

Análise da Variabilidade Morfológica e Genética do Fungo *Thielaviopsis paradoxa*

Joane Marília Santana dos Santos Tamanho¹, Hallana Souza Santos²,
Maria Isabel de Assis Chagas³, Liz Ribeiro Brito Amorim⁴, Viviane Talamini⁵,
Leandro Eugenio Cardamone Diniz⁶

Resumo

A resinose do coqueiro causada pelo fungo *Thielaviopsis paradoxa* constitui uma importante doença no estado de Sergipe, causando podridão do tronco em palmeiras. Não foram encontrados estudos sobre a variabilidade genética de *T. paradoxa* utilizando marcadores moleculares, tampouco correlacionando estudos morfológicos e dados de sequenciamento do rDNA. O objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade fenotípica através de características morfológicas e a diversidade genética através do uso de marcadores do tipo RAPD e por sequenciamento do rDNA de isolados coletados em diferentes localidades. Foram utilizados 48 isolados pertencentes à coleção de cepas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, coletados entre 2011 e 2012, e separados em três amostragens: a primeira analisada no laboratório de Fitopatologia para a caracterização morfológica; a segunda analisada no laboratório de Biologia Molecular, para caracterização molecular; e a terceira enviada para sequenciamento. Na análise morfológica não foi possível formar grupos divergentes entre os isolados, tendo apresentado similaridade nas características avaliadas. A análise molecular foi realizada com 50 iniciadores RAPD, que revelaram um total de 338 fragmentos polimórficos amplificados. Pela análise de similaridade genética calculada pelo coeficiente de Jaccard, foi gerado um dendrograma de similaridade do tipo UPGMA, no

¹ Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Tiradentes (UNIT), Aracaju, SE, joanemariasantos@gmail.com.

² Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Tiradentes (UNIT), Aracaju, SE, hallana_8@hotmail.com.

³ Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Tiradentes (UNIT), Aracaju, SE, isabelbio10@hotmail.com.

⁴ Graduanda em Biomedicina, Universidade Tiradentes (UNIT), Aracaju, SE, liz.ufs@gmail.com.

⁵ Engenheira-agrônoma, doutora em Fitopatologia, pesquisadora Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, viviane.talamini@embrapa.br.

⁶ Biólogo, doutor em Genética e Melhoramento, pesquisador Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, leandro.diniz@embrapa.br.

qual foram observados três grandes agrupamentos, correlacionados com a localização geográfica e o tipo de hospedeiros. Os primeiro grupo apresentou um coeficiente de dissimilaridade genética de aproximadamente 90%. O segundo grupo se subdividiu grupos menores revelando similaridade genética relativamente alta entre amostras interestaduais (35-90%) e intraestaduais (32-99%), bem como foi possível correlacionar similaridade genética entre amostras isoladas de um mesmo tipo de hospedeiro. O terceiro grupo obteve destaque na maior dissimilaridade genética (71-99%), tendo apresentado os dados do sequenciamento divergentes dos demais isolados. As sequências nucleotídicas encontradas através do sequenciamento do rDNA foram analisadas, editadas e comparadas com aquelas depositadas no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information website), utilizando o Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para a pesquisa de espécies. Na análise, 96% dos isolados confirmaram similaridade para *Ceratocystis fimbriata* e *Ceratocystis norvegica*. O alinhamento múltiplo dos isolados feito com o programa ClustalW, resultou em sequências conservadas com aproximadamente 595 aminoácidos.

Palavras-chave: marcador molecular, resinose, variabilidade genética e morfológica.

Introdução

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma das frutíferas mais difundidas naturalmente no globo terrestre, ocorrendo em praticamente todos os continentes. Seu cultivo e sua utilização se dão de forma expressiva em todo o mundo, com os mais variados produtos, de forma in natura ou industrializada (MARTINS et al., 2011). Desempenha um importante papel na sustentabilidade dos ecossistemas, sendo utilizado como cultura de subsistência para produtores agrícolas e produto de exportação em alguns países (PERSLEY, 1990).

Segundo a Food and Agriculture Organization (FAO), o país foi o quarto maior produtor mundial com uma produção aproximada de 2,8 milhões de toneladas de coco. Embora o Nordeste venha mantendo maior participação na produção nacional, o rendimento da cultura em termos de produtividade é menor do que em outras regiões (MARTINS et al., 2011). Os atuais plantios encontram-se em sua maioria abandonados e essa situação decorre principalmente devido aos baixos preços do coco, da falta de políticas governamentais de incentivo à cultura e problemas fitossanitários (FONTES, 2010).

Durante as fases de desenvolvimento, o coqueiro sofre ação de inúmeros insetos-pragas e doenças que danificam órgãos vitais da planta (FERREIRA et al., 2011). Merece destaque a alta incidência de doenças foliares, que provocam queda acentuada de produção, bem como a rápida expansão da doença “Resinose do coqueiro”, que tem provocado mais recentemente elevada mortalidade de plantas (FONTES, 2010). A resinose do estipe ou “steem bleeding”, doença causada pelo fungo *Thielaviopsis paradoxa*, tem se disseminado gradualmente, aumentando o número de coqueiros infectados e de focos nas propriedades a cada ano (MOURA et al. 2007). A doença tem se tornado o principal motivo de preocupação entre produtores, pesquisadores e órgãos de pesquisa e fiscalização, devido a sua rápida disseminação e por ainda não existir nenhum método seguro de controle da doença (COSTA e CARVALHO, 2011).

Thielaviopsis paradoxa (De Seynes) Höhn é a fase imperfeita ou assexuada do patógeno. Em sua fase sexual ou perfeita, é denominado *Ceratocystis paradoxa* (Dade) C. Moreau (1952) (Ascomycetes, Microascales, família Ophiostomatacea), cuja fase raramente é observada em ambientes naturais (COSTA e CARVALHO, 2011). O fungo pode sobreviver por longos períodos no solo, nos restos de cultura em decomposição e pode causar infecção através de ferimentos e das fissuras naturais de crescimento do tronco, disseminando-se através de insetos vetores e do contato entre raízes (NAMBIAR et al., 1986). Ainda não existem estudos sobre a variabilidade genética do *T. paradoxa* utilizando marcadores moleculares no Brasil. A caracterização de variedades ou linhagens por meio de marcadores de DNA tem sido de grande importância em programas de melhoramento genético e estão sendo utilizados como complemento da caracterização morfológica, de forma que acessam o genoma e destacam-se na quantificação da variabilidade genética ao nível de sequências de nucleotídeos no DNA, no estudo de diversidade e distância genética, e na construção de mapas genéticos (COSTA, 2010).

Estudos moleculares envolvendo o cluster gênico do rDNA (DNA ribossomal) (ITS1, 5.8S e ITS2) têm facilitado a identificação de fungos e contribuído para expandir o conhecimento da diversidade microbiana nos últimos anos. A utilização de programas computacionais, que permite a comparação destas sequências de organismos alvos e não alvos, auxilia na definição de regiões apropriadas para a síntese de primers utilizados para detectar uma dada espécie de fungo (FUNGARO, 2000; MARTINS, 2005).

O estudo da variabilidade genética do fungo *T. paradoxa* permite fornecer informações que podem ser úteis para futuros trabalhos de melhoramento da cultura do coqueiro para resistência à resinose, bem como no desenho de primers específicos para o fungo. Sendo assim, com este trabalho, objetivou-se analisar o grau de similaridade genética dos isolados do fungo *T. paradoxa*, pertencentes à coleção de cepas da Embrapa Tabuleiros Costeiros coletados em diferentes Estados, por dados morfológicos, por meios do uso de marcadores moleculares do tipo RAPD e por sequenciamento.

Material e Métodos

As atividades deste trabalho foram desenvolvidas no Laboratório de Fitopatologia e no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Tabuleiros Costeiros (CPATC). Os isolados de *T. paradoxa* utilizados para realização deste trabalho foram coletados entre 2011 e 2012, obtidos de diferentes hospedeiros (inseto e planta), bem como isolados obtidos no solo. Estes isolados pertencem à coleção do banco de fungos do Laboratório de Controle Biológico, localizada no município de Aracaju – SE.

Análise Morfoestrutural

As linhagens foram cultivadas em meio BDA (batata-dextrose-ágar), durante um período de 5 dias, seguindo o procedimento de acordo Costa e Carvalho et al. (2011). A taxa do crescimento micelial dos isolados foi avaliada, em de 24 horas, medindo-se dois diâmetros ortogonais com auxílio de um paquímetro digital, até que cada placa apresentasse crescimento completo.

Para a contagem de conídios, obteve-se a suspensão do filtrado micelial, no qual foi utilizado para quantificação em câmara de Neubauer, conforme o método de Alves e Moraes (1998). As características morfológicas utilizadas na análise dos isolados foram: (a) crescimento micelial; (b) coloração; (c) topografia; (d) textura; (e) contagem microscópica de conídios, no qual foram comparadas às características descritas por Caetano et. al. (2008).

Análise Genética

A suspensão fúngica foi submetida à extração utilizando o protocolo estabelecido pelo Kit de Extração de DNA de Plantas e Fungos (Norgen Biotek). O DNA obtido de cada isolado foi quantificado e a concentração foi ajustada para 50 ng μL^{-1} .

RAPD

O DNA genômico foi submetido à amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando 50 oligonucleotídeos iniciadores RAPD, com as mesmas condições de amplificação descritas por Pinheiro et. al. (2012). O programa de amplificação percorreu de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 96°C, seguido de 45 ciclos, sendo que cada ciclo consiste de uma etapa de desnaturação (1 minuto a 95°C), uma etapa de pareamento (1 minuto a 36°C) e uma etapa de alongamento (1 minuto a 72°C), com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Após o processo de amplificação, os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, corados em brometo de etídio (0,5 µg mL⁻¹) e visualizados através de luz ultravioleta.

Sequenciamento Do DNA

Para amplificação de regiões específicas do rDNA dos isolados, foram utilizados os primers NU-SSE-0817 e NU-SSE-1536, seguindo as mesmas condições de reação descritas por Borneman e Hartin (2000). Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados com o Kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) e enviados para sequenciamento.

BLAST e Alinhamento

As sequências obtidas de *T. paradoxa* foram tratadas tendo suas extremidades cortadas para que todas obtivessem o mesmo número de bases, utilizando o programa Chromas Lite. As sequências foram submetidas a uma análise através do programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) contra a base de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information website [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>]). O alinhamento múltiplo das sequências nucleotídicas foi gerado através do programa ClustalW.

Análise Estatística dos Isolados

Para a análise de dados, foram consideradas a presença e a ausência de fragmentos de RAPD, os quais foram transferidos para uma matriz onde a ausência de uma dada banda foi denominada por 0 e a presença, por 1. Para análise genética intrapopulacional, utilizou-se o programa Dendro-UPGMA (<http://genomes.urv.es/UPGMA/>).

Resultados e Discussão

Análise Morfoestrutural

Os isolados de *T. paradoxa* cultivados em BDA, apresentaram homogeneidade no crescimento micelial, no qual foram relatadas velocidades médias elevadas e não foram observadas diferenças significativas entre os isolados. Um percentual de 60% dos isolados mostrou um padrão de crescimento similar, onde se notou maior velocidade de crescimento total do fungo, ocupando toda a placa ao 2º dia. De maneira geral, o percentual restante apresentou um desenvolvimento mais lento, com crescimento total ao 3º dia de cultivo.

Em relação à coloração do micélio, os isolados não apresentaram variações entre si cresceram em tonalidades que variaram de branco a negro, com coloração intermediária acinzentada. Foi observado que durante os 5 dias de crescimento, a coloração variou homogeneamente apresentando o micélio branco, entre os dois primeiros dias; coloração acinzentada na parte central do micélio com extremidades brancas, entre o segundo e o terceiro dia; coloração homogênea cinza, entre o terceiro e o quarto dia; e coloração negra, entre o quarto e quinto dia.

Os isolados de *T. paradoxa*, em sua maioria (70%), apresentaram micélio plano, superficial e homogêneo. Aproximadamente 15% dos isolados tiveram o crescimento do micélio aéreo médio e 15% mostraram crescimento micelial aéreo alto na análise topográfica. Verificou-se que todos os isolados apresentaram textura micelial aveludada.

Houve diferença na quantificação dos conídios, bem como no tamanho e na forma. Os conídios foram classificados em microconídios, apresentando forma retangular; e macroconídios, formas esféricas e ovais. Constatou-se diferença significativa na quantidade entre microconídios e macroconídios, em que este último apresentou maior disponibilidade. As características morfológicas analisadas do fungo foram idênticas às descritas por Caetano et. al. (2008).

Análise da Variabilidade Genética

Na análise RAPD, a partir dos 50 oligonucleotídeos iniciadores testados foram gerados 339 fragmentos amplificados. O cálculo da dissimilaridade genética entre os isolados foi feito através do programa Dendro-UPGMA (<http://genomes.urv.es/UPGMA/>), no qual foi gerado um dendrograma. A análise do

dendrograma mostrou a formação de três grandes grupos (A, B e C). O grupo A formado pelos isolados TC 01, TC 02, TC 39 e TC 49, apresentaram um coeficiente de dissimilaridade de aproximadamente 90%, evidenciando grande divergência genética e geográfica quando comparados com os outros isolados. As amostras TC 01 e TC 02 são oriundas dos Estados de Pernambuco e Paraíba, respectivamente; e as amostras TC 39 e TC 49, oriundas do Rio de Janeiro e Sergipe.

O grupo B foi formado por 42 isolados, que se subdividiu em grupos menores, dos quais apresentaram um coeficiente de similaridade genética variando entre 32% e 99%. As amostras TC 03 e TC 07 apresentaram 55% de similaridade, oriundos de Neópolis/SE e Paracuru/CE, respectivamente. Um subgrupo formado por isolados oriundos de Neópolis/SE (TC 04, TC 05 e TC 12), São Cristóvão/SE (TC 14 e TC 35) e Quissamã/RJ (TC 43), apresentaram uma similaridade genética de 73%, caracterizando baixa divergência genética. Os isolados TC 06, TC 13, TC 15, TC 16 e TC 17 (São Cristóvão/SE); TC 18, TC 24 e TC 25 (Neópolis/SE); e TC 23 (Piaçabuçu/SE) apresentaram um alto coeficiente de similaridade (81-87%), tendo sido isoladas de hospedeiros insetos em sua maioria (*Rhynchophorus palmarum* e *Metamasius hemipterus*), com exceção do isolado TC 23. Os isolados TC 11 e TC 27, oriundos de Paracuru/CE e Neópolis/SE, respectivamente, apresentaram uma grande similaridade genética, considerando a divergência geográfica destes isolados. Os isolados TC 19, TC 20 e TC 21 apresentaram a maior similaridade genética (99%) entre os demais, são similares quanto à localização geográfica, bem como foram isolados do mesmo tipo de hospedeiro (inseto *R. palmarum*). Também no grupo B, o subgrupo formado pelos isolados TC 32 e TC 37, oriundos da Baixada Fluminense/RJ, apresentaram grande similaridade genética (84-90%) com isolados provenientes de Aracaju/SE (TC 45 e TC 46). Os isolados TC 41 e TC 47, provenientes de Boca da Mata/AL e Quissamã/RJ, respectivamente, apresentaram um coeficiente de similaridade genética de 70%, enquanto que os isolados TC 29 e 34, oriundos da Baixada Fluminense/RJ e Conde/BA, apresentaram o mesmo coeficiente de similaridade entre si. Foi constatado que os isolados TC 44 e TC 50, originados de Quissamã/RJ e São Cristóvão/SE apresentaram um coeficiente também de 70%.

O grupo C formado pelos isolados TC 08 e TC 42, oriundos de Paracuru/CE e São Cristóvão/SE obteve destaque com o maior coeficiente de dissimilaridade genética entre as amostras (72-91%) Os dados do sequenciamento destes

isolados foram comparados com os dados do GenBank, no qual não confirmaram similaridade genética para *C. fimbriata*, o que pode explicar a grande divergência genética destes isolados.

De maneira geral, observou-se a relação entre os grupos formados pela análise molecular e o local de procedência dos isolados, sendo que isolados oriundos de uma mesma região mostraram-se mais próximos geneticamente do que os isolados oriundos de regiões diferentes. Foi possível considerar que algumas amostras provenientes de diferentes Estados (Alagoas, Bahia, Ceará, Rio de Janeiro e Sergipe) mostraram similaridade genética relativamente alta, bem como se correlacionou, em alguns casos, similaridade genética entre amostras isoladas de um mesmo tipo de hospedeiro.

Conclusões

Neste trabalho, não foi possível formar grupos distintos de isolados de *T. paradoxa* apenas por meio de características miceliais, uma vez que todos os isolados apresentaram similaridade nas características morfológicas utilizadas na análise, não havendo uma correlação entre as características fenotípicas, a origem e o tipo de hospedeiro dos isolados analisados.

A análise da variabilidade genética por RAPD revelou três grupos distintos entre os isolados, correlacionando a localização geográfica e o tipo de hospedeiro. Os agrupamentos com menor divergência genética coincidem com o local de procedência, embora grupos de isolados de diferentes localidades tenham apresentado alta similaridade. A análise RAPD foi capaz de distinguir isolados de uma possível espécie de fungo diferente do *C. fimbriata*, correlacionando dados obtidos através do sequenciamento.

O alinhamento múltiplo permite identificar domínios conservados que podem ser utilizados para o desenho de primers específicos para o *T. paradoxa*, que serão utilizados na detecção quantitativa do fungo no solo por PCR em tempo real (qRT-PCR).

Referências

ALVES, S. B. **Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens.** (Ed.). Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ, 1998.

BORNEMAN, J.; HARTIN, R. J. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4356-4360, 2000.

CAETANO, M. F.; ROCHA, M.; DUCLOS, J. Ocorrência de podridão do tronco das palmeiras em Portugal. **Actas de Horticultura**, v. 52, p. 381-385, 2008.

COSTA e CARVALHO, R. R. **Epidemiologia da resinose do coqueiro e sensibilidade de *Thielaviopsis paradoxa* a óleos essenciais.** Lavras: UFLA, 2011.

COSTA e CARVALHO, R. R.; WARWICK, D. R. N.; SOUZA, P. E.; CARVALHO FILHO, J. L. S. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de esporos de *Thielaviopsis paradoxa* isolado de coqueiros em Sergipe. **Scientia Plena**, v. 7, n. 9, 2011.

COSTA, J. C. **Utilização de marcadores ISSR na caracterização de cultivares.** Recife: UFRPE, 2010.

FERREIRA, J. M. S.; FONTES, H. R.; PASSOS, E. E. M.; MIRANDA, F. R.; CINTRA, F. L. D.; BASTOS, E. A. Coco 'Anão'. **Informe agropecuário**, v. 32, p. 264, 2011.

FONTES, H. R. Caracterização do quadro atual e principais ameaças à produção de coco seco no nordeste do Brasil. **Portal do Agronegócio**, 2010.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, p. 12-16, 2000.

MARTINS, M. K. **Variabilidade genética de isolados de *Fusarium spp.* e estudo de interação com a planta hospedeira.** Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2005.

MARTINS, C. R.; JESUS JUNIOR, L. A. de. **Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional: panorama 2010.** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2011. 28 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 164).

MOURA, J. I. L.; VIEIRA, S. D.; BEZERRA, J. L. **Resinose do coqueiro**. Ceplac, 2007. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/RESINOSE%20DO%20COQUEIRO.pdf>>. Acesso em: 15 jul. 2014.

NAMBIAR, K. K. N.; JOSHI, Y.; VENUGOPAL, M. N.; MOHAN, R. C. Stem bleeding disease of coconut: reproduction of symptoms by inoculation with *Thielaviopsis paradoxa*. **J Plantation Crops**, v. 14, p. 130-133, 1986.

PERSLEY, G. J. **The coconut palm: prosperity or poverty**. Canberra: ACIAR, 1990.