

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



18º Seminário de Iniciação Científica e 2º Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental

ANNAIS 2014

12 a 14 de agosto

Embrapa
Belém, PA
2014



IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Lasiodiplodia pseudotheobromae* ASSOCIADO AO BACURIZEIRO

Sandra Valéria Dias Cardoso¹, Alessandra Keiko Nakasone Ishida², Alessandra de Jesus Boari³, Crislayne Azevedo Almeida⁴

¹Bolsista de Macroprograma, Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, sandravaléria_cardoso@hotmail.com

²Pesquisadora Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, alessandra.ishida@embrapa.br

³Pesquisadora Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, alessandra.boari@embrapa.br

⁴Estagiária Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, crysazalmeida@hotmail.com

Resumo: O bacurizeiro é uma espécie frutífera tipicamente tropical, com alto potencial comercial, encontrada em todos os estados da região Norte e nos estados de Mato Grosso, Maranhão e Piauí, sendo o clima dessas regiões favorável para diversas doenças fúngicas. No entanto, ainda há poucas informações sobre as doenças que ocorrem na cultura e seus devidos danos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo identificar uma espécie do gênero *Lasiodiplodia* associada à seca descendente de plantas de bacurizeiro por meio do PCR, seguido do sequenciamento nucleotídico. O isolado de *Lasiodiplodia* sp. foi cultivado em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) por sete dias, sendo em seguida realizada a extração de DNA e PCR utilizando-se os primers ITS4 e ITS5. Os produtos do PCR foram sequenciados e avaliados via programas Blastn, ClustalW e Mega 5.0, onde se verificou identidade de 100% com vários acessos de *Lasiodiplodia pseudotheobromae*.

Palavras-chave: *Platonia insignis*, primers ITS4 e ITS5

Introdução

Espécies do gênero *Lasiodiplodia* são capazes de causar diferentes sintomas nas plantas infectadas, incluindo a seca descendente, cancro e lesões em diferentes partes da planta, além de incitar a morte de mudas e enxertos de diversos hospedeiros (FREIRE et al., 2004). Além da variada gama de hospedeiros, várias espécies de *Lasiodiplodia* são associadas às espécies frutíferas. Na região Nordeste do Brasil, Marques et al. (2013) identificaram sete espécies de *Lasiodiplodia* associadas a morte descendente e podridão peduncular de frutos de manga.

O bacurizeiro é uma espécie arbórea de médio a grande porte com aproveitamento frutífero, madeireiro e energético. Seu centro de origem é a Amazônia Oriental, sendo encontrado em todos os estados da região Norte do país e nos estados de Mato Grosso, Maranhão e Piauí (MENEZES et al., 2011). No entanto, existem poucas informações sobre as doenças que ocorrem na cultura e seus danos.



Assim, o presente trabalho teve como objetivo, identificar uma espécie do gênero *Lasiodiplodia* associada à seca descendente de plantas de bacurizeiro por meio do PCR, seguido do sequenciamento nucleotídico.

Material e Métodos

Utilizou-se neste trabalho o isolado de *Lasiodiplodia* sp., obtido de plantas apresentando sintomas de seca descendente, provenientes do Campo Experimental da Embrapa Amazônia Oriental, o qual se encontra preservado em óleo mineral no Laboratório de Fitopatologia.

Para a extração do DNA, utilizou-se uma colônia do isolado fúngico cultivada em meio batata-dextrose-ágar (BDA) por sete dias. A extração de DNA foi realizada utilizando-se o protocolo de Gibbs e Mackenzie (1997). As reações de PCR foram elaboradas em um volume total de 50 µL contendo 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. As condições de amplificação foram: 30 ciclos de 30 seg. a 94°C, 30 seg. a 50°C e 30 seg. a 72°C, seguido de 5 min. a 72°C. O produto do PCR foi avaliado em gel de agarose 0,8%, 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, ClustalW e Mega 5.0.

Resultados e Discussão

Foram amplificados fragmentos de DNA de cerca de 450 pb, a partir do isolado fúngico obtido do bacurizeiro. O isolado de *Lasiodiplodia* sp. associado ao sintoma de seca descendente, apresentou identidade de 100% com acessos de *Lasiodiplodia pseudotheobromae* Phillips, Alves & Crous disponíveis no GenBank. Segundo Marques et al. (2013), atualmente são reconhecidas 17 espécies de *Lasiodiplodia*. Os mesmos autores identificaram sete espécies de *Lasiodiplodia* associadas à morte descendente e podridão pedicular de frutos de manga na região Nordeste do Brasil, dentre elas, *L. pseudotheobromae*. Santos et al. (2013) estudando a virulência de cinco espécies de *Lasiodiplodia* (*L. brasiliense*, *L. hormozganensis*, *L. iraniensis*, *L. pseudotheobromae* e *L. theobromae*) obtidas de manga, verificaram que todas as espécies foram patogênicas a plantas de maracujá, goiaba e citros, demonstrando a não especificidade destas espécies.



O isolado de *L. pseudotheobromae* se encontra preservado em óleo mineral no Laboratório de Fitopatologia de Embrapa Amazônia Oriental para posterior caracterização morfológica da espécie. A etiologia da doença é crucial para estudos epidemiológicos, importância das espécies, bem como para a elaboração de estratégias de manejo efetivas para cada patógeno (MARQUES et al., 2013).

Conclusão

O isolado de *Lasiodiplodia* sp. associado à seca descendente do bacurizeiro é da espécie *Lasiodiplodia pseudotheobromae*.

Agradecimentos

À Embrapa pelo financiamento do projeto de pesquisa “Melhoramento genético do bacurizeiro, camucamuzeiro, muricizeiro e cajazeira do Norte” (02.11.02.001.00.00).

Referências Bibliográficas

- FREIRE, F. C. O.; VIANA, F. M. P.; CARDOSO, J. E.; SANTOS, A. A. **Novos hospedeiros do fungo *Lasiodiplodia theobromae* no Estado do Ceará**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. 6 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado técnico, 91).
- 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.
- MARQUES, M. W.; LIMA, N. B.; MORAIS JUNIOR, M. A.; BARBOSA, M. A. G.; SOUZA, B. O.; MICHEREFF, S. J.; PHILLIPS, A. J. L.; CÂMARA, M. P. S. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61, p. 181–193, 2013.
- MENEZES, A. J. E. A.; HOMMA, A. K. O.; SCHÖFFEL, E. R.; FILGUEIRAS, G. C. A comercialização do fruto de bacuri pela agricultura familiar no Nordeste paraense e ilha de Marajó, no Pará. In: CONGRESSO REGIONAL DA SOBER, 6., 2011, Petrolina. **Nordeste: desafios do desenvolvimento para a inclusão social**. Petrolina: Embrapa Semiárido: FACAPE: UNIVASF: Instituto Federal do Sertão Pernambucano, 2011.
- SANTOS, C. M. A.; TSUJI, S. S.; SILVA, M. A.; SILVA, S. L.; TEIXEIRA, Y. R.; MICHEREFF, S. J. Influência da umidade e da gama de hospedeiros na virulência de espécies de *Lasiodiplodia* associadas com a podridão peduncular da manga. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 13., 2013, Recife. **Anais...** Recife: UFRPE, 2013.