

Diagnóstico molecular por PCR-RFLP e gene *LYS2* para identificação de *Fusarium decemcellulare*

Matos K.S.¹, Hanada R.E.¹, Silva G.F.²

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Laboratório de Fitopatologia, 69080-971, Manaus, AM, Brasil. ²Embrapa Amazônia Ocidental, Laboratório de Biologia Molecular, 69010-970, Manaus, AM, Brasil. E-mail: gilvan.silva@embrapa.br

Resumo

Fusarium decemcellulare é encontrado como agente causal de doenças com diferentes sintomas em diversas espécies de plantas em regiões tropicais e subtropicais. Em guaranazeiro, espécie nativa da Amazônia de importância econômica e social, a doença denominada de complexo superbrotamento é atualmente um dos principais problemas da cultura. Técnicas moleculares são cada vez mais requeridas para identificação rápida e segura de patógenos como complemento as técnicas convencionais. O objetivo do trabalho foi desenvolver métodos moleculares por PCR e PCR-RFLP para rápida identificação de *F. decemcellulare*. O desenvolvimento do método baseado em PCR-RFLP foi realizado com base em 42 sequências do rDNA (18S, ITS1, ITS2, 5.8S e 28S) de 26 espécies do gênero *Fusarium* e identificado perfil de clivagem específico para Fdc com a enzima *HaeIII*. O diagnóstico baseado em PCR foi feito com base em sequências do gene *lys2* de 26 espécies do gênero *Fusarium* foram analisadas e *primers* específicos foram desenvolvidos para *Fdc*, denominados de Fdc Lys2 399F e Fdc Lys2 R, e Fdc Lys2 654F e Fdc Lys2 832R. Ambos os métodos mostraram-se eficientes para diagnóstico de *Fusarium decemcellulare*.

Palavras-chave: superbrotamento, hiperplasia floral, galhas, *Paullinia cupana*, marcador molecular.

Introdução

Fusarium decemcellulare Brick (teleomorfo *Albonectia rigidiuscula*) é encontrado como agente causal de doenças em mais de 80 espécies de plantas em

regiões tropicais e subtropicais (Farr e Rossman, 2016). No Brasil, culturas economicamente importantes como mangueira, cacaueiro, seringueira e guaranazeiro são afetadas pelo patógeno. Em guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.), espécie nativa de importância econômica e social da Amazônia, a doença é caracterizada por diferentes sintomas, como hiperplasia floral, superbrotamento das gemas vegetativas e galhas no caule. A doença denominada de complexo superbrotamento é atualmente um dos principais problemas da cultura (Atroch, 2002).

A identificação de *F. decemcellulare* (Fdc) é comumente realizada por caracteres morfológicos, em que muitas vezes pode ser complicada e demorada, devido à plasticidade das características morfológicas e das condições a serem testadas. O uso de técnicas moleculares é cada vez mais requerido para identificação rápida e segura de patógenos. Nas últimas décadas várias técnicas e marcadores moleculares têm sido desenvolvidos contribuindo para a identificação e diferenciação de espécies em *Fusarium*, dentre eles PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) baseada em padrões de restrição com o uso de enzimas selecionadas com base em sua habilidade de revelar polimorfismo nos fragmentos de DNA analisado (Lee et al., 2000; Bogale et al., 2007) e o gene *lys2 Aminoacidoputrescine aminotransferase*, específico em fungos e importante para a biossíntese da lisina foi indicado como um possível marcador genético para identificação de isolados do gênero *Fusarium* (Watanabe et al., 2011a; 2011b).

O objetivo do trabalho foi desenvolver métodos moleculares baseados em ITS PCR-RFPL e via amplificação do gene *lys2* para rápida identificação de *Fusarium decemcellulare*.

Material e métodos

A presente pesquisa foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular na Embrapa Amazônia Ocidental em Manaus, AM.

O desenvolvimento da técnica baseada em PCR-RFLP foi realizada com base em 42 sequências do rDNA (18S, ITS1, ITS2, 5.8S e 28S) de 26 espécies do gênero *Fusarium* obtidas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*): *F. acuminatum*, *F. armeniacum*, *F. asiaticum*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. decemcellulare*, *F. dimerum*, *F. dimerum* var. *violaceum*, *F. equiseti*, *F. incarnatum*, *F. kyushuense*, *F. langsethiae*, *F. lateritium*, *F. nurragi*, *F. oxysporum* f. sp. *raphani*, *F. oxysporum* f. sp. *rapae*, *F. poae*, *F. phyllophilum*, *F. solani*, *F. solani* f.

sp. *mori*, *F. sporotrichioides*, *F. subglutinans*, *F. tricinctum*, *Gibberella moniliformis*, *G. intermedia* e *G. zae*. O alinhamento das sequências foi realizado usando o programa MUSCLE e sítios de restrição foram identificados usando a ferramenta *Search (Find motif)* no programa MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013). O método foi validado usando isolados monospóricos previamente identificados como *F. decemcellulare* de guaranazeiro e como controle *Fusarium solani* f. sp. *piperis* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. O DNA dos isolados foi extraído usando o método CTAB de Doyle e Doyle (1987). A amplificação foi realizada usando os *primers* ITS5 (White et al., 1990) e NL4 (O'Donnell, 1993) com posterior clivagem com a enzima *HaeIII* (sítio de restrição GGCC) a 37 °C por 3 horas. O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose a 2%.

Primers específicos para o Fdc com base no gene *lys2* foi realizado com base em 40 sequências de 26 espécies do gênero *Fusarium* (mesmas espécies da metodologia anterior), incluindo duas sequências de *F. decemcellulare* utilizadas por Watanabe et al., (2011b) (AB586966 e AB586967) foram obtidas no banco de dados do NCBI e alinhadas no programa MEGA 6.0. Por meio da análise da homologia das sequências e da presença de dois íntrons encontrados somente nas sequências de *F. decemcellulare*, pares de *primers* específicos foram desenvolvidos para a amplificação da região conservada do gene *lys2* denominados de Fdc *lys2* 399F (5'-GTGCAGCTTCTTGTCATTG-3') e Fdc *lys2* 639R (5'-TCTCGCTCCTAAAGGCCGTATAC-3'), e Fdc *lys2* 654F (5'-CATCAGTGGCTAACAGACA G-3') e Fdc *lys2* 832R (5'-GCTGTCAATATCATTGAGCTC-3') (Figura 1).

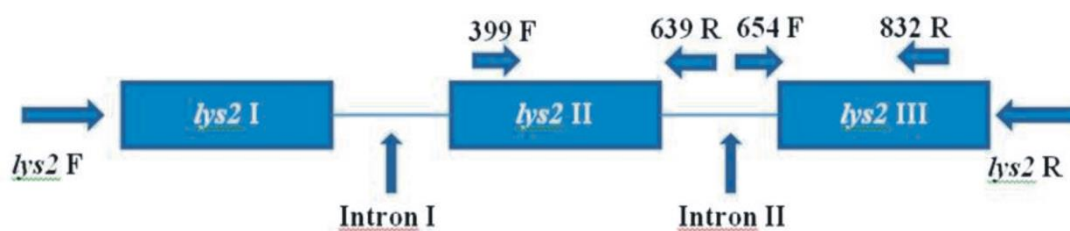


Figura 1 Esquema estrutural (éxons e íntrons) da região conservada do gene *lys2* em *F. decemcellulare*. *Primers* (F - forward e R - reverse) foram desenvolvidos a partir do íntron II localizado apenas em *F. decemcellulare*.

A reação da PCR foi realizada com um volume final de 25 µl contendo 1µL de DNA de *F. decemcellulare*, 1µL de cada *primer*, 2,5 µL de tampão, 1,0 µL de dNTPs, 1,5 µL de MgCl₂ e 0,2 µL de Taq DNA. Na amplificação, a desnaturação inicial foi de 94 °C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, temperatura de anelamento de 60 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e extensão final de 72 °C por 1 minuto. O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose a 2%.

Resultados e discussão

Nas análises de polimorfismo, a perda do primeiro sítio de restrição localizado na região ITS 1 ocorreu devido a inserção de cinco nucleotídeos (GCTCG) entre as duas citosinas (Figura 2) que gerou um fragmento de restrição ~500pb em *F. decemcellulare* (*A. rigidiuscula* e *Albonectria albosuccinea*) e fragmentos menores nas outras espécies de *Fusarium* que possuem pelo menos cinco sítios de restrição (Figura 3).

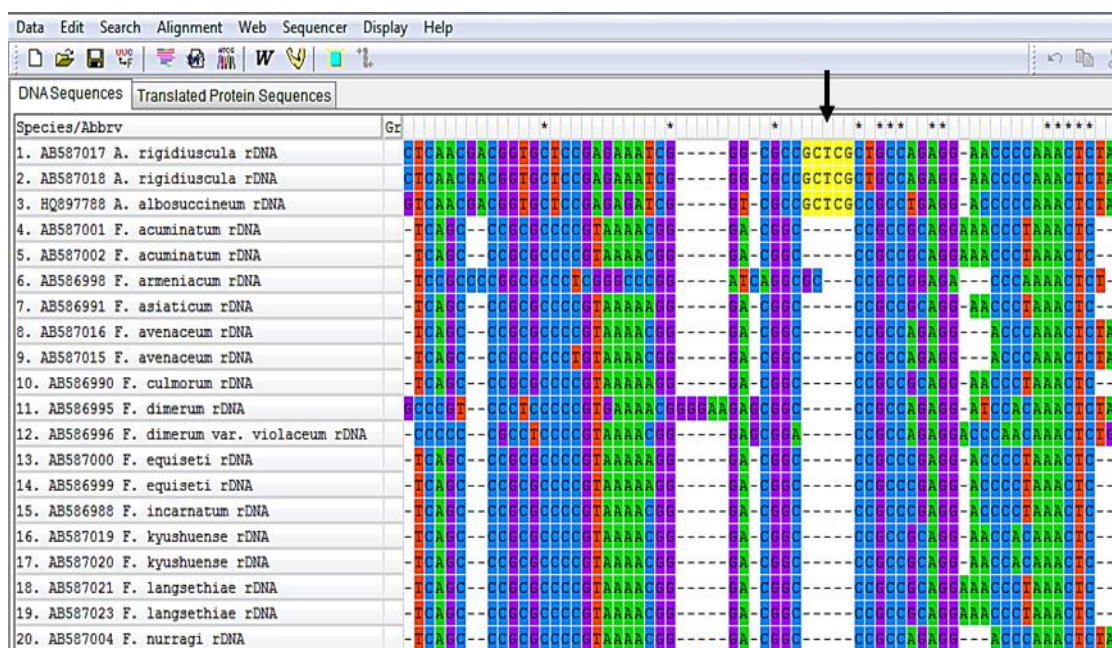


Figura 2 Alinhamento das sequências da região rDNA (18S, ITS1, ITS2, 5.8S e 28S) das espécies do gênero *Fusarium*. Na região ITS 1 ocorre a inserção de cinco nucleotídeos (GCTCG) entre duas citosinas (seta) em *Fusarium decemcellulare* (fase sexuada: *Albonectria rigidiuscula* e *A. albosuccinea*).

A digestão do produto ITS com diferentes enzimas de restrição revelou perfis diferentes entre *F. decemcellulare* e a espécie controle, possibilitando a diferenciação inter e intra-específica. Análise *in silico* com HaeIII permite diferenciar 24 das 26

espécies de *Fusarium* analisadas neste trabalho. O método de PCR-RFLP foi validado utilizando isolados de *F. decemcellulare* de guaranazeiro e como controle *F. oxysporum* f. sp. *cubense* e *F. solani* f. sp. *piperis* o que permitiu separar as espécies podendo ser observado o padrão de bandas geradas após clivagem com a enzima *HaeIII* em gel de agarose a 2% (Figura 3).

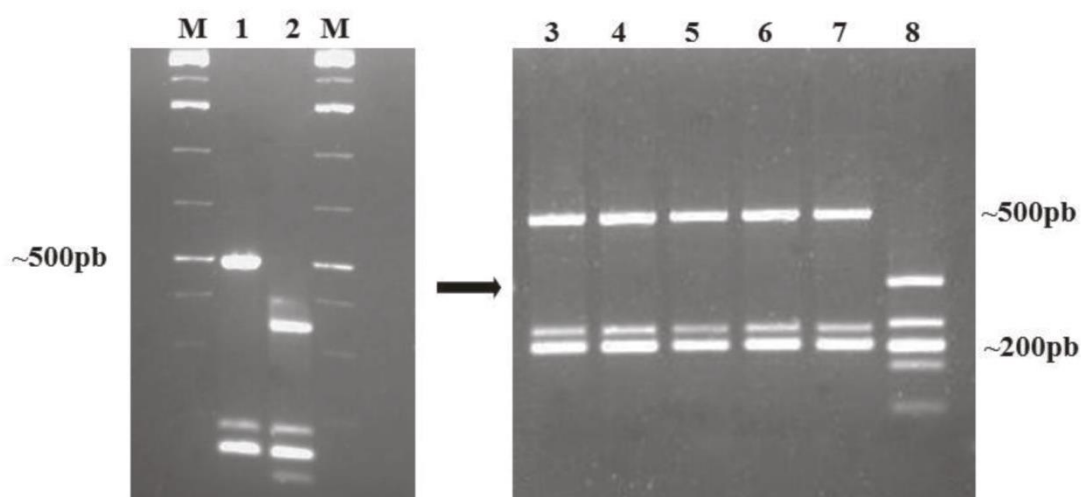


Figura 3 PCR-RFLP clivagem com a enzima *HaeIII* em gel de agarose (2%). M representa o marcador 1kb plus (invitrogen). Números 1, 3-7 representam isolados de *Fusarium decemcellulare*, 2 - *F. oxysporum* f. sp. *cubense* e 8 - *F. solani* f. sp. *piperis*.

As análises de PCR-RFLP baseiam em tamanho de fragmentos gerados por amostras de DNA após clivagem com enzimas de restrição e são comparadas entre número e tamanho de fragmentos que surgem após a digestão do DNA (Marques et al., 2002). As relações genéticas de 12 espécies de *Fusarium* foram investigadas utilizando a região ITS e PCR-RFLP com sete enzimas de restrição e cinco grupos foram observados de acordo com o polimorfismo observado entre as espécies analisadas (Lee et al., 2000). A técnica de PCR-RFLP proporcionou um diagnóstico simples e barato para a identificação de *Fusarium redolens* e membros de três clados de *F. oxysporum* (Bogale et al., 2007).

Validação do diagnóstico para Fdc baseado no gene *lys2* foi confirmado tanto em gel por meio da amplificação do fragmento do tamanho esperado (~260pb), quanto por meio do sequenciamento do amplicon. Das diferentes combinações de *primers* desenvolvidas neste trabalho os *primers* Fdc *lys2* 399F e 639R foram selecionados como os *primers* mais eficientes (Figura 4).

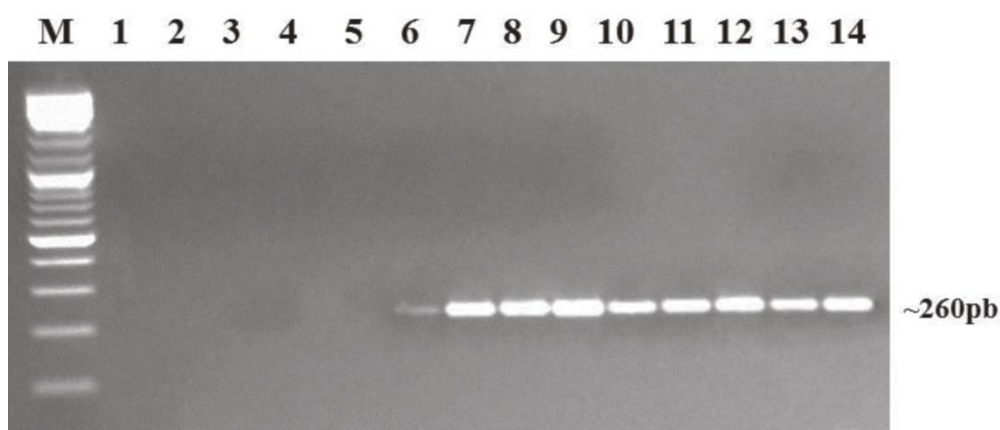


Figura 4 Identificação de *Fusarium decemcellulare* com base na amplificação do gene *lys2* usando os *primers* Fdc 399R e Fdc 639R. M - representa o marcador 1kb plus (invitrogen). Números de 1 a 5 representam diferentes fungos filamentosos isolados de guaranazeiro, e 6 a 14 representam isolados de *F. decemcellulare*.

O gene *lys2* é específico em fungos e está relacionado com a síntese da lisina. Resultados indicam que esse gene tenha sido submetido à seleção positiva dentro do gênero *Fusarium*. Estudo avaliou seis marcadores genéticos para identificar isolados de diferentes espécies do gênero *Fusarium* e o gene *lys2* apesar de não ser considerado um bom marcador para análise filogenética em *Fusarium*, devido a possível transferência horizontal (Watanabe et al., 2011a; 2011b), neste trabalho mostrou-se um interessante marcador para identificação de Fdc, devido a ocorrência de um íntron presente apenas nessa espécie.

As técnicas de diagnóstico molecular têm sido utilizadas na taxonomia de microrganismos e aplicadas também em programas de melhoramento genético. Elas permitem avaliar a variabilidade em nível de DNA e identificar diferenças entre isolados e espécies (Marques et al., 2002). O uso de ferramentas moleculares para a identificação de fungos apresenta diversas vantagens como, alta sensibilidade, especificidade e rapidez e pode ser um diagnóstico mais rápido do que por métodos convencionais. De acordo com os resultados obtidos nesse estudo os marcadores moleculares PCR-RFLP e gene *lys2* podem ser utilizados para diagnóstico rápido e seguro de *F. decemcellulare* como complemento a identificação convencional.

Conclusão

Os métodos moleculares desenvolvidos no estudo, PCR-RFLP e amplificação da região correspondente ao íntron II do gene *lys2*, foram eficientes para a identificação de *Fusarium decemcellulare*.

Referências

- Atroch AL (2002) Aspectos gerais da cultura do guaraná. *Foods and Food Ingredients*. J Jpn 204:53-59.
- Bogale M, Wingfield BD, Wingfield MJ, Steenkamp ET (2007) Species-specific primers for *Fusarium redolens* and a PCR-RFLP technique to distinguish among three clades of *Fusarium oxysporum*. *FEMS Microbiol Lett* 271:27-32.
- Doyle JJ, Doyle JL, Hortorium LHB (1987) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Farr DF, Rossman AY. (2016). Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Disponível em: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>. Acessado em 12 Jan 2016.
- Lee Y, Yong C, Byung M (2000) PCR-RFLP and Sequence Analysis of the rDNA ITS Region in the *Fusarium* spp. *J Microbiol* 38:66-73.
- Marques EK, Ikuta N, Lunge VR, Fonseca ASK (2002) Diagnóstico molecular e biotecnologia. In: Serafini, A.M., Barros, N.M., Azevedo, J.L. Biotecnologia: avanços na agricultura e na agropecuária, Caxias do Sul, 101-130.
- O'Donnell K (1993) *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds, D.R., Taylor, J.W. The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematic. Wallingford, CAB International, 225-233.
- Rossman AY, Samuels GJ, Rogerson CT, Lowen R (1999) Genera of *Bionectriaceae*, *Hypocreaceae* and *Nectriaceae* (*Hypocreales*, *Ascomycetes*). *Stud Mycol* 42:134-137.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725-2729.

Watanabe M, Yonezawa T, Lee K, Kumagai S, Sugita H, Gotod K, Hara Y (2011a) Evaluation of genetic markers for identifying isolates of the species of the genus *Fusarium*. *J Sci Food Agric* 91:2500-2504.

Watanabe M, Yonezawa T, Lee K, Kumagai S, Sugita Y, Goto K, Hara Y (2011b) Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. *BMC Evolutionary Biology* 11:322.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR protocols: A guide to methods and application*, Academic Press, 315-322.