **Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2010**, Salvador. CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2010.

PEREIRA, Á. T. B.; SILVA .G. F.; GASPAROTTO L.; HANADA, R. E. INTER-SINGLE-SEQUENCE-REPEAT (ISSR) EM *Mycosphaerella fijiensis*, SELEÇÃO DE LOCOS E PADRONIZAÇÃO DA PCR. In: Simpósio Brasileiro de Recursos Genéticos, 2008, 2.Brasília. **Anais do Simpósio Brasileiro de Recursos Genéticos**, 2008. v. 1.