



16 a 20  
outubro  
**2016**

Centro de  
Convenções de  
GOIÂNIA - GO

## MESA REDONDA: Diversidade e distribuição geográfica de fungos micorrízicos arbusculares

### **P3:** Estudo de Fungos Micorrízicos Arbusculares utilizando técnicas moleculares

Prof. Dra. Camila Maistro Patreze  
Departamento de Botânica – UNIRIO  
e-mail: [camila.m.patreze@unirio.br](mailto:camila.m.patreze@unirio.br)

19/10/2016  
Goiânia - GO





UNIRIO



16 a 20  
outubro  
**2016**

Centro de  
Convenções de  
GOIÂNIA - GO

## Tópicos

- ✓ Introdução
  - ✓ Linha do tempo
  - ✓ Publicações
- ✓ Amostragem molecular dos FMAs
- ✓ Reconhecimento do filo e filogenia molecular
- ✓ Estudos moleculares no Brasil
- ✓ Estudos de metagenoma, proteoma, transcriptoma e genoma
- ✓ Histórico de sequenciamento de genomas de FMAs





## Número de publicações envolvendo FMAs e estudos moleculares



Termos de busca	Número de artigos	Período das publicações
arbuscular mycorrhizal fungi	14247	1930-2016
arbuscular mycorrhizal fungi and molecular	1532	1990-2016
arbuscular mycorrhizal fungi and phylogeny	349	1992-2016
arbuscular mycorrhizal fungi and phylogeny and molecular	167	1992-2016
arbuscular mycorrhizal fungi and rDNA	371	1994-2016
arbuscular mycorrhizal fungi and mtDNA	9	2012-2016
arbuscular mycorrhizal fungi and genome	239	1990-2016
arbuscular mycorrhizal fungi and metagenomics	17	2008-2016
arbuscular mycorrhizal fungi and transcriptome	101	2001-2016
arbuscular mycorrhizal fungi and metabolome	14	2010-2015
arbuscular mycorrhizal fungi and next generation sequencing	34	2010-2016

➤ 10,7%

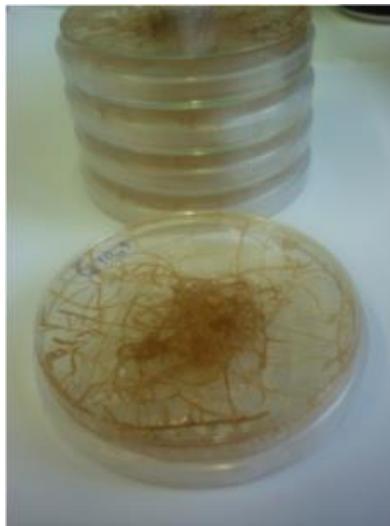
De 1990 – 2016:  
AMF: 13704 artigos  
AMF *and* molecular:  
11,1%



# Iniciando os estudos moleculares: o isolamento do ácido nucleico

## AMOSTRA

Cultivo *in vitro* de raiz



Cultivo armadilha



Múltiplos esporos



Simples esporos





## Para estudos de comunidades e análises metagenômicas

Solo rizosférico



Foto: Pavan Kumar Agrawal, Bhavdish N Johri

Raiz

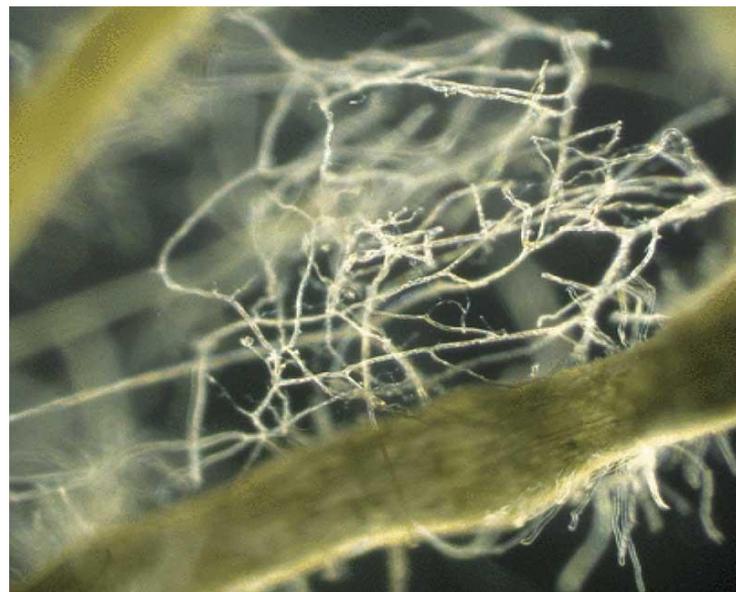
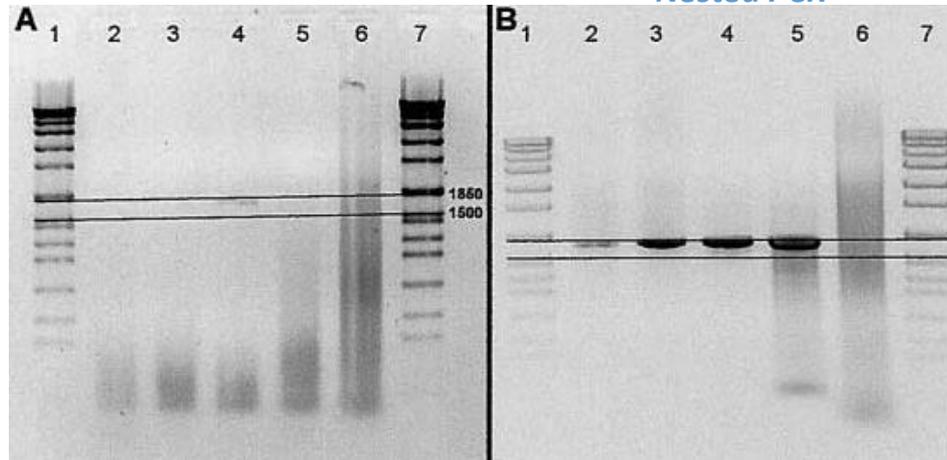


Foto: Yoshihiro Kobae

## QUANTIDADE DE DNA

### Nested PCR



Schwarzott e Schüßler (2001)

- 2 *Glomus luteum*
- 3 *Scutellospora gilmorei*
- 4 *Gigaspora aff. margarita*
- 5 *Glomus caledonium*
- 6 controle negativo

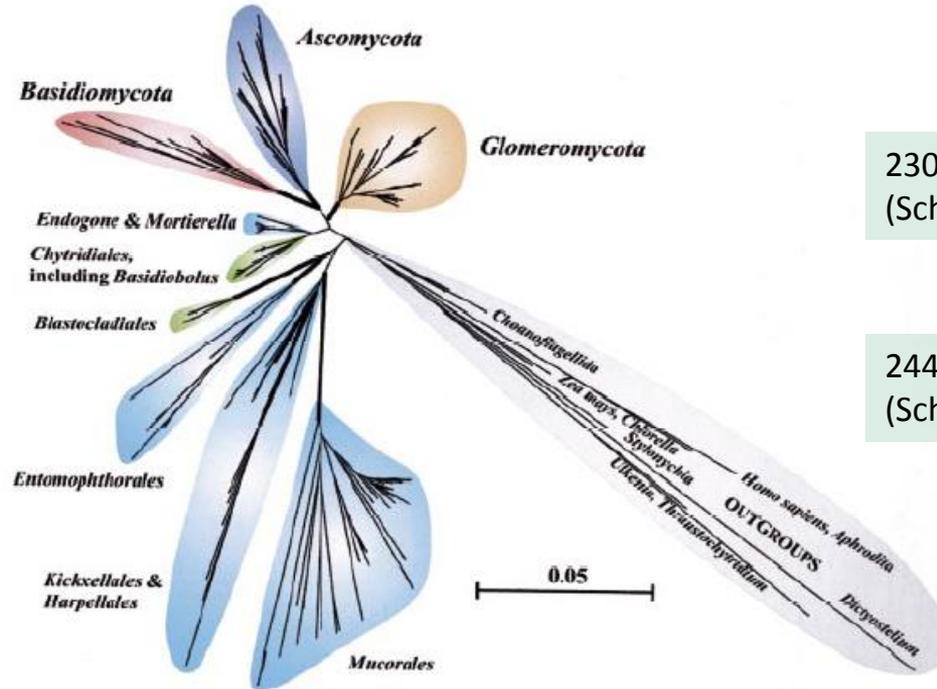
dsDNA HS: 10 pg/ $\mu$ L a 100 ng/ $\mu$ L  
dsDNA BR: 100 pg/ $\mu$ L a 1.000 ng/ $\mu$ L



2 a 15.000 ng/ $\mu$ L



# Filogenia dos fungos baseada nas seqüências do rRNA SSU



230 espécies de FMA são conhecidas (Schüßler and Walker, 2010)

244 espécies de FMA são conhecidas (Schüßler, 2013)



16 a 20  
outubro  
2016

Centro de  
Convenções de  
GOIÂNIA - GO

# Filogenia de Glomeromicetes baseada em outros genes

**Actina e fator de alongação 1-alfa**  
Helgason et al. (2003)

Grupo-irmão: Zigomicete (ordem Mortierellales)

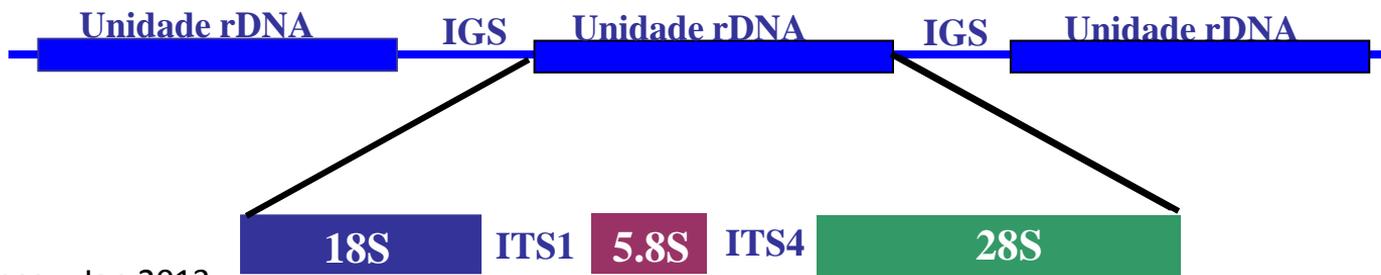
**gene  $\beta$ -tubulina**  
Corradi et al. (2004)  
Msiska e Morton (2009)

Grupo-irmão: Quitridiomicete



## Estudos filogenéticos: a busca pela região *barcoding*

CO1 para todos os animais  
16S para bactérias  
Genes de cloroplasto para plantas  
18S para fungos



>170 papers

>70 papers

>70 papers using LSU



16 a 20  
outubro  
2016

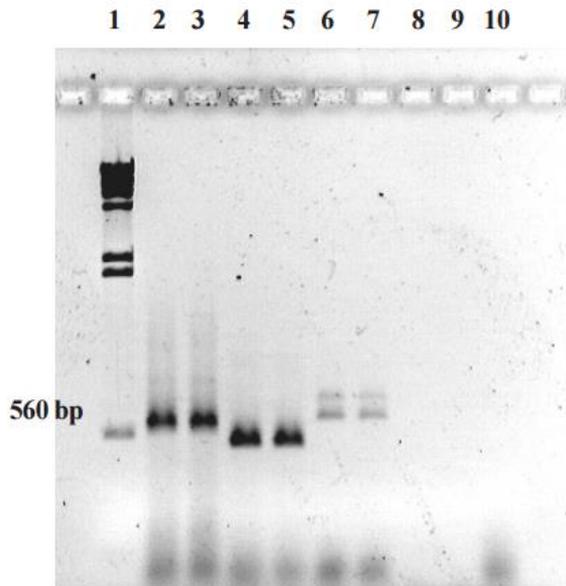
Centro de  
Convenções de  
GOIÂNIA - GO

## Estudos moleculares - Brasil



Colozzi-Filho e Cardoso (2000)

Detecção de *Acaulospora* em raízes de cafeeiro – PCR



ITS5 e ITS4

**2, 3: *Acaulospora longula* (esporo simples)**

**4, 5: *Scutellospora gilmorei* (esporo simples)**

**6, 7: raízes colonizadas (dil. 1:100)**

**8, 9: raízes não colonizadas (dil. 1:100)**

**10: controle negativo**

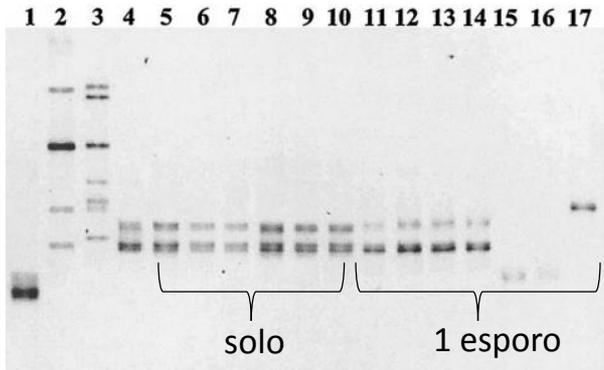
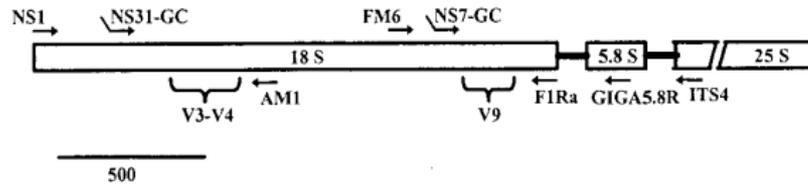


## Estudos moleculares - Brasil

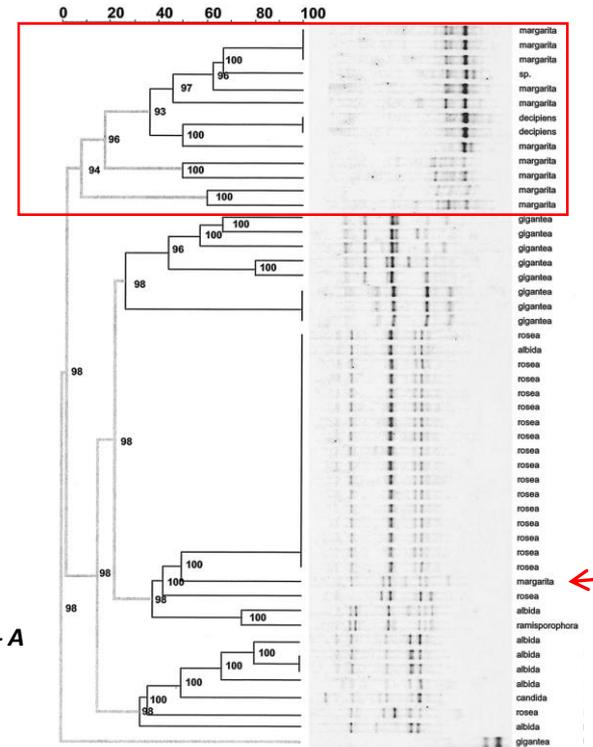


de Souza et al. (2004)

### Diferenciação de isolados de *Gigaspora* - DGGE



- 1: *G. gigantea*
- 2: *G. gigantea*
- 3: *G. ramisporophora*
- 4: *G. margarita*
- 5 -7: solo cultura A;
- 8-10: solo cultura B
- 11 -14: simples esporos - A
- 15 e 16: simples esporos de *S. heterogama-A*
- 17: simples esporos de *S. coralloidea - A*.





16 a 20  
outubro  
2016

Centro de  
Convenções de  
GOIÂNIA - GO

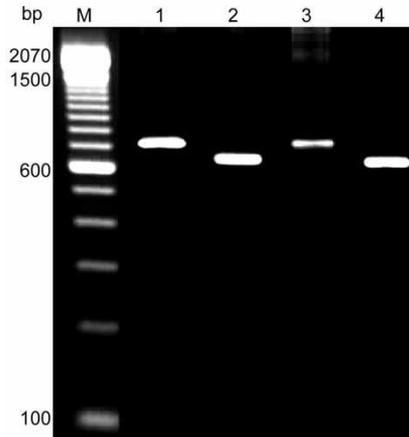
## Estudos moleculares - Brasil



Mergulhão et al. (2008)

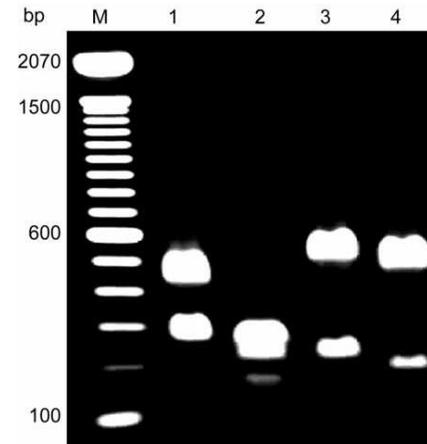
Detecção de espécies de *Paraglomus* e *Glomus* - PCR-RFLP

PCR- primers ITS1 e ITS4



- 1: *Paraglomus occultum*
- 2: *Glomus mosseae*
- 3: *Glomus intraradices*
- 4: *Glomus etunicatum*

Restrição com *MobI*

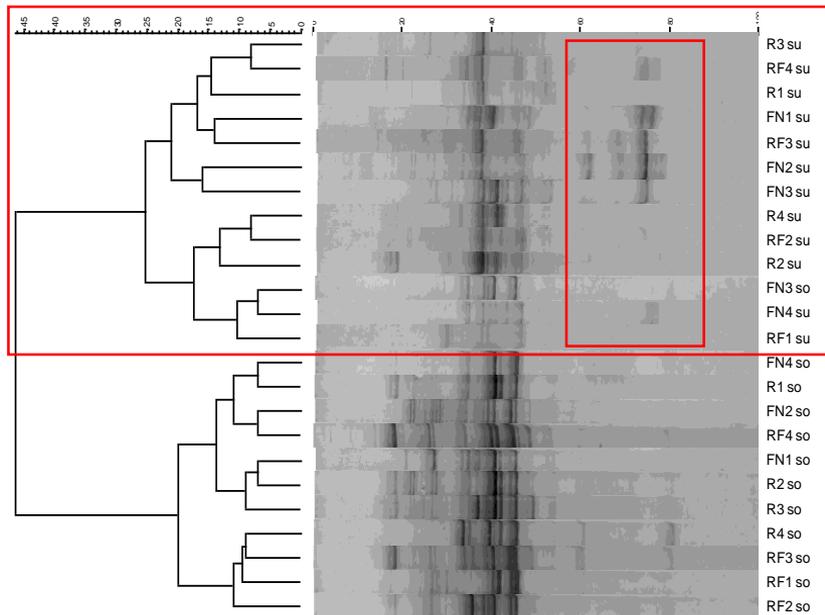


# Estudos moleculares - Brasil



Patreze et al. (2009)

Comunidades de solo e substrato inoculado de FMAs - *F-RISA*



ITSI-5.8S-ITS2

(Primers: 2234C e 3126T)





16 a 20  
outubro  
2016

Centro de  
Convenções de  
GOIÂNIA - GO

## Estudos moleculares - Brasil

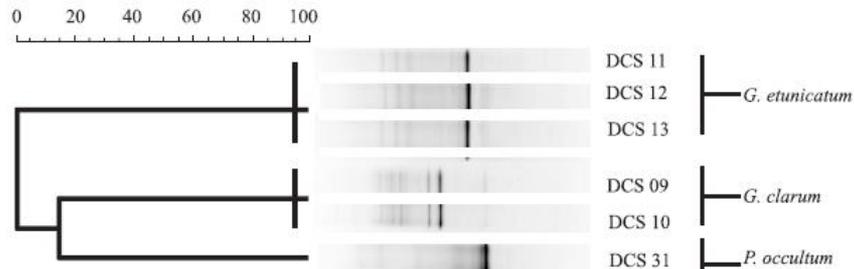


Novais, de Sousa e Siqueira (2010)

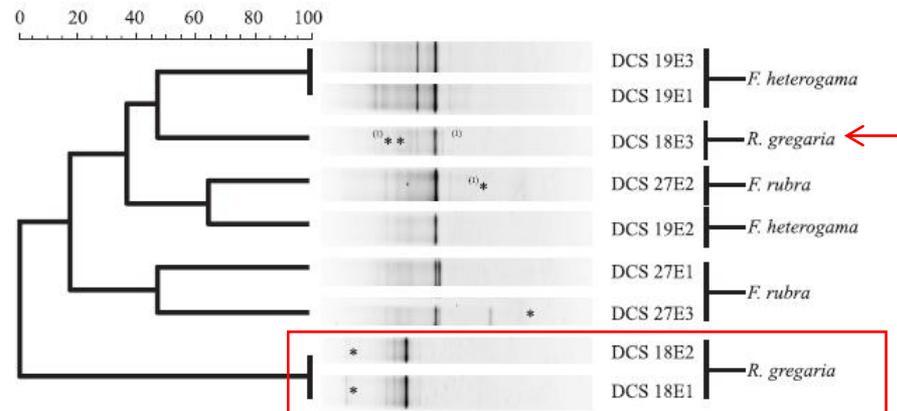
Detecção de isolados em coleção e discriminação de diferentes gêneros - *DGGE*

Região V9 do 18S rDNA

*Glomus* e *Paraglomus* (múltiplos esporos)



*Fuscutata* e *Racocetra* (simples esporos)





16 a 20  
outubro  
2016

Centro de  
Convenções de  
GOIÂNIA - GO

## Estudos moleculares - Brasil

Pagano et al. (2011)

**FMA**s como indicadores biológicos da qualidade de solos - *DGGE*

**E1:** *Anadenanthera peregrina* e *Eucalyptus camaldulensis*.

**E2:** *Platymenia reticulata* e *E. camaldulensis*.

**E3:** *Enterolobium contortisiliquum* e *E. grandis*.

**E4:** *Schinopsis brasiliensis* e *E. camaldulensis*

**PR:** área preservada na Reserva Legal

**Ca:** área degradada “Carrasco”.

T1 –nativa + fertilização completa(CF);

T2 –nativa + *Rhizobium* (R) e/ou FMA + 80% de fertilização

T3 –*Eucalyptus* + CF;

T4 –*Eucalyptus* + FMA + 80% de fertilização

T5 – nativa + *Eucalyptus* + CF,

T6 – nativa + *Eucalyptus* + R e/ou FMA + 80% de fertilização.

Primers NS1 e NS4;  
nested VANS1 e NS21



Reserva Biológica do Jaíba



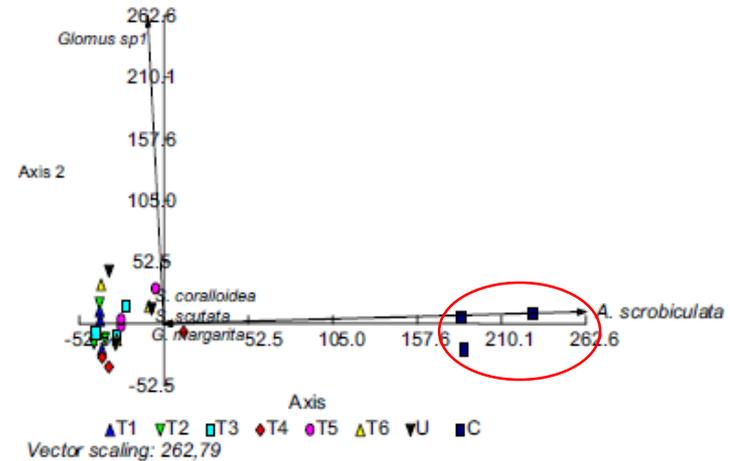
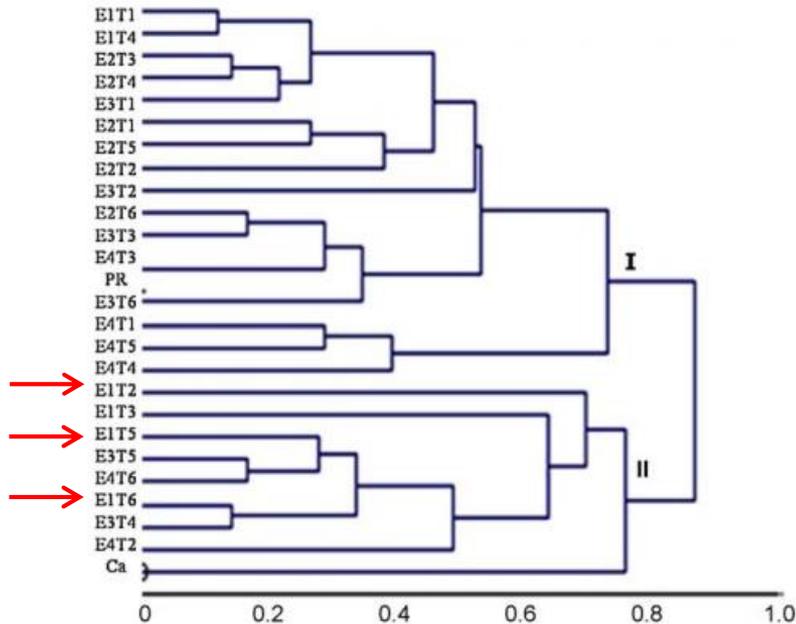
Nogueira (1998)

## Estudos moleculares - Brasil

Dois grupos distintos  
Todas E2 agruparam com PR

Diversidade de FMA nos sítios

E2: *Platymenia reticulata* (nativa) e *E. camaldulensis*.



## Estudos moleculares - Brasil

Błaszowski et al. 2012

Descrição de duas novas espécies: *Septoglomus fuscum* e *S. furcatum* - PCR e sequenciamento

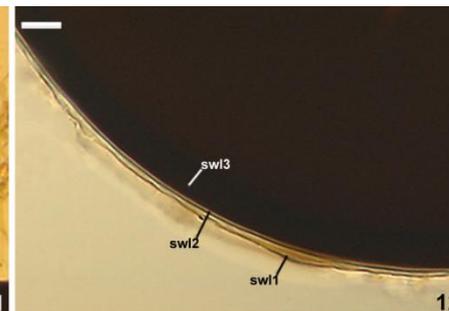
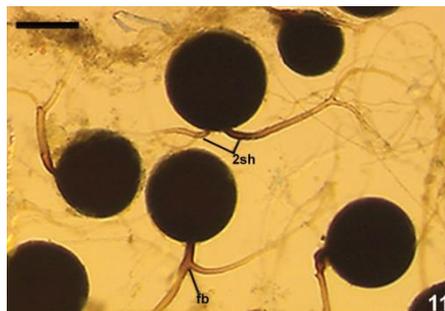


*S. furcatum* associado com *Cordia oncocalyx* de uma floresta seca do Ceará.

Parcial SSU - AML1 e AML2

Parcial LSU - LR1 e FLR2, *nested* - 28G1 e 28G2

ITS region - GLOM1310, Redecker(2000) e ITS4





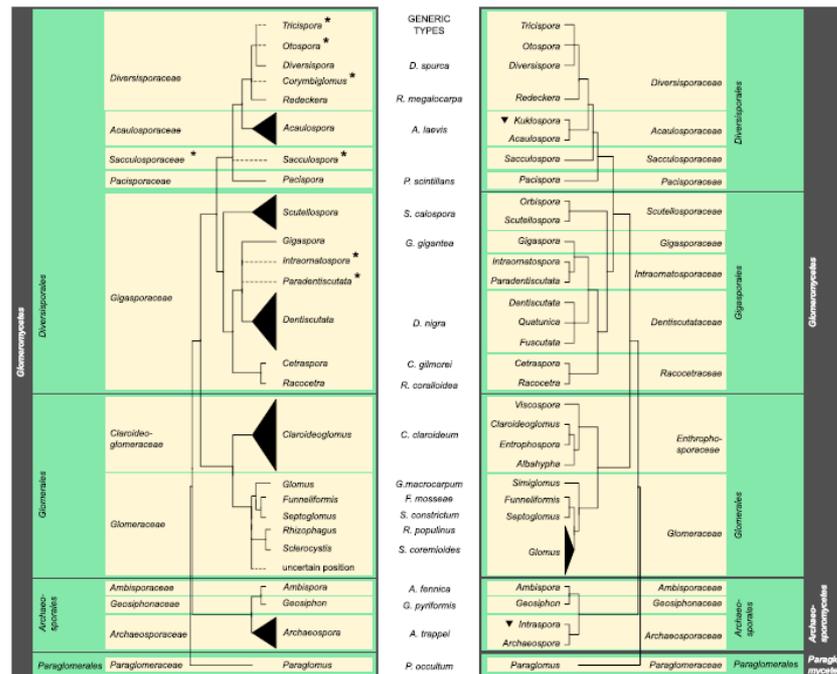
16 a 20  
outubro  
2016

Centro de  
Convenções de  
GOIÂNIA - GO

## Estudos moleculares - Brasil

Redecker et al. (2013)

Proposta de classificação dos FMAs baseada no consenso molecular-morfologia



Oehl et al. (2011)



16 a 20  
outubro  
2016

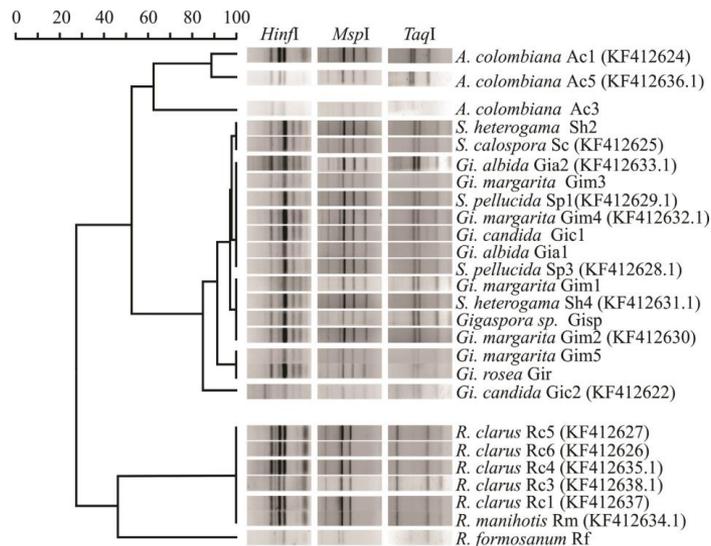
Centro de  
Convenções de  
GOIÂNIA - GO

## Estudos moleculares - Brasil

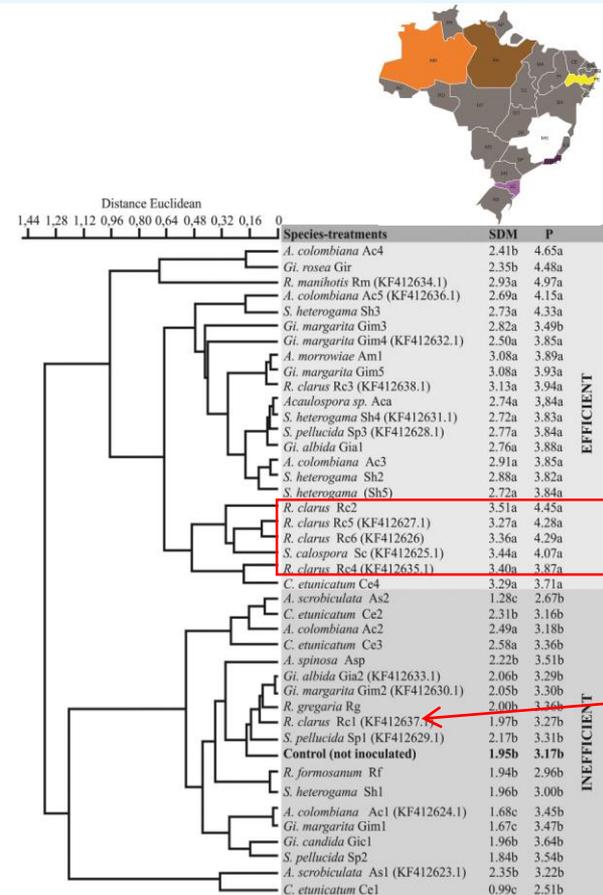
Novais et al. (2014)

Variabilidade funcional de esporos em plantas de milho - *PCR-RFLP*

NS1 e ITS4; *nested* NS31 e F1Ra



Não houve correlação entre gênero, espécie ou origem dos isolados com a promoção do crescimento





16 a 20  
outubro  
2016

Centro de  
Convenções de  
GOIÂNIA - GO

## Estudos moleculares - Brasil



Błaszowski, Chwat e Góralaska (2015)

Descrição de duas novas espécies: *Acaulospora ignota* e *Claroideoglomus hanlinii* –  
*PCR e sequenciamento*

Primers: SSUmAf–LSUmAr; nested SSUmCf–LSUmBr  
2006 caracteres alinhados.

Parque Estadual das Dunas de Natal Jornalista “Luiz  
Maria Alves” - Natal-RN

Esporos de  
*Acaulospora ignota*

*s*: esporo intacto  
*ss*: sáculo esporífero  
*n*: pescoço





16 a 20  
outubro  
2016

Centro de  
Convenções de  
GOIÂNIA - GO

## Estudos moleculares - Brasil



Moreira et al. 2016

### Diversidade de FMAs em raízes superficiais de *Araucaria angustifolia* - PCR e sequenciamento

18S rDNA (Primers NS31-AM1)

5 sítios

62 clones positivos de cada sítio;

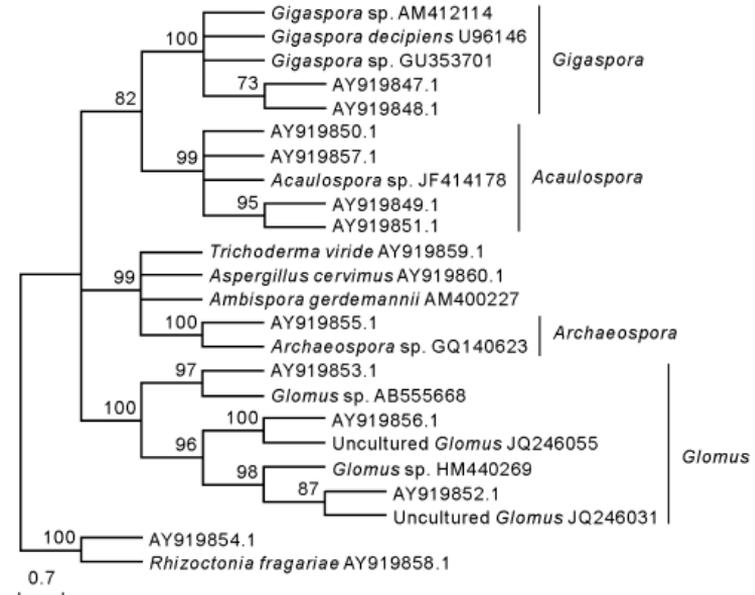
RFLP (2 enzimas):

10 tipos de clones – 13 sequencias

Taxa de colonização:

31- 54% raízes acima do solo

7-48% - raízes abaixo do solo





16 a 20  
outubro  
2016

Centro de  
Convenções de  
GOIÂNIA - GO

## Estudos moleculares - Brasil





# METAGENOMA

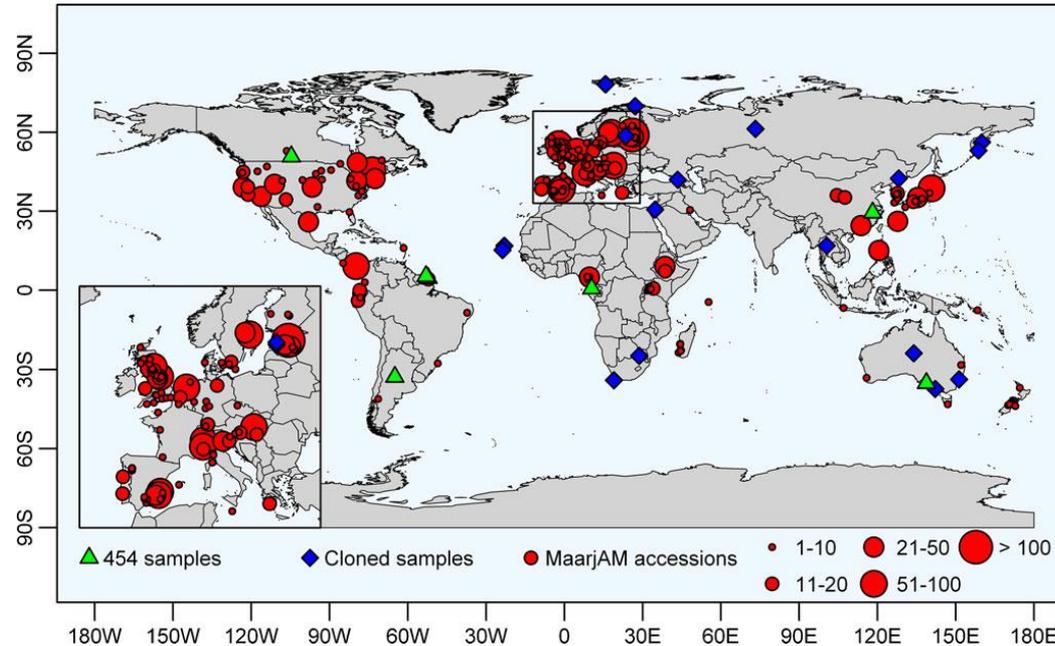
Öpik et al (2013)

Diversidade molecular usando amostragem global – Sequenciamento Sanger e Plataforma 454

Primers SSU:  
NS31 e AML2  
(560pb)

96 plantas;  
25 sítios;  
**204 filogrupos –**  
**VT (taxa virtual)**

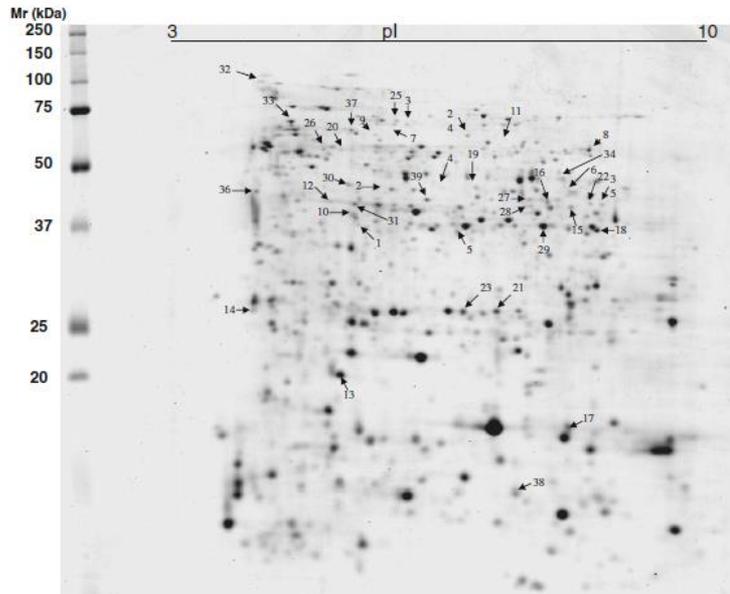
Aumentou de  
**308 a 341 VT**



## PROTEOMA

Cangahuala-Inocente et al. (2011)

Proteoma de videira inoculada com 2 espécies de AMF - eletroforese 2-D



39 spots diferencialmente acumulados entre controle x FMAs;

25 proteínas co-identificadas em *G.irregulare* e *G. mosseae*

defesa  
Biossíntese de lignina

Gir/Nm	Gm/Nm	Protein Name
		32 Subtilisin-like protease
		5 Putative signal peptidase
		36 26S proteasome regulatory subunit 55A
		18 TGF-beta receptor-interacting protein 1
		13 Putative ATP synthase D chain
		38 Ubiquitin carrier protein
		14 RNA-binding glycine rich protein
		21 ATP synthase subunit beta
		33 Putative cell division control protein
		24 Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
		39 Malate dehydrogenase
		23 Proteasome subunit alpha type-8
		1 Aspartate carbamoyltransferase 2
		17 CBS 1 (fragment)
		22 Fructose biphosphate aldolase
		16 Formate dehydrogenase
		29 Malate dehydrogenase
		19 GDP mannose-3',5'-epimerase
		27 Peroxidase precursor
		37 Chaperonin 60
		15 Phosphoserine aminotransferase
		20 Importin alpha-like protein
		25 Phosphoglyceromutase
		8 Catalase
		35 Fructose biphosphate aldolase
		28 Putative pyruvate dehydrogenase E1 alpha subunit
		34 Alcohol dehydrogenase-like protein
		11 Putative T-complex protein 1
		9 Putative phosphoesterase
		6 Putative RNA-binding protein
		4 Anthocyanidin dioxygenase
		10 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase
		30 Putative actin
		7 Monodehydroascorbate reductase
		12 Putative dehydrogenase
		26 ATP synthase subunit beta
		31 Adenosine kinase
		3 Putative phosphoglycerate mutase
		2 Probable cinnamyl alcohol dehydrogenase



16 a 20  
outubro  
2016

Centro de  
Convenções de  
GOIÂNIA - GO

## TRANSCRIPTOMA

Recchia (2015) – tese

**Expressão gênica da interação feijoeiro-FMAs sob déficit hídrico - RNAseq**

*Glomus clarum* , *Acaulospora scrobiculata* e *Gigaspora rosea*

**myc+/seca**

**myc+/controle**

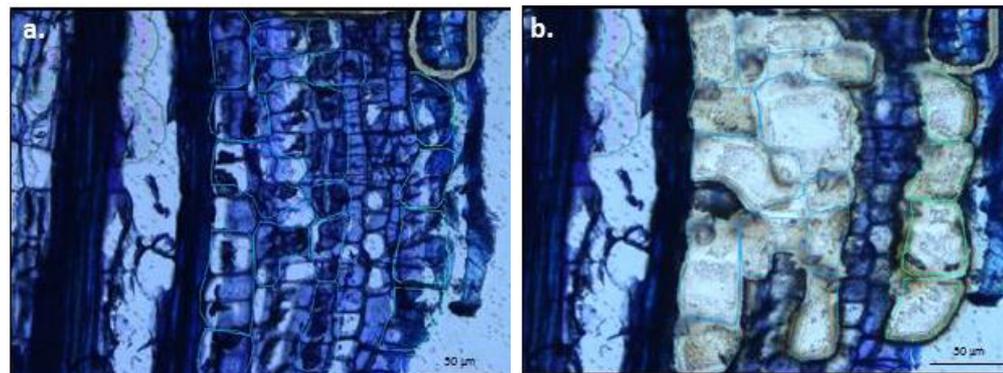
**myc-/seca**

**myc-/controle**

71 transcritos induzidos em feijoeiro por FMA-seca

Somente 2 genes detectados  
exclusivamente em células corticais  
contendo arbúsculos

### Laser Capture Microdissection(LCM)



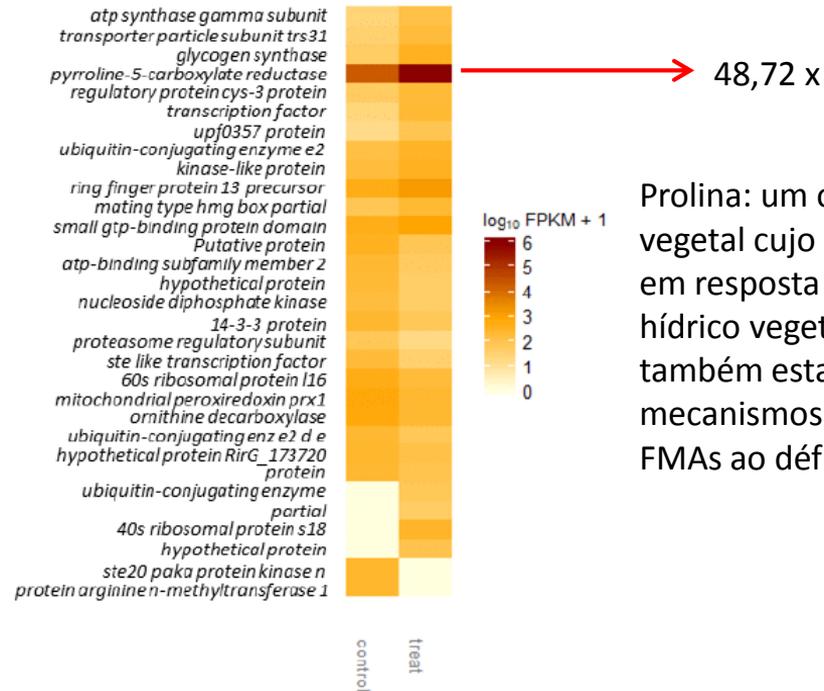
## Análise dos transcritos dos FMAs usando o genoma de referência de *Rhizophagus irregularis*

171 transcritos diferencialmente expressos - 31 transcritos com maior regulação FMA controle x FMA seca:

5 exclusivos de trat. seca

3 exclusivos de trat. controle

Dos 11 relacionados ao crescimento e desenvolvimento, 10 foram reprimidos no estresse por seca



Prolina: um osmoprotetor vegetal cujo acúmulo ocorre em resposta ao déficit hídrico vegetal, pode também estar envolvido no mecanismos de resposta dos FMAs ao déficit hídrico



16 a 20  
outubro  
2016

Centro de  
Convenções de  
GOIÂNIA - GO

## Genoma completo de FMAs

**2004:** obter genomas de bactérias e fungos associados a *Populus* (Martin et al. 2004);  
tamanho estimado de 14-16,5 Mb (Hijri e Sanders, 2004)

**2008:** Glomus Genome Consortium (CGC) – *Glomus intraradices*  
e diversos sequenciamentos em paralelo (*WGS, fosmideos, 454*) – estimativa de tamanho de genoma **>150Mb**

**2012:** transcrito de *Glomus intraradices* (Tisserant et al. 2012)

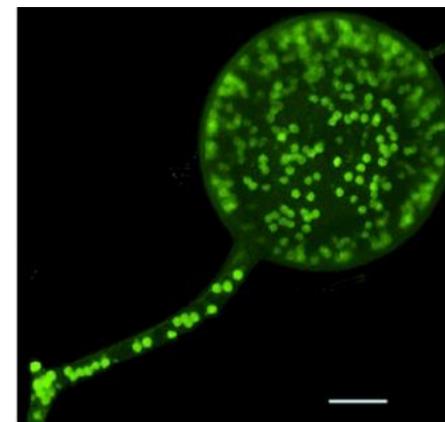
**2013:** genoma de *Rhizophagus irregularis* (Tisserant et al. 2013) – Sanger, 454, Illumina e PacBio

153Mb

28,232 genes

Baixo nível de polimorfismo (0,43 SNP por Kb)

**Biotrofismo Obrigatório:** não é explicado pela perda de genes do metabolismo central, mas pela ausência de genes que codificam enzimas que degradam a parede celular e de genes envolvidos com síntese de toxinas ou tiamina.





16 a 20  
outubro  
2016

Centro de  
Convenções de  
GOIÂNIA - GO

## Genomas mitocondriais

Lee e Young (2009)– *Rhizophagus irregularis* – **70.606 bp**

Pelin et al. (2012) – *Gigaspora margarita* - **96.998 bp**

Illumina : 4 667 308 reads  
454 pirosequenciamento: 266 716 reads  
Inserito: 337pb - **Cobertura ~52x**

Nadimi et al., 2012 – *Gigaspora rosea* - **97.350 bp**

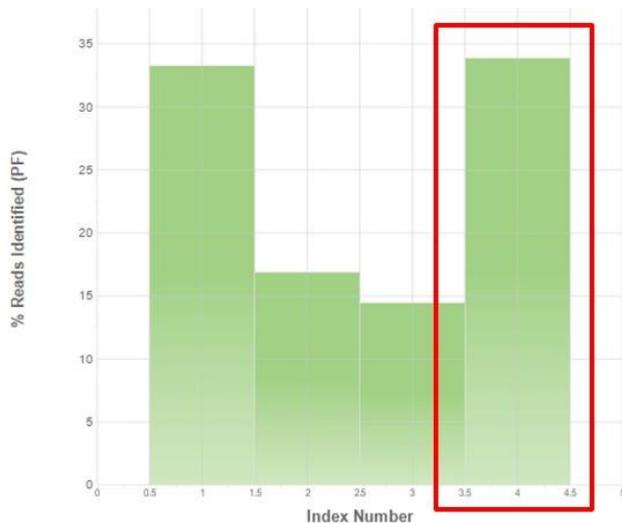
Formey et al. (2012) - *Rhizophagus irregularis* – 4 isolados - **70.783 bp a 87.754 bp.**

**Cobertura: 46,3X**

**Table 1** Strains of *Rhizophagus irregularis* used in this study and the number of reads and contigs obtained for each strain after 454 or MiSeq sequencing

Name	Origin of isolates	Reads 454 (MiSeq)	Contigs 454 (MiSeq)
MUCL_43204	Clarence Creek, Ontario, Canada	261 046	5928
MUCL_46239	Iles-de-la-Madeleine, Quebec, Canada	381 424	7311
MUCL_46240	Buckingham, Quebec, Canada	87 901 ( $5.5 \times 10^6$ )	797 ( $1.4 \times 10^5$ )
MUCL_46241	Ripon, Quebec, Canada	249 597	3632
DAOM197198	Pont Rouge, Quebec, Canada	247 631	4360

## Sequenciamento do genoma de *Gigaspora margarita*



Número de *reads*:  
4.441.150

Tamanho do genoma: ~154.000.000 pb  
Cobertura: **2,1x**  
Bases: 298.043.356



NCBI: cobertura de genomas completos de FMAs varia de **70-80x**

12.320.000.000 bases (80x)



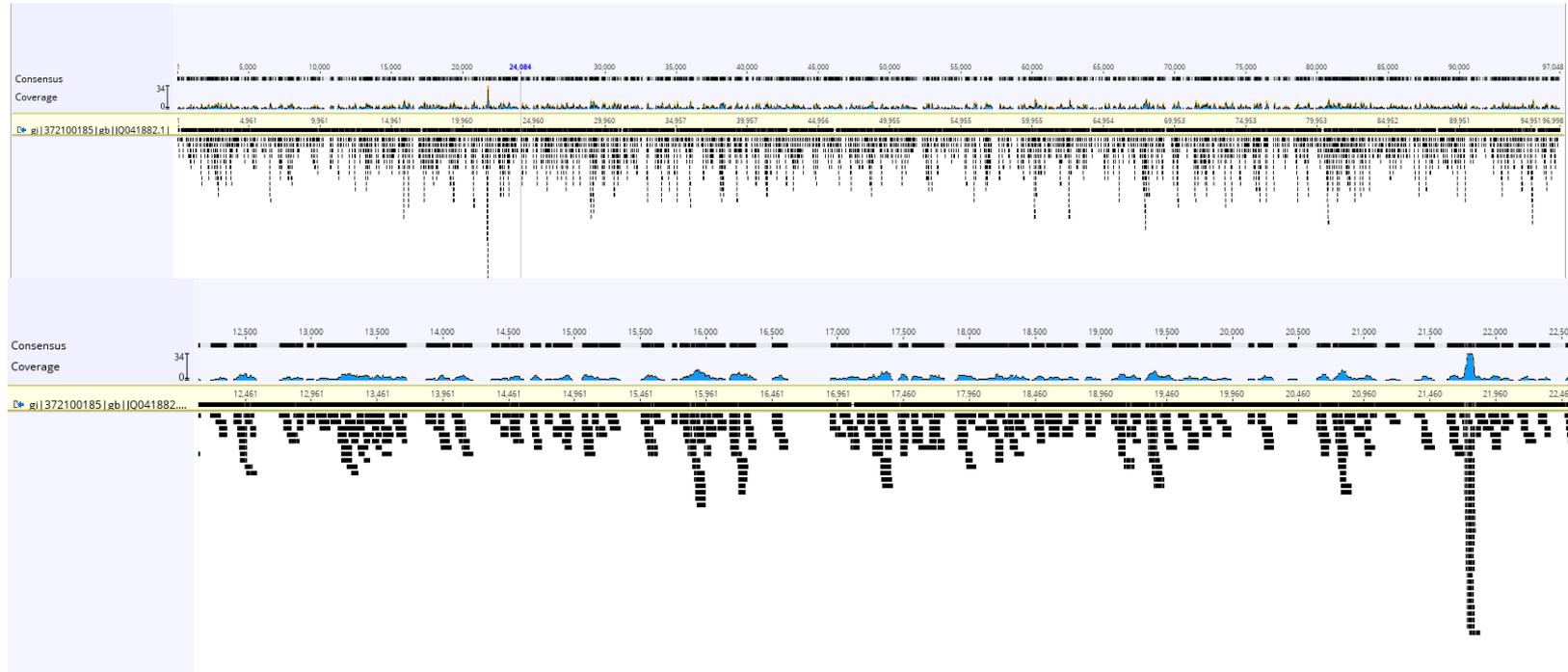
*flow cells* : 3,29 (2x75) ou 1,64 (2x150)



16 a 20  
outubro  
2016

Centro de  
Convenções de  
GOIÂNIA - GO

## Referência - Mitocôndria (*Gigaspora margarita* - JQ041882)





16 a 20  
outubro  
2016

Centro de  
Convenções de  
GOIÂNIA - GO

## Presença de outros organismos dentro de esporos

Outros microrganismos foram encontrados dentro dos esporos (Scannerini e Bonfante, 1991)

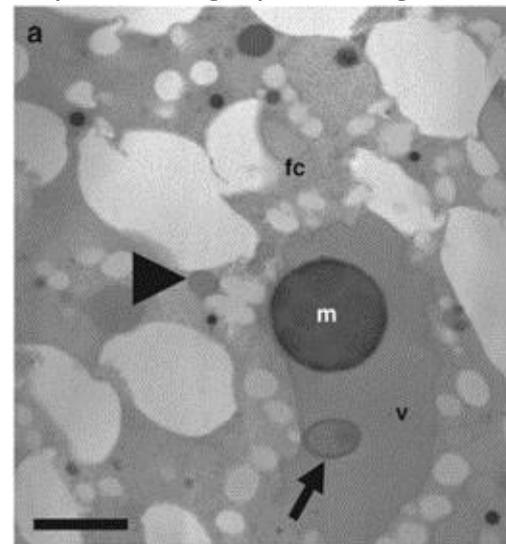
Endobacteria relacionada a *Mollicutes*

*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*



NCBI: 4 genomas de tamanho de 1.300.000 pb a 2.300.000 pb

Esporo de *Gigaspora margarita*



Desirò et al. 2003



UNIRIO

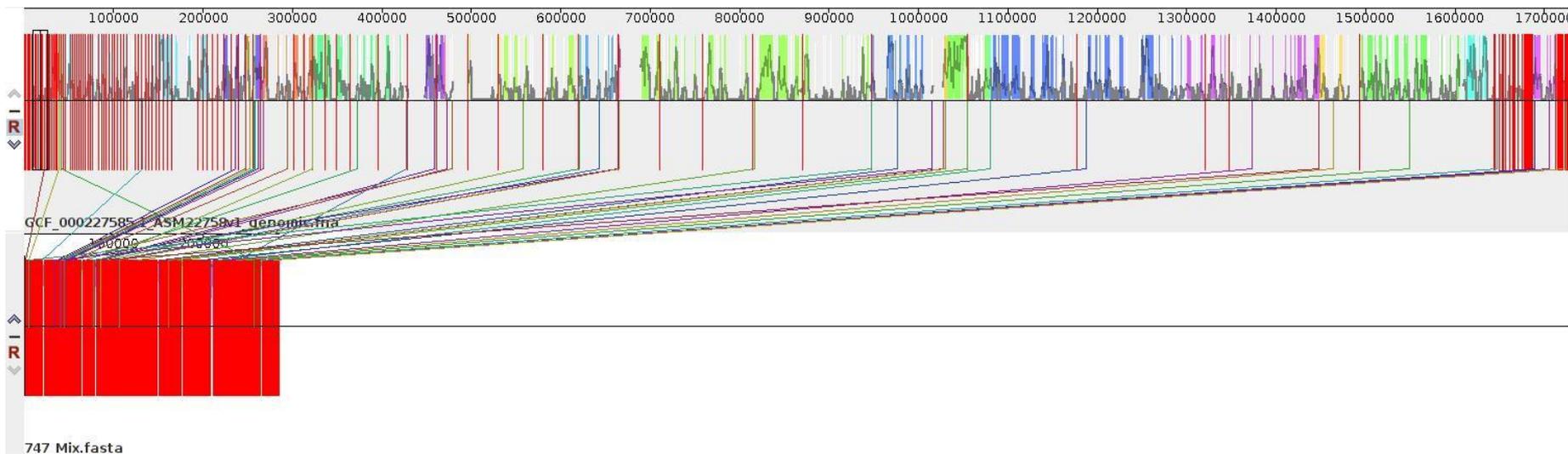


16 a 20  
outubro  
2016

Centro de  
Convenções de  
GOIÂNIA - GO

## Ordenamento dos Contigs baseado na Referência *Candidatus Glomeribacter gigasporarum* BEG34

1.726.950



**283.730 bases**

**Cobertura de 11x**



16 a 20  
outubro  
2016

Centro de  
Convenções de  
GOIÂNIA - GO

## Agradecimentos



Lázara Cordeiro (UNESP-Rio Claro) –*In memoriam*  
Eduardo Gross (UESC)



Siu Mui Tsai (CENA/USP)  
Adriana Pinheiro Martinelli (CENA/USP)  
Ezio Nalin de Paula (CENA/USP)



Milene Moreira (APTA Polo Regional Centro Sul)

Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso (ESALQ)  
Denise de L. C. Mescolotti (ESALQ)



Orivaldo José Saggin Júnior (EMBRAPA-Agrobiologia)  
Eliane Maria Ribeiro da Silva (EMBRAPA-Agrobiologia)  
Itamar Franco Garcia (EMBRAPA-Agrobiologia)  
Cândido Barreto de Novaes



INSTITUTO TECNOLÓGICO VALE

Gisele Lopes Nunes (ITV)  
Guilherme Oliveira (ITV)



### Alunos:

Mariana Cordeiro  
Juliana Weingartner Pernas  
Fábio São Pedro da Silva  
Camila Keiko Sylvestre Maeda  
Lauro Gonçalves Amado dos Santos  
Raquel Gorrera



Conselho Nacional de Desenvolvimento  
Científico e Tecnológico



Diretoria de  
Pesquisa