

Caracterização da Variabilidade Genética da Coleção de Isolados de *Thielaviopsis paradoxa*

Magali Santana dos Santos¹, Leandro Eugenio Cardamone Diniz², Joana Maria dos Santos Ferreira³, André Luiz Pinto Santos⁴, Frederico Alberto de Oliveira⁵, Viviane Talamini⁶

Resumo

Foram analisados quinze isolados de *Thielaviopsis paradoxa*, obtidos de amostras coletadas de solo, do inseto *Rhynchophorus palmarum* e de palmeiras, dentre elas o coqueiro, as quais foram analisadas quanto a variabilidade genética por meio de marcadores moleculares RAPD. Analisando a similaridade genética foi possível a formação de quatro grupos com coeficientes variando de 70 a 91 %. O primeiro grupo formado pelos isolados obtidos da palmeira Imperial e da palmeira Azul. O segundo grupo foi formado pelos isolados de Neópolis, SE, sendo dois provenientes do inseto *R. palmarum* e dois isolados do coqueiro. O terceiro grupo, formado por dois isolados, um de *R. palmarum* e outro do coqueiro são de áreas relativamente distantes (São Cristóvão, SE, e Piaçabuçu, AL). O quarto grupo contou com os isolados obtidos do solo. Dois isolados foram altamente divergentes dos demais, havendo a necessidade de verificação da etiologia destes espécimes.

Palavras-chave: resinose, marcadores moleculares, polimorfismo, palmeiras.

¹ Estudante de Biologia, Bolsista CNPq/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, magalisoliveira@yahoo.com.br.

² Biólogo, Doutor em Genética e Melhoramento, Pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, leandro.diniz@embrapa.br.

³ Engenheira Agrônoma, Mestre em Entomologia, Pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, joana.ferreira@embrapa.br.

⁴ Estudante de Biologia, Bolsista FAPITEC/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, andre-luiz_04@yahoo.com.br.

⁵ Engenheiro-agrônomo, Doutor em Fitopatologia, DCR FAPITEC/CNPq/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, fredericoalberto@yahoo.com.br.

⁶ Engenheira-agrônoma, Doutora em Fitopatologia, Pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, viviane.talamini@embrapa.br.

Introdução

A doença denominada “stem bleeding” é conhecida nas áreas produtoras de palmeiras no mundo, incluindo o coqueiro (*Cocos nucifera* L.), sendo causada pelo fungo *Thielaviopsis paradoxa* (De Seyn) Höllh, anamorfo do ascomiceto *Ceratocystis paradoxa* (Dade) C. Este fungo também foi detectado associado a doenças em diversas espécies de plantas tropicais como abacaxi, cana-de-açúcar e bananeira. *T. paradoxa* já foi isolado a partir do solo e de insetos como o *Rhynchophorus palmarum* (PARRA et al., 2003). Nas áreas produtoras de coco no Brasil esta doença foi registrada em 2004 e denominada resinose (WARWICK; PASSOS, 2009). Nesta cultura, o fungo também foi associado a queda prematura dos frutos jovens (CARVALHO et al., 2012). Mesmo diante da relevância desta doença, praticamente não foram encontrados estudos sobre a variabilidade genética deste fungo com a utilização de marcadores moleculares. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar por meio de marcadores do tipo RAPD, a diversidade genética de isolados de *T. paradoxa* provenientes dos Estados de Sergipe, Bahia e Alagoas.

Material e Métodos

As atividades deste trabalho foram desenvolvidas no Laboratório de Controle Biológico e no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Tabuleiros Costeiros Para esta análise foram selecionados 15 isolados (Tabela 1), coletados nos Estados de Sergipe, Bahia e Alagoas, pertencentes à coleção de isolados de *T. paradoxa* da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Os isolados foram repicados individualmente para frascos com meio batata e dextrose, com agitação a 100 RPM, por 4 dias, quando a massa micelial foi coletada e submetida a filtração a vácuo sendo congelado em seguida. Para a extração do DNA, dois gramas do micélio foram macerados em nitrogênio líquido e submetido a extração utilizando protocolo estabelecido pelo Kit de Extração de DNA de Plantas e Fungos da Norgen Biotek®. Para a quantificação do DNA foi utilizado um espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo®).

Tabela 1. Isolados de *Thielaviopsis paradoxa* coletados nos em Sergipe, Alagoas e Bahia.

TC 003	Coqueiro (estipe)	Neópolis-SE
TC 004	Coqueiro (estipe)	Neópolis-SE
TC 005	Rhynchophorus palmarum	Neópolis-SE
TC 006	Rhynchophorus palmarum	São Cristovão-SE
TC 012	Rhynchophorus palmarum	Neópolis-SE
TC 013	Rhynchophorus palmarum	São Cristovão-SE
TC 023	Coqueiro (estipe)	Piaçabuçu-AL
TC 027	Coqueiro (estipe)	Neópolis-SE
TC 034	Coqueiro (estipe)	Conde, BA
TC 036	Palmeira Azul (raiz)	São Cristovão-SE
TC 040	Solo	São Cristovão-SE
TC 041	Palmeira Imperial (raiz)	Boca da Mata, AL
TC 042	Planta Ornamental (raiz)	São Cristovão-SE
TC 045	Solo	Aracaju-SE
TC 046	Solo	Aracaju-SE

Uma vez quantificadas as amostras, as mesmas foram submetidas a amplificação por PCR utilizando 15 primers de RAPD. As amplificações foram realizadas em termociclador Axygen®. O produto destas reações foi separado por eletroforese em gel de agarose e coloração em brometo de etídeo e fotodocumentados em L-Pix HE (Loccus®). A análise da similaridade genética foi feita utilizando o software POP2. O perfil eletroforético de cada primer de RAPD foi transformado em uma matriz binária, empregada na estimativa das estatísticas subsequentes.

Resultados e Discussão

Por meio do dendrograma de dissimilaridade verificaram-se quatro grupos. O primeiro grupo apresentou similaridade genética de 70% e foi formado pelos isolados TC041 e TC036 coletados de palmeira Imperial e palmeira Azul de Alagoas e Sergipe, respectivamente.

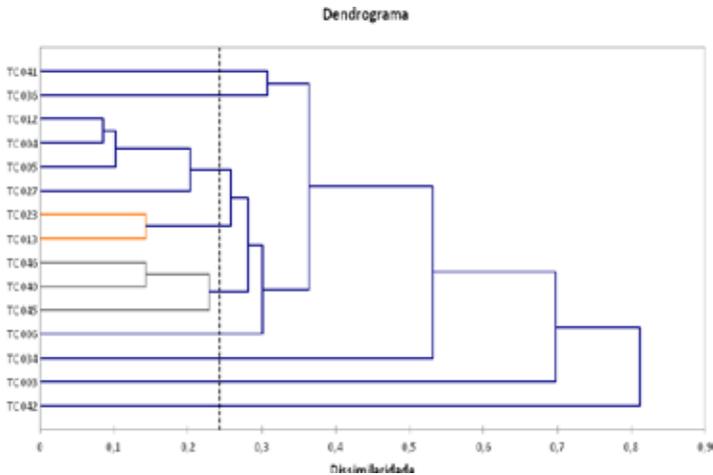


Figura 1. Dendrograma de dissimilaridade genética entre as 15 amostras avaliadas.

O segundo grupo foi formado pelos isolados TC012, TC004, TC005 e TC027, todos coletados em Sergipe na região de Neópolis. A similaridade genética entre estes isolados foi muito grande, variando entre 75% (isolados TC005 e TC027) e 91% (isolados TC004, TC005 e TC012) o que pode indicar que o inseto *R. palmarum* carrega propágulos (TC005) do fungo possíveis de causar doenças nas plantas. Um terceiro grupo, formado por apenas dois isolados (TC013 e TC023) apresentou uma similaridade genética muito alta, em torno de 86%. Estes isolados são de áreas relativamente distantes, sendo a primeira coletada em insetos encontrados de São Cristóvão, SE, e a segunda no estipe de coqueiro na cidade de Piaçabuçu, AL. Um quarto grupo foi formado pelos isolados TC040, TC045 e TC046, todos estes coletados diretamente do solo de regiões infectadas e com similaridade genética variando entre 74 e 86%. O fungo isolado do solo de São Cristóvão apresentou similaridade alta com quase todos os isolados obtidos no Estado de Sergipe (entre 70 e 81%). O isolado TC006 coletado em São Cristóvão apresentou boa similaridade genética com os isolados TC013 e TC040 também da mesma região (cerca de 73%). Já os isolados TC003 e TC042, coletados em Neópolis e São Cristóvão, respectivamente, apresentaram alta dissimilaridade genética com todas as outras amostras, o que pode indicar isolados oriundos de regiões muito distantes, ou ainda que estejam indevidamente classificados com *T. paradoxa*. Até o presente, poucos trabalhos com relação a variabilidade genética de *T. paradoxa* foram encontrados utilizando *T. paradoxa*. Costa Neto (2002) identificou este fungo em pupunha (*Bactris gasipaes*) e o compara aos demais

fungos endofíticos encontrados nesta planta, tendo encontrado após análise das regiões espaçadoras ITS 1 e 2 e do gene 5,8S pouca variabilidade genética.

Conclusões

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que há o indicativo de uma grande diversidade genética entre os isolados estudados e que um estudo ampliado com mais isolados, mais primers (RAPD e específicos) e ainda o sequenciamento de regiões conhecidas, como ITS 1 e ITS2 bem como o gene 5,8S seria muito importante para uma melhor classificação dos isolados e análise de similaridade genética.

Referências

CARVALHO, P.A.; MORAES, W.S.; CARNEIRO, O.L.G.; PEREIRA, T.G.; LIMA, J.D. ***Ceratocystis paradoxa* ocorrendo em palmeiras frutíferas e ornamentais do Vale do Ribeira**. Disponível em <http://prope.unesp.br/xxi_cic/27_36950928823.pdf>, 2012. Acessado dia 20 de julho de 2012.

COSTA NETO, P.Q. **Isolamento e identificação de fungos endofíticos da pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) e caracterização por marcadores moleculares**. São Carlos: UFSCar, 2002, 86p.

PARRA, D.; MORILLO, F.; SÁNCHEZ, P.; PINEDA, J.; GUERRA, J. Presencia de *Thielaviopsis paradoxa* De Seynes Höhn en el tubo digestivo de *Rhynchophorus palmarum* Linneo (Coleoptera: Curculionidae). **Entomotropica**, v.18, p. 49-55, 2003.

WARWICK, D.R.N.; PASSOS, E.E.M. Outbreak of stem bleeding in coconuts caused by *Thielaviopsis paradoxa* in Sergipe, Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 32, p 175-177, 2009.