

Identificação molecular de fungos filamentosos isolados dos sintomas de superbrotamento em guaranazeiro

Lobo, I.K.C.^{1,2}, L.B. Almeida^{1,2}, Souza Á.², Sousa N. R.², Silva G.F.²

¹Universidade Federal do Amazonas – UFAM (Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, Coroado I - Manaus/AM), ²EMBRAPA Amazônia Ocidental (Rodovia AM-010, Km 29, Zona Rural, Caixa Postal 319 - Manaus/AM, Brasil). E-mail: gilvan.silva@embrapa.br

Resumo

O complexo superbrotamento, cujo agente causal é o fungo *Fusarium decemcellulare*, destaca-se como uma das principais doenças que acometem o guaranazeiro na região Amazônica. Entender a dinâmica da comunidade de fungos presente nas lesões e a interação com fatores bióticos e abióticos pode contribuir com o combate à doença. O objetivo deste trabalho foi identificar os diferentes fungos presentes nos três sintomas do superbrotamento em guaranazeiro e nos tecidos assintomáticos. Foi obtido um total de 77 fungos isolados a partir de tecidos sintomáticos e assintomáticos. Após uma triagem realizada por meio da técnica ERIC-PCR, 46 isolados foram analisados com base nas regiões ITS e D1/D2 da subunidade 28S do DNA ribossomal, resultando na identificação de 9 gêneros e 8 diferentes espécies de fungos no material analisado, além de 4 gêneros que não puderam ser identificados a nível de espécie. *F. decemcellulare* foi detectado nos três sintomas do superbrotamento, como esperado. Além disso, foram constatados fungos endofíticos com potenciais de controle biológico, como *Fusarium poae* e fungos do gênero *Pestalotiopsis*. O presente trabalho, portanto, apresenta informações que podem fundamentar novas táticas de combate ao superbrotamento.

Palavras-chave: complexo superbrotamento, comunidade de fungos, ITS.

Introdução

O guaraná é extraído das sementes de *Paullinia cupana* H.B.K. Typica e *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) e assume importante papel social e econômico na Amazônia brasileira e no estado da Bahia, devido a seu uso na agricultura familiar, suas propriedades medicinais e estimulantes (Atroch *et al.*, 2010).

O clima amazônico contribui para maior proliferação de doenças e estas são uma das principais causas da diminuição da produção de guaraná no estado do Amazonas, sendo que os danos e a incidência variam de acordo com o agente causal. Diante das dificuldades de controle, o complexo superbrotamento é, atualmente, um dos principais problemas da cultura do guaranazeiro na região amazônica. O primeiro relato atribuindo a causa do superbrotamento a *F. decemcellulare* foi feito por Bastista (1983). No estudo, 30 dias após as inoculações, foram observados os sintomas típicos da doença.

O complexo superbrotamento ataca diferentes partes da planta e apresenta três sintomas bem característicos: 1- hiperplasia floral, ocorrendo hiperplasia e hipertrofia atingindo toda a inflorescência; 2- superbrotamento de gemas vegetativas e florais, consistindo em brotações sucessivas a partir de pontos muito próximos uns dos outros, ao longo dos ramos; 3- galhas do caule, que é o entumescimento do coleto, podendo tomar grandes extensões do caule (Batista, 1983). Em função desse quadro, é inviável economicamente a realização de pulverizações com fungicidas como estratégia de controle da doença.

Muitos micro-organismos são fundamentais na prevenção de doenças da planta, bem como no seu crescimento e entender a dinâmica da comunidade fúngica presente nas lesões pode colaborar com o desenvolvimento de táticas mais eficientes de combate à doença. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar os diferentes fungos presentes nos três diferentes sintomas do superbrotamento em guaranazeiro.

Material e Métodos

Isolamento, Cultivo Monospórico e Extração de DNA genômico

O isolamento foi feito dos três sintomas de superbrotamento, além de material seco e tecidos assintomáticos provenientes dos clones 48 e 70, em condições de ocorrência natural da doença, no campo experimental da Embrapa Amazônia Ocidental (Rodovia AM 010, km 29, Manaus-AM). Foram realizadas a assepsia (álcool 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio 2% por 1 minuto) e lavagem com água estéril, procedimento repetido 3 vezes. Em seguida, fragmentos dos diferentes tecidos foram inoculados em placas de Petri com meio de cultura Ágar-Água. Depois, as colônias crescidas foram repicadas para o meio BDA (2 g L⁻¹ de peptona, 10 g L⁻¹ de dextrose, 16 g L⁻¹ de ágar, 1,5 g L⁻¹ de caseína, 2 g L⁻¹ de extrato de levedura e 250 g L⁻¹ de batata). O cultivo monósporico foi realizado por meio de diluição em água estéril a 1-10

unidades por campo microscópico (lente de 10x). Em seguida, 1 mL desta suspensão foi vertido em meio BDA, sendo as placas incubadas invertidas, à temperatura ambiente, por 24 a 36 horas. O esporo germinado foi transferido para outra placa de Petri com meio de cultura BDA. O DNA total dos fungos foi extraído segundo Doyle e Doyle (1990).

Análise da diversidade e identificação dos isolados

Amplificações e Sequenciamento

Após o isolamento, os 77 isolados obtidos (Tabela 1) foram, posteriormente, triados por meio da técnica ERIC-PCR, para definir os isolados com diferentes perfis de bandas a seguirem para o sequenciamento.

Tabela 1. Fungos isolados dos sintomas de superbrotamento, tecido assintomático e material seco dos clones 48 e 70, antes da triagem, totalizando 77 isolados.

Clone	Superbrotamento de gemas vegetativas	Superbrotamento de gemas vegetativas (material seco)	Hiperplasia floral	Galhas do caule	Tecido Assintomático
48	F52, F53, F54, F55, F56, F57, F58	F45, F46, F47, F48, F49, F50, F51	F59, F60, F61, F62, F63, F64, F65, F66, F67	-	F68, F69, F70, F71, F72, F73, F74, F75, F76, F77
70	F12, F13, F14, F15, F16, F17, F18, F19, F20, F21	F22, F23, F24, F25, F26, F27, F28, F29, F30, F31, F32, F33	F34, F35, F36, F37, F38, F39, F40, F41, F42, F43, F44	F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10, F11	-

Os fungos selecionados tiveram a região do DNA ribossomal ilustrada na Figura 1 sequenciada e os *primers* utilizados para a amplificação foram ITS5 (F) (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAGG-3') (White *et al.*, 1990) e NL4 (R) (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (O'Donnel, 1993).

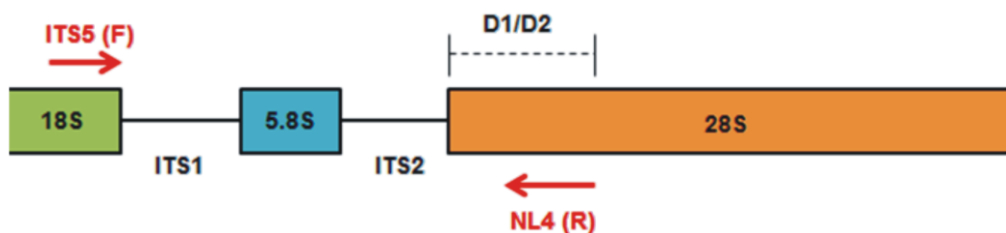


Figura 1. Região para identificação dos isolados (1000 a 1200 pb).

Análises das sequências, alinhamento e filogenia

Cada fragmento teve as duas fitas sequenciadas pelo método de Sanger e uma sequência consenso foi obtida para as análises subsequentes. As sequências foram comparadas com o banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com o auxílio da ferramenta BLAST. Em seguida, foram alinhadas e os filogramas foram construídos por meio do *software* Mega 6.0.

Resultados e Discussão

Isolamento e identificação molecular

Após a triagem com ERIC-PCR, 46 isolados tiveram a região do DNA ribossomal, ilustrada na Figura 1, sequenciada e os fungos identificados são os que constam na Tabela 2:

Tabela 2. Identificação de fungos isolados dos clones 48 e 70.

Clone	Superbrotamento de gemas vegetativas	Superbrotamento de gemas vegetativas (material seco)	Hiperplasia floral	Galhas do caule	Tecido Assintomático
48	<i>Diaporthe</i> sp., <i>Nigrospora oryzae</i> , <i>Pestalotiopsis</i>	<i>Microdochium</i> sp.	-	-	<i>Fusarium poae</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Diaporthe citri</i>
70	<i>Nigrospora oryzae</i> , <i>Diaporthe</i> sp., <i>Diaporthe phaseolorum</i> , <i>Phomopsis</i> sp.,	<i>Phomopsis</i> sp., <i>Diaporthe phaseolorum</i> , <i>Colletotrichum thailandicum</i>	<i>Albonectria rigidiuscula</i> , <i>Diaporthe citri</i>	<i>Poitrasia circinans</i> , <i>Fusarium polyphialidicum</i>	-

A comunidade fúngica isolada inclui *Poitrasia circinans*, *Pestalotiopsis* sp., *Nigrospora oryzae*, *Fusarium* sp., *F. polyphialidicum*, *F. poae*, *Albonectria*

rigidiuscula, *Colletotrichum thailandicum*, *Diaporthe* sp., *D. citri*, *D. phaseolorum*, *Phomopsis* sp. e *Microdochium* sp.. Desta forma, foi possível a identificação de 9 gêneros e 8 espécies de fungos. O fato de as demais espécies do presente trabalho não terem sido identificadas pode ser justificado pela região que foi trabalhada (ITS), uma vez que para o gênero *Colletotrichum*, por exemplo, o gene *gapdh* é mais eficiente na distinção de espécies (Weir *et al.*, 2012). Assim, há a necessidade de complementação das análises com outras regiões do DNA.

Este tipo de estudo, acerca da comunidade fúngica presente nos sintomas do superbrotaamento em guaranazeiro, ainda não havia sido realizado. Em guaranazeiro, fungos associados à planta saudável têm sido estudados e os gêneros mais comuns encontrados em *Paullinia cupana* var. *sorbilis* são *Guignardia*, *Phomopsis*, *Glomerella* (*Colletotrichum*) e *Xylaria*. Gêneros menos frequentemente encontrados são *Fusarium*, *Dreschrella*, *Pestalotia*, *Curvularia*, *Humicola* e *Nodulisporium* (Azevedo *et al.*, 2000).

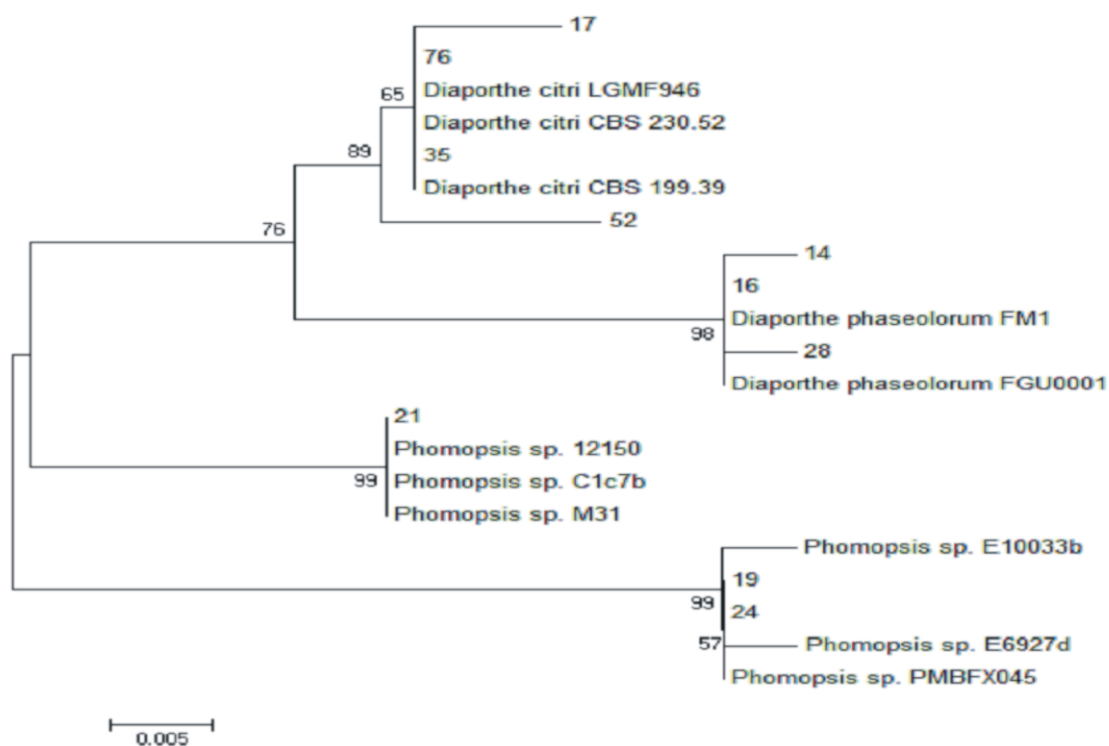


Figura 2. Análise filogenética molecular pelo método de Máxima Verossimilhança dos isolados identificados como *Phomopsis/Diaporthe*. *Bootstrap* mostrado próximo de cada ramo. Análises evolucionárias conduzidas no *software* MEGA 6.0. **14:** F14, **16:** F16, **17:** F17, **19:** F19, **21:** F21, **24:** F24, **28:** F28, **35:** F35, **52:** F52, **76:** F76.

No presente trabalho, fungos do gênero *Phomopsis/Diaporthe* (Figura 2) foram predominantes na identificação dos isolados e também de maior número de espécies

identificadas, seguidos por fungos dos gêneros *Fusarium*/*Albonectria* (Figura 3), *Nigrospora* (Figura 4), *Poitrasia* (Figura 5), *Pestalotiopsis* (Figura 6), *Colletotrichum* (Figura 7) e *Microdochium* (Figura 8).

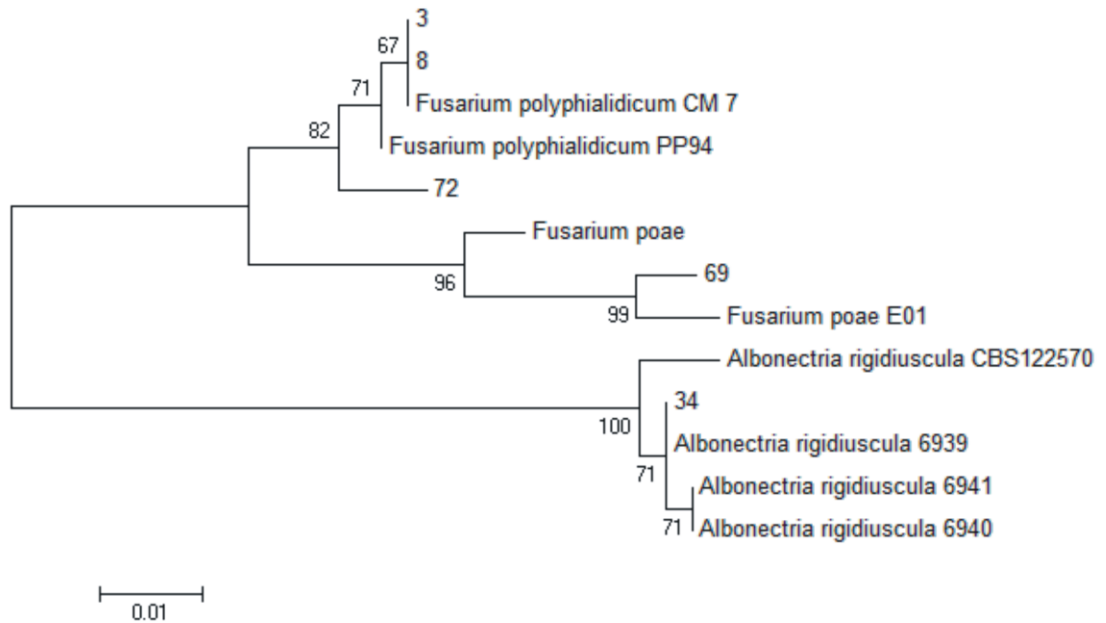


Figura 3. Análise filogenética molecular pelo método de Máxima Verossimilhança dos isolados identificados como *Fusarium*/*Albonectria*. *Bootstrap* mostrado próximo de cada ramo. Análises evolucionárias conduzidas no *software* MEGA 6.0. **3:** F3, **8:** F8, **34:** F34, **69:** F69, **72:** F72.

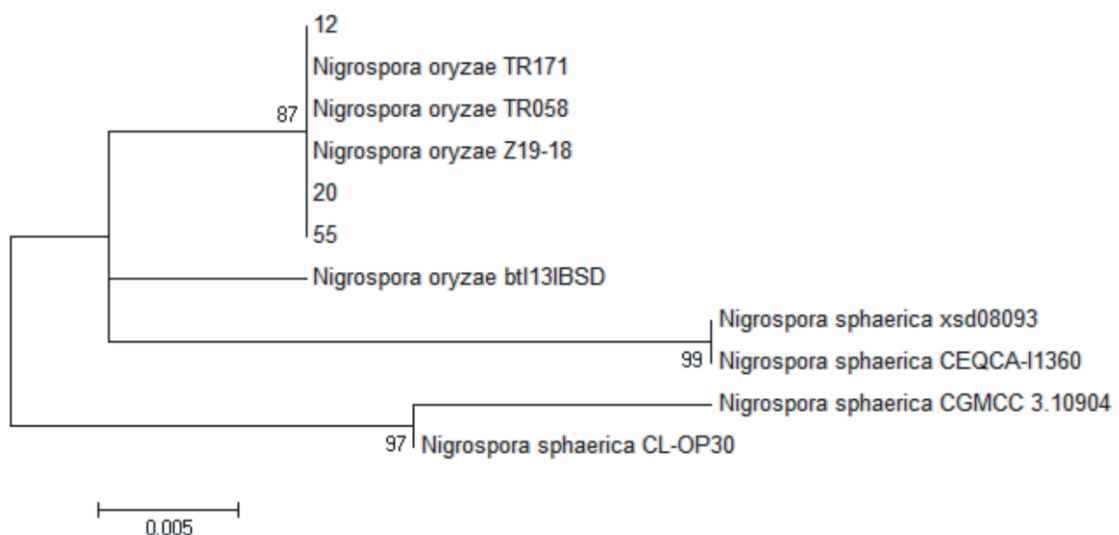


Figura 4. Análise filogenética molecular pelo método de Máxima Verossimilhança dos isolados identificados como *Nigrospora oryzae*. *Bootstrap* mostrado próximo de cada ramo. Análises evolucionárias conduzidas no *software* MEGA 6.0. **12:** F12, **20:** F20, **55:** F55.

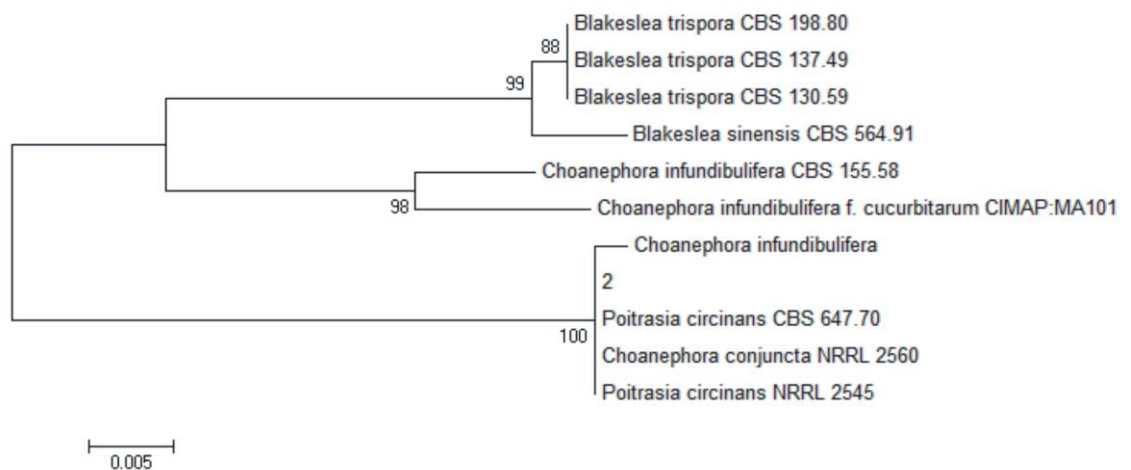


Figura 5. Análise filogenética molecular pelo método de Máxima Verossimilhança do isolado identificado como *Poitrasia circinans*. *Bootstrap* mostrado próximo de cada ramo. Análises evolucionárias conduzidas no *software* MEGA 6.0. **2:** F2.

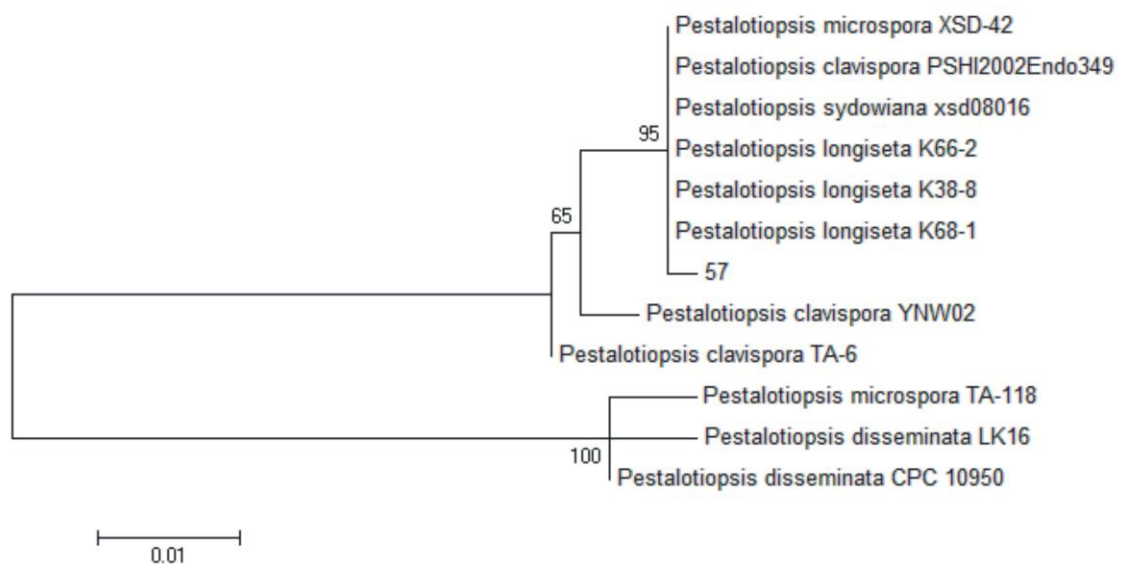


Figura 6. Análise filogenética molecular pelo método de Máxima Verossimilhança do isolado identificado como *Pestalotiopsis* sp.. *Bootstrap* mostrado próximo de cada ramo. Análises evolucionárias conduzidas no *software* MEGA 6.0. **57:** F57.

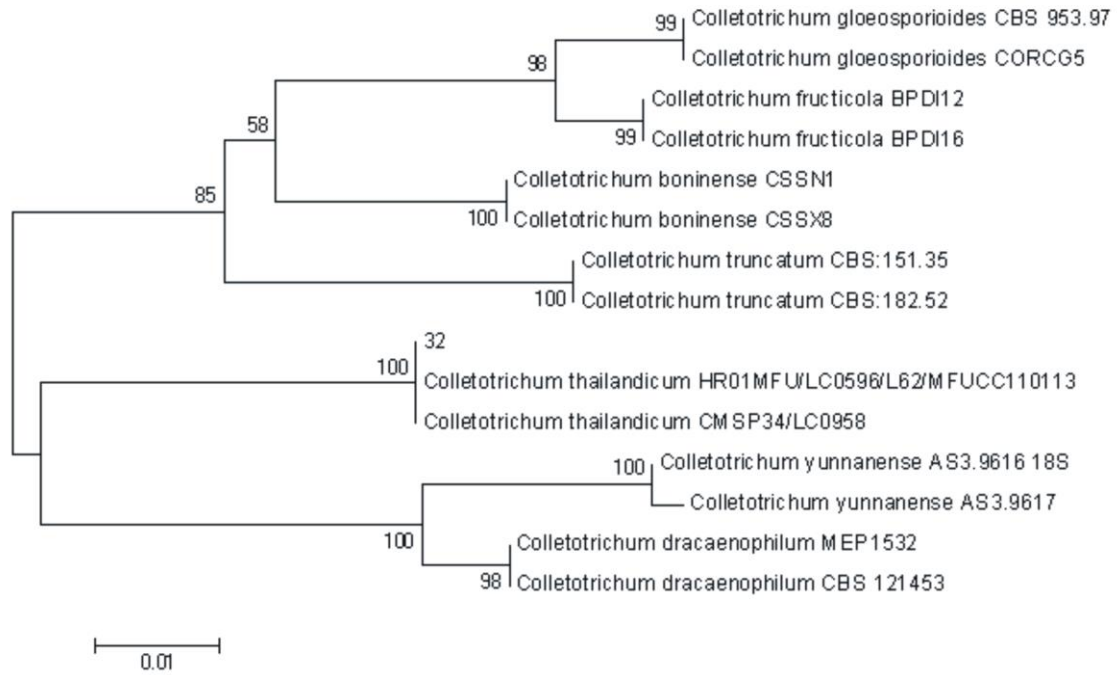


Figura 7. Análise filogenética molecular pelo método de Máxima Verossimilhança do isolado identificado como *Colletotrichum thailandicum*. *Bootstrap* mostrado próximo de cada ramo. Análises evolucionárias conduzidas no *software* MEGA 6.0. **32:** F32.

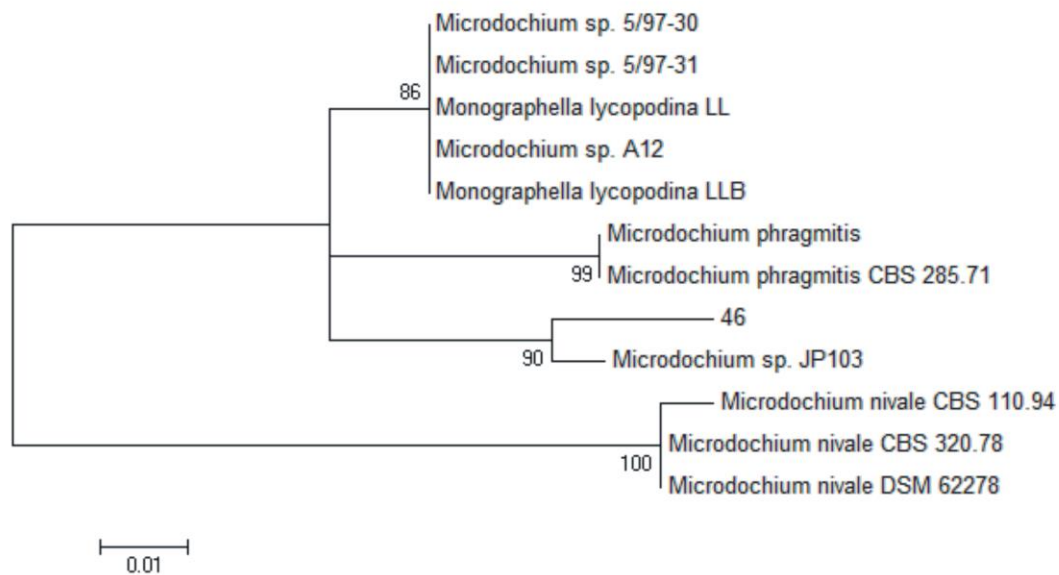


Figura 8. Análise filogenética molecular pelo método de Máxima Verossimilhança do isolado identificado como *Microdochium* sp.. *Bootstrap* mostrado próximo de cada ramo. Análises evolucionárias conduzidas no *software* MEGA 6.0. **46:** F46.

Os fungos do gênero *Diaporthe*, cuja forma assexuada é denominada *Phomopsis*, ocorrem como endofíticos, sapróbios e também como patógenos de plantas

(Gomes *et al.*, 2013). Foram identificados como sendo também alguns dos endofíticos isolados dos sintomas de superbrotamento em guaranazeiro *F. polyphialidicum* e *F. poae*. *F. poae* produz, comumente, uma ou mais micotoxinas (Stenglein, 2009), interessante a estudos de antagonismo contra *F. decemcellulare*, agente causal do superbrotamento. Alguns isolados foram identificados como *N. oryzae*, do qual observou-se uma especificidade pelo sintoma superbrotamento de gemas vegetativas, uma vez que *N. oryzae* não é comum como endofítico em guaranazeiro (Azevedo *et al.*, 2000). Em todos os sintomas analisados foram obtidos isolados identificados como *F. decemcellulare* (teleomorfo *Albonectria rigidiuscula*). Segundo Guimarães (2013), *F. decemcellulare* trata-se de um complexo de espécies homotáticas e heterotáticas. Guimarães (2013) observou, ainda, que os isolados heterotáticos causadores de galhas e superbrotamento em cacauzeiro e mangueira pertencem a uma espécie filogeneticamente distinta da espécie homotática, não causadora dos sintomas. Os gêneros com menos isolados identificados neste trabalho foram, além de *Colletotrichum*, os gêneros *Poitrasia*, *Microdochium* e *Pestalotiopsis*.

Conclusões

Foram observados endofíticos com potenciais para controle biológico, como *Fusarium poae* e fungos do gênero *Pestalotiopsis*.

Foi observada também a especificidade de *Nigrospora oryzae* pelo sintoma superbrotamento de gemas vegetativas, considerando que o mesmo não está sequer entre os fungos menos frequentemente isolados de guaranazeiro.

O primeiro relato de isolamento da comunidade fúngica dos sintomas de superbrotamento em guaranazeiro, portanto, apresenta informações essenciais a estudos mais aprofundados sobre estes fungos, buscando melhores estratégias para o controle do superbrotamento.

Referências

Atroch AL, Nascimento filho FJ do, Resende MDV, Lopes R, Clement CR (2010) Avaliação e seleção de progênies de meios-irmãos de guaranazeiro. *Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 53:123-130.

Azevedo JL, Maccheroni Jr W, Pereira JO, Araújo WL (2000) Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *EJB Electronic Journal of Biotechnology* 3:40-65.

Batista MF (1983) Doenças do guaranazeiro. Embrapa UEPAE – Circular Técnica 9. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/665065>.

Doyle J J, Doyle J L (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.

Gomes RR, Glienke C, Videira SIR, Lombard L, Groenewald JZ, Crous PW (2013) *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia* 31:1-41.

Guimarães EA (2013). Biologia reprodutiva, filogenia e patogenicidade de *Fusarium decemcellulare*. Lavras, Minas Gerais, Brasil, 58 p. (Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras).

O'Donnell K, (1993) *Fusarium* and its near relatives. *In*: Reynolds, D.R.; Taylor, J.W.(eds). The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics, CAB International, Wallingford, United Kingdom, 225–233.

Stenglein SA (2009) *Fusarium Poae*: A Pathogen That Needs More Attention. *Journal of Plant Pathology* 91: 25-36.

Weir BS, Johnston PR, Damm U (2012) The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73: 115-180.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J.(eds). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., New York, USA, 315-322.