



ESTUDO DA REGIÃO ITS DE *Curvularia* sp. E *Bipolaris* sp. (TELEOMORFO *Cochliobolus* sp.) PROVENIENTES DE PALMA DE ÓLEO.

Taise Pereira Carvalho¹, Alessandra de Jesus Boari¹, **Clenilda Tolentino Bento da Silva**³

¹ Bolsista ITI Universidade Federal Rural da Amazônia, taisecarvalho_proswin@hotmail.com

² Pesquisadora Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, ajboari@cpatu.embrapa.br

³ Assistente Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, clenilda@hotmail.com

Resumo: O gênero *Cochliobolus* (anamorfos *Bipolaris*, *Curvularia*) possui muitos fitopatógenos que causam grandes perdas no mundo, dentre as culturas afetadas se encontra a palma de óleo. A taxonomia de *Cochliobolus* é confusa devido às alterações de nomenclatura que tem ocorrido nos estados sexual e assexual das espécies há mais de 50 anos. A análise da sequência de DNA tem sido utilizada para identificar e/ou auxiliar na caracterização das espécies de fungos e nos estudar a filogenia. Recentemente, isolados de *Bipolaris* e *Curvularia* com morfologia semelhante foram obtidos de plantas de dendê e seu híbrido (*E. guineensis* x *E. oleifera*). Assim, objetivou-se comparar a região ITS entre um isolado de *Bipolaris* e quatro de *Curvularia* provenientes de palma de óleo do Estado do Pará, e acessos disponíveis em banco de gene. Para isso, tecidos de folhas de palma de óleo que apresentavam necrose foram plaqueados em meio ágar-água. Posteriormente, os fungos foram repicados para meio BDA e mantidos a temperatura ambiente. Após 10 dias, o fungo teve seu DNA extraído para realização do PCR utilizando os primers ITS4 e ITS5. Os produtos do PCR foram sequenciados e avaliados via programas Blast e ClustalW. Verificou-se que um isolado de *Curvularia* proveniente da cultivar Tanzania x Ekona agrupou com vários acessos de *C. Affinis*, dois isolados de *Curvularia* de HIE com acessos de *C. eragrostidis* e o isolado de *Bipolaris* (mudas do BAG da Embrapa Amazônia Oriental) com *B. spicifera* e *B. papendorffii*. Comparando os isolados de *Curvularia* com o de *Bipolaris* provenientes do estado Pará verificou-se a identidade de 74 a 85%.

Palavras-chave: prospecção, *Cochliobolus*, *Elaeis guineensis* Jacq.

Introdução

A palma de óleo ou dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) e seus híbridos resistentes ao Amarelecimento Fatal (*E. guineensis* e *E. Oleifera*) vem sendo amplamente plantados no Estado do



Pará. Como qualquer cultura em expansão também ocorre o aumento do aparecimento de doenças, e dentre elas a mancha foliar causada pelos fungos do gênero *Curvularia* e recentemente *Bipolaris*.

Durante a investigação de fitopatógenos associados à palma de óleo verificou-se a presença de fungos do gênero *Bipolaris* e *Curvularia*. Assim, objetivou-se identificar e caracterizar molecularmente estes via teste de PCR utilizando *primers* da região ITS, seguido de sequenciamento de DNA.

Material e Métodos

Amostras de estipe e folhas necrosadas de palma de óleo, provenientes de plantios dos municípios de Moju-PA, foram levadas para o Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental onde se procedeu ao isolamento fúngico.

Tecidos do interior do estipe e de folhas foram externamente esterilizados com álcool 70% e hipoclorito, plaqueados em ágar-água e, posteriormente, repicados para meio BDA. As placas foram mantidas em temperatura ambiente até o aparecimento da frutificação do fungo. Em seguida, o fungo foi analisado em microscopia óptica para sua identificação.

Posteriormente, foi feita a extração do DNA dos isolados fúngicos. Para isso, a colônia fúngica foi raspada da placa e, em seguida, realizou-se a extração utilizando o protocolo de Gibbs e Makenzie (1997). Para a realização do PCR utilizou-se 1µL do DNA fúngico, 10µL de tampão 5X, 5µL de MgCl₂, 0,5µL dos primers ITS4 e ITS5, 1µL de dNTP, 0,3µL de Taq polimerase e 31,7µL de água ultra pura. Foi feito 30 ciclos de 94°C/30s, 50°C/30s e 72°C/30s, seguido de 72°C por 5 minutos. O produto do PCR foi avaliado em gel de agarose 0,7%, corado com GelRed (Biotium) e fotodocumentado. Posteriormente, fez-se a limpeza do produto do PCR utilizando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega), seguido da quantificação de DNA. Os produtos de PCR da região ITS foram sequenciados pela empresa Helixxa base for Life. As sequências foram avaliadas utilizando os programas Blastn e ClustalW (THOMPSON et al., 1994). Vários acessos de *Curvularia* e *Bipolaris* disponíveis no GenBank foram utilizados no estudo de comparação da região ITS.

Resultados e Discussão

Foram amplificados fragmentos de DNA com cerca de 530pb, a partir dos dois isolados fúngicos da palma de óleo.

Verificou-se que um isolado de *Curvularia* proveniente da cultivar Tanzania x Ekona agrupou com vários acessos de *C. Affinis*, dois isolados de *Curvularia* de HIE com acessos de *C. eragrostidis* e

o isolado de *Bipolaris* (mudas do BAG da Embrapa Amazônia Oriental) com *B. spicifera* e *B. papendorfii*. Comparando os isolados de *Curvularia* com o de *Bipolaris* provenientes do estado Pará verificou-se a identidade de 74 a 85%.



Figura 1: *Bipolaris* sp. proveniente do viveiro do BAG de palma de óleo da Embrapa Amazônia Oriental: germinação de conídios nos dois pólos. Foto: Boari, A.J.

Por causa de seu impacto econômico, as espécies de *Cochliobolus* e se seus estados assexuados vêm tendo merecida atenção taxonômica (Berbee et al., 1999). Sapateiro (1959) classificou *Helminthosporium* à categoria genérica de *Bipolaris* e associado ao teleomorfo *Cochliobolus*.

Desde então, o teleomorfo *Cochliobolus* têm sido mais descrito em associação com *Bipolaris* (anamorfo) (Alcorn 1983a; Sivanesan 1987). Nelson (1960) foi primeiro que relatar *Curvularia intermedia* com *Cochliobolus intermedius*. Desde então, correram muitas associações entre *Cochliobolus* e *Curvularia* (Nelson 1964b; Sivanesan 1987). *Bipolaris* e *Curvularia* compartilham algumas semelhanças morfológicas (Sivanesan 1987), como por exemplo da germinação de um ou dois polos do conídio. Devido a estas semelhanças morfológicas, von Arx e Luttrell (1979) sugeriram que *Bipolaris* e *Curvularia* eram sinônimos. Entretanto, estudos flogenéticos realizados por Berbee et al. (1999) entre isolados de *Curvularia* e *Bipolaris* mostraram que estes não são monofilético. A separação dos *Bipolaris* e *Curvularia* é controversa (Sivanesan 1987; Alcorn 1988). É evidente que são necessárias novas abordagens para resolver a taxonomia de *Bipolaris* e *Curvularia* (Nakada et al.1994). Impressões digitais de DNA com sondas é um instrumento potencialmente útil para a



separação de espécies e identificação de *Bipolaris* e *Curvularia* quando acoplada com outra característica como a morfologia de conídios (Nakada et al.1994). Segundo Manamgoda et al. (2011), uma abordagem filogenética molecular é necessária para estabelecer um quadro taxonômico de *Cochliobolus* e seus anamorfos.

Conclusão

O estudo filogenético indica que há duas espécies de *Curvularia* entre os isolados obtidos no Estado do Pará, e que o isolado de *Bipolaris* possui maior identidade com duas espécies disponíveis no GenBank.

Agradecimentos

Ao FINEP, CNPq e a Agroindústria Marborges SA.

Referências Bibliográficas

- ALCORN, J.L. The taxonomy of Helminthosporium species. **Annual Review Phytopathology**, n.26, p. 37–56, 1988.
- BERBEE, M.L.; PIRSEYEDI, M.; HUBBARD, S. Cochliobolus phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. **Mycologia**, n. 91, p.964–977, 1999.
- 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, p. 9-16, 1997.
- MANAMGODA, D.M.; CAI, L.; BAHKALI, A.H.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K.D. Cochliobolus: na overview and currente status of species. **Fungal Diversity**, n. 51, p. 3-42, 2011.
- NAKADA, M.; TANAKA, C.; TSUNEWAKI K.; TSUDA, M. RFLP analysis for species separation in the genera *Bipolaris* and *Curvularia*. **Mycoscience**, n. 35, p. 271–278, 1994.
- SIVANESAN, A. Graminicolous species of bipolaris, curvularia, drechslera, exserohilum and their teleomorphs. **Mycology**, n. 158, p.1–261, 1987.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.22, p.4673-4680, 1994.