

## Capítulo 4

# Estudos de caracterização molecular de *Neonectria ditissima* no Rio Grande do Sul

*Daiana Luisa Stein*

*Bruna Carla Agustini*

*Fabiana Vieira Tormente*

*Silvio André Meirelles Alves*

*Fabio Rossi Cavalcanti*

### Introdução

A primeira reação de um produtor ou um técnico de campo quando encontra uma degeneração ou má-formação em alguma parte da planta é imaginar que tal alteração foi causada por uma doença ou por uma praga. A interpretação visual de um sintoma se constitui, assim, como o modo mais simples, direto e primordial para o entendimento de que algo pode estar ameaçando um cultivo. No entanto, sintomas visuais podem gerar confusão a respeito do estabelecimento das possíveis causas para uma doença, porque os sintomas produzidos por diferentes causas podem ser muito parecidos.

Com o advento da Fitopatologia como Ciência, a tecnologia ganhou importância no estabelecimento cada vez mais preciso da associação entre agente causal e doença. O estabelecimento dessa correta associação, bem como o conhecimento da biologia do patógeno, é fundamental para a tomada de decisão sobre qual estratégia de controle será eficaz para combater a doença.

Uma matéria foi criada para organizar toda a metodologia relacionada aos esforços para associar agente causal e doença: a Etiologia. Em paralelo, foi criada uma disciplina correlata, a Clínica e diagnose de doenças de planta. Desde finais do século 19, várias técnicas foram sendo adaptadas para auxiliar a correta diagnose de doenças de planta: testes de patogenicidade baseados nos postulados de Koch; isolamento e análise da morfologia do patógeno por técnicas de microscopia; estudo de gama de hospedeiros; adoção de meios seletivos, análises bioquímicas (perfis de proteínas e ácidos graxos), técnicas sorológicas, etc.

Nas últimas décadas do século passado e em anos recentes, metodologias envolvendo extração de ácido nucleico vêm sendo continuamente adaptadas para aplicação na diagnose de doenças de planta. As ferramentas moleculares comumente usadas para a identificação de fungos fitopatogênicos se baseiam principalmente na reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), que será detalhada a seguir neste capítulo. A PCR possui vantagens em termos de simplificação metodológica, custos de implantação relativamente reduzidos, facilidade de acesso a insumos, rapidez, especificidade e alta sensibilidade. Associadas a técnicas de PCR convencional, é possível desenvolver abordagens para identificação de patógenos fúngicos que envolvam desenho de iniciadores (*primers*) espécie-específicos, com pareamento simples ou *multiplex* (quando mais de um par de iniciadores são utilizados), aliada ao uso de informações de um ensaio complementar de marcação molecular (PCR-RFLP, AFLP) ou de sequenciamento de produtos de PCR de região específica do DNA do patógeno a ser checado.

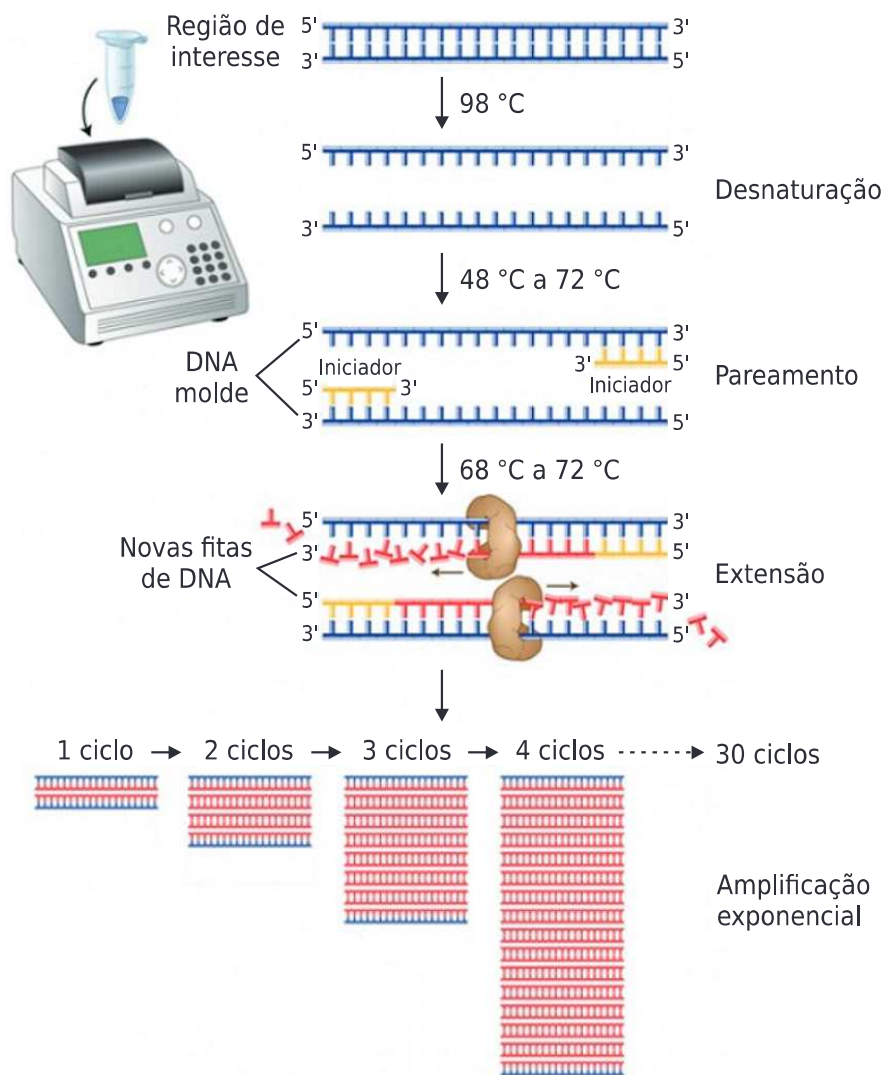
O cancro europeu, causado pelo fungo filamentosso *Neonectria ditissima*, tem se apresentado de forma muito agressiva nos pomares

de macieira no Brasil. Embora a doença não leve necessariamente à morte da planta, ela pode prejudicar muito a quantidade e qualidade da produção. Os sintomas típicos de podridão concêntrica (cancro) próximos a ferimentos e cicatrizes de queda de folhas e de poda, como também a presença de estruturas características do fungo (corpos de frutificação), perceptíveis a olho nu, tornam relativamente robusto o diagnóstico do cancro europeu por morfologia. O *N. ditissima* possui dois corpos de frutificação característicos das fases teleomorfa (sexuada) e anamorfa (assexuada) de reprodução: o peritécio e o esporodóquio, respectivamente. Em condições ambientais favoráveis, essas frutificações se manifestam como sinais evidentes sobre o tecido doente. A morfologia dos esporos também pode ser analisada pelo microscópio ótico: os ascos em formas cilíndricas e alongadas que contêm os ascósporos; os conídios que podem ser microconídios, unicelulares, ou macroconídios com até sete células.

Então, se a identificação do agente causador do cancro europeu da macieira é relativamente segura por sintomatologia e microscopia, por que investir em metodologias moleculares com o mesmo objetivo? Em primeiro lugar, pela exatidão e rapidez nos resultados. Métodos que dependem de isolamento do microrganismo, além de necessitarem de dias para o cultivo em meio de cultura, são vulneráveis à contaminação. Em segundo lugar, em análises oficiais e credenciamentos, quase sempre é exigida uma checagem da identificação morfológica por métodos moleculares. Em terceiro, a sensibilidade da metodologia não necessita de amostras coletadas a partir de lesões muito evidentes. Inclusive, vislumbra-se o uso de métodos moleculares para tentar identificar o patógeno em tecidos assintomáticos da planta, uma vez que há relatos de latência (período de incubação) do microrganismo no tecido. Isso faz com que a

doença seja disseminada a partir de mudas comercializadas como material sadio, já que não apresentam lesões visíveis aos técnicos e fiscais. Em quarto lugar, o fato de os trabalhos serem realizados mediante uso do DNA genômico ou ribossomal do microrganismo abre a possibilidade da execução contínua de trabalhos envolvendo filogenia molecular, diversidade genética de populações de patógenos associada à caracterização fenotípica dessas populações, no que tange a sua virulência sobre o hospedeiro e sensibilidade a princípios ativos fungicidas. Essas informações são muito valiosas na busca pelo aumento da eficiência no controle do cancro europeu nos pomares.

Como anteriormente comentado, a reação em cadeia da polimerase (PCR) está entre as técnicas moleculares mais utilizadas para caracterização de patógenos de planta, sendo aplicada também no estudo de *N. ditissima*. O método, que se baseia no princípio in vivo da replicação do DNA, tem por objetivo a síntese de um grande número de cópias (em milhões) de uma região específica do DNA de um organismo. A síntese in vitro é dependente de uma enzima DNA polimerase termoestável, a *Taq polimerase*, que reconhece um par de oligonucleotídeos (18 a 30 pares de bases pb), ou iniciadores (*primers*), que vão definir o ponto de iniciação e finalização para a síntese de novas fitas de DNA, em reações em cadeia. A síntese das novas fitas envolve três etapas principais: 1) desnaturação do DNA fita dupla; 2) pareamento dos iniciadores nas regiões 5' a 3' das fitas; e 3) extensão da fita na direção 5' -> 3', pela enzima. Essas etapas são repetidas 30 a 40 vezes ( $n$  ciclos), e, a cada fita de DNA molde, duas fitas são obtidas por ciclo, ocorrendo uma amplificação exponencial ( $2^n$ ) da região de interesse delimitada pelos iniciadores (Figura 1).



**Figura 1.** Reação de PCR adaptado pelos autores.

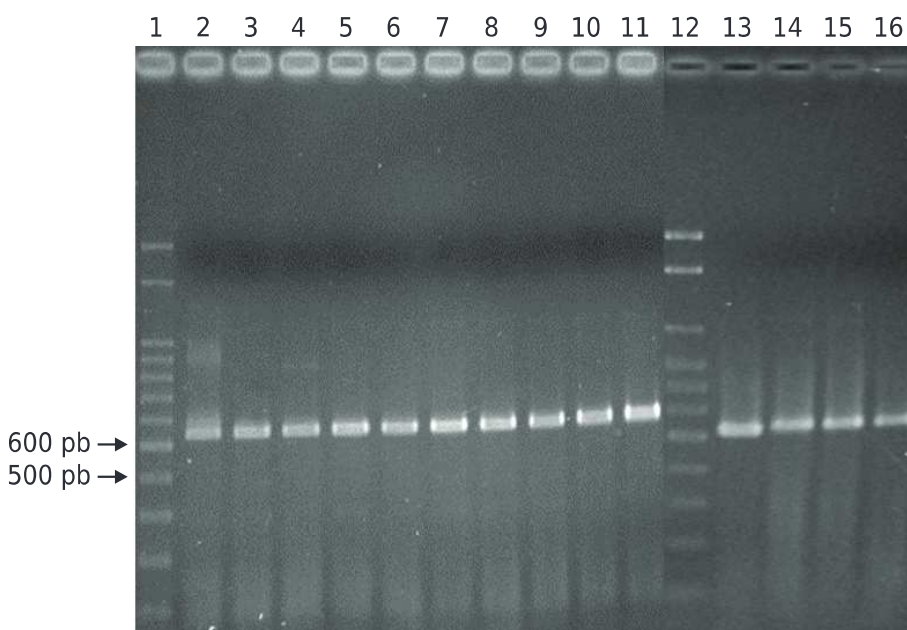
Fonte: Siratuti (2014).

A detecção molecular de *N. ditissima* por PCR já está difundida mundialmente. O estudo e definição da temperatura de fusão ( $T_m$ , do inglês *melting temperature*) e temperatura de pareamento ou anelamento ( $T_a$ , do inglês *annealing temperature*) dos iniciadores é de suma importância para o sucesso das metodologias de PCR. Essas variáveis são a base para uma configuração de PCR útil para qualquer estudo envolvendo fungos fitopatogênicos. Os ajustes para isolados de *N. ditissima* encontrados nos pomares de macieira do Rio Grande do Sul são descritos a seguir.

Inicialmente, DNA total de biomassa vegetativa, obtida a partir do subcultivo em meio líquido BD (batata-dextrose) de um disco micelial, foi extraído a partir de cultivos puros de isolados de *N. ditissima* obtidos de amostras de tecido lenhoso de macieira com sintomas de cancro europeu em diversos pomares do Rio Grande do Sul. Para confirmar o DNA obtido como proveniente de um fungo verdadeiro (*true fungi*), foram utilizados iniciadores da região do espaçador interno transcrito (ITS), *ITS1* e *ITS4*. Essa região pertence ao DNA ribossomal (rDNA) do microrganismo e se caracteriza pelo baixo polimorfismo intraespecífico, sendo uma região do DNA muito adotada por pesquisadores em estudos envolvendo filogenia entre diferentes espécies de fungos. O DNA ribossomal de eucariotos consiste em uma repetição em *tandem* (sequência repetitiva) de um segmento unitário, um *operon*, composto por regiões NTS (espaçador não transcrito), ETS (espaçador transcrito externo), 18S (gene rDNA para subunidade grande), *ITS1*, 5.8S (gene rDNA para subunidade pequena), *ITS2* e 28S (gene rDNA para subunidade grande). Essas regiões são também conhecidas como regiões organizadoras de nucléolo, pois participam da estrutura dessa partícula.

No estudo com todos os *N. ditissima* obtidos em pomares gaúchos, o par de iniciadores *ITS1* e *ITS4* se mostrou competente em amplificar a região ITS1/2 dos isolados, tanto de DNA micelial (Figura 2) quanto do DNA total de plantas infectadas, obtendo-se produtos de PCR com aproximadamente 545 pares de bases (pb).

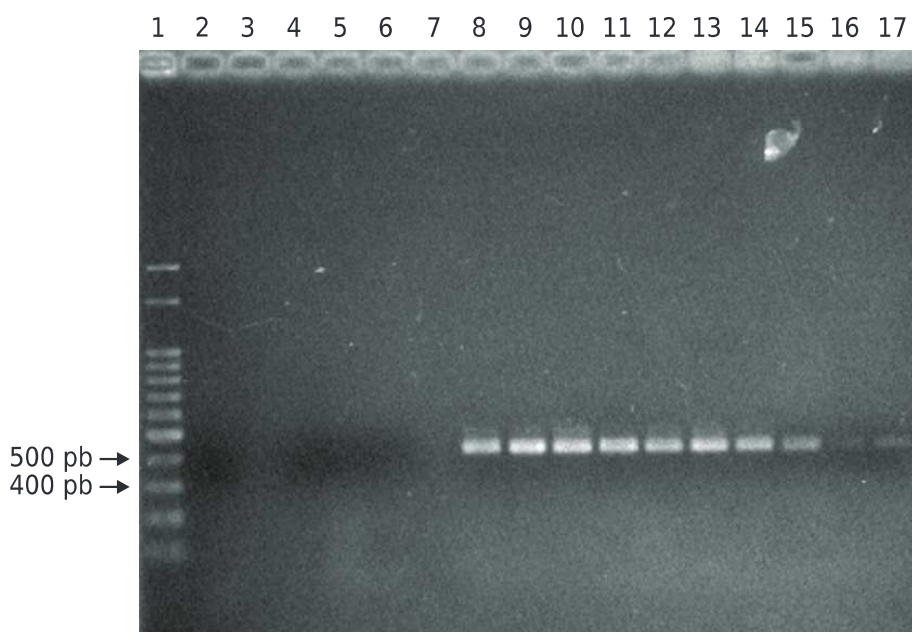
No entanto, o uso dos iniciadores que amplificam a região entre o ITS1/2 acarreta a detecção de qualquer fungo presente em tecido vegetal, seja ele endofítico ou patogênico. Para detectar especificamente *N. ditissima* em DNA total vegetal, foi localizado na



**Figura 2.** Detecção de isolados de *Neonectria ditissima* com os iniciadores *ITS1* e *ITS4*. Ordem das amostras nas canaletas: 1) Marcador Ludwig Biotec (100 pb); 2) 5453; 3) 5454; 4) 5531; 5) 31ACRC; 6) 105EJQ; 7) 104EJQ; 8) 101EJQ; 9) 107LF; 10) 106LF; 11) 105LF; 12) Marcador; 13) 5452; 14) 5538; 15) 5118; 16) 5455.



literatura um par de iniciadores *Ch1* (senso) e *Ch2* (antissenso), o qual foi desenhado a partir do alinhamento de sequências da região do rDNA ITS. Esses iniciadores permitem a obtenção de produtos de PCR de 412 pb para o fungo causador do cancro europeu (Figura 3). Adaptações foram feitas nas metodologias de PCR, e os iniciadores anglo-australianos se mostraram relativamente competentes para detecção de *N. ditissima* em amostras de macieira com cancro europeu coletadas no Rio Grande do Sul.



**Figura 3.** Detecção de isolados de *Neonectria ditissima* com os iniciadores *Ch1* e *Ch2*. Ordem das amostras nas canaletas: 1) Marcador Ludwig Biotec (100 pb); 2) \*C-, Água; 3) Vazio; 4) C-, *Fusarium* sp.; 5) C-, *Phaeoacremonium* sp.; 6) C-, *Botryosphaeria dothidea*; 7) Vazio; 8) 5534; 9) 5453; 10) 5119; 11) 105EJQ; 12) 5535; 13) 5532; 14) 5455; 15) 105LF; 16) 5104; 17) 5533. \*C- = controle negativo.

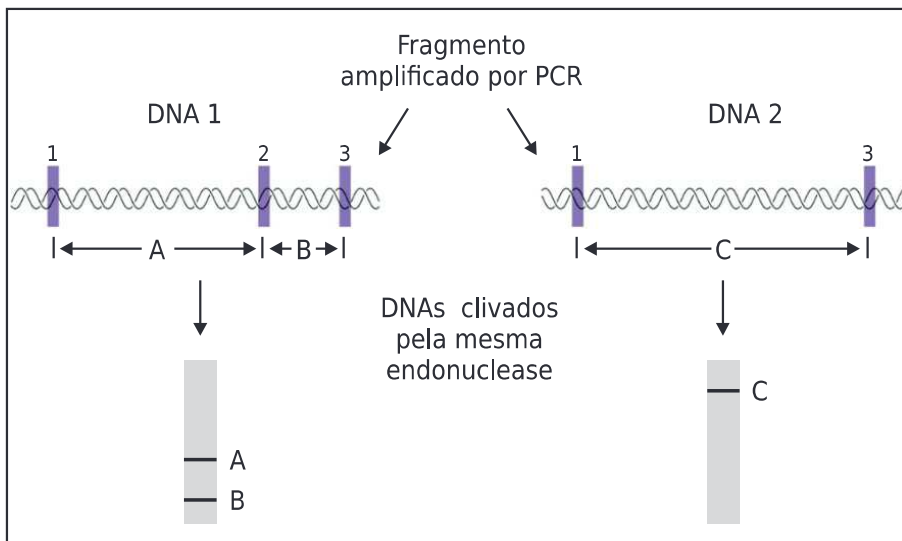
Fonte: Stein et al. (2016).



Esse par de iniciadores também se mostrou relativamente eficiente para a detecção específica de *N. ditissima* em DNA total de tecido vegetal. Desde então, o par *Ch1/2* vem sendo usado em protocolos de diagnose molecular do cancro europeu na Austrália e na África do Sul (doença quarentenária neste país). No entanto, os autores opinam que desenhos de iniciadores adaptados para regiões conservadas de isolados brasileiros de *N. ditissima* devam ser testados, para efeito de incremento na especificidade da PCR convencional, ou mesmo para testes envolvendo *nested PCR* com o uso *ITS1/4* ou *ITS5/4*.

Paralelamente aos trabalhos envolvendo iniciadores de PCR específicos, uma combinação entre técnicas de PCR e digestão dos seus produtos por endonucleases de restrição (hidrólise) pode servir para gerar informações para identificação da espécie fúngica. Essa técnica é conhecida como CAPS (do inglês, *Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) ou ainda por PCR-RFLP (do inglês, *Restriction Fragment Length Polymorphism* após uma PCR) (Figura 4), e é empregada para visualização de padrões de fragmentação de DNA que podem ser documentados, analisados e comparados com isolados não identificados ou desconhecidos. Cada enzima usada na técnica reconhece uma região específica do DNA, denominada “sítio de restrição”, onde ocorre a clivagem das fitas de DNA. Tal fragmentação promove o aparecimento de um perfil de fragmentos com um padrão de “bandas” específico, que é visualizado no gel, após a eletroforese. A partir dessa técnica, já foi possível caracterizar padrões de restrição para isolados gaúchos de *N. ditissima*.

Outra estratégia para identificação do fungo consiste no uso dos produtos de PCR para sequenciamento da região amplificada e posterior alinhamento e submissão ao *Genbank*, o banco de dados de



**Figura 4.** Esquema ilustrativo da técnica de PCR-RFLP (CAPS).

Fonte: Adaptado de Chhabra (2015).

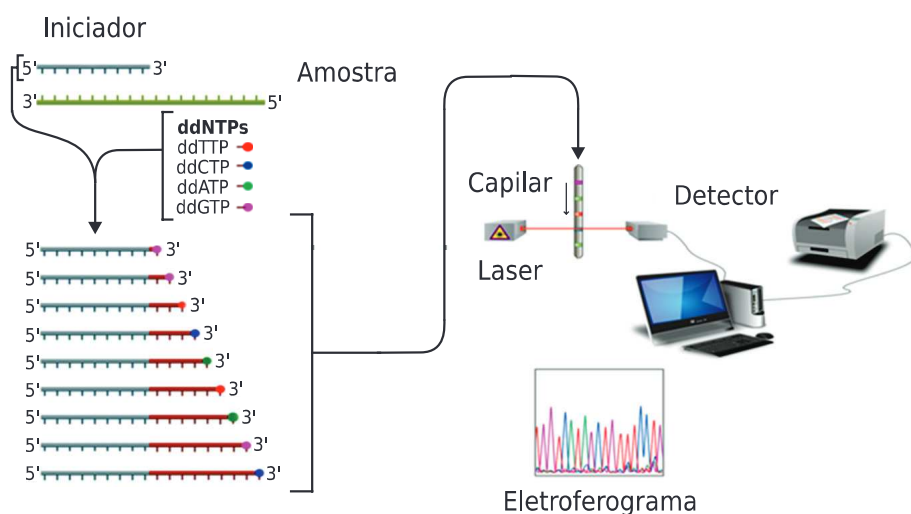
Nota: os produtos de PCR de uma região do DNA do fungo podem ser clivados por enzimas de restrição, produzindo padrões típicos de bandas em uma eletroforese simples em gel de agarose. Esses padrões estão fortemente correlacionados com a espécie estudada.

nucleotídeos da United States National Library of Medicine/National Center for Biotechnology Information (NLM/NCBI), localizado nos *National Institutes of Health* (NIH). Nesse caso, essa metodologia não é prática para o evento de ‘detecção’ do fungo, pois depende de vários passos metodológicos no preparo da amostra. No entanto, é uma contraprova bastante robusta em termos de informação. De posse da informação da sequência, o pesquisador pode acessar esse banco de dados e utilizar uma das ferramentas de pesquisa por microrganismo. Geralmente, a ferramenta utilizada é o BLASTN (do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*). A sequência é submetida na caixa de texto da ferramenta e, ao cabo de alguns segundos,

o sistema retorna uma lista de entradas de organismos. Essa lista é ordenada em função do maior para o menor escore de identidade e *query cover*, coeficientes que sintetizam estatísticas sobre homologia e similaridade obtidas do alinhamento automático feito com a sequência de estudo pelo próprio sistema on-line.

O sequenciamento do DNA de microrganismos é uma abordagem comum em laboratórios de pesquisa e análise. Com a automação, o sequenciamento tornou-se uma técnica simples, eficiente e de baixo custo. Em um sequenciamento, o DNA molde é desnaturado para obter as fitas simples livres. Em seguida ocorre o pareamento de um iniciador (*primer*) em apenas uma das fitas. Depois, a DNA polimerase sintetiza a nova fita em uma mistura contendo os quatro desoxirribonucleotídeos (dNTPs, N = A, C, T, G) fosfatados constituintes do polímero do DNA. Entretanto, no meio reacional, há a presença, também, de mais quatro didesoxirribonucleotídeos bifosfatados, os ddNTPs marcados, cada um, com uma molécula fluorescente diferente. Como a enzima não consegue discriminar os dNTPs dos ddNTPs para incorporação na fita sintetizada, a chance do ddNTP ser incorporado é de 50%. Quando isso acontece, a síntese é interrompida por causa da falta de uma hidroxila 3' livre do ddNTP. No final, a síntese produz fragmentos de tamanhos diferentes, que migram ao longo de um gel capilar de forma ordenada, separados em razão de sua massa molecular. Um feixe de laser excita a sonda específica a cada ddNTP e a fluorescência é detectada. Um computador conectado ao sistema recebe a informação e processa os dados de forma a gerar o eletroferograma da sequência da região desejada da amostra fornecida (Figura 5).

As sequências referentes às regiões de interesse para os estudos de identificação possibilitam a análise de informações no ponto de



**Figura 5.** Ilustração para o método de sequenciamento de SANGER.

Fonte: Adaptado de Khan Academy (2012).

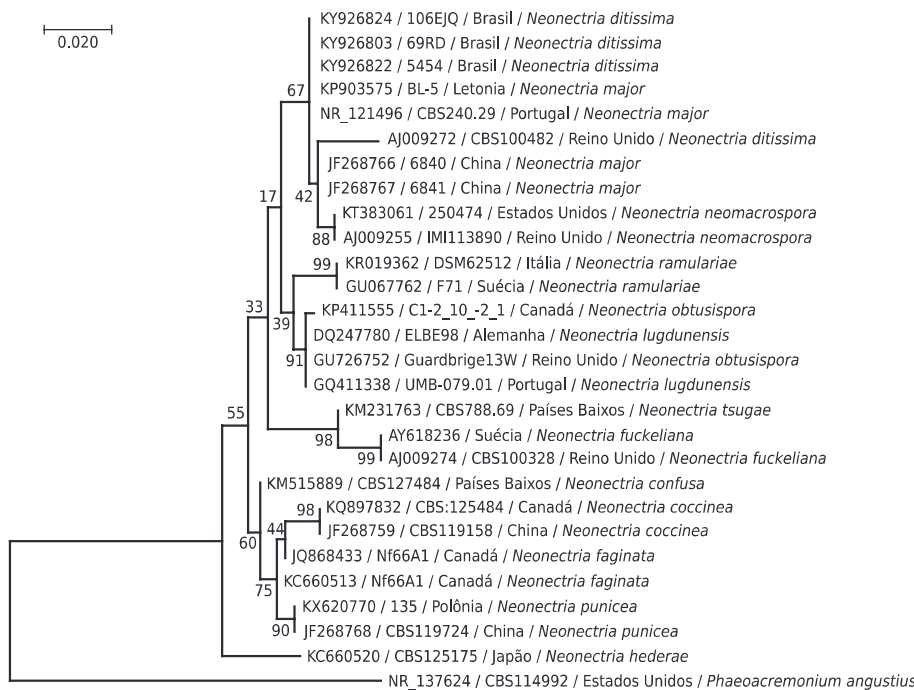
Nota: uma fita simples do DNA do microrganismo serve de molde para o pareamento do oligonucleotídeo iniciador e a extensão da fita complementar, por uma DNA polimerase. As paradas são providenciadas aleatoriamente, pela ligação de uma sonda ddNTP de parada, marcada com um fluoróforo correspondente a uma determinada base nitrogenada. Os fragmentos de fita são separados no capilar em função de sua massa molecular.

vista evolutivo. A disponibilidade de ferramentas de bioinformática na rede de computadores auxilia esse trabalho. O objetivo principal da *filogenia molecular* é ordenar os eventos evolucionários e representá-los em árvores filogenéticas que demonstrem, por agrupamento, as relações entre espécies ao longo do tempo, e com seus ancestrais. Essas relações podem ser definidas por histórias evolutivas de um único gene, proteína, da função ou da espécie associada.

Para criar uma árvore filogenética adequada, deve-se partir de um sequenciamento de boa qualidade e posterior alinhamento das

sequências de estudo. O próximo passo é a escolha do *método evolutivo* a ser aplicado, que é a base de cálculo para a construção das árvores. Há vários métodos de análise de alinhamentos que usam informações extraídas das substituições, transversões, espaçamentos e agrupamentos presentes nesses alinhamentos. Depois, é determinado um método de montagem de distâncias para construção da árvore filogenética, que deve ser adaptado para o tipo de pesquisa, espécies envolvidas no estudo e informações biológicas associadas às sequências (ex., métodos UPGMA, *neighbor joining*, máxima parcimônia, análise bayesiana, etc.). Por fim, a qualidade da árvore gerada é aferida. A técnica estatística mais conhecida para isso é o cálculo do valor de *bootstrap*, que avalia a confiança no suporte de cada nó da árvore. O programa se baseia na construção de novos conjuntos de sequências, a partir do conjunto original, estabelecendo uma nova árvore para esses conjuntos. Em seguida, calcula-se o percentual de vezes que um ramo aparece nas repetições, estabelecido pelo operador. Se estes conjuntos fornecerem a mesma árvore filogenética, a confiabilidade na árvore original aumenta (percentual elevado). Porém, se fornecerem uma árvore diferente, nenhuma delas é confiável (percentual baixo). Portanto, à medida que se aumenta a repetição da análise, a confiabilidade do resultado é aumentada.

Como exemplo, um estudo resumido foi proposto para agrupar três isolados de *N. ditissima* de Vacaria, RS (KY926824; KY926803; KY926822) com *N. ditissima* espalhados pelo mundo, de acordo com informações contidas nas sequências da região do ITS entre 18S rDNA (ITS1) e 5.8S rDNA (ITS2) (Figura 6). A árvore gerada pelo método Máxima Verossimilhança mostrou alta similaridade entre sequências brasileiras obtidas experimentalmente e os acessos de ITS dos isolados do mundo baixados no *Genbank*. Não foi possível



**Figura 6.** Árvore filogenética construída para espécies de *Neonectria*, na região entre 18S rRNA (ITS1) e 5.8S rRNA (ITS2).

Nota: foram comparados seis isolados de Vacaria, RS com diferentes regiões do mundo. O método usado foi o de Máxima Verossimilhança, com Kimura dois parâmetros e deleção completa de gaps. *Bootstrapping* por 800x replicações. *Phaeoacremonium angustius* CBS114992 usado como *outgroup*.

identificar com segurança um ancestral comum que pudesse oferecer uma indicação de centro de origem. Três isolados (Canadá, Dinamarca e Portugal) foram desdobrados do agrupamento principal, mas por valores muito baixos de *bootstrap*. Para evidenciar com mais segurança os centros de origem de populações de patógenos, cabem análises filogenéticas mais aprofundadas, a partir do estudo

de outras regiões conservadas do DNA e estudos de diversidade genética com o uso de perfis moleculares.

A disseminação do cancro europeu nas regiões produtoras de maçã no Brasil vem causando redução na produtividade e qualidade dos frutos. A utilização de técnicas de biologia molecular no contexto do cancro europeu é importante, tanto por sua sensibilidade, quanto por sua adequação e custo acessível. Ademais, é possível desenvolver estudos sistemáticos envolvendo a caracterização da filogenia e da diversidade genética da população de *N. ditissima* encontrada em diferentes pomares e regiões geográficas. Informações sobre a base genética de populações de *N. ditissima* e seus níveis de patogenicidade e virulência (fenótipo), considerando as bases de resistência das cultivares de macieira adotadas pelos produtores, são fundamentais para a composição de estratégias específicas e precisas de proteção de plantas, e redução de custos no controle da doença.

Por fim, testes e aprimoramentos com desenhos originais de iniciadores específicos, com o aperfeiçoamento de novas técnicas de PCR para *N. ditissima* encontrados no Brasil, em DNA total vegetal, se fazem importantes para o estabelecimento de protocolo unificado para confirmação de identificação de isolados brasileiros do agente causador do cancro europeu em território nacional.

## Referências

CHHABRA, N. **Case details - VNTR Analysis**. Clinical Cases Biochemistry for Medics, April 4, 2015. Disponível em: <<http://usmle.biochemistryforme-dics.com/case-details-vntr-analysis/>>. Acesso em: 20 jun. 2017.



KHAN ACADEMY. **DNA sequencing**. 2012. Disponível em: <<https://www.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/dna-sequencing>>. Acesso em: 20 jun. 2017.

SIRATUTI, V. **FAQ#8 Como ver se a transformação gênica deu certo?** 2014. Disponível em: <<http://scienceblogs.com.br/synbiobrasil/tag/pcr/>>. Acesso em: 1 ago. 2017.

STEIN, D. L.; AGUSTINI, B. C.; ALVES, S. A. M.; CAVALCANTI, F. R.  
**Adaptação de um método de detecção molecular para agentes do cancro europeu das pomáceas (*Neonectria ditissima*) isolados na Região Sul**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2016. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado técnico, 185).

## Literatura recomendada

EDWARDS, J. **National diagnostic protocol for detection of *Neonectria ditissima* (European canker)**. [Canberra]: Australian Government, Department of Agriculture, 2013. 37 p.

LANGRELL, S. R. H. Molecular detection of *Neonectria galligena* (syn. *Nectria galligena*). **Mycological Research**, v. 106, n. 3, p. 280-292, 2002. DOI: 10.1017/S095375620200552X.