

AVALIAÇÃO MORFOLOGIA E MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DE *FUSARIUM* SP.

C.C. Aparecido¹, E.C. Rosa²

Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-900, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: christianeceriani@biologico.sp.gov.br.

¹Pesquisador Científico. ²Agente de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica.

RESUMO

O gênero *Fusarium* engloba inúmeras espécies importantes sob o ponto de vista fitopatogênico e/ou toxigênico, uma vez que algumas cepas, havendo condições abióticas favoráveis, podem produzir micotoxinas. A identificação correta da espécie em curto espaço de tempo é necessária para a definição das medidas de controle a serem utilizadas, de forma a minimizar qualquer dano. Normalmente, a identificação é baseada em características culturais, morfológicas, odores, produção de micotoxinas e, mais recentemente, técnicas moleculares. Mesmo com todas essas ferramentas, ainda existe muita confusão, principalmente quando são utilizadas de maneira separada. Em relação às técnicas moleculares, existe ainda o custo elevado, pois para a identificação, o sequenciamento é exigido. Assim, com o objetivo de se comparar a avaliação de características morfológicas e as técnicas moleculares para a identificação de um isolado do gênero *Fusarium*, foi realizado este estudo. Todas as características morfológicas observadas, bem como as técnicas moleculares, possibilitaram identificar o isolado estudado como *Fusarium verticillioides*, sinônimo *F. moniliforme*. Porém, os procedimentos morfológicos foram realizados em 5 dias, enquanto para os ensaios de Biologia Molecular, mais de 2 semanas, principalmente devido aos protocolos para o sequenciamento. Além disso, os custos para as técnicas moleculares foram mais elevados.

PALAVRAS-CHAVE: características morfológicas, ITS, fator de alongação.

ABSTRACT

MORPHOLOGY AND MOLECULAR EVALUATION FOR IDENTIFICATION OF *FUSARIUM* SP.

The genus *Fusarium* encompasses the top of phytopathogenic and/or toxigenic, one part of which some strains, under biologically favorable conditions, mycotoxins can proliferate. The correct measurement is used in a period of time for the execution of the control measures. Typically, an identification is based on cultural characteristics, morphological features, odors, production of mycotoxins and more recently with the use of strategies. Different service from the other side. According to the statistics, there is still the cost, for an identification, the sequencing is necessary. Thus, with the objective of comparing an evaluation of morphological characteristics and as one of the main ways to identify an object of the genus *Fusarium*, this study was carried out. All the morphological characteristics observed, as well as the molecular techniques, allowed the student diagnosis as *Fusarium verticillioides*, synonymy *F. moniliforme*. However, the morphological procedures were performed in 5 days, while the Molecular Biology assays, more than 2 weeks, mainly due to applications for sequencing. In addition, the costs to businesses were higher.

KEYWORDS: morphological characteristics, ITS, elongation factor.

O gênero *Fusarium* é um dos mais importantes na patologia vegetal mundial, muitas vezes causando murcha em diferentes culturas de importância econômica (BOOTH, 1971). Nos últimos anos, adquiriu também importância a produção de micotoxinas, substâncias responsáveis por doenças em humanos e animais (HAWKSWORTH, et al., 1995; JOUANY, 2007). Exemplos de micotoxinas produzidas pelo gênero *Fusarium* são: tricotecenos, zearalenona, fumonisinas e moniliformina. Vale ressaltar que a grande maioria das espécies são saprófitas do solo e fitopatógenos, enquanto uma minoria, patogênica para humanos. A primeira grande revisão do gênero foi rea-

lizada por WOLLENWEBER; REINKING (1935), sendo descrita na publicação "Die Fusarien" com 65 (sessenta e cinco) espécies, 55 (cinquenta e cinco) variedades e 22 (vinte e duas) especiais de formato, agrupados em 16 (dezesesseis) seções. Desde então, cerca de 1.000 (mil) espécies já foram descritas (MONTEIRO, 2004). A infecção por *Fusarium* geralmente resulta em redução substancial do rendimento da safra e, portanto, em perdas econômicas. Apesar do fato de que várias espécies de *Fusarium* podem estar implicadas em doenças de plantas, algumas merecem atenção especial, como: *F. graminearum* (*Gibberella zeae*), *F. culmorum* e *F. avenaceum*

(*Gibberella avenacea*), *F. verticillioides* (*F. moniliforme*), *F. roseus*, *F. tricinctum* e *F. nivale* (UHLIG et al., 2007). Enquanto alguns são altamente patogênicos, outros se destacam por produzirem micotoxinas altamente prejudiciais a humanos e animais (OSBORNE; STEIN, 2007). Na produção das micotoxinas, destaca-se *F. verticillioides* (*F. moniliforme*), fungo que pode contaminar os grãos de milho em pré e pós-colheita, produzindo sob condições abióticas apropriadas substâncias tóxicas pertencentes ao grupo de micotoxinas denominado fumonisinas (MARÍN et al., 1999). Tais substâncias têm a capacidade de se acumularem nos grãos que, ao serem consumidos, levam à intoxicação e, até mesmo, à morte do consumidor por problemas neuro e/ou hepatotóxicos.

A identificação correta e de maneira rápida da espécie que infecta o produto é altamente importante, uma vez que permite que medidas de manejo eficazes sejam adotadas. Tradicionalmente, para o gênero *Fusarium*, a identificação é baseada em características culturais, morfológicas (conidióforos, conídios e clamidósporos), em odores, e, mais recentemente, através da produção de micotoxinas, o que tem gerado controvérsias em relação à identificação das espécies (ALEXOPOULOS et al., 1996). Também, a Biologia Molecular dispõe de técnicas que podem ser utilizadas. Porém, no caso das técnicas mais modernas, é importante ressaltar que os custos tornam-se mais elevados, além de exigirem mais tempo em algumas das etapas.

Nesse sentido, o propósito deste estudo foi o de comparar as avaliações morfológicas (macro e microscópicas) com as técnicas de PCR e sequenciamento, visando à identificação de uma cultura pertencente ao gênero *Fusarium*.

No estudo comparativo foi utilizada a cultura MMBF 227/12 (*Fusarium* sp.), depositada na coleção Micoteca “Mário Barreto Figueiredo” desde 2012. O isolado foi semeado em meio BDA (batata-água-dextrose), permanecendo incubado em BOD à 25 °C, com fotoperíodo de 12h de escuro e 12h de luz, durante 10 (dez) dias. Foram preparadas seis placas, sendo metade utilizada para o estudo referente à morfologia e a outra metade utilizada para o estudo molecular.

Para as avaliações macroscópicas, foram observadas as características da colônia, como coloração, e as avaliações microscópicas foram realizadas sob microscopia óptica, por meio do preparo de 10 (dez) lâminas por placa, contendo as estruturas do fungo. As preparações foram coradas com azul de tripan. Foram observadas a morfologia de microconídios, macroconídios, células conidiogênicas (fiálides) e clamidósporos, conforme os critérios propostos por LESLIE; SUMMERELL (2006). Quanto ao estudo molecular, foram sequenciadas a região ITS e o gene do fator de elongação da tradução (TEF). Para a região ITS, reações de PCR foram preparadas utilizando os iniciadores ITS1 (5'-TC-CGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATTGC-3'),

segundo WHITE et al. (1990). As reações de PCR para região Fator de Elongação foram preparadas utilizando-se 2 (dois) pares de iniciadores: EF11 (5'-GTGGGGCATTACCCCGCC-3') e EF22 (5'-AGGAACCCTTACCGAGCTC-3'), e EF1 (5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAA-GAC-3') e EF2 (5'-GGA(G/A)GTACCAG-T(G/C)ATCATGTT-3'), segundo O'DONNELL et al. (1998).

Os produtos das PCR foram purificados seguindo protocolo descrito por SCHMITZ; RIESNER (2006), conforme descrito a seguir: em microtubo de 1,5 mL foram misturados 1,6 µL de EDTA 0,5 M, 21,0 µL PEG a 50% e 8,1 µL de NaCl 5 M. Adicionou-se o produto da PCR (\pm 20 µL) à mistura, sendo este incubado em temperatura ambiente por 10 min. Realizou-se a centrifugação durante 10 min a 14.000 g e descartou-se o sobrenadante. Foram adicionados 125 µL de etanol 70%, e realizada nova centrifugação (5 min a 14.000 g). Em seguida, o sobrenadante foi descartado. Secou-se o pellet a 37 °C por 20 min. O DNA foi ressuspensionado em 20 µL de água de osmose reversa estéril. As bandas de fragmentos de DNA resultantes da amplificação por PCR foram visualizadas sob luz UV em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo. Os produtos purifica-

dos foram sequenciados pelo método de terminação de cadeia, descrito por SANGER et al. (1977). As reações para o sequenciamento foram efetuadas com o kit Big Dye (Applied Biosystems), sendo utilizado o sequenciador (ABI 377 - ABI Prism/Applied Biosystems), conforme instruções do fabricante. As sequências obtidas foram alinhadas e analisadas utilizando o programa BioEdit, versão 7.1.11.

As avaliações macroscópicas possibilitaram registrar colônias de crescimento rápido, micélio aéreo cotonoso de coloração branca. Não foi observada pigmentação evidente na colônia (Figura 1). As observações microscópicas permitiram constatar macroconídios hialinos, septados, fusiformes ou com típico aspecto “em forma de foice”, característico do gênero, muitas vezes com célula apical alongada e célula basal pedicelada (Figura 1A). Foram observados, também, microconídios hialinos, dispostos em cadeias longas e unicelulares, apresentando forma piriforme ou oval, sendo produzidos em abundância (Figura 1B). Quando às células conidiogênicas, foram observadas monofiálides que, em geral, apresentaram-se divididas em forma de “V”, aparentando “orelhas de coelho” (Figura 1D).

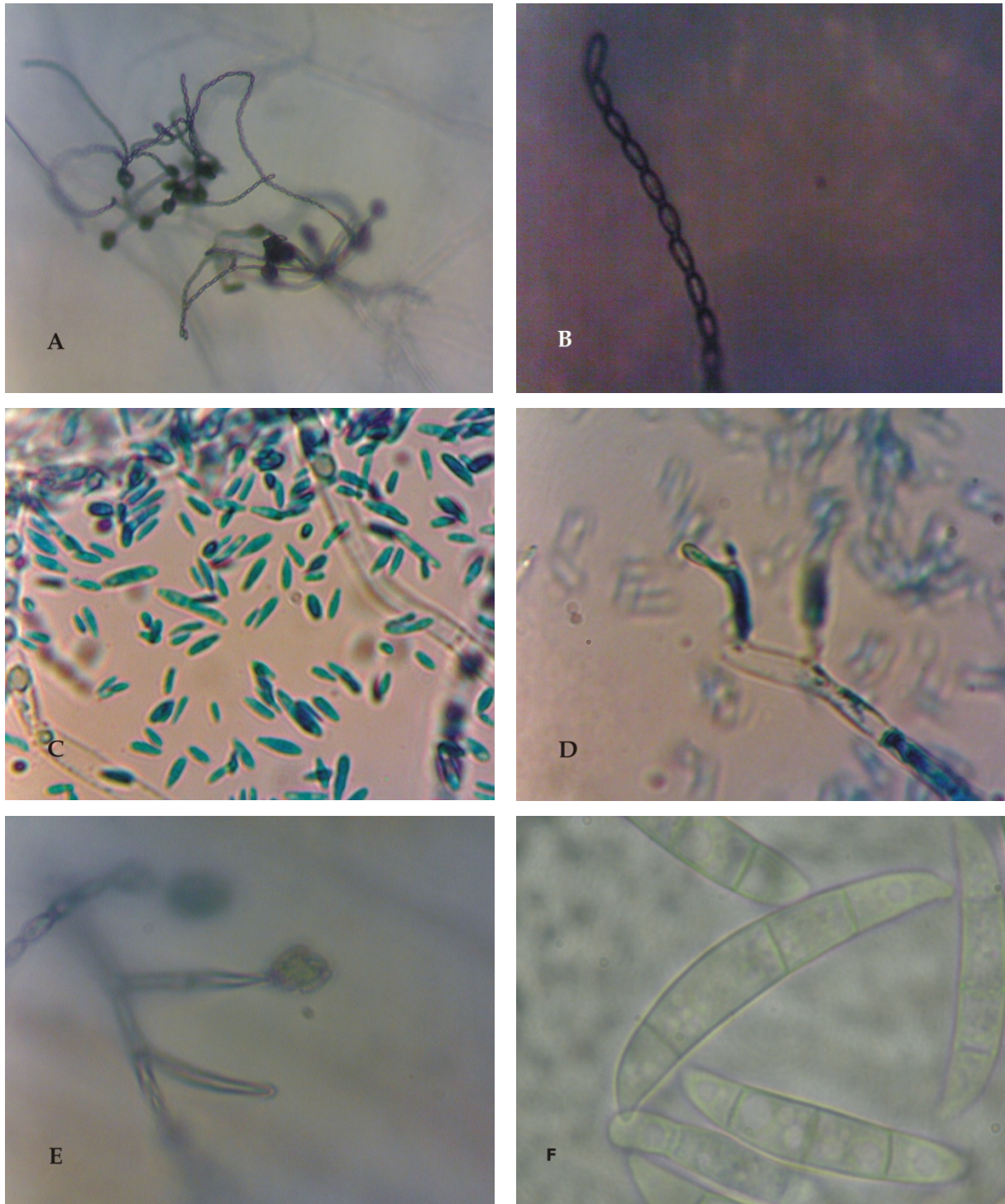


Figura 1 - Estruturas microscópicas observadas na cultura MMBF 227/12. A e B. Microconídios em corrente. C. microconídios. D. Monofiálides em “V” - “orelhas de coelho”. E. Monofiálides. F. Macroconídios.

Todas as características morfológicas observadas e documentadas possibilitaram identificar o isolado estudado como *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (LESLIE, et al., 2006).

SUMMERELL, 2006), sinonímia *F. moniliforme*. Com relação às técnicas moleculares, após o sequenciamento das regiões amplificadas com os primers específicos, o resultado foi o mesmo, ou seja, MMBF 227/12 - *F. verticillioides*. Convém destacar que, para a realização dos procedimentos morfológicos, foram necessários cinco dias, enquanto para os ensaios de Biologia Molecular, mais de

2 semanas, principalmente devido aos protocolos para o sequenciamento. Além disso, deve-se levar em consideração os custos que, para as técnicas moleculares são bem mais elevados. Observa-se, portanto, que embora os resultados tenham sido os mesmos com técnicas diferentes, os prazos e custos foram menores para as avaliações morfológicas, sendo estes os aspectos positivos para sua utilização. Porém, para confiabilidade da análise, se faz necessário um treinamento adequado, bem como a utilização de bibliografia mais atualizada possível.

REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; Blackwell, M. (Ed.). *Introductory mycology*. 4th ed. John Wiley and Sons, New York, 1996. 870p.
- BOOTH, C. The genus *Fusarium*. Kew, England: Commonwealth Mycological Institute, 1971, 58p.
- HAWKSWORTH, D.L.; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C.; PEGLER, D.N. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*. 8.ed. Oxon, UK: CAB International, 1995. 650p.
- JOUANY, J.P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal Feed Science and Technology*, v.137, p.342-362, 2007.
- LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. *The fusarium laboratory manual*. Ames: Blackwell Publishing, 2006. 388p.
- MAIORANO, A.; REYNERI, A.; SACCO, D.; MAGNI, A.; RAMPONI, C. A dynamic risk assessment model (FUMAGrain) of fumonisin synthesis by *Fusarium verticillioides* in maize grain in Italy. *Crop Protection*, v.28, p.243-256, 2009.
- MARÍN, S.; HOMEDES, V.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J.; MAGAN, N. Impact of *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum* colonisation of maize on calorific losses and fumonisin production under different environmental conditions. *Journal of Stored Products Research*, v.35, p.15-26, 1999.
- MONTEIRO, S.A. Análise genômica e sequenciamento automático de rDNA em populações de *Fusarium oxysporum*. 2004. 112p. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia). Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2004.
- O'DONNELL K.; KISTLER H.C.; CIGELNIK E.; PLOETZ R.C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings National Academy of the Science*, v.95, p.2044-2049, 1998.
- OSBORNE, L.E.; STEIN, J.M. Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *International Journal of Food Microbiology*, v.119, p.103-108, 2007.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings National Academy of the Science*, v.74, p.5463-5467, 1977.
- SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. *Analytical Biochemistry*, v354, p.311-313, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2006.03.014> Acesso em: 10 jul. 2019.
- SUÁREZ-ESTRELLA, F.; VARGAS-GARCÍA, M.C.; LÓPEZ, M.J.; MORENO, J. Survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis on plant waste. *Crop Protection*, v.23, p.127-133, 2004.
- UHLIG, S.; JESTOI, M.; PARIKKA, P. *Fusarium avenaceum* - The North European situation. *International Journal of Food Microbiology*, v.119, p.17-24, 2007.
- WHITE T.J.; BRUNS T.D.; 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*. San Diego, California: Academic Press, 1990. p.315-322.
- WOLLENWEBER, H.W.; REINKING, O.A. *Die fusarien, ihre beschreibung, schadwirkung und bekämpfung*. Berlin: P. Parey, 1935. 355p.

Recebido em: 30/07/2019

Aprovado em: 11/09/2019