

Diversidade Microbiana da Amazônia

Editores:

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



Copyright © 2016, 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, Lucas Souza, Natália Nakashima, Paulo Maciel e Sabrina Trindade.

FICHA CATALOGRÁFICA

D618 Diversidade microbiana da Amazônia /Editor L. A. Oliveira... [et.al.]--
Manaus: Editora INPA, 2016.
436.: il. color.

ISBN 978-85-211-0159-8

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

Caracterização de *Fusarium decemcellulare* isolado de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) por meio de ERIC-PCR

Queiroz C.Á.¹, Silva A.F.¹, Cruz J.C.², Silva G.F.², Sousa N.R.², Matos K.S.³, Hanada R.E.⁴

¹Pós-graduação em Biotecnologia - Universidade Federal do Amazonas – UFAM / Embrapa Amazônia Ocidental; ²Embrapa Amazônia Ocidental; ³Pós-doutoranda - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; ⁴Instituto de Pesquisa da Amazônia. E-mail: gilvan.silva@embrapa.br

Resumo

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) é uma espécie de grande importância para a região Amazônica, suas sementes são ricas em cafeínas sendo utilizadas como matéria-prima para a produção de bebidas industrializadas e energéticos. O Brasil é o único produtor mundial de guaraná em escala comercial, sendo os estados do Amazonas e Bahia responsáveis por 19,5% e 72,4% da produção. Um dos principais responsáveis pela baixa produção no Amazonas são as doenças causadas por fungos, entre elas o superbrotamento que tem como agente etiológico *Fusarium decemcellulare* que vem se tornando um problema sério para a cultura. Neste trabalho foram analisados 76 isolados obtidos dos três principais sintomas 26 da hipertrofia da gema vegetativa, 16 hipertrofia floral, 18 isolados de galha no caule e 16 isolados de raiz, caule e folhas de guaranazeiro que apresentava sintomas. A diversidade foi avaliada via marcador ERIC-PCR por meio de 18 bandas polimórficas obtidas. A similaridade genética variou de 0,43 a 1 e com base na similaridade genética maior que 0,48% foi possível reunir os isolados em três grandes grupos independentes do local de coleta ou sintomas.

Palavras-chave: Superbrotamento, Hipertrofia floral, galhas e marcador molecular.

Introdução

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) é uma espécie nativa da Amazônia de grande importância para a região, pois suas sementes são ricas em cafeína, matéria-prima para a produção de bebidas industrializadas e energéticos. Além da cafeína, o guaraná apresenta outros compostos químicos como flavonóides e taninos, que lhes conferem características estimulantes e medicinais (Campos *et al.*, 2011). O Brasil é praticamente o único produtor de guaraná em escala industrial, o Estado da Bahia contribui com 72,4% da produção e o Amazonas com 19,5% (IBGE 2013). Entre os vários fatores que contribuem para essa baixa produtividade no Estado do Amazonas, o superbrotamento é uma doença que foi detectada no Amazonas no início da década de 80 e só em 2014 nas plantações baianas, causada pelo agente etiológico *Fusarium decemcellulare*, atualmente vem se tornando um problema sério para a cultura do guaraná, pois afeta desde o estágio de mudas às plantas adultas impedindo seu desenvolvimento (Araújo *et al.*, 2007).

Em levantamento realizado por Araújo *et al.* (2007) constatou-se que a doença tem ocorrência generalizada nos municípios produtores do estado do Amazonas, contudo a maior prevalência foi observada em Urucará (41,36%), Itacoatiara (31,43%), Maués (27,89%) e Boa Vista do Ramos (23,77%). A doença afeta órgãos em crescimento ativo como as gemas vegetativas e apresenta pelo menos três sintomas bem característicos como o superbrotamento das gemas vegetativas (caracterizado pela presença de inúmeras brotações a partir de uma gema, apresentando entrenós curtos a partir dos quais surgem vários ramos secundários), hipertrofia floral (caracterizada pelo endurecimento e secamento das flores impossibilitando a polinização) e galhas no caule (caracterizadas por inúmeros brotos numa mesma gema, formando uma massa desordenada e compacta).

Desde a identificação do agente etiológico na década de 80 por Batista e Bolkan (1982) e os trabalhos epidemiológicos realizados por Araújo *et al.* (2007), pouca importância foi dada a este patossistema e inúmeras questões ainda continuam sem respostas, não se sabe exatamente como esse fungo penetra no hospedeiro, se em guaranazeiro existe a ocorrência de formas homotáticas (não patogênicas) e heterotáticas (patogênicas) como observado em cacauzeiro, muito menos sobre a diversidade e comportamento da população nas áreas produtoras de guaraná. Diante disso, a presente pesquisa visa analisar a diversidade genética de *F. decemcellulare* isolado de mudas e plantas adultas de guaranazeiro com sintomas de superbrotamento, hipertrofia floral ou galhas por meio do marcador molecular ERIC-PCR.

Material e métodos

A presente pesquisa foi realizada no laboratório de Biologia Molecular na Embrapa da Amazônia Ocidental (CPAA) localizada na cidade de Manaus-AM.

Isolamento de F. decemcellulare

O isolamento de *F. decemcellulare* foi realizado a partir dos três diferentes sintomas de 39 plantas de guaranazeiro de Manaus, Maués e Presidente Figueiredo em 2013. Todos os tecidos coletados foram submetidos ao isolamento indireto conforme descrito por Santos (1983). A partir do isolamento foi realizado o cultivo monospórico onde foram obtidos 76 isolados de *F. decemcellulare* (Tabela 1). Os isolados foram crescidos em meio batata-dextrose BD sob agitação de 150 rpm para obtenção de massa micelial, que foi filtrada e em seguida realizada a extração de DNA utilizando o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990). A quantificação de DNA foi mensurada por meio de espectrofotômetro *Nanodrop* e em gel de agarose (0,8%).

Marcadores ERIC-PCR

A diversidade genética de *F. decemcellulare* foi analisada por meio do marcador molecular ERIC-PCR utilizando os *primers* ERIC 1R 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' e ERIC F- 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'. As reações de PCR foram realizadas com: 1X de tampão (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.4, 1% de T), 1,5 mM de cloreto de magnésio, 0,5mM de dNTP, 50ng de DNA, 0,2µM de cada *primer* e 1U de enzima Taq DNA polimerase (*Karpa*). As reações foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial 94 °C por 5 min, 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 48 °C por 1 min, 65 °C por 5 min, seguido pela extensão final de 65°C por 16 minutos.

Análises de dados

A partir dos géis obtidos pelo marcador ERIC-PCR, foi construído uma matriz de dados binários onde 1 representa a presença e 0 a ausência da banda. A diversidade foi calculada pelo coeficiente de similaridade de Dice usando o *software* NTSYSpc-2.02 (Rohlf et al., 2009). A matriz de similaridade foi utilizada para construção do dendrograma baseada pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Averages*).

Tabela1- Isolados de *Fusarium decemcellulare* obtidos de mudas e plantas adultas de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) com sintomas de superbrotamento (hiperplasia da gema vegetativa, hipertrófica floral ou galhas)

ISOLADOS	LOCAL DA COLETA	ORIGEM DO GENOTIPO	TECIDO	SINTOMA DA PLANTA	ISOLADOS	LOCAL DA COLETA	ORIGEM DO GENOTIPO	TECIDO	SINTOMA DA PLANTA
F01	Mudas/Ma	PL 001	RM	HGV	F82	Mudas/Ma	38	Flor	HF
F02	Mudas/Ma	PL 002	RM	HGV	F85	Mudas/Ma	41	Flor	HF
F04	Pl.Ad/Ma	CL 003	RM	HGV	F86	Mudas/Ma	41	Flor	HF
F05	Pl.Ad/Ma	CL 003	RM	HGV	F87	Mudas/Ma	41	Flor	HF
F07	Pl.Ad/Ma	CL 001	RM	HGV	F89	Mudas/Ma	42	Flor	HF
F08	Pl.Ad/Mu	CL 601	Flor	HF	F90	Mudas/Ma	FMI 305 A	RM	HGV
F12	Mudas/Mu	626	RM	HGV	F92	Mudas/Ma	FMI 305 A	RM	HGV
F14	Mudas/Mu	300 ^a	Flor	HF	F94	Mudas/Ma	FMI 305 A	RM	HGV
F17	Pl.Ad/Mu	CL 300-C	RM	HGV	F96	Mudas/Ma	306 B	Ra	Ga
F19	Pl.Ad/Mu	CL 300-B	Flor	HF	F97	Mudas/Ma	307 B	Ra	Ga
F19B	Pl.Ad/Mu	CL 300-B	Flor	HF	F100	Mudas/Ma	310 B	Ra	Ga
F20	Pl.Ad/Mu	CL 300-C	RM	HGV	F105	Mudas/Ma	P384	Ra I	Ga
F21	Pl.Ad/Mu	CL 217-A	RM	HGV	F109	Mudas/Ma	P382	Ra	Ga
F22	Pl.Ad/Mu	CL 217-A	RM	HGV	F112	Mudas/Ma	P385	Fo	TA
F23	Pl.Ad/Mu	CL 300-A	Flor	HF	F114	Mudas/Ma	E29	Ra	Ga
F24	Pl.Ad/Mu	CL 300-A	Flor	HF	F115	Mudas/Ma	E29	Ra	Ga
F26	Pl.Ad/Mu	CL 619	RM	HGV	F119	Mudas/Ma	E29	Ca	Ga
F27	Mudas/Mu	021	Flor	HF	F120	Mudas/Ma	E29	Ca	Ga
F28	Mudas/Ma	022 (887)	Ca	Ga	F121	Mudas/Ma	E29	Ca	Ga
F29	Mudas/Ma	023 (889)	Ca	Ga	F125	Mudas/Ma	E29	Fo	TA
F30	Mudas/Ma	023 (889)	Ca	Ga	F127	Mudas/Ma	FMI 305 A	Ca	Ga
F31	Mudas/Ma	023 (889)	Ca	Ga	F129	Mudas/Ma	1816	Ca	Ga
F34	Mudas/Ma	24	Fo	TA	F132	Mudas/Ma	1816	Ra	HGV
F37	Mudas/Ma	24	Fo	TA	F134	Mudas/Ma	1816	Ca	HGV
F38	Mudas/Ma	24	Fo	TA	F135	Mudas/Ma	1816	RM	HGV
F40	Mudas/Ma	24	Fo	TA	F137	Mudas/Ma	575 B	Ca	Ga
F41	Mudas/Ma	24	Fo	TA	F139	Mudas/Ma	576 B	Ca	Ga
F52	Mudas/Mu	12	RM	HGV	F141	Mudas/Ma	1752	Flor	HF
F53	Mudas/PF	26	Flor	HF	F143	Mudas/Ma	1752	Flor	HF
F54	Mudas/PF	26	Flor	HF	F145	Mudas/Ma	1752	Fo	TA
F57	Mudas/PF	26	RM	HGV	F146	Mudas/Ma	1752	Fo	TA
F58	Mudas/PF	26	RM	HGV	F147	Mudas/Ma	1752	Fo	TA
F59	Mudas/PF	28	RM	HGV	F148	Pl.Ad/Ma	1779 (217)	Fo	TA
F60	Mudas/PF	28	RM	HGV	F149	Pl.Ad/Ma	1779 (217)	Fo	TA
F62	Mudas/PF	29	RM	HGV	F152	Mudas/Ma	(296) (145)	Ca	HGV
F63	Mudas/Ma	29	RM	HGV	F155	Mudas/Ma	(296) (145)	Ca	HGV
F80	Mudas/Ma	37	Flor	HF	F170	Mudas/Ma	P 702	Ca	Ga

‘**Origem:** Pl.Ad (Planta Adulta); Ma (Manaus); Mu (Maués); PF (Presidente Figueiredo).

‘‘**Sintomas Tecidos:** HGV (Hiperplasia Gema Vegetativa); HF (Hiperplasia Floral); Ga (Galha); Ra (Raiz); Ca (Caule); Fo (Folhas); RM (Ramo); TA (Tecido assintomático).

Resultados e Discussão

Com uma ampla gama de hospedeiros, *F. decemcellulare* já foi reportado em mais de 75 diferentes espécies de plantas em regiões tropicais e subtropicais (Farr e Rossman 2016). Porém recentes trabalhos indicam a existência de um complexo de espécies morfológicamente semelhantes por meio dos caracteres usualmente utilizados para identificação como a análise de macro e microconídios. Análise filogenética realizada por Guimarães (2013) confirmam a separação entre homotáticos e heterotáticos, já verificada deste a década de 70 por meio de marcador morfológico no qual os homotáticos apresentam quatro ascósporos por asco, enquanto que os isolados heterotáticos possuem oito ascósporos por asco.

Apesar da importância econômica deste patógeno, ainda não foram realizados estudos sobre a diversidade genética ou estrutura de população. Neste trabalho foram analisados 76 isolados caracterizados morfológicamente como *F. decemcellulare*, obtidos de 38 plantas de guaranazeiro, sendo 28 mudas mantidas em casa de vegetação e 10 clones adultos. Dos tecidos sintomáticos foram obtidos 26 isolados oriundos da hiperplasia da gema vegetativa, 16 da hipertrofia floral e 18 das galhas do caule e 16 isolados foram obtidos da raiz, caule ou tecido foliar de plantas que apresentavam sintomas de hiperplasia da gema vegetativa ou galhas (Tabela 1).

A análise da diversidade genética dos 76 isolados foi realizada por meio do marcador ERIC-PCR por meio de 18 bandas polimórficas foram obtidas. Com base na similaridade genética maior que 0, 48% foi possível verificar que a técnica de ERIC-PCR foi capaz de reunir os isolados em grupos independentes do local de coleta ou sintomas (Figura 1). Demonstrando que a variação do tipo de sintoma não estar relacionado com uma possível especialização fisiológica ou genética do patógeno e sim com o local de infecção no hospedeiro que vai expressar sintomas com morfologia diferentes.

A elevada diversidade observada para *F. decemcellulare* em guaranazeiro e a possível indicação de uma única população independentemente do local de coleta, pode ser um indicativo de fluxo de material vegetal ou do patógeno entre as diferentes regiões de coleta. Outro fator determinante no aumento da diversidade genética de um patógeno é possibilidade de terem diferentes tipos de reprodução podendo ser sexuada/fluxo gênico, assexuada/fluxo genotípico ou mista, aumentando capacidade de mutação e seleção de genes de virulência que é maior que a capacidade de mutação e seleção de gene de resistência do hospedeiro (MCDonalds e Linde 2002).

Outra explicação para essa alta diversidade seria a ocorrência das formas homotática e heterotática em *F. decemcellulare* e conseqüentemente dos alelos funcionais idiomorfos conhecidos como MAT-1 e MAT-2 presentes no mesmo cromossomo (Alexander e Carmichael, 1973; Leslie e Summerell, 2006; Guimarães 2013). Isolados homotáticos possuem os MAT-1 e MAT-2 podendo se autofecundar, nesses casos é raro os recombinantes serem reproduzidos, já a forma heterotática para sua reprodução é indispensável o encontro de isolados que possuem *mating types* distintos e tem como conseqüência o aumento da diversidade genética da população (Duarte et al., 1999; Leslie e Summerell, 2006).

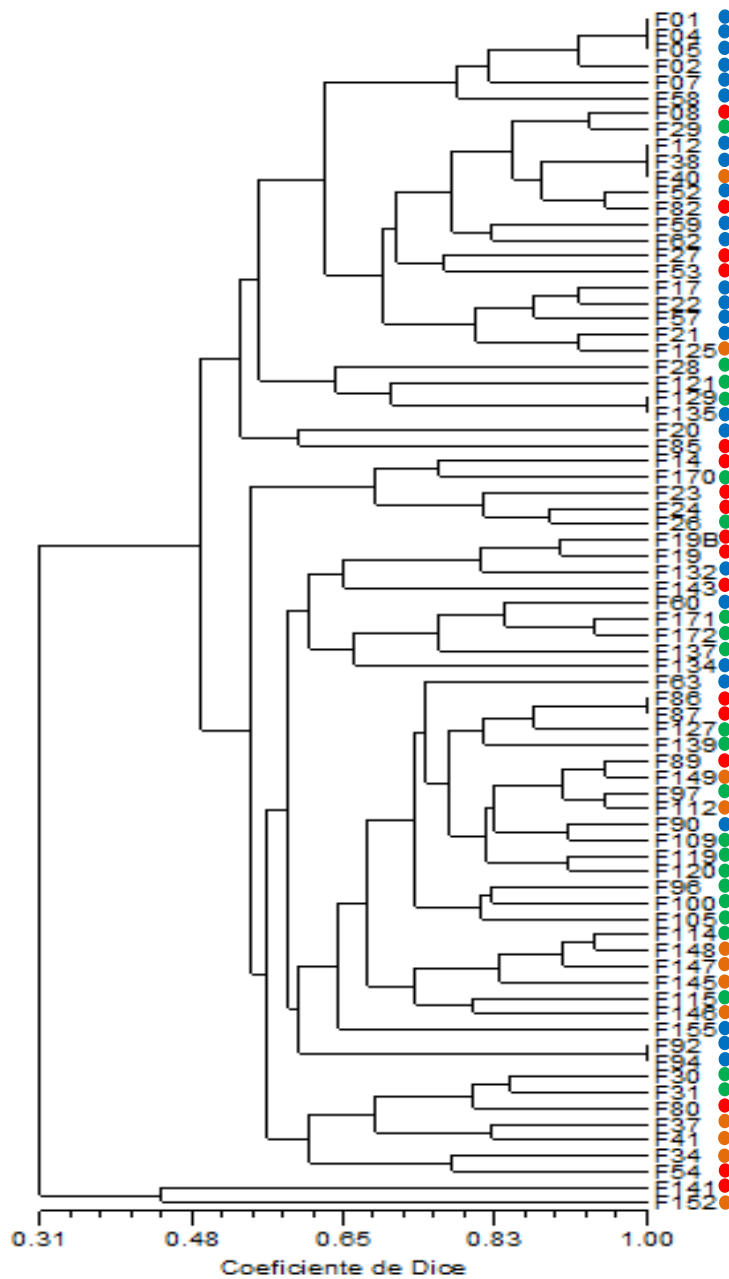


Figura 1 Dendrograma da similaridade entre os 76 isolados de *Fusarium decemcellulare*, obtido pelo método UPGMA. Cada planta utilizada foi caracterizada de acordo com os sintomas em hiperplasia da gema vegetativa, hipertrofia floral e galha. A origem de cada tecido é indicada pelos círculos:

● Folha; ● Hipertrofia floral; ● Galha; ● Hipertrofia da gema vegetativa.

Resultado semelhante aos encontrados neste trabalho foram visto por Silva (2009) que utilizando os marcadores RAPD e SSR em 66 isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* coletado em diferentes municípios em Santa Catarina, viu que os mesmos não se agruparam por origens geográficas, os isolados foram distribuídos indistintamente nos grupos apresentando uma alta diversidade entre eles.

Conclusão

Com a utilização da técnica do ERIC-PCR foi possível observar o agrupamento dos isolados independente do sintoma ou local de coleta, confirmando uma alta diversidade genética de *F. decemcellulare* em guaranazeiro.

Referências

- Alexander JV, Cook R J (1965) *Fusarium* species and *Calonectria* associated with cushion gall of Cacao in Central America. *Cacao* 10: 15-16.
- 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) Embrapa - Comunicado Técnico. Antracnose do guaranazeiro e seu controle. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/681674/1/ComTec462007.pdf>
- Batista MF, Bolkan HA (1982) O superbrotamento do guaranazeiro. *Fitopatol. Bras.* 7: 315-317.
- Campos MPO, Riechelmann R, Matins LC, Hassan BJ, Casa FBA, Del-Giglio A (2011) Guarana (*Paullinia cupana*) improves fatigue in breast cancer patients undergoing systemic chemotherapy. *J. Altern. Complement. Med.* 17: 505-512.
- Doyle JJ, Doyle JL, Hortorium LHB (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Duarte M LR (1999) Doenças de plantas no Trópico úmido Brasileiro. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. 296p.
- Farr DF, Rossman AY (2016) *Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA*. Retrieved December 12, disponível em: <http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases>.

Guimarães EA (2013) Biologia Reprodutiva, Filogenia e patogenicidade de *Fusarium decemcellulare*. (Dissertação). Mestrado em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2013) Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa_201308.pdf>. Acesso em: 10 de Set. 2014.

Leslie JF, Summerell BA (2006) The *Fusarium* laboratory manual. Malden: Blackwell. 388p.

McDonald B.A, Linde C (2002) "Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance." *Ann. Rev. Phytopathol.* 40: 349-379.

Rohlf FJ (2009) NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.2. Exeter Software, Setauket, NY.

Santos ABC, Tabosa SAS, Mendes RGP, Ataíde PF (1983) Etiologia do Superbrotamento da mangueira no estado do Pará. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Resumos do Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Brasília, 1985, v.8, p.595.

Silva CMD (2009) Análise da diversidade genética por marcadores RAPD e SSR em *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* no Estado de Santa Catarina (Tese). Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil.