

Diversidade Microbiana da Amazônia

Vol. 2

Editores:

Oliveira L.A., Bentes J.L.S., Jesus M.A., Rocha L.C., Fernandes
O.C., Andrade S.L., Souza A.Q.L.



Copyright © 2018, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

PRESIDENTE DA REPÚBLICA

Michel Temer

MINISTRO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES

Gilberto Kassab

DIRETOR DO INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA

Luiz Renato de França

EDITORA INPA

Editor: Mario Cohn-Haft. **Produção editorial:** Rodrigo Verçosa, Shirley Ribeiro Cavalcante, Tito Fernandes. **Bolsistas:** Brenda Costa, Alan Alves, Mariana Franco de Sá e Sabrina Trindade.

FICHA CATALOGRÁFICA

D618 Diversidade microbiana da Amazônia Vol.2 /Editor L. A. Oliveira... [et.al.].--
Manaus: Editora INPA, 2017.
348.: il. color.

ISBN 978-85-211-0175-8

1. Microbiologia - Amazônia. 2. Diversidade. I. Oliveira, L. A.

CDD 576.9811



Editora do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Av. André Araújo, 2936 – Caixa Postal 2223
Cep : 69067-375 Manaus – AM, Brasil
Fax : 55 (92) 3642-3438 Tel: 55 (92) 3643-3223
www.inpa.gov.br e-mail: editora@inpa.gov.br

Diferenciação genética entre as formas homotáticas e heterotáticas de *Fusarium decemcellulare* por meio de marcadores moleculares

Sousa T.F.¹, Queiroz C.A.de.², Sousa S.B.de², Silva G.F.⁴

¹Universidade do Estado do Amazonas – UEA; ²Universidade Federal do Amazonas –UFAM;
³Embrapa Amazônia Ocidental, Laboratório de Biologia Molecular. gilvan.silva@embrapa.br

Resumo

Fusarium decemcellulare já foi reportado em mais de 80 diferentes espécies vegetais em regiões tropicais e subtropicais, sendo identificadas quanto à reprodução sexuada em: homotático (autofértil) e heterotático. As diferenças filogenéticas e no número de ascósporos formados entre homotáticos e heterotáticos indicam a possível ocorrência de um complexo de espécies. Contudo, até o momento as principais formas de diferenciação estão relacionadas a uma laboriosa caracterização do número de ascósporos ou identificação molecular de sistema de *mating type*. Deste modo, este trabalho teve como objetivo avaliar a habilidade dos marcadores moleculares ISSR e ERIC-PCR em diferenciar as formas homotáticas e heterotáticas. Foram analisados 20 isolados, sendo 10 heterotáticos e 10 homotáticos com base em três marcadores ISSR que geraram 109 loci polimórficos e ERIC-PCR com 41. Quando comparados com ambos marcadores, a análise de variância molecular (AMOVA) indica que a maior variação ocorre dentro (75%) do que entre os grupos (25%). Embora os dois marcadores apresentem elevado grau de polimorfismo, o marcador ERIC-PCR foi mais eficaz em separar essas duas populações.

Palavras chave: Diferenciação genética, *mating-type*, ISSR, ERIC-PCR.

Introdução

De ocorrência em regiões tropicais e subtropicais, *F. decemcellulare* já foi reportado em espécies de importância econômica como *Mangifera indica* (manga), *Theobroma cacao* (cacau) e *Piper nigrum* (pimenta-do-reino). Em *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaranazeiro) é o agente causal do superbrotamento que pode provocar perdas de até 100% da produção de guaraná. A crescente incidência da doença no estado do Amazonas vem se tornando um sério problema, contribuindo para a baixa produtividade da cultura (Leslie, Summerell, 2006; Araújo *et al.*, 2007).

O sistema de *mating-type* em *F. decemcellulare* consiste de um locus *MAT* e dois idiomorfos, *MAT-1* e *MAT-2*, sequências não relacionadas presentes na mesma posição do cromossomo. Os indivíduos que apresentam somente *MAT-1* ou *MAT-2* são chamados de heterotáticos, já os que apresentam os dois no mesmo genoma são denominados de

homotáticos. A existência desses idiomorfos sugere que a reprodução de *F. decemcellulare* pode ser mista (sexuada e assexuada). No que concerne à reprodução sexuada, a forma homotática é capaz de fazer autofecundação, enquanto que na forma heterotática o cruzamento é feito somente por meio de encontro entre isolados que possuem *mating-types* distintos, tendo como consequência o aumento da diversidade genética da população (Alexander, Carmichael, 1973; Ferreira, 2005; Leslie, Summerell, 2006, Guimarães, 2013).

A diferença na patogenicidade entre os isolados homotáticos e heterotáticos foi relatada por Ford *et al.* (1967) e Thomas e Snyder (1970), que usando isolados de cacaueteiro, observaram que a forma homotática não causa doença, diferentemente da heterotática.

Guimarães (2013), com base em sequências parciais dos genes *tef-1 α* , *rpb2*, *act1* e da região ITS-LSU de isolados obtidos de sintomas como galha-floral e superbrotamento de mangueira, cacaueteiro, espatódea, pimenta-do-reino, guaranazeiro e de substratos como serapilheira e solo, mostrou a ocorrência de duas espécies filogenéticas uma homotática e outra heterotática, indicando a existência de um complexo de espécies em *F. decemcellulare*.

Este trabalho utilizou os marcadores ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*) e ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*), caracterizado como pequenas unidades repetitivas de 127 pb contendo região central altamente conservada com repetições invertidas de 40 pb (Hulto *et al.*, 1991). O uso de ambas as técnicas em *F. decemcellulare* permitiu identificar variações dentro e entre as formas homotáticas e heterotáticas, contribuindo assim para um maior entendimento da genética e evolução entre os dois grupos.

Material e Métodos

Foram utilizados 20 isolados de *F. decemcellulare*, sendo 10 homotáticos e 10 heterotáticos oriundos de diferentes locais de coleta e hospedeiros (Tabela 1).

Os isolados monospóricos foram repicados e colocados em frascos com 50 mL de meio de cultura BD (batata, dextrose) sob agitação 125 rpm e temperatura de 25 °C por quatro dias para obtenção de massa micelial, que foi filtrada e seca para posterior extração de ácido nucléico. A extração do DNA foi realizada usando protocolo de extração com o detergente catiônico CTAB 2% (Doyle e Doyle, 1987).

Foram utilizados dois marcadores moleculares para analisar a variação genética entre isolados homotáticos e heterotáticos de *F. decemcellulare*. Para o marcador

molecular ERIC-PCR foram utilizados os *primers* ERIC 1R e ERIC2 conforme descrito por Queiroz et al (2016) e para o marcador ISSR os *primers* utilizados foram UBC836, UBC 840 e UBC 842 (Tabela 2). As reações de PCR foram realizadas com volume de 20µL, utilizando 50 ng de DNA; tampão 1X com 1,5 mM de MgCl₂; 0,5mM de dNTPs; 1U de Taq DNA Polimerase e 0,25 µM de *primer*. As condições para amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, 40 ciclos de 94 °C por 30 seg.; a temperatura de anelamento variou de acordo com o primer utilizado (Tabela 2), extensão de 72 °C por 2 min, seguido pela extensão final de 72°C por 10 minutos.

Tabela 1. Lista de isolados de *Fusarium decemcellulare* de acordo com *mating-type*, local de coleta e hospedeiro ou substrato

ISOLADO	MATING-TYPE	LOCALIDADE	SUBSTRATO
CML 0038	Ho	Belém/PA	Solo
CML 0800	Ho	Marrocos	Nd
CML 2241	Ho	Uruçuca/Bahia	Galha floral/Cacaueiro
CML 2245	Ho	Lavras/MG	<i>Spathodea campanulata</i> / Espatódea
CML 2246	Ho	Lavras/MG	<i>Spathodea campanulata</i> / Espatódea
CML 2248	Ho	Santo Amaro/BA	<i>Theobroma cacao</i>
CML 2249	Ho	Bahia	<i>Piper nigrum</i> / Pimenta-do-reino
CML 2250	Ho	Bahia	<i>Piper nigrum</i> / Pimenta-do-reino
CML 2370	Ho	Igrapiúma/BA	Serra pilheira
NRRL 13412	Ho	República Dominicana	Cafeeiro
FDC 200	Mat 2	Maués/AM	<i>Paullinia cupana</i>
FDC 193	Mat 2	Maués/AM	<i>Paullinia cupana</i>
FDC 307	Mat 1	Urucará/AM	<i>Paullinia cupana</i>
FDC 272	Mat 1	Itapiranga/AM	<i>Paullinia cupana</i>
CML 2251	Mat 1	Ponta Grossa/AM	<i>Theobroma cacao</i>
CML 2271	Mat 1	Tecomán, México	<i>Mangifera indica</i>
CML 2255	Mat 2	Uricurituba/AM	<i>Mangifera indica</i>
CML 2332	Mat 2	Ilhéus/BA	<i>Theobroma cacao</i>
CML 2409	Mat 1	Manaus/AM	<i>Paullinia cupana</i>
FDC 356	Mat 2	Rio Preto da Eva	<i>Paullinia cupana</i>

CML: Coleção Micológica de Lavras, NRRL: National Center for Agricultural Utilization Research (USDA), FDC: Coleção de *Fusarium decemcellulare* da Embrapa Amazônia Ocidental, Ho: homotáticos, Mat 1: *mating* 1 e Mat 2: *mating* 2

Os dados foram analisados usando uma matriz binária, onde (1) indica a presença e (0) a ausência do produto da amplificação para ambos marcadores aqui chamados de loci ou bandas. A percentagem de loci polimórficos foi calculada de acordo com a fórmula: % de bandas polimórficas = número de bandas polimórficas/ número total de bandas x 100%.

A estrutura genética dos isolados de *F. decemcellulare* foi avaliada por análises da dispersão e agrupamentos dos acessos. A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) foi realizada usando o GenAlex 6.5 (Peakall e Smouse, 2012). Para a análise da dissimilaridade foi utilizado o programa DARwin 6 (Perrier e Jacquemoud-Collet, 2006) utilizando o coeficiente de similaridade de jaccard pelo método Neighbor-joining.

Resultados e Discussão

Dos 20 isolados de *F. decemcellulare* analisados com base em ERIC-PCR, foram obtidas um total de 41 loci sendo todos polimórficos (Tabela 2). No entanto, quando analisada a porcentagem de loci polimórficos entre heterotáticos e homotáticos foi obtido uma porcentagem de 85,37 e 75,61%, respectivamente.

Tabela 2. Lista dos *primers* de ERIC-PCR e ISSR utilizados para avaliar a diversidade de isolados homotáticos e heterotáticos de *Fusarium decemcellulare*.

ERIC 1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	48°C	41	100
ERIC 2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG			
UBC 836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	55°C	52	100
UBC 840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	49°C	28	100
UBC 842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	53°C	29	96,5

TM: temperatura de anelamento; N°: Número de bandas; % polimorfismo

O marcador ERIC-PCR foi eficaz em separar os isolados homotáticos dos heterotáticos (Figura 1), onde a relação entre os isolados das formas homotáticas tiveram resultado similar ao da análise filogenética realizada por Guimarães (2013). A relação entre os 20 isolados foi comparado pela análise das coordenadas principais (PCoA) (Figura 2) onde foi possível notar que a dispersão dos isolados corroborou com os grupos identificados pelo dendrograma utilizando o algoritmo de Neighbor-joining.

A diferenciação genética entre as populações foi analisada pela AMOVA e a variância dentro de cada grupo apresentou 75% da variação total, enquanto que 25% da variação foi observada entre homotáticos e heterotáticos.

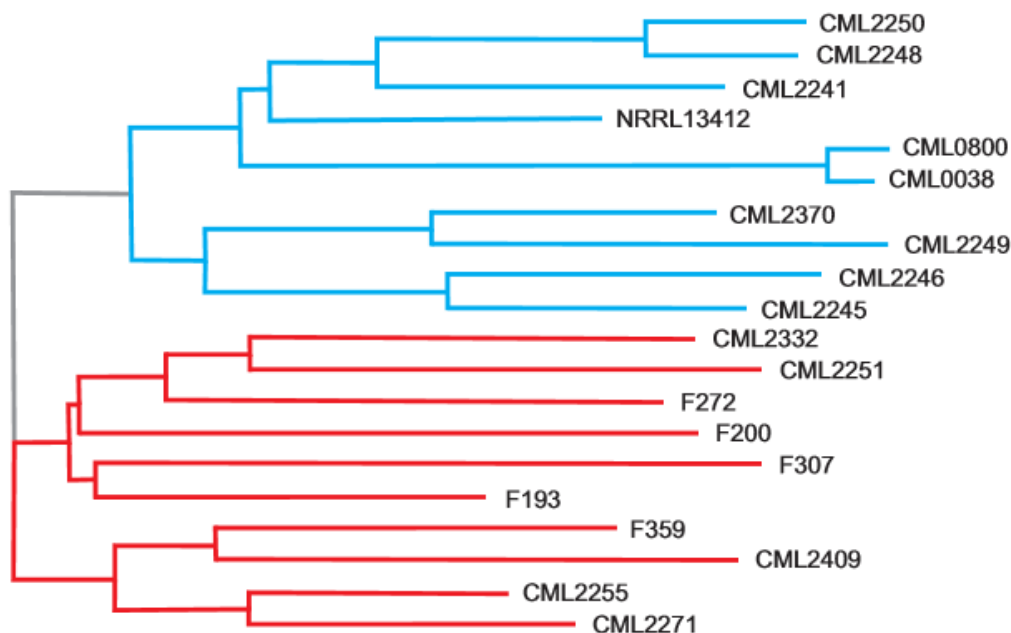


Figura 1. Dendrograma com base na técnica de ERIC-PCR obtido por meio do algoritmo Neighbor-joining dos isolados de *Fusarium decemcellulare*, homotáticos em azul e heterotáticos em vermelho.

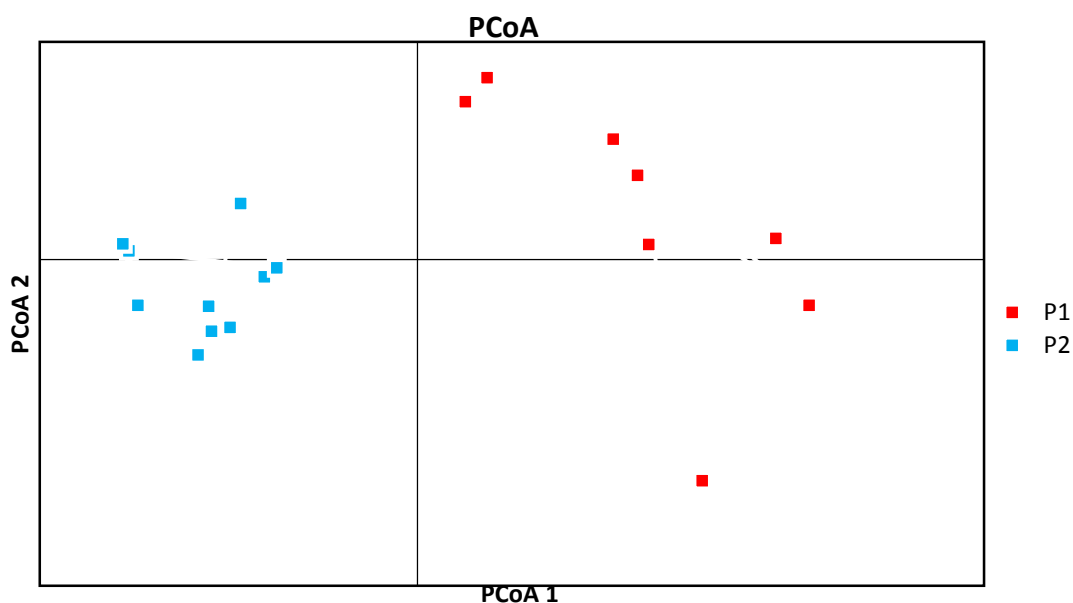


Figura 2. Análise de coordenadas principais (PCoA) mostrando a distribuição com base na variação genética de 41 loci obtidos com o marcador ERIC-PCR em *F. decemcellulare*. As cores dos pontos correspondem às linhagens P1= homotáticas (azul) e P2= heterotáticas (vermelho).

Com base nos três marcadores ISSR foram obtidos 109 loci. O *primer* UBC 842 foi o único com 1 locus monomórfico dos 29 gerados e apresentou 96,5% de polimorfismo, enquanto que os demais 100% dos loci foram polimórficos (Tabela 2).

Assim como o marcador ERIC-PCR, a análise da AMOVA, com base no marcador ISSR, mostrou maior variação dentro dos grupos (88%) que entre as formas homotáticas e heterotáticas (12%).

Os isolados heterotáticos mostram uma porcentagem de loci polimórficos de 87,16% em relação aos homotáticos 80,73%. Apesar dessa alta porcentagem de polimorfismos, quando comparadas pela análise das coordenadas principais (PCoA) não foi possível notar um agrupamento formado apenas por homotáticos ou heterotáticos, da mesma forma que não foi possível observar no dendrograma separação entre os dois grupos (Figura 3).

A separação das duas populações pelo marcador molecular ERIC-PCR em contraposição ao marcador ISSR pode ter ocorrido pelo fato de que as regiões entre os microssatélites onde os marcadores ISSR amplificam, são regiões que apresentam alto grau de evolução genética, sendo menos conservadas entre as formas homotáticas e heterotáticas. Já as regiões amplificadas pelo marcador ERIC, caracterizado como pequenas unidades repetitivas de 127 pb com repetições invertidas de 40 pb (Hulton *et al.*, 1991) são regiões mais conservadas, e permitiu uma melhor análise evolutiva entre dos dois grupos.

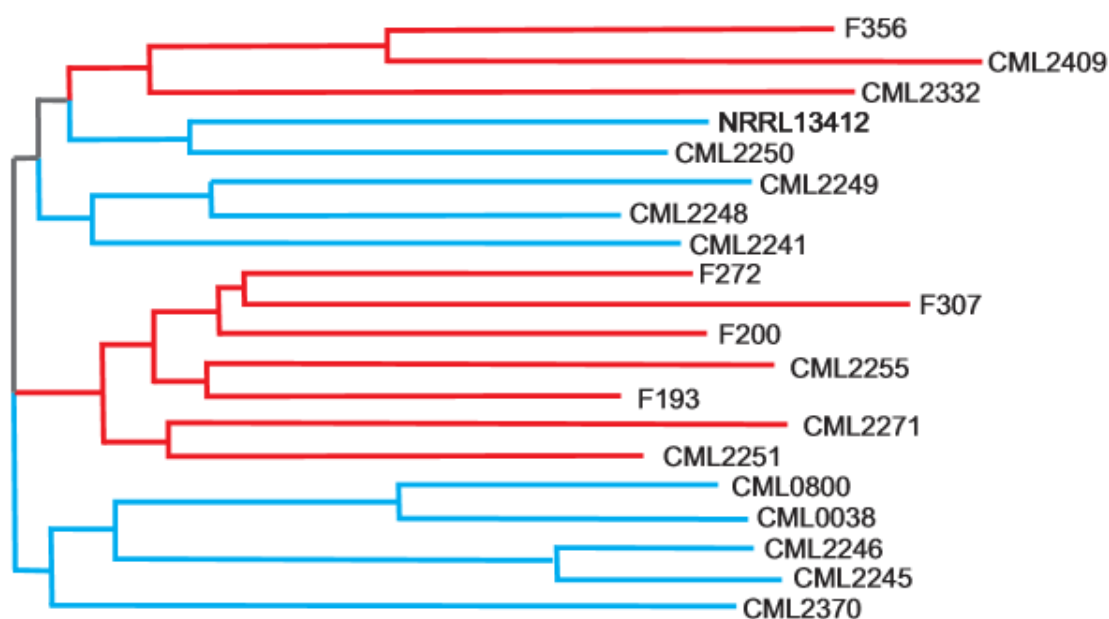


Figura 3. Dendrograma obtido com base no marcador molecular ISSR usando o algoritmo de Neighbor-joining em *Fusarium decemcellulare*. Em vermelho isolados heterotáticos e em azul homotáticos.

Conclusão

Com base nos resultados é possível sugerir que apesar dos dois marcadores apresentarem alto grau de polimorfismo em *F. decemcellulare*, o marcador ERIC-PCR foi mais eficaz em separar os isolados homotáticos e heterotáticos.

Referências

- Alexander JV, Carmichael NM (1973). Divergent patterns of ascus development in homothallic and heterothallic isolates of *Calonectria rigidiuscula*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 100:35-40.
- Araújo JCA, Pereira JCR, Gasparotto L, Arruda MR, Moreira A (2007). Antracnose do guaranazeiro e seu controle. *Embrapa - Comunicado Técnico*. 4p.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Ferreira AVB (2005). Fungos, os primórdios do sexo. *Ciência Hoje*, 37(218):34-41.
- Ford EJ, Bourret JA, Snyder WC (1967). Biologic specialization in *Calonectria rigidiuscula* in relation to green point gall of Cocoa. *Phytopathology*. 57(7):710-712
- Guimarães EA (2013). *Biologia Reprodutiva, Filogenia e patogenicidade de Fusarium decemcellulare*. (Dissertação). Mestrado em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil. p. 27-29.
- Hulto CSJ, Higgins CF, Sharp PM (1991). ERIC sequences: a novel Family of repetitive the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology*. 1991, 5:825-834.
- Leslie JF, Summerell BA (2006). *The Fusarium laboratory manual*. Malden: Blackwell. 160p.
- Peakall R, Smouse PE (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28: 2537-2539
- Peppineli AC (2014). Seleção de primers para análise de Inter Simple Sequence Repeats na cultivar 'itália' de *Vitis vinífera* L. *Ciência Téc. Vitiv*, 29(2) 81-87.
- Perrier X, Jacquemoud-Collet JP (2006). *DARwin software* <http://darwin.cirad.fr/darwin>.
- Queiroz CA (2016). Caracterização de *Fusarium decemcellulare* isolado de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) por meio de ERIC-PCR. In: Oliveira et al. *Diversidade Microbiana da Amazônia 2015*. Editora INPA.