

Análise da Variabilidade Genética dos Isolados de *Thielaviopsis paradoxa* e Detecção no Solo por PCR em Tempo Real

André Luiz Pinto Santos¹; Leandro Eugenio Cardamone Diniz²

Resumo

A resinose é uma doença conhecida nas áreas produtoras de palmeiras no mundo, incluindo o coqueiro, sendo causada pelo fungo *Thielaviopsis paradoxa* (De Seyn) Höhl, patogênico de plantas, que vem causando prejuízos na produção de importantes culturas. Já foram relatadas doenças relacionadas com a infecção por *T. paradoxa* em diversas espécies de plantas tropicais como abacaxi (*Ananas comosus*), cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), bananeira (*Musa* sp.), coqueiro (*Cocos nucifera* L.) e outras palmeiras da família Arecaceae. Apesar da relevância desta doença, praticamente não foram encontrados na literatura estudos sobre a variabilidade genética de *T. paradoxa* com a utilização de marcadores moleculares. Por isso, o objetivo deste trabalho foi de analisar através do uso de marcadores do tipo RAPD, a diversidade genotípica dos isolados coletados em diferentes hospedeiros em algumas regiões do estado de Sergipe comparando aos isolados coletados na Bahia e Alagoas. As atividades foram desenvolvidas no Laboratório de Fitopatologia e no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Tabuleiros Costeiros (CPATC). Para esta análise foram utilizados 15 isolados, coletados nos Estados de Sergipe, Bahia e Alagoas, pertencentes à coleção de *T. paradoxa* mantidas pela Embrapa CPATC. A análise com 15 primers RAPD geraram um total de 111 fragmentos amplificados, dos quais 33,33% foram monomórficos e 66,67% de fragmentos polimórficos, o que representa um número médio de 4,9 fragmentos polimórficos por primer selecionado. Foi possível identificar a formação de quatro grupos com três amostras isoladas. O primeiro grupo formado pelos isolados TC041 e TC036 são amostras coletas de palmeira imperial e palmeira azul coletadas em Alagoas e Sergipe, respectivamente. Apesar da distância geográfica, estes isolados apresentaram uma similaridade genética de

¹ Graduando em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, andreluiz_04@yahoo.com.br.

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

cerca de 70%, indicando uma proximidade genética relativamente grande. O segundo grupo foi formado pelos isolados TC012, TC004, TC005 e TC027, todos coletados em Sergipe na região do Platô de Neópolis, nas Fazendas H. Dantas e Saman. 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 uma mesma fonte de inóculo nestas áreas. 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.

Palavras-chave: Coco, diversidade, RAPD, resinose.

Introdução

A resinose é uma doença conhecida nas áreas produtoras de palmeiras no mundo, incluindo o coqueiro, sendo causada pelo fungo *Thielaviopsis paradoxa* (De Seyn) Höllh, anamorfo do ascomiceto *Ceratocystis paradoxa* (Dade), fungo filamentosso, patogênico de plantas, que vem causando prejuízos na produção de importantes culturas. Já foram relatadas doenças relacionadas com a infecção por *T. paradoxa* em diversas espécies de plantas tropicais como abacaxi (*Ananas comosus*), cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), bananeira (*Musa* sp.), coqueiro (*Cocos nucifera* L.) e outras palmeiras da família Arecaceae. O agente pode estar presente no solo, nos insetos, ou ainda em ferramentas usadas na colheita e/ou na erradicação das plantas doentes, aumentando a chance de infecção da planta através de ferimentos (MOURA et al., 2007; FERREIRA; MICHEREFF FILHO, 2007). Nas áreas produtoras de coco no Brasil esta doença foi registrada em 2004 e, desde então, tem se disseminado gradualmente para outras áreas de produção (MOURA et al., 2007). Nesta cultura, o fungo também causa a podridão-negra-do-fruto ou podridão-do-fruto-maduro provocando perdas devido à queda prematura dos frutos jovens e também dos frutos mais desenvolvidos (HERNÁNDEZ; MENDES, 2009). Este fungo também pode ser encontrado em palmeiras ornamentais, muito utilizadas no Brasil e que podem se tornar verdadeiras fontes de inóculos.

Dentre os sintomas associadas ao fungo, destaca-se a resinose do coqueiro como sendo uma importante doença que já atinge grandes áreas da cocoicultura. O coqueiro é tido como uma das plantas cultivadas de maior importância no mundo,

especialmente em algumas regiões, onde se constitui na principal fonte alimentar e de renda para a população (FERREIRA, 2009). No Brasil, esta doença foi denominada resinose, pela observação da sintomatologia evidenciada pela exsudação da seiva que escorre pelo estipe do coqueiro (WARWICK et al., 2004). A situação é preocupante, pois a disseminação da resinose está ocorrendo rapidamente, aumentando o número de focos, e de coqueiros infectados a cada ano no Nordeste e Norte do Brasil (MOURA et al., 2007). Hoje a resinose pode ser considerada uma das mais importantes doenças do coqueiro no Brasil, pelos danos que provoca nas plantas e na produção. Atualmente, apenas algumas medidas com baixa eficácia são aplicadas as plantas infectadas.

Considerando que, apesar da relevância desta doença, praticamente não foram encontrados na literatura estudos sobre a variabilidade genética de *T. paradoxa* com a utilização de marcadores moleculares, o objetivo do presente estudo foi o de analisar através do uso de marcadores do tipo RAPD, a diversidade genotípica dos isolados coletados em diferentes hospedeiros em algumas regiões do estado de Sergipe comparando aos isolados coletados na Bahia e Alagoas.

Material e Métodos

As atividades deste trabalho foram desenvolvidas no Laboratório de Fitopatologia e no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Tabuleiros Costeiros (CPATC). Para esta análise foram selecionados 15 isolados (Tabela 1), coletados nos Estados de Sergipe, Bahia e Alagoas, pertencentes à coleção de *Thielaviopsis paradoxa* mantidas pela Embrapa CPATC. Estas amostras foram repicadas em meio BDA líquido onde cresceram submetidas a agitação, por 4 dias. Em seguida, a massa micelial passou por filtração a vácuo para retirada do meio, sendo congelado em seguida. Cerca de 2 g. do material foi macerado 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. Elsolados de *Thielaviopsis paradoxa* coletados nos em Sergipe, Alagoas e Bahia.

Isolado	Hospedeiro (meio)	Origem
TC 003	Coqueiro(estipe)	H. Dantas, Platô de Neópolis-SE
TC 004	Coqueiro(estipe)	SAMAN, Platô de Neópolis-SE
TC 005	Inseto1Rp	H. Dantas, Platô de Neópolis-SE
TC 006	Inseto1Rp	Caipi Velho, São Cristovão-SE
TC 012	Inseto2Rp	H. Dantas, Platô de Neópolis-SE
TC 013	Inseto2Rp	Caipi Velho, São Cristovão-SE
TC 023	Coqueiro(estipe)	Piaçabuçu-AL
TC 027	Coqueiro(estipe)	H. Dantas, Platô de Neópolis-SE
TC 034	Coqueiro(estipe)	Conde, BA
TC 036	Palmeira Azul(raiz)	Caipi Velho, São Cristovão-SE
TC 040	Solo	Caipi Velho, São Cristovão-SE
TC 041	Palmeira Imperial(raiz)	Boca da Mata, AL
TC 042	Planta Ornamental(raiz)	Caipi Velho, São Cristovão-SE
TC 045	Solo1	Aruana, Aracaju-SE
TC 046	Solo2	Aruana, Aracaju-SE

Uma vez quantificada as amostras, as mesmas foram submetidas a amplificação por PCR utilizando inicialmente 15 primers de RAPD (Tabela 2) sendo cada reação feita em volume final de 20 μL , sendo: 13,4 μL de H₂O ultra pura, 2 μL de tampão, 0,4 μL de dNTP, 2 μL de cada primer, 0,2 μL de Taq DNA polimerase (NeoBio[®]) e 50 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador Axygen[®] e o programa utilizado constituiu de uma desnaturação inicial a 96°C por 5 min, seguido por 45 ciclos de 95°C por 1 min, 36°C por 1 min e 72°C por 1 min com uma extensão final a 72°C por 10 min. O produto destas reações foi separado por eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TBE 1X, utilizando o marcador de 1 Kb (Neobio), e após coloração em brometo de etídeo (10 mg/ μL) os géis foram expostos a luz ultravioleta e fotodocumentados com o aparelho L-Pix HE (Loccus[®]).

Tabela 2. Bandas geradas a partir de 15 primers de RAPD.

Primer	Sequencia 5' → 3'	Nº total de bandas	Nº de bandas polimórficas	Polimorfismo (%)
OPA11	CAATCGCCGT	6	5	83,3
OPA13	ATGGGTACCG	1	0	0
OPA15	ATGGGTACCG	6	6	100
OPA19	ATGGGTACCG	6	6	100
OPB11	ATGGGTACCG	6	6	100
OPK20	ATGGGTACCG	4	4	100
OPN20	ATGGGTACCG	8	8	100
OPT01	ATGGGTACCG	3	3	100
OPT02	ATGGGTACCG	2	2	100
OPT04	ATGGGTACCG	4	4	100
OPT12	ATGGGTACCG	6	6	100
OPT14	ATGGGTACCG	3	3	100
OPW03	ATGGGTACCG	6	5	83,3
OPW08	ATGGGTACCG	5	5	100
OPX03	ATGGGTACCG	11	11	100

Resultados e Discussão

A análise inicial com os 15 primers de RAPD geraram um total de 111 fragmentos amplificados (Tabela 2), dos quais 33,33% foram monomórficos e 66,67% de fragmentos polimórficos, o que representa um número médio de 4,9 fragmentos polimórficos por primer selecionado.

Foi possível identificar a formação de quatro grupos com três amostras isoladas. O primeiro grupo formado pelos isolados TC041 e TC036 são amostras coletadas de palmeira imperial e palmeira azul coletadas em Alagoas e Sergipe, respectivamente. Apesar da distância geográfica, estes isolados apresentaram uma similaridade genética de cerca de 70%, indicando uma proximidade genética relativamente grande (Figura 1). O segundo grupo foi formado pelos isolados TC012, TC004, TC005 e TC027, todos coletados em Sergipe na região do Platô de Neópolis, nas Fazendas H. Dantas e Saman. 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 uma mesma fonte de inóculo nestas áreas.

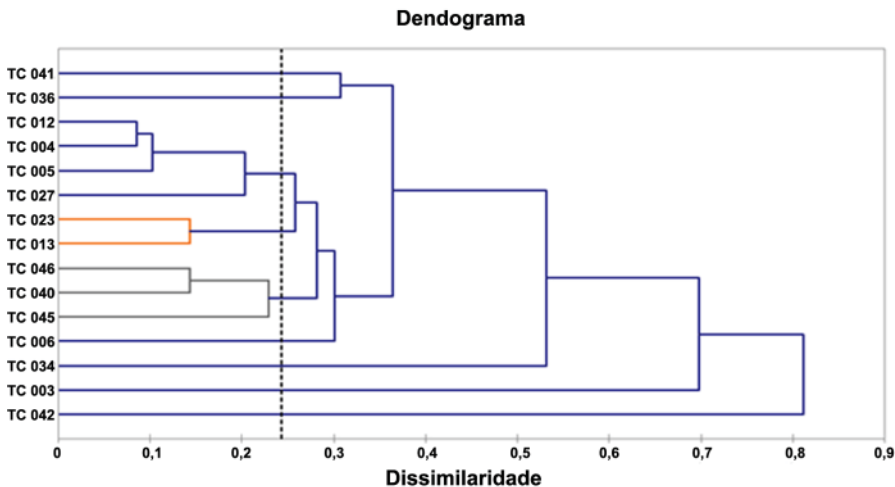


Figura 1. Dendrograma de dissimilaridade genética entre as 15 amostras avaliadas.

O terceiro grupo foi formado por apenas 2 isolados (TC013 e TC023) e apresentou uma similaridade genética muito alta, em torno de 86%. Estes isolados são de áreas relativamente distantes, sendo a primeira coletada em insetos encontrados na Fazenda CaiPI Velho em 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 da Fazenda CaiPI Velho apresentou similaridade alta com quase todos os isolados obtidos no Estado de Sergipe (entre 70 e 81%), e deve ser melhor investigado.

O isolado TC006 coletado em São Cristóvão apresentou boa similaridade genética com os isolados TC013 e TC040 também coletados na mesma região (cerca de 73%). Já os isolados TC003 e TC042, coletados na Fazenda H. Dantas e CaiPI Velho, respectivamente, apresentaram alta dissimilaridade genética com todas as outras amostras, o que pode indicar isolados oriundos de regiões muito distantes, ou ainda que estes estão indevidamente classificados com *T. paradoxa*. Reforçando a necessidade de sequenciar as regiões ITS e 5,8S para melhor classificação destes isolados e comparação entre os diversos isolados da coleção mantida pela Embrapa Tabuleiros Costeiros.

A maior parte dos trabalhos publicados sobre *Thielaviopsis* sp. se concentra na espécie *T. basicola*. A importância dos estudos com *T. paradoxa* a fim de se conhecer o grau de diversidade genética e a partir desta análise entender um

pouco mais sobre o fungo e sua variabilidade, poderá auxiliar os estudos sobre patogenicidade, dispersão e controle. Até o presente momento, poucos trabalhos foram encontrados utilizando *T. paradoxa*, e geralmente associado a abacaxi como o de Costa Neto (2002) que identifica a presença deste 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.

Conclusão

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.

Agradecimentos

Este trabalho foi sendo feito graças ao apoio da Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC/SE), CNPq, Embrapa Tabuleiros Costeiros e Universidade Tiradentes/ITP.

Referências

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

FERREIRA, J. M. S.; MICHEREFF FILHO, M. Pragas e métodos de controle. In: FONTES, H. R.; FERREIRA, J. M. S.; SIQUEIRA, L. A. (Ed.). **A cultura do Coqueiro.** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2007. (Sistemas de Produção 1). Disponível e: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Coco/ACulturadoCoqueiro/pragas.htm>> Acesso em: 13 de Julho de 2012.

FERREIRA, J. M. S. Pragas e métodos de controle ajustados à baixa capacidade de investimento dos pequenos produtores rurais. In: CINTRA, F. L. D.; FONTES, H. R.; PASSOS, E. E. M. et al. (Ed.). **Fundamentos tecnológicos para a revitalização das áreas cultivadas com coqueiro gigante no Nordeste do Brasil**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009. 233 p. p.191-218.

CINTRA, F. L. D.; FONTES, H. R.; PASSOS, E. E. M.; FERREIRA, J. M. S. (Ed.). **Fundamentos tecnológicos para a revitalização das áreas cultivadas com coqueiro gigante no nordeste do Brasil**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009. p. 191-218.

ROLLEMBERG, H. F.; PROCÓPIO, S. de O. **Resinose do coqueiro**: como identificar e manejar. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2007. 126 p.

MOURA, J. I. L.; VIEIRA, S. D.; BEZERRA, J. L. Resinose do Coqueiro. Cruzeiro, DF: CEPLAC, [2007]. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/RESINOSE%20DO%20COQUEIRO.pdf>> . Acesso em: 10 de Julho de 2012.

Warwick, D. R. N.; Ferreira, J. M. S.; Passos, E. E. M. Ocorrência de resinose do estipe do coqueiro em Sergipe provocada por Chalara paradoxa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 29, p.171, 2004.