

Primers* específicos para a determinação de MAT-1 em *Fusarium decemcellulare

V.K.S. Siqueira¹, K.S. Matos¹, R.E. Hanada¹, G.F. Gualberto², G.F. Silva²

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, ²Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, Brasil. E-mail: gilvan.silva@embrapa.br

Resumo

Fusarium decemcellulare é caracterizado por ser endófito ou patogênico a diversas plantas em regiões tropicais e subtropicais. Em guaranazeiro é o agente causal de superbrotamento um dos principais problemas da cultura. O estudo do sistema *mating type*, idiomorfos *MAT-1* e *MAT-2*, além de fornecer uma compreensão detalhada para delimitar espécies dentro de complexos de espécies, é fundamental para estudo da dinâmica e do potencial de variação genética de um patógeno. *Primers* degenerados disponíveis na literatura para determinar *mating type* em várias espécies de *Fusarium*, não foi capaz de amplificar o *MAT-1* em Fdc. Assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver *primers* específicos para determinar *MAT-1* em *F. decemcellulare*. Inicialmente *primers* degenerados foram desenhados com base nas sequências do *MAT-1* disponíveis no NCBI, amplificado em Fdc e o fragmento do tamanho esperado foi clonado e sequenciado para o desenho de iniciadores específicos que foram validados usando população de isolados de Fdc de diferentes locais de coleta.

Palavras-chave: superbrotamento, heterotalismo, homotalismo, gene *MAT*.

Introdução

Fusarium decemcellulare Brick (teleomorfo *Albonectria rigidiuscula*) está presente principalmente em regiões tropicais, podendo ser endófito ou patogênico a diversas plantas (Farr e Rossman, 2016).

Em guaranazeiro, espécie nativa da Amazônia, *F. decemcellulare* causa a doença denominada de superbrotamento (hipertrofia floral, hiperplasia das gemas vegetativas e galhas no caule) sendo um dos principais problemas da cultura (Atroch, 2002). E apesar da

relevância econômica da doença, ainda pouco se conhece sobre a biologia reprodutiva, variabilidade genética, estrutura da população ou sobre o potencial evolutivo e risco deste patógeno.

A identificação de espécie biológica por meio de cruzamentos em laboratório pode ser útil quando não há marcadores morfológicos suficientes para delimitar espécies (Rossman et al. 1999; Leslie e Summerell, 2006) como em *F. decemcellulare* que existem evidências de que representa um complexo de espécies com diferença filogenética entre isolados homotáticos e heterotáticos, uma clara identificação molecular por PCR dos *Mating type* é útil e pode auxiliar nos cruzamentos entre os isolados (Guimarães, 2013).

O sistema de cruzamento entre fungos é denominado de *mating type*, consiste em um loco *MAT* e geralmente apresenta dois idiomorfos, *MAT-1* e *MAT-2*. Os genes do loco *MAT* possuem regiões conservadas entre espécies distantes, que codificam proteínas denominadas HMG-box (*high mobility group*) e α -box que regulam todo o processo de reprodução sexual. Em espécies heterotáticas o cruzamento ocorre entre isolados de *mating types* opostos, enquanto que em espécies homotáticas, os isolados são autoférteis (Leslie e Summerell, 2006).

Estudos baseados em determinação de *mating type* e cruzamentos têm sido utilizados para delimitar espécies dentro de *Gibberella fujikuroi species complex* (GFC) que é composto por distintas espécies filogenéticas e biológicas, e que anteriormente eram denominadas apenas como *Fusarium moniliforme* (Leslie e Summerell, 2006). *Primers* degenerados foram desenvolvidos para determinar *mating type* em várias espécies de *Fusarium* (Kerényi et al., 2004). Esses *primers* foram testados em *F. decemcellulare*, entretanto, somente o idiomorfo *MAT-2* foi amplificado. O presente trabalho teve como objetivo desenhar *primer* específico para determinar *MAT-1* em *F. decemcellulare* para auxiliar estudos de indução da fase sexuada em laboratório.

Material e métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular na Embrapa Amazônia Ocidental em Manaus, AM.

Sequências da região conservada *MAT-1* de 20 isolados de *Fusarium* foram obtidas no banco de dados do GenBank (AJ535627.3, AJ535626.3, AJ535625.4, AM295820.1, AF100925.1, AM295817.1, AM295819.1, AM295818.1, AM295816.1, AM295815.1, AM295814.1, AM295302.1, AM295301.1, AJ876530.1, AM072517.1, AM072514.1,

AM072513.1, AM072512.1, AJ876534.1, AJ876531.1) foram alinhadas no programa MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013) e *primers* degenerados foram desenhados para *MAT-1* denominados de fus052 F (5'-AAGCGCCCTCTBAAYGSYTTC-3') e *MAT-1* fus241 R (5'-TTRGCAATYARRGCCCATTTG-3').

Os *primers* degenerados desenhados para *MAT-1* foram testados com as amostras de DNAs de *F. decemcellulare*. A reação da PCR foi realizada com um volume final de 20 µL, com 1µL de *primers* (0,25 µM), tampão 10X (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,4; 1% Triton X-100), 1,2 µL MgCl₂ (1,5 mM), 0,4 µL dNTP (0,2 mM), 0,05 U/µL Taq polimerase, 20 ng/µL de DNA e água destilada. As condições de ciclos foram: desnaturação inicial de 94 °C por 30 segundos, seguida por 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, temperatura de anelamento de 60 °C por 30 segundos, extensão de 72 °C por 90 segundos, e extensão final de 70 °C por 1 minuto.

Os fragmentos amplificados foram clonados com o kit CloneJET PCR Cloning (*Thermo Scientific*), segundo as recomendações descritas pelo fabricante. Os clones foram selecionados por PCR de colônia para confirmação de cada fragmento, para extração de plasmídeo e purificados para sequenciamento, usando o kit *BigDye® Terminator v3.1* e sequenciados em um sequenciador 3500 Genetic Analyser.

O alinhamento das novas sequências de nucleotídeos foi através do programa MEGA 6.0 e a partir da homologia dessas sequencias foi realizado o desenho de *primers* específicos para determinação de *MAT-1* para *F. decemcellulare* no PRIMER 3. Os *primers* degenerados *MAT-2* de Kerényi et al., (2004) também foram testados com os isolados de *F. decemcellulare*.

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5 % para a visualização dos resultados. O comprimento dos fragmentos amplificados foi comparado com o marcador Fermentas 1 Kb.

Resultados e discussão

Os *primers* degenerados desenhados para determinação de *MAT-1* foram testados com isolados de *F. decemcellulare* e dois fragmentos foram observados com 189 pb e 373 pb. Os fragmentos foram clonados e sequenciados.

A sequencia do fragmento de 373 pb do gene *MAT-1* de *Fusarium decemcellulare* apresentou dois íntrons e dois blocos de sequencias conservadas (Figura 1).

```

1  AAGCGCCCTCTTAACGCTTTCATGGCTTTTCGAAGTGAGTGCCAAACTTCTGCTAACGAA
1  K R P L N A F M A F R
61  TCCGATGCTGACTTCGACAAGCATATTACCTCAAACCTCTTTCCGGAATATCCGCAGAAGC
21  Y Y L K L F P E Y P Q K L
121 TCGTGTCTGGCTTCCTCACCACCCTCTGGAACAAGGACCATAATCGCAACAAATGGGCCC
41  V S G F L T T L W N K D H N R N K W A L
181 TAAAGCGCCCTCTTAACGCTTTCATGGCTTTTCGAAGTGAGTGCCAAACTTCTGCTAAC
61  K K R P L N A F M A F R
241 GAATCCGATGCTGACTTCGACAAGCATATTACCTCAAACCTCTTTCCGGAATATCCGCAGA
81  Y Y L K L F P E Y P Q K
301 AGCTCGTGTCTGGCTTCCTCACCACCCTCTGGAACAAGGACCATAATCGCAACAAATGGG
101 L V S G F L T T L W N K D H N R N K W A
361 CCCTGATTGCCAA

```

Figura 1 Sequencia do fragmento de 373 pares de base do gene *MAT-1* de *Fusarium decemcellulare* obtido a partir do DNA genômico. Os aminoácidos deduzidos são apresentados abaixo de cada sequencia. Em vermelho dois íntrons localizados *in silico* e em negrito dois blocos de sequencias conservadas.

Os *primers* específicos para *MAT-1* em *F. decemcellulare* foram desenhados através do alinhamento das sequências clonadas no MEGA 6.0, denominados de *MAT-1* FDC F (5'-ACGCTTTCATGGCTTTTCG-3') e *MAT-1* FDC R (5'-GCCCATTTGTTGCGATTATG-3').

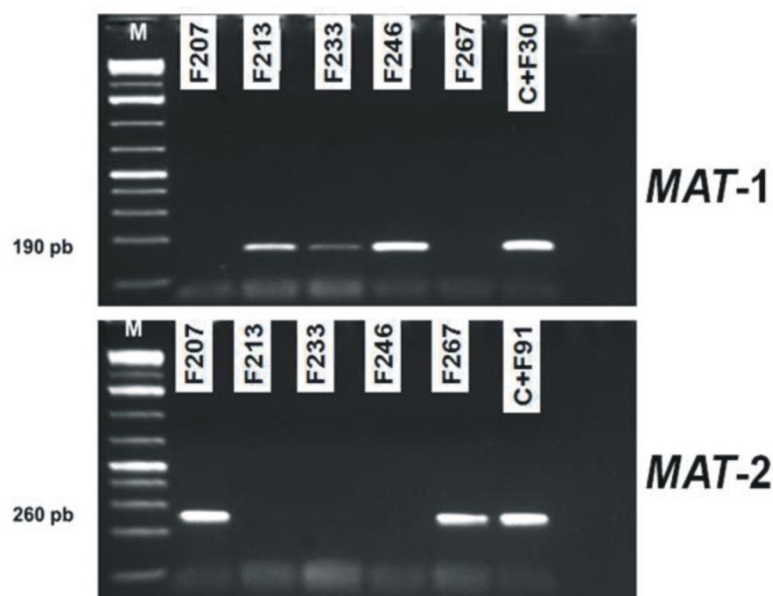


Figura 2 Gel de agarose mostrando a determinação de *mating type* em cinco isolados de *Fusarium decemcellulare* utilizando os *primers* desenhados para *MAT-1* e os *primers* para *MAT-2* (Kerényi et al., 2004). **A)** Amplificação do gene *MAT-1* (190 pb). **B)** Amplificação do gene *MAT-2* (260 pb). M- marcador 1 Kb Plus (Fermentas); C + – controle positivo para cada *mating type*.

O total de 42 isolados de *F. decemcellulare* foram testados com os *primers* específicos desenhados para *MAT-1* e com os *primers* de Kerényi et al., (2004) para *MAT-2*, resultando em 26 isolados *MAT-1* e 16 isolados *MAT-2*, com 190 e 260pb, respectivamente (Figura 2).

O conceito biológico de espécies vem sendo aplicado com sucesso para delimitar espécies principalmente dentro de complexo de espécies (Leslie e Summerell, 2006; Zhan et al., 2007). No gênero *Fusarium*, o complexo de espécies amplamente estudado é o GFC, em que *primers* foram desenvolvidos para determinar *mating type* e auxiliar na identificação de várias espécies biológicas (Steenkamp et al., 2000). De acordo com Guimarães (2013), *F. decemcellulare* representa um complexo de espécies com caracteres morfológicos semelhantes.

Primers degenerados testados anteriormente para determinar o *mating type* de espécies de *Fusarium* (Kerényi et al., 2004) forneceram resultado satisfatório somente para o idiomorfo *MAT-2* em isolados de *F. decemcellulare*. Provavelmente a não funcionalidade dos *primers* para *MAT-1* pode estar relacionada com a divergência de sequência que pode ocorrer mesmo em regiões conservadas para esse gênero (Steenkamp et al., 2000). O idiomorfo *MAT-1* é relativamente mais complexo, pois possui três genes (*MAT-1-1*, *MAT-1-2* e *MAT-1-3*), sendo que *MAT-1-1* codifica proteína da α -box com funções importantes na formação de peritécios e ascósporos. *MAT-1-2* e *MAT-1-3* aumentam a eficiência dos cruzamentos. Já o idiomorfo *MAT-2* tem somente a proteína HMGbox, que desempenha papel importante na ascosporigênese e na determinação de cruzamentos específicos (Yun et al., 2000).

Os *primers* específicos desenvolvidos no presente estudo podem ser utilizados com sucesso para determinar o *MAT-1* em *F. decemcellulare* e assim, auxiliar estudos de indução da fase sexuada em laboratório para a identificação de espécies biológicas. Além disso, é possível identificar isolados heterotálicos de isolados homotálicos. Em homotálicos, ocorre a amplificação de ambos idiomorfos, como foi observado em *F. graminearum* (Kerényi et al., 2004). As espécies homotálicas carregam genes para ambos os *mating types* no mesmo genoma que podem estar ligados ou não (Yun et al., 2000).

Conclusão

Os *primers* específicos desenvolvidos no presente estudo podem ser utilizados com sucesso para determinar o *MAT-1* em *F. decemcellulare* e assim, auxiliar estudos de indução da fase sexuada em laboratório para a identificação de espécies biológicas.

Referências

- Atroch AL (2002) Aspectos gerais da cultura do guaraná. *Foods and Food Ingredients*. J Jpn 204:53-59.
- Farr DF, Rossman AY. 2016. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Disponível em: <http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases>. Acessado em 12 Jan 2016.
- Guimarães EA (2013) Biologia reprodutiva, filogenia e patogenicidade de *Fusarium decemcellulare*. Minas Gerais, Brasil, 68p. (M.Sc. Dissertação Universidade Federal de Lavras. UFLA).
- Kerényi Z, Moretti A, Waalwijk C, Oláh B, Hornok L (2004) Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol* 70:4419-4423.
- Leslie JF, Summerell BA (2006) The *Fusarium* laboratory manual. Malden: Blackwell.
- Rossman AY, Samuels GJ, Rogerson CT, Lowen R (1999) Genera of *Bionectriaceae*, *Hypocreaceae* and *Nectriaceae* (*Hypocreales*, Ascomycetes). *Stud Mycol* 42:134-137.
- Steenkamp ET, Wingfield BAD, Coutinho TA, Zeller KA, Wingfield MJ, Marasas WFO, Leslie JF (2000) PCR-based identification of MAT-1 and MAT-2 in the *Giberella fujikuroi* species complex. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4378-4382.
- 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.
- Yun SH, Arie T, Kaneko I, Yoder OC, Turgeon BG (2000) Molecular organization of *mating type* loci in heterothallic, homothallic and asexual *Gibberella/Fusarium* species. *Fungal Genet Biol.* 31:7-20.
- Zhan J, Torriani SFF, McDonald BA (2007) Significant difference in pathogenicity between *MAT1-1* and *MAT1-2* isolates in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genet Biol.* 44:339-346.