



IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Pseudallescheria boydii* EM PALMA DE ÓLEO

Alessandra de Jesus Boari¹, Célia Regina Tremacoldi², Manoel Luiz Andrade da Silva³, Clenilda Tolentino Bento da Silva⁴, Rozangela Souza da Silva⁵, Taise Pereira Carvalho⁶

¹ Pesquisadora Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, ajboari@cpatu.embrapa.br

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

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

⁴ Assistente Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, monoel@hotmail.com

⁵ Bolsista ITI Universidade Federal Rural da Amazônia, rozsilva@hotmail.com

⁶ Bolsista ITI Universidade Federal Rural da Amazônia, rozsilva@hotmail.com

Resumo: A cultura da palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) vem se expandindo rapidamente no Estado do Pará. Durante os testes de investigação da principal doença da cultura, o amarelecimento fatal, verificou-se a presença de alguns fungos provenientes de plantas doentes e sem sintoma. Assim, o presente trabalho teve o objetivo de identificar uma dessas espécies de fungos por meio do PCR seguido do sequenciamento nucleotídico. Para isso, tecidos do interior do estipe e raízes foram plaqueados em meio ágar-água, e posteriormente, os fungos foram repicados para meio BDA. As placas contendo a espécie selecionada foram mantidas 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, onde se verificou identidade de 98 a 100% com vários acessos de *Pseudallescheria boydii*, inclusive aqueles que têm efeito fungistático contra fungos fitopatogênicos. Os isolados foram mantidos na micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental e estão sendo estudados quanto ao seu potencial uso no controle biológico de fungos fitopatogênicos. Este foi o primeiro relato de *P. boydii* em palma.

Palavras-chave: banco de dados, fungo, *Elaeis guineensis*

Introdução

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma palmeira originária da Costa Ocidental da África (Golfo da Guiné). No Brasil, foi introduzido no século 17 pelos escravos e adaptou-se bem ao clima tropical úmido (TRINDADE et al., 2005).



Os principais produtos do dendezeiro são os óleos de palma e de palmiste, extraídos industrialmente da polpa do fruto e da amêndoa, respectivamente. Essa cultura vem assumindo, cada vez mais, maior importância, graças à crescente demanda por óleos vegetais, para a área alimentícia, medicinal, cosmética, industrial e, principalmente, para o biodiesel. As características especiais desse produto conferem-lhe grande versatilidade, o que possibilita sua aceitação por indústrias mundiais diversas (TRINDADE et al., 2005).

Essa palmeira é a oleaginosa de maior produtividade conhecida no mundo, permitindo extrair entre 4 e 5 toneladas de óleo de palma (da polpa dos frutos) e de 1 a 1,5 tonelada de óleo de palmiste (da amêndoa) por hectare/ano (MÜLLER; ALVES, 1998).

Entretanto, algumas doenças podem reduzir sua produtividade como as causadas por fitopatógenos e o Amarelecimento Fatal (AF), que ainda tem causa desconhecida. Durante a investigação de fitopatógenos associados ao AF verificou-se a presença de um fungo diferente dos fitopatogênicos comumente detectados na palma de óleo. Assim, objetivou-se identificar este fungo via teste de PCR seguido de sequenciamento de DNA.

Material e Métodos

Amostras de estipes e raízes de palma de óleo com e sem sintomas de AF, provenientes de plantios no município 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 raízes 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 de 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, 10 µL 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 sequencias foram avaliadas utilizando os programas Blastn (Altschul et al., 1997) e ClustalW (Thompson et al., 1994)

Resultados e Discussão

Foram amplificados fragmentos de DNA de cerca de 590pb a partir de isolados fúngicos de palma de óleo.

Os quatro isolados obtidos de três plantas com AF e um de planta sem AF são da espécie *Pseudallescheria boydii* (Shear) McGinnis, A.A. Padhye & Ajello 1982, fase teleomorfa, segundo a análise das sequencias nucleotídicas pelo programa Blast. Verificou-se identidade de 98 a 100% com os acessos de *P. boydii* disponíveis no GenBank. Entretanto, os isolados obtidos em BDA são da fase anamorfa, *Scedosporium apiospermum* (Sacc.) Sacc., pois foram observados conídios unicelulares, alongados (6 x 12 x 3,5 – 6,9 µm) e lisos variando de hialino ou marrom (Figura 1).



Figura 1: Conídios de *Pseudallescheria boydii* isolados de plantas de palma de óleo. Foto: A.J. Boari.

Entre os cinco isolados de palma de óleo verificou-se identidade de 99 a 100% com acessos disponíveis no GenBank. *P. boydii* pertence à divisão Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Microascales e família Microascaceae.

Segundo K et AL. (2010) os isolados de *P. boydii* provenientes de solos supressivos produziram substância fungistática. Quatro isolados de fungos foram capazes de usar tecidos vegetais para multiplicação no solo e reduzir a doença pinta preta da couve-flor causada por *Alternaria*



brassicicola, e inibir a germinação dos seus conídios. Os autores verificaram que a substância fungistática, de peso molecular entre 500 e 1000 é muito estável sob alta temperatura e pH alto ou baixo. Estes estudos sugeriram que *P. boydii* é um fungo saprófita muito competitivo, o que pode explicar a ocorrência generalizada deste agente patogênico humano no solo.

Os isolados obtidos em plantio de palma de óleo foram armazenados na micoteca da Embrapa Amazônia Oriental e serão avaliados quanto ao seu potencial uso no controle de fitopatógenos.

Conclusão

O fungo isolado de raízes e estipes de plantas de palma de óleo com e sem sintomas de AF é *Pseudallescheria boydii*.

Agradecimentos

Ao FINEP e a Agroindústria Marborges.

Referências Bibliográficas

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; BARRET, A.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acid Research**, Cambridge, v.25, p.3389-3402, 1997.

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.

KO, W.H.; TSOU, Y.J.; JU, Y.M; HSIEH, H.M; ANN, P.J. Production of a fungistatic substance by *Pseudallescheria boydii* isolated from soil amended with vegetable tissues and its significance. **Mycopathologia**, v.169, p.125-131, 2010.

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.

TRINDADE, D. R.; POLTRONIERI, L. S.; FURLAN JÚNIOR, J. Abordagem sobre o estado atual das pesquisas para a identificação do agente causal do amarelecimento fatal do dendezeiro. In: POLTRONIERI, L. S.; TRINDADE, D. R.; SANTOS, I. P. (Ed.). **Pragas e doenças de cultivos amazônicos**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2005. p. 439-450.