

Adaptação de um Método de Detecção Molecular para Agentes do Cancro Europeu das Pomáceas (*Neonectria ditissima*) Isolados na Região Sul

Daiana Luisa Stein
Bruna Carla Agustini
Silvio André Meirelles Alves
Fabio Rossi Cavalcanti

Introdução

O cancro europeu é uma doença importante da macieira e pereira, podendo ser evidenciada nas principais regiões produtoras. Também é conhecida como cancro de Néctria, em função do seu agente causador, anteriormente denominado *Nectria galligena*, mas, atualmente aceito pela comunidade científica como *Neonectria ditissima*. Este fungo normalmente infecta ramos do ano, galhos e o tronco principal da planta; ou seja, a parte lenhosa da planta. Os sintomas de cancro são inicialmente pequenos, amarronzados e possuem uma forma circular. Ocasionalmente, os frutos também podem ser afetados.

Com o progresso da doença, os cancros vão se desenvolvendo lentamente ao longo do ponto de penetração, formando calos em forma de “alvo” com a interação entre a planta e o patógeno e a expansão desse último sobre o tecido sadio, ao longo dos anos. A consequência dessa infecção, em plantas jovens, é a fragilidade e quebra do caule pelo vento, perda do vigor e queda na produtividade.

Atualmente, a ocorrência do cancro europeu representa uma enorme ameaça aos pomares dos estados de Santa Catarina e no Rio Grande do Sul, os principais do Brasil, com produção em torno de 1,2 milhão de toneladas (FAOSTAT, 2012).

Fungicidas à base de cobre e benzimidazóis podem trazer alguma proteção quando aplicados após a colheita das frutas. No entanto, o controle químico reconhecidamente não garante proteção eficaz para o controle da doença. A principal abordagem para o controle do cancro europeu leva em consideração a quebra do ciclo de vida do fungo, como a inspeção dos pomares para a retirada de ramos e queima a das partes doentes. Em casos mais severos, a planta inteira deve ser cortada (LATORRE et al., 2002; MCCRACKEN et al., 2003). A época mais adequada para essas medidas sobre as culturas é a primavera e o verão. Nesse período, os ramos afetados podem ser mais facilmente identificados e, além disso, reduz-se o inóculo produzido dentro do pomar, antes da queda das folhas no outono, período no qual há

¹ Graduanda em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, RS. E-mail: daiana.lstein@hotmail.com.

² Farmacêutica, Dra., Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. E-mail: bruna.agustini@embrapa.br.

³ Eng. Agrôn., Dr., Embrapa Uva e Vinho, Estação Experimental de Fruticultura de Clima Temperado, Vacaria, RS. E-mail: silvio.alves@embrapa.br.

⁴ Eng. Agrôn., Dr., Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. E-mail: fabio.cavalcanti@embrapa.br.

aumento de susceptibilidade à infecção, em tecidos sadios (GROVE, 1990).

Normalmente, a identificação de *Neonectria ditissima* é feita por identificação morfológica em microscopia, a partir de isolamento de estruturas do microrganismo, como corpos de frutificação, conídios e os ascósporos. Os conídios são cilíndricos e podem ter entre uma a quatro células. São produzidos em agrupamentos, chamados por esporodóquio, que podem ser observados a olho nu como pontuações esbranquiçadas na superfície infectada da casca ou fruto. Eles são dispersos pela chuva. Nos cancros mais velhos, são formados também ascósporos bicelulares. Esses ascósporos são produzidos dentro de estruturas capazes de lançá-los e promover dispersão pelo vento. Sob alta umidade, os ascósporos são expelidos do peritécio com uma mucilagem, na primavera e outono, podendo ser dispersos pelo vento, chuva ou ferramentas de poda (CHAVERRI et al., 2011).

Com o advento das técnicas de extração e amplificação de DNA de microrganismos, as ferramentas de biologia molecular passaram a ser utilizadas em métodos para detecção do fungo associado à determinada doença, mesmo em casos onde o desenvolvimento da lesão é incipiente. Tais métodos são muito mais sensíveis e específicos que os métodos morfológicos tradicionais, os quais possuem dificuldades associadas ao consumo de tempo, contaminações cruzadas e falsos negativos.

O objetivo do presente trabalho foi o de adaptar métodos de extração e de amplificação do DNA de *Neonectria ditissima* isoladas da região Sul do Brasil, no intuito de detectar a presença do fungo em biomassa fúngica e no tecido vegetal. Para isso foram testadas e, posteriormente, alinhadas técnicas de PCR, nestedPCR e análise do polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (do inglês, *random fragment length polymorphism* - RFLP) associada ao PCR, atualmente conhecida como CAPS (*cleaved amplified polymorphic sequences*). Nestas técnicas, foram usados tanto um iniciador universal para fungos (ITS1/ITS4) quanto um par de iniciadores específicos para *N. ditissima* (Ch1/Ch2).

Metodologia

Isolamento de *Neonectria ditissima* e cultivo da biomassa dos isolados

Trinta (30) isolados de *Neonectria ditissima* foram obtidos de pomares com plantas apresentando sintomas de cancro europeu, nos estados de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul. Cultivos monospóricos foram realizados em meio BDA e transferidos para tubos com o mesmo meio inclinado, e estocados a 4°C. Todos os isolados foram identificados morfológicamente e depositados na coleção de microrganismos de interesse agroindustrial (CMIA) da Embrapa Uva e Vinho, em Bento Gonçalves, RS, Brasil.

O micélio do fungo foi cultivado para efeito de obtenção de biomassa que foi usada na extração de DNA. Para isso, erlenmeyers de 50 mL, esterilizados, com meio líquido batata-dextrose (20%; 2% m/m) contendo um disco transferido de BDA com micélio fúngico, sofreram agitação por uma semana, em condições escuras, a 25°C. Após a incubação, o meio foi filtrado em um sistema a vácuo funil-kitassato com chumaço de algodão, e o micélio recolhido, identificado e estocado a -20°C.

Extração de DNA total de micélio e tecido vegetal, ensaios de PCR-RFLP (CAPS)

Em relação aos fungos isolados, aproximadamente 200 mg do micélio cultivado foi usado para extração de DNA em solução de fenol:clorofórmio:isoamílico (25:24:1), conforme protocolo publicado por Sambrook et al. (1989).

Tecidos vegetais sadios e acometidos por cancro europeu foram selecionados para verificar a aplicabilidade das metodologias para a detecção molecular do patógeno. Primeiramente, o tecido cortical de amostras foi raspado com auxílio de bisturi. Em seguida foi homogeneizado em almofariz com o auxílio de pistilo e nitrogênio líquido, durante dois minutos, para obter um pó fino. A extração do DNA foi realizada seguindo o protocolo CTAB modificado de Doyle & Doyle (1987, 1990).

Para os trabalhos envolvendo PCR, foram realizados testes com i) DNA extraído de micélio de um isolado de referência (31ACRC) para *N. ditissima*, ii) tecido lenhoso sadio de macieira, iii) tecido lenhoso sadio de macieira misturado ao micélio de 31ACRC, e iv) tecido lenhoso com sintomas de cancro europeu. Esses ensaios envolvendo extração de DNA total da interação tecido vegetal + fungo tiveram como objetivo principal o estabelecimento de um protocolo de detecção molecular do patógeno a partir do tecido da planta, como uma ferramenta metodológica para diagnose do cancro europeu da macieira. Estudos de configuração de termociclador foram conduzidos utilizando-se o DNA micelial, apenas.

As reações de amplificação empregando os DNA dos trinta (30) isolados de *Neonectria ditissima* foram realizadas usando-se iniciadores universais ITS1/ITS4 (WHITE et al., 1990) e iniciadores específicos do agente do cancro europeu, Ch1/Ch2 (5'-AAC CCC TGT GAA CAT ACC CAT C-3'/5'-GTG GCC GCG CTG CTC TTC CG-3') (LANGRELL, 2002). As reações de PCR foram compostas por DNA extraído (20-40 ng), tampão Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 200 μM de cada dNTP, 0,8 μM do iniciador e 1,5 U de *Taq* DNA polimerase HotStart (Promega). As amplificações foram conduzidas em termociclador *ProFlex* (Applied Biosystems®). O programa de amplificação utilizado para os iniciadores ITS1/4 foi desnaturação inicial 95°C por 5 min, alongação de 40 ciclos (95°C por 30 s; 60°C por 1 min; 72°C por 1 min), um ciclo final de 72°C por 10 minutos. Para as reações de amplificação utilizando os iniciadores específicos Ch1/Ch2, as etapas foram: desnaturação inicial 94°C por 3 min, alongação de 30 ciclos (94°C por 1 min; 67°C por 1 min; 72°C por 1 min), um ciclo final de 72°C por 10 minutos.

A detecção dos produtos de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em solução tampão TBE 1x (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM). Como referência de tamanho molecular foi utilizado marcador de 100 pb (Ludwig Biotec). A revelação dos amplicons foi realizada por imersão do gel em brometo de etídeo a 0,5 μg/mL durante 15 minutos. A fotodocumentação foi realizada sob luz UV com comprimento de excitação em 302 nm.

Os amplicons resultantes da reação empregando os iniciadores ITS1/ITS4 foram ainda digeridos, de forma individual, com as endonucleases *HaeIII* e *CfoI*. As clivagens enzimáticas seguiram orientação do fabricante quanto meio reacional e ocorreram por 2 horas e meia, a 37°C. A detecção dos fragmentos de restrição foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 3% em solução tampão TBE 1x. A revelação do gel foi idêntica à descrita anteriormente.

Resultados e Discussão

No presente estudo, foram adaptados dois métodos para detecção específica de *Neonectria ditissima* em isolados regionais brasileiros. Um empregando iniciadores universais ITS1/4 com posterior restrição com endonucleases, e o segundo método empregando iniciadores específicos Ch1/Ch2 (LANGRELL 2002).

Tradicionalmente, a detecção de Cancro Europeu é feita por sintomatologia, isolamento, identificação de estruturas morfológicas do fungo causador e testes de patogenicidade. Os conídios são cilíndricos, com uma a quatro células, produzidos em esporodóquios na superfície infectada, podendo ser vistos como pontuações de coloração rósea ou creme. Outro tipo de esporo produzido no ciclo do fungo é o ascósporo. Esta estrutura de dispersão é produzida internamente a peritécios avermelhados que se tornam marrons ou pretos na medida em que a lesão vai envelhecendo (Figura 1).

Atualmente, também existem ferramentas de detecção molecular para a identificação de *N. ditissima*, principalmente em casos de necessidade de confirmação em sintomas cruzados ou contaminações diversas, uma vez que ainda não existe um método efetivo para detecção da presença do patógeno em tecidos lenhosos assintomáticos. Dessa forma, os DNA de todos os isolados foram extraídos e amplificados utilizando os iniciadores universais ITS1/4, todos resultando em bandas com aproximadamente 520 pb (LANGRELL, 2002).

Esta amplificação positiva demonstra que o método empregado para extração do DNA do micélio foi bem sucedido.



Fig. 1. (A) Segmento caulinar da macieira apresentando cancros e sinais do fungo como esporodóquios e peritécios; (B) Peritécio rompido de *N. ditissima* extravasando ascos e ascósporos visualizados em MO; (C) Conídios soltos de *N. ditissima*, visualizados em MO.

O uso da técnica de PCR-ITS-RFLP para identificação de espécies de microrganismos é muito difundido na literatura (RUIZ-MOYANO et al., 2009; DIGUTA et al., 2011). No entanto, em relação a identificação do *N. ditissima*, foi encontrado apenas um estudo envolvendo PCR-RFLP, o qual conseguiu revelar quatro grupos distintos de polimorfismo em 40 isolados, empregando um gene de subunidade pequena SSU do rRNA (COCKARD et al., 1998). Dos trinta isolados avaliados, oito foram clivados com as endonucleases *HaeIII* e *CfoI* após amplificação da região ITS. Apenas dois destes isolados apresentaram padrões de restrição distintos dos demais, sendo estes nomeados como 5452 e 5101 (Figura 2). Os outros seis isolados apresentaram

os mesmos tamanhos de fragmentos de restrição. No caso da *CfoI*, foram observadas bandas características (280 pb, 90 pb e 70 pb), enquanto com a *HaeIII* foram verificadas marcações em 350 pb e 100 pb (Figura 4). Esta variabilidade intraespecífica no perfil de restrição é comum e já foi relatada em outros estudos científicos (ESTEVE-ZARZOSO et al., 1999; RUIZ-MOYANO et al., 2009; PHAM et al., 2011).

De forma a assegurar o processo de identificação, o uso de iniciadores específicos para detecção de patógenos é muito interessante visto que em uma única etapa de PCR a identificação já é possível. Sendo assim, os DNA dos isolados foram também

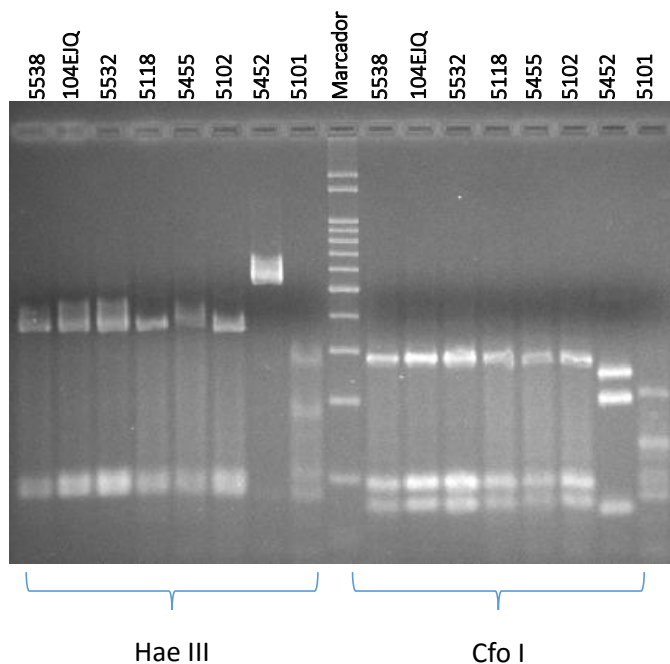


Fig. 2. Perfil de restrição do DNA amplificado com ITS1/ITS4 e submetido à digestão enzimática por *Hae*III e *Cfo*I, revelado por meio de eletroforese em gel de agarose. Poços 1-9: Padrão de restrição promovido por *Hae*III no DNA extraído de isolados de *N. ditissima*; 10: Marcador 100 pb (Ludwig Biotec); 11-19: Padrão de restrição promovido por *Cfo*I para o DNA dos mesmos isolados.

testados com os iniciadores específicos Ch1/Ch2. A especificidade deste par de iniciadores é discutível visto que o DNA de fungos de outros gêneros (*Phaeoacremonium* spp., e *P. chlamydospora*), usados, nesse caso, como controle negativo, apresentaram amplificação de fragmentos na mesma faixa (~410 pb) dos isolados referentes a *N. ditissima* (Figura 2). Langrell (2002) realizou estudos de especificidade destes iniciadores com uma grande variedade de fungos, incluindo *Penicillium*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, entre outros, mas não haviam testado contra o gênero *Phaeoacremonium*. Estes fungos foram usados por sua disponibilidade de biomassa micelial e pelo relativo distanciamento filogenético de *Neonectria/Cylindrocarpon*. Vale ressaltar que o método original para detecção molecular do agente do cancro europeu que referenciou o estudo foi modificado em todas as suas etapas, e estão acima descritas, neste trabalho. Com o aparecimento de bandas fracas, mesmo no melhor ajuste possível das condições de PCR, se cria a necessidade da realização de um estudo de desenho de iniciadores para os isolados regionais, a fim de aumentar ainda mais a garantia de especificidade na detecção molecular do patógeno (Figura 3).

Foi observado que a PCR de amostras contendo DNA fúngico puderam gerar amplificações adequadas empregando os iniciadores ITS1/ITS4 e Ch1/Ch2 com a presença ou não de DNA do tecido vegetal (Figura 3). Em amostras com DNA de tecido cortical contaminadas por DNA fúngico e amplificadas com os iniciadores ITS1/4, pôde-se observar uma banda de 700 pb provavelmente associada ao DNA vegetal, amplificada logo acima da banda de amplificação do DNA fúngico (~520 pb). Em amostras de DNA de tecido sadio, pôde-se confirmar apenas a banda associada ao DNA vegetal, não sendo verificadas bandas associadas à amplificação da região ITS relacionada ao fungo. Já com o uso do par Ch1/Ch2 específico a *N. ditissima*, foi evidenciada apenas a banda de aproximadamente 410 pb característica do referido fungo partindo de amostra de tecido lenhoso sintomático (Figura 4).

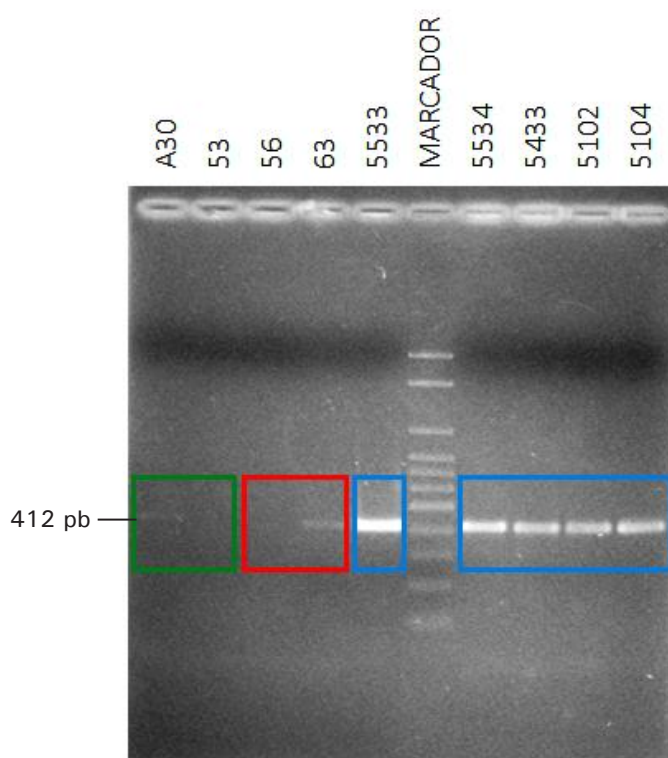


Fig. 3. Ensaio de PCR com iniciadores Ch1/Ch2 específicos para *Neonectria ditissima* (Langrell, 2002), em DNA extraído de micélio fúngico. Quadrado vermelho destaca ausência de amplificação (isolado 56) e amplificação fraca (63) de *Phaeoacremonium* spp., usados como controle negativo. Quadrado verde destaca amplificação fraca do isolado A30ACRC de *Phaeomoniella chlamydospora*, usado como controle negativo, e uma ausência de amplificação do isolado 53 do mesmo fungo. Quadrados azuis destacam bandas amplificadas de isolados de *N. ditissima*.

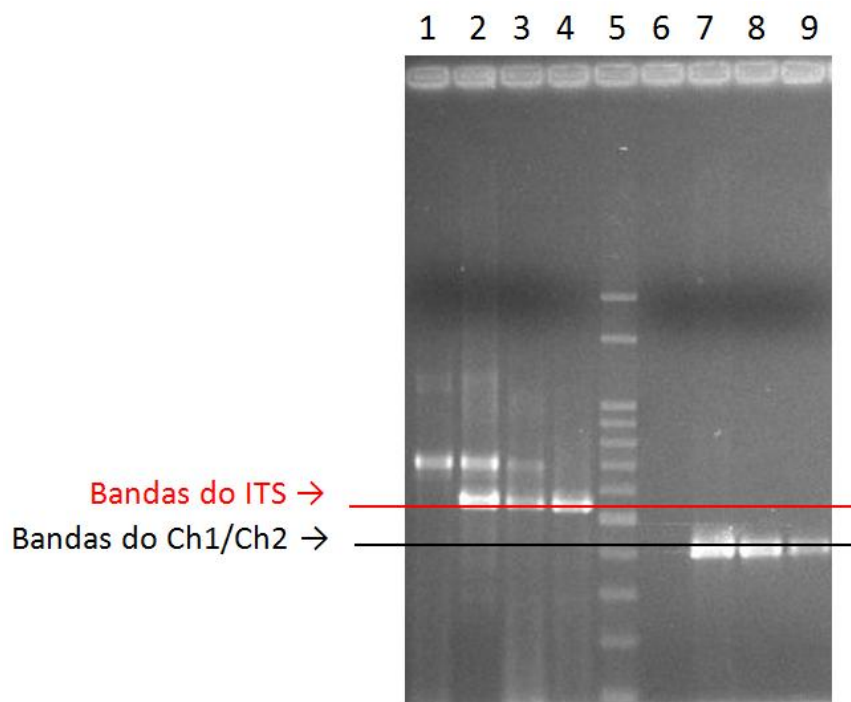


Fig. 4. Detecção de *Neonectria ditissima* a partir do DNA extraído de micélio do isolado 31ACRC, mistura de tecido caulinar sadio com micélio do 31ACRC, tecido caulinar sadio e tecido caulinar sintomático. Primers utilizados foram ITS (ITS1/ITS4) e Ch1/Ch2. Poços: 1, planta sadia (ITS); 2, mistura planta sadia + 31ACRC (ITS); 3, caule sintomático (ITS); 4, micélio 31ACRC (ITS); 5, Marcador 100 pb (Ludwig Biotec); 6, planta sadia (Ch1/Ch2); 7, mistura planta sadia + 31ACRC (Ch1/Ch2); 8, caule sintomático (Ch1/Ch2); 9, micélio 31ACRC (Ch1/Ch2).

Considerações Finais

1. Métodos de extração de DNA baseados em fenol:clorofórmio:isoamílico e CTAB são eficazes para a obtenção de DNA total de micélio de *Neonectria ditissima* e de tecido lenhoso de videira, respectivamente;
2. Os pares de iniciadores ITS1/ITS4 e Ch1/Ch2 são capazes de amplificar diferencialmente DNA fúngico do DNA total extraído de tecido vegetal, e detectar DNA de isolados de *N. ditissima* do sul do Brasil;
3. No entanto, a presença de falsos positivos em PCR com iniciadores específicos Ch1/Ch2 apontam a necessidade de trabalhos envolvendo sequenciamento e desenho de novos iniciadores para isolados brasileiros de *N. ditissima*;
4. Perfis de PCR-RFLP (CAPS) foram apresentados aqui de forma pioneira para isolados de *N. ditissima*. Neles, há uma variabilidade intraespecífica, evidenciando a existência de polimorfismo entre os isolados do sul do Brasil, e a necessidade de estudos de diversidade genética entre tais isolados.

Referências

- CHAVERRI, P.; SALGADO, C.; HIROOKA, Y.; ROSSMAN, A. Y.; SAMUELS, G. J. Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. **Studies in Mycology**, v. 68, p. 57–78, Mar. 2011. DOI: 10.31144/sim.2011.68.03.
- CROCKARD, M. A.; FULTON, C. E.; BJORSON, A. J.; BROWN, A. E. Intron polymorphism in small subunit rDNA of *Nectria galligena*. **Microbiology**, v. 144, n. 8, p. 2367-2372, Aug. 1998.
- DIGUTA, C. F.; VINCENT, B.; GUILLOUX-BENATIER, M.; ALEXANDRE, H.; ROUSSEAU, S. PCR ITS-RFLP: A useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. **Food Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1145-1154, Sep. 2011. DOI: 10.1016/j.fm.2011.03.006.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

DOYLE, J. J.; DOYLE J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; BELLOCH, C.; URUBURU, F.; QUEROL, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, n. 1, p. 329-337, Jan. 1999. DOI: 10.1099/00207713-49-1-329.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of The United Nations Statistics Division. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 12 fev. 2016.

GROVE, G. G. Nectria canker. In: JONES, A. L.; ALDWINCKLE, H. S. (eds). **Compendium of apple and pear diseases**. St. Paul, MN: The American Phytopathological Society, 1990.

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

LATORRE, B. A.; RIOJA, M. E.; LILLO, C.; MUNOZ, M. The effect of temperature and wetness duration on infection and a warning system for European canker (*Nectria ditissima*) of apple in Chile. **Crop Protection**, v. 21, n. 4, p. 285-291, May 2002. DOI: 10.1016/S0261-2194(01)00099-0.

McCRACKEN, A. R.; BERRIE, A.; BARBARA, D. J.; LOCKE, T.; COOKE, L. R.; PHELPS, K.; SWINBURNE, T. R.; BROWN, A. E.; ELLERKER, B.; LANGRELL, S. R. H. Relative significance of nursery infections and orchard inoculums in the development and spread of apple canker (*Nectria ditissima*) in young orchards.

Plant Pathology, v. 52, n. 5, p. 553-566, Oct. 2003. DOI: 10.1046/j.1365-3059.2003.00924.x.

NATIONAL PLANT BIOSECURITY DIAGNOSTIC NETWORK. **Diagnostic resources for priority pests: *Neonectria ditissima* (*Nectria gallegina*): European canker, Nectria canker**. 2014. Disponível em: <<http://plantbiosecuritydiagnostics.net.au/resource-hub/priority-pest-diagnostic-resources/>>. Acesso em: 15 fev. 2016.

PHAM, T.; WIMALASENA, T.; BOX, W. G.; KOIVURANTA, K.; STORGASDS, E.; SMART, K. A.; GIBSON, B. R. Evaluation of ITS PCR and RFLP for differentiation and identification of brewing yeast and brewery 'Wild' yeast contaminants. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 117, n. 4, p. 556-568, 2011. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2011.tb00504.x.

RUIZ-MOYANO, S.; BENITO, M. J.; MARTIN, A.; ARANDA, E.; HERNANDEZ, A.; CÓRDOBA, M. G. Characterization of molds isolated from smoked paprika by PCR-RFLP and micellar electrokinetic capillary electrophoresis. **Food Microbiology**, v. 26, n. 8, p. 776-782, Dec. 2009. DOI:10.1016/J.FM.2009.05.002.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. 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, Orlando, Flórida, ch. 38, p. 315-322, 1990.

**Comunicado
Técnico, 185**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Uva e Vinho
Rua Livramento, 515 - Caixa Postal 130
95700-000 Bento Gonçalves, RS
Fone: (0xx) 54 3455-8000
Fax: (0xx) 54 3451-2792
<https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/>

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



1ª edição

**Comitê de
Publicações**

Presidente: *César Luis Girardi*
Secretária-executiva: *Sandra de Souza Sebben*
Membros: *Adeliano Carginin, Alexandre Hoffmann,
Ana Beatriz da Costa Czermainski, Henrique
Pessoa dos Santos, João Caetano Fioravanço,
João Henrique Ribeiro Figueredo, Jorge Tonietto,
Rochelle Martins Alvorcem e Viviane Maria Zanella
Bello Fialho*

Expediente

Editoração gráfica: *Alessandra Russi*
Normalização bibliográfica: *Rochelle Martins Alvorcem*