



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

PEDRO VICTOR DA SILVA

**ESTUDO FILOGENÉTICO E PRODUÇÃO DE MARCADORES
MOLECULARES *IN SILICO* PARA O DIAGNÓSTICO DE *FUSARIUM
OXYSPORUM F. SP. RAPAE*, EM *IPOMOEA BATATAS (L.) LAM.***

SUMÉ - PB

2022

PEDRO VICTOR DA SILVA

**ESTUDO FILOGENÉTICO E PRODUÇÃO DE MARCADORES
MOLECULARES *IN SILICO* PARA O DIAGNÓSTICO DE *FUSARIUM
OXYSPORUM F. SP. RAPAE*, EM *IPOMOEA BATATAS (L.) LAM.***

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientadora: Professora Dra. Ana Verônica Silva do Nascimento.

SUMÉ - PB

2022



S586e Silva, Pedro Victor da.

Estudo filogenético e produção de marcadores moleculares in silico para diagnóstico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *rapae*, in *Ipomoea potatoes* (L.) Lam. / Pedro Victor da Silva. - 2022.

54 f.

Orientadora: Professora Dra. Ana Verônica Silva do Nascimento.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Batata doce. 2. *Ipomoea batatas*. 3. Análise filogenética. 4. *Fusarium oxysporum*. 5. Patógenos fúngicos - batata doce. 6. Diagnóstico molecular. 7. Gene LYL2. 8. Fungos - batata doce. 9. Micologia. 10. Blast - MCBI. 11. Técnicas moleculares - QPCR e LAMP. I. Nascimento, Ana Verônica Silva do. II. Título.

CDU: 60 (043.1)

Elaboração da Ficha Catalográfica:

Johnny Rodrigues Barbosa
Bibliotecário-Documentalista
CRB-15/626

PEDRO VICTOR DA SILVA

**ESTUDO FILOGENÉTICO E PRODUÇÃO DE MARCADORES
MOLECULARES *IN SILICO* PARA O DIAGNÓSTICO DE *FUSARIUM
OXYSPORUM F. SP. RAPAE*, EM *IPOMOEA BATATAS (L.) LAM.***

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Ana Verônica Silva do Nascimento
Orientadora – UAEB/ CDSA/ UFCG.

Prof. Dr. Aldre Jorge Morais Barros
Examinador Interno I - UAEB/ CDSA/ UFCG.

Prof. Dr. Franklin Ferreira de Farias Nóbrega
Examinador Interno II - UAEB/ CDSA/ UFCG.

Trabalho aprovado em: 30 de agosto de 2022.

SUMÉ -PB

Dedico este trabalho a minha família (Edleusa, Antônio, Alexandre, Janaina e Edgrecia) que me apoiaram nessa jornada e a todos que colaboram para meu crescimento.

AGRADECIMENTOS

A minha jornada só foi possível graças a Deus e agradeço todos os dias a ele pela possibilidade de ter iniciado essa jornada. Gratidão por sempre estar comigo em todos os momentos.

Aos meus pais, Maria Edleusa e Antônio Leite, pelo apoio e incentivo nessa jornada acadêmica. Sem vocês isso também não seria possível. As minhas irmãs Edgrecia e Janaina por toda ajuda e compreensão. E ao meu irmão Alexandre Devid, por toda ajuda em todos os momentos.

A Universidade Federal de Campina Grande, campus Sumé, por ter proporcionado a construção do saber. Agradeço a todos que fazem parte dessa instituição que contribuíram de alguma forma na minha construção.

Quero agradecer aos amigos/ família que Deus e a Universidade proporcionou: Ao meu amigo/ irmão Franklin Fagundes que sempre esteve comigo durante essa jornada acadêmica, agradeço por todos os momentos de loucuras e alegrias vivenciados, estaremos sempre juntos apesar da distância; As minhas amigas Danielle Ferreira e Graciele Santana que moram no meu coração e ficaram sempre comigo não importa aonde estiverem, saibam que vocês fizeram toda a diferença na minha vida durante essa jornada e agradeço de coração por todos os momentos.

A minha amiga Beatriz Ribeiro, que apesar de pouco tempo vivenciados, surgiu uma grande amizade. A Andreza Larissa, minha amiga e companheira de momentos e surtos, meu muito obrigado por todos os momentos e conselhos.

Aos meus amigos de Araripina Jussara Goncalves, Amanda Danielle, Hyaly Pires e Jucilene Gonçalves que apesar da distância sempre mantiveram contato comigo. Ao meu amigo Victor Epephanio, por todos os momentos de conversas e loucuras.

A Alecksandra Lacerda, por me aceitar a fazer parte da Família LAEB e por orientar no projeto PIBIT. Aos professores Jean Queiroz, Mérgia, Glauciane Coelho, Adriana, Janduy Guerra, Bruno Nunes, Aldre, Tatiana, Aldinete, Morgana e Franklin Nobrega, meus sinceros agradecimentos por toda aprendizagem e conselhos passado. Agradeço aos demais professores que de alguma forma contribuíram para meu aprendizado.

A minha orientadora, Ana Verônica, pela paciência, atenção, apoio e incentivo quando tanto precisei durante a minha vida acadêmica até a entrega do trabalho de conclusão de curso. Agradeço a Debora Santos, que esteve comigo durante o desenvolvimento do presente trabalho,

dando o suporte necessário. Vocês são anjos e agradeço as duas por toda ajuda e atenção. Aos examinadores Franklin Nobrega e Aldre Jorge por ter contribuído com o presente trabalho.

A minha grande amiga, que sempre ajudou e me recebeu na sua casa em Arcoverde, Franci. Meus sinceros agradecimentos. Você é um anjo que Deus colocou minha vida.

A Ranielly, minha primeira amiga em Sumé, meus agradecimentos; todos os momentos de conversas foram essenciais para minha jornada, e levarei você no meu coração. A minha colega Lais, meu agradecimento por toda ajuda.

A minha vizinha Gracinha, por toda ajuda quando eu tanto precisei. Você tem um coração enorme e agradeço de coração por toda ajuda. Além disso, agradeço a Gilmara e sua família por toda compreensão durante minha estadia em sua residência.

Não posso deixar de lembrar das colegas da Secretaria de Saúde de Sumé Denilza e Mana por sempre me ajudarem quando eu precisava. Vocês foram muito importantes na minha jornada em Sumé. Agradeço de coração por tudo.

RESUMO

A batata-doce (*Ipomoea batatas*) é uma hortaliça de importância nacional, uma vez que é a quarta hortaliça mais consumida no Brasil com grande adaptação aos diversos sistemas de climas e solos, possuindo baixo custo de produção. Nacionalmente, as regiões Sul e Nordeste destacam-se por serem responsáveis por grande parte da produção do país. Mas atualmente as plantações vêm sofrendo grande perdas com as infecções de patógenos fúngicos, em destaque a espécie *Fusarium Oxysporum*. Assim, o presente trabalho teve por objetivo fazer um estudo genético da espécie *Fusarium Oxysporum f. sp. rapae*, pertencente ao grupo do complexo *Fusarium Oxysporum*, além de produção de primers para diagnóstico molecular com o gene LYS2. Com as buscas das sequências do gene de interesse utilizando a ferramenta blast da plataforma do NCBI, foram selecionadas 15 sequências para em seguida gerar a árvore filogenética com as sequências selecionadas e depois desenhar os marcadores para qPCR e os iniciadores da técnica LAMP. Os resultados obtidos da árvore filogenética, com o método de inferência bootstrap, apresentaram bons resultados de similaridades entre as espécies, resultando em uma boa árvore de espécie com representação de topologia histórica das espécies. Os primers desenhados com a plataforma primer3Plus demonstraram serem bons marcadores, atendendo todos os parâmetros e apenas três dos cinco conjuntos de iniciadores desenhados foram selecionados para técnica LAMP. Os protocolos desenvolvidos (*in silico*) foram baseados em técnicas moleculares para diagnosticar o *F. oxysporum* na batata doce, sendo um protocolo para técnica qPCR e outro protocolo para técnica LAMP.

Palavras-chave: Batata-doce; Primers; kit diagnóstico.

SILVA, P. V. da. **Phylogenetic study and production of molecular markers (*in silico*) for the diagnosis of *Fusarium oxysporum f. sp. rapae*, in *Ipomoea potatoes (L.) Lam.*** Course Conclusion Work (Biotechnology and Bioprocess Engineering), Federal University of Campina Grande, Sumé-PB, 2022.

ABSTRACT

Sweet potato (*Ipomoea batatas*) is a vegetable of national importance, also it is the fourth most consumed vegetable in Brazil with great adaptation to different climates and soils and has a low production cost. Nationally, the south and northeast regions have the title of being responsible for the biggest part of the country's production, but currently the crops have been suffering several damages with the infection of fungal pathogens, especially the species *Fusarium Oxysporum*. The present work is intended to make a genetic study of the species *Fusarium Oxysporum f. sp. rapae*, that belongs to the *Fusarium Oxysporum* genetic complex, and also the production of primers for molecular diagnosis with the LYS2 gene. Researching genetic sequences using the blast tool of the NCBI platform, 15 sequences were selected to form the phylogenetic tree using the selected sequences and then design the primers for qPCR and the primers specific of the LAMP technique. The results obtained from the phylogenetic tree, with the bootstrap inference method, brought forward good results and similarities between species, resulting in a good tree of species with representation of the historical topology of the species. The primers designed with the primer3Plusplatform proved to be good primers, achieving all the parameters and only three of the five primer sets designed were selected for the LAMP technique. The developed protocols (*in silico*) were based on molecular techniques to diagnose *F. oxysporum* in sweet potato, one protocol for qPCR technique and another protocol for LAMP technique.

Keywords: Sweet potato; Primers; Diagnostic kit.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Informações relacionadas com as sequencias do Gene LYS2. Dados coletadas com a ferramenta Blast da plataforma NCBI.	35
Tabela 2 – Primers do gene LYS2.....	42

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação da podridão do pé em plantas de batata-doce. Lesões necróticas nas hastes acima da região do coleto das plantas.....21
- Figura 2** – Pústulas de *Ipomoeae-panduratea* na superfície inferior da folha21
- Figura 3**- *Alternaria* spp atacando a superfície da folha, formando várias lesões nas cores marrom e amarela.22
- Figura 4** - *Ceratocystis fimbriata* infectando o tecido vegetal da batata-doce.22
- Figura 5**- Folha da sarna causada por *Sphaceloma batatas*. Folhas em concha, distorcidas e eretas mostrando as lesões escamosas.23
- Figura 6** – Contaminação *F. oxysporum* f. sp. batatas em tecidos vegetais. A figura superior apresenta amarelecimento das folhas seguido de murcha e na figura inferior o caule arroxeadado com tecido afetado marrom a preto.24
- Figura 7**– Infecção por *Monilochaetes infuscans*. Uma colina de batata-doce mostrando lesões de escamas que estão espalhadas pelo caule da planta.....24
- Figura 8**– Manchas causadas por *Sclerotium rolfsii*. Do lado esquerdo há Hifas e escleródios de *Sclerotium rolfsii* em brotos infectados e decomposição parcial da raiz. Do lado direito apresenta manchas circulares em uma raiz.....25
- Figura 9**– Micromorfologia a do *Fusarium oxysporum* por microscopia óptica. Nas figuras A,B,C,D E, e F são macroconidia. A escala são de: A – D= 25 µm; E – F = 50 µm.26
- Figura 10**– Árvore filogenética bootstrap consensus do gene *LYS2* do microrganismo *Fusarium oxysporum* f. sp. rapae obtida no MEGA-XI.39

Figura 11- Iniciadores projetados a partir do gene LYS2 por meio do software Primer Explorer V5 para identificação de *Fusarium Oxysporum* f. sp rapae, pela técnica LAMP. Os Conjuntos estão representados por 1,3 e 5 são compostos por iniciadores externos (F3/B3 e e FIP/BIP).

.....45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 JUSTIFICATIVA.....	15
2 OBJETIVO.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
3.1 ASPECTOS GERAIS.....	18
3.1 PRINCIPAIS PATOGENOS QUE AFETAM A BATATA DOÇE (<i>IPOMOEA BATATAS</i> (<i>L</i>) <i>LAM</i>).....	20
3.2 O GÊNERO <i>FUSARIUM SPP.</i>	25
3.3 <i>FUSARIUM OXYSPORUM F.SP. RAPAE</i>	28
3.4 KIT DIAGNOSTICO – QPCR E LAMP	29
4 METODOLOGIA	33
4.1 TRIAGEM E OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS.....	33
4.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA E AGRUPAMENTO DAS SEQUÊNCIAS	33
4.3 PRODUÇÃO E VALIDAÇÃO DE PRIMERS	34
4.4 PROCOTOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA E TÉCNICA RT-QPCR E LAMP.....	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 PROTOCOLO PARA AS TÉCNICAS MOLECULAR QPCR E LAMP	45
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

A batata-doce é uma dicotiledônea pertencente à família Convolvulaceae, gênero *Ipomoea* e espécie *Ipomoea batatas* (L) Lam que agrupam aproximadamente 50 gêneros e mais de 1000 espécies, mas somente a batata-doce tem cultivo de expressão econômica. É uma planta de clima tropical ou subtropical, podendo ser cultivada em regiões temperadas. Esta espécie vem despertando grande interesse dos pesquisadores por conta da diversidade de material existente no Brasil, por sua rusticidade e alta produtividade, além de destaca-se por seu cultivo e por um baixo custo de implantação (MOTA *et al.* 2011).

A hortaliça ainda se destaca como uma grande fonte de vitamina A e vitaminas do complexo B, além de minerais como cálcio (Ca), enxofre (S), magnésio (Mg), ferro (Fe) e especialmente potássio (K). A espécie ainda possui um alto valor nutritivo, por conter carboidratos, e tem uma ampla versatilidade sensorial, por possuir diferentes cores de polpa, sabor e textura (VIZZOTO *et al.* 2018). A importância econômica e social dessa cultura é resultante de ampla adaptação climática e elevada capacidade de produção de energia em curto espaço de tempo (AMARO *et al.*, 2017; AMARO *et al.*, 2019; PINTO, 2021), resultando em uma hortaliça de grande relevância para produtores familiares como meio de subsistência e comércio (CASTRO, 2010).

Ademais, a planta apresenta grande potencial de produção, uma vez que possui alta capacidade de produzir energia por unidade de área e tempo (kcal/ha.dia), em que um hectare dessa raiz consegue fornecer aproximadamente 40 toneladas de biomassa. Apresenta raízes de grande conceituação, pois são largamente usadas na alimentação humana, animal e como matéria-prima em indústrias de produtos alimentícios, cosméticos, tecidos, de papel e adesivos (SILVA, 2016). Ainda mais, no Brasil, é cultivada em todas as regiões do país, com ênfase as regiões Sul e Nordeste; e na América-latina, o país surge como principal produtor deste tubérculo, com mais de 805,4 mil toneladas, destacando-se os estados de Sergipe, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Paraíba e Alagoas como os maiores produtores (IBGE, 2020).

Entretanto, é notado que grandes cultivos de produção dessa hortaliça vêm sofrendo com os grandes impactos de patógenos (EMBRAPA, 2021). De forma geral, dentre os principais agentes infecciosos da batata doce estão os fungos, bactérias e nematoides, sendo os fungos os de maiores números e os principais em infecção de cultivo. Assim, os principais fungos que acometem a batata-doce são: *Albugo ipomoeae-panduratea*, *Plenodomus destruens*, *Alternaria spp*, *Ceratocystis fimbriata*, *Esinoe batatas* (*sphaceloma batatas*),

Sclerotium rolsii e o *Fusarium spp*, sendo o último um dos patógenos de grande influência na espécie (EMBRAPA, 2021).

O *Fusarium spp* é um patógeno imperfeito, que teve sua primeira descrição em 1809. O gênero *Fusarium*, segundo Index Fungorum (2012), é pertencente ao Reino Fungi, divisão Ascomycota, Subdivisão Pezizomycotina, Classe Sordariomycetes, Sub-classe Hypocreomycetidae, Ordem Hypocreales e Família Nectriaceae.

Sua ocorrência, em especial, é em locais de climas tropicais e subtropicais, sendo capaz de sobreviver por longos períodos no solo pela formação de estruturas chamadas clamidósporos (MILANESI, 2009). Ainda, Milanesi (2009), considera que o fungo pode colonizar ramos, folhas, inflorescências e frutos através de seus conídios, disseminados pelo ar ou pela água, visto que sua complexidade do sistema solo e a diversidades das espécies existentes constituem para sua sobrevivência e disseminação. Ressalta-se que a variabilidade genética dentro do gênero *Fusarium* é amplamente alta.

Como alternativa de identificação desse patógeno, surgem os métodos moleculares, resultando de uma ampliação de conhecimentos sobre a epidemiologia e ecologia dos organismos. Segundo Carnielli (2014), a técnica mais comum para identificar fitopatógenos, em especial fungos, é com base no exame microscópico para buscar diferenças entre suas culturas e identificar características morfológicas específicas tais como, forma, estrutura das hifas e tamanhos dos conídios. Entretanto os diagnósticos moleculares têm sido bastante usados, pois são métodos que trazem resultados seguros e específicos, além de apresentarem várias vantagens em relação ao método convencional por serem mais precisas, rápidas, confiáveis e não necessitarem de uma interpretação subjetiva (CARNIELLI, 2014).

Dentre as técnicas de detecção molecular, estar a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que tem revolucionado o processo de diagnose de doenças, devido à capacidade de amplificação de regiões específicas do alvo (Njiru *et al.*, 2008). Ao longo dos anos, novas métodos que derivam da PCR têm-se surgido, melhorando cada vez mais os processos de estudos de base molecular. Desta forma, algumas delas são a qPCR, Multiplex PCR, LAMP PCR, BIO PCR e muitas outras, sendo que cada técnica tem um objetivo e característica comum para estudo em questão.

A qPCR ou PCR quantitativa em tempo real baseia-se em uma multiplicação enzimática de sequências de DNA e detecção do produto amplificado por meio da fluorescência. (GONÇALVES, 2009). Esse método molecular tem sido o foco principal no mercado na área de diagnósticos uma vez que apresenta grandes vantagens: reação executada de maneira rápida, detecção imediata do produto dentro de placas fechadas, a opção de detecção

de mais de um patógeno ao mesmo tempo e a não necessidade de eletroforese em gel após a PCR. Já a técnica LAMP (derivada da PCR) - Loop mediated isothermal amplification - é caracterizada por amplificar rapidamente o DNA alvo sob temperaturas constantes, sendo necessário apenas um banho seco para reprodutibilidade do método (Njiru *et al.*, 2008), demonstrando vantagem sobre a PCR convencional, pois há redução de custos e etapas para obtenção dos produtos.

Assim, é notável que os métodos moleculares podem ser grandes aliados no diagnóstico de fitopatógenos. Logo, considerando a alta incidência de infecção da *Ipomoea batatas* por *Fusarium Oxysporum*, é relevante um estudo de levamento filogenético da espécie, como também uma alternativa de diagnóstico com base no gene de interesse do estudo, que tenha por objetivo custo baixo e especificidade alta.

1.1 JUSTIFICATIVA

É sabido que a batata-doce é considerada um alimento energético, com cerca de 30% de matéria seca que contém em média 85% de carboidratos, cujo seu componente principal é o amido. Ademais é uma das principais culturas hortaliças produzidas em todo o mundo em regiões tropicais e temperadas da África, Ásia e América.

Segundo Resende e Ferreira (2019), a batata-doce é a quarta hortaliça mais consumida no Brasil, considerada uma cultura rústica, fácil manutenção e com boa tolerância a períodos de seca. Além disso, apresenta, em geral, baixo custo de produção, sendo uma das hortaliças com maior capacidade de produzir energia por unidade de área e tempo (kcal/ ha/dia). Destaca-se, ainda, por ser uma planta adaptada aos diversos sistemas, e por seu cultivo em pequenas propriedades da agricultura familiar.

Além disso, na América-latina, o Brasil surge como principal produtor, com mais de 800 mil toneladas, sendo os estados de Sergipe, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Paraíba e Alagoas, que apresentam produtividades superiores à média nacional (IBGE, 2020). Com tudo, observa-se que segundo a pesquisa do orçamento familiar (POF) feito pelo IBGE (2020), a aquisição anual per capita de batata-doce no Brasil, no ano de 2008, foi de 0,639 kg. Assim, os estados que maior consumiram a batata doce foram Paraíba, com 2,142 kg per capita; Pernambuco, com 1,473 kg per capita; Santa Catarina, com 1,264 kg per capita.

Entretanto, apesar do grande cultivo nas diversas regiões do país, as produções vêm sofrendo grandes impactos de patógenos. Dentre as principais estão as bactérias, fungos e nematoides. Na literatura observa-se grande incidência de patógenos do reino dos fungos, em

destaques: *Fusarium spp*, *Albugo ipomoeae pandurataea*, *Alternaria spp*, *Ceratocystis fimbriata*, *Elsinoe batata (Sphacelima batata)* e *Sclerotium rolfsii*. Entre os patógenos fúngicos que afetam a *Ipomoea batata* o *Fusarium spp* merece destaque, uma vez que o mesmo representa grande ameaça aos cultivares da hortalíça (EMBRAPA, 2021). Mas, apesar dos grandes impactos que as plantações vêm sofrendo, as pesquisas voltadas para diagnósticos moleculares vêm avançando cada vez mais, possibilitando uma prevenção e diagnóstico específico de agentes infecciosos.

As técnicas moleculares estão entre os meios mais preciso de diagnósticos de microrganismo. Entre elas, destaca-se a Reação da amplificação da polimerase em cadeia (PCR) e seus métodos derivados. A PCR se baseia em aumentar o número de cópias de sequências de DNA por meio de reação enzimática *in vitro*. A qPCR – PCR quantitativa, é um dos métodos mais utilizados, uma vez que apresenta grandes vantagens em relação a PCR convencional, visto que possui caráter quantitativo e tem-se maior sensibilidade, realizando ensaios com menores riscos de contaminação cruzada (CANKAR *et al.*, 2006). E outra técnica que vem ganhando destaque é Loop mediated isothermal amplification (LAMP), sendo caracterizada por amplificar rapidamente o DNA alvo sob temperaturas constantes (NJIRU *et al.*, 2008; TEXEIRA, 2016). Sua vantagem sobre a PCR é resultado da redução de custos e etapas para obtenção dos produtos.

Portanto, considerando que o estado da Paraíba estar entre os maiores produtores da batata-doce (cultivado principalmente nas microrregiões do brejo litoral Paraibano) e entre os dez em nível nacional (SOARES *et al.*, 2002; RICARDO, 2010), e que as técnicas moleculares são ótimas opções para diagnósticos de fitopatógenos, é importante que se destaquem pesquisas voltadas para área genética do *Fusarium Oxysporum* e seu grupo de complexos, relacionado com a batata-doce (*Ipomoea batatas*), raiz tuberosa de grande importância econômica para o estado, afim de proporcionar um maior entendimento da evolução do agente e maior confiabilidade de diagnóstico molecular da espécie infectante.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudo genético de espécie *Fusarium Oxysporum f sp rapae*, pertencente ao grupo do complexo *Fusarium Oxysporum*, causador de infecções em *Ipomoea batatas* e produção de primers para diagnóstico molecular de gene de interesse.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Busca em bancos de dados de genes relacionados com *Fusarium oxysporum*;
- Triagem do gene de interesse – LYS2;
- Análise filogenética das sequências selecionadas;
- Desenhos de primers com base na sequência do gene da lisina;
- Desenvolver protocolo de diagnóstico molecular qPCR, com base nos melhores primers obtidos;
- Desenvolver iniciadores e protocolo do método LAMP.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ASPECTOS GERAIS

A batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) é uma espécie da família Convolvulaceae, possuindo característica de uma hortaliça tuberosa com raízes ricas em amido e altamente produtiva. É facilmente cultivada, visto que apresenta alta rusticidade e adaptação aos mais variados climas, sendo estes os principais fatores que contribuem para seu cultivo em escala mundial (QUEIROGA, *et al.* 2007).

Há diversas hipóteses em relação a origem *Ipomoea batatas* (L.) Lam. fundamentadas em teorias linguísticas, correntes migratórias, achados arqueológicos, estudos citológicos. Entretanto, atualmente é comum que em diversas literaturas a batata-doce é originária da América tropical.

A espécie *Ipomoea batatas* é uma planta herbácea perene, porém, quando cultivada é tratada como anual e possui uma grande variabilidade em sua morfologia. Tem-se um hábito de crescimento, prostrado com ramos se espalhando horizontalmente sobre o solo de forma rápida (NUNES, 2016). Logo, observa-se considerável diversidade genética em batata-doce nas diversas regiões produtoras do Brasil, oriunda da segregação obtida pela propagação sexuada e de introduções de plantas provenientes de outras localidades.

A classificação da batata-doce é realizada, na maioria das vezes, pelos agricultores ainda na propriedade, não existindo, ainda, alguma normativa oficial do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) sobre a classificação e rotulagem da batata-doce. Entretanto, há uma padronização adotada pela Ceagesp (2004), adesão voluntária. Ademais a batata-doce tem sido classificada no mercado em três (3) categorias, usando como fatores os tamanho e o peso como critério:

1) Peso e tamanho – padrão maior, superior a 300 gramas (popularmente conhecida, em diferentes regiões, como “cocão”).

2) Peso e tamanho – padrão médio, entre 250 a 300 gramas, considerada o melhor padrão comercial.

3) Peso e tamanho – padrão pequeno, inferior a 250 gramas.

As classificações das raízes 1 e 3 costumam ter preços inferiores às do padrão médio, e usualmente podem ser destinadas a outras finalidades como processamento em cozinhas industriais, fábricas de doces/geleias no tipo 1, ou embaladas em conjunto em bandejas e comercialização em feiras (EMBRAPA, 2021).

Segundo Miranda *et al.* (1995), a batata-doce consegue desenvolver-se bem em qualquer tipo de solo, desde que sejam franco-arenosos até os mais argilosos. Entretanto, o ideal é que seja solos mais leves, soltos, bem estruturados, de média ou alta fertilidade, bem drenados e com boa aeração. Nesses solos, as raízes são mais uniformes e com pouca aderência de terra na superfície tendo melhor aparência. Ainda mais, a propagação dessa hortaliça pode ser feita por meio de mudas, estacas, sementes botânicas, enraizamento de folhas destacadas ou cultura de tecido. Contudo, as ramas constituem o meio de propagação mais recomendado para culturas comerciais por ser mais econômico.

Comercialmente, essas raízes ganham destaques visto que se têm alto consumo por parte da população e pela produção de alimentos de subsistência por produtores de base familiar, além de uso na alimentação de animais, usando resíduos da parte aérea da planta e dos descartes de raízes. É importante destacar que é uma alternativa na produção de amido, farinhas, biocombustível, macarrão entre outras coisas que fazem ser uma cultura considerada com diversas finalidades. Ao fim de cada processo, ela está disponível de forma in natura, cozida, frita ou desidratada para fabricação de farinhas utilizadas em bolos, tortas, doces e pães (MAINO *et al.*, 2019; GALERIANI *et al.* 2020; PINTO, 2021).

Sua característica principal é ser um alimento altamente energético, rico em carboidratos e boa fonte de vitaminas, principalmente A, B e C. Além disso, as cultivares de polpa alaranjada são fontes excelentes de carotenoides e minerais, como por exemplo, Ferro (Fe), Calcio (Ca) e Potássio (K) (SOARES *et al.*, 2002).

Essa hortaliça representa uma grande importância mundial, uma vez que é considerada uma cultura imprescindível para a segurança alimentar, principalmente em países em desenvolvimento (EMBRAPA, 2021). A exemplo disso, em fatos históricos, a grande representação em fonte de alimento importante para grande parte da população norte-americana na Crise de 1929, nos Estados Unidos.

Em dados atuais de produção, a China produz 53,01 milhões de toneladas de batata-doce anualmente, representando mais de 58% da produção mundial, estimada em 91,95 milhões de toneladas. A produção da Ásia passa 65% desse total, seguida pela África, com 28,3%, e pelas Américas com 4,6% (FAOSTAT, 2020). O Brasil ocupa a posição 16º lugar entre os maiores produtores de batata-doce, com 805,4 mil toneladas e R\$ 886,6 milhões em valor de produção, sendo o maior produtor da América Latina. (EMBRAPA,2021).

No Brasil, a produção de batata-doce vem aumentando nos últimos anos. Isso porque há alta demanda por essa hortaliça, principalmente em função de suas características nutricionais corroboradas por inúmeros estudos científicos. Observa-se que a batata-doce está

presente em quase todos os planos de dietas, em virtude de qualidades como, o alto conteúdo de fibras, baixo índice glicêmico e a diversidades de vitaminas (EMBRAPA,2021). Isso faz com que essa hortaliça seja mais procurada nos comércios, contribuindo para fatores como o bem-estar e expansão de comercio como símbolo de status.

No Brasil os estados da região nordeste como Sergipe, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Paraíba e Alagoas são uns dos mais produtores (IBGE, 2020) e contribuindo fortemente para os pequenos agricultores. A exemplo disso, Pereira (2013) relata como a batata-doce está fazendo a diferença na cidade de Conceição-PB, em que a economia se desenvolveu a partir do cultivo da mesma e vem fazendo a diferença na vida da população local, e contribuindo com exportação para outros estados brasileiros, mudando a vida da população e o melhorando o desenvolvimento da cidade.

3.1 PRINCIPAIS PATOGENOS QUE AFETAM A BATATA DOÇE (*Ipomoea batatas* (L) Lam)

Os principais patógenos que acometem a cultura da batata doce são: patógenos fúngicos, bactérias, vírus e nematoides (EMBRAPA, 2021). Abaixo será detalhado os principais fungos que estão predominantemente na batata-doce:

- MAL-DO-PÉ (*Plenodomus destruens*):

No coleto (região entre a raiz e o caule) da planta forma-se um cancro escuro, que interrompe a absorção de água e nutrientes, com o desenvolvimento da planta observa-se folhas murchas, amareladas ou seca (Figura 1) (EMBRAPA, 2021).

Figura 1 - Representação da podridão do pé em plantas de batata-doce. Lesões necróticas nas hastes acima da região do coleto das plantas.



Fonte: Embrapa, (2021).

- **ALBUGO** (*Ipomoeae-panduratea*):

Muito conhecida como ferrugem branca. Forma lesões pulverulentas no limbo foliar se transformando em pústulas salientes de cor leitosa, reduzindo a área fotossintética (Figura 2). A alta umidade relativa do ar favorece o desenvolvimento da doença) (EMBRAPA, 2021).

Figura 2 – Pústulas de *Ipomoeae-panduratea* na superfície inferior da folha



Fonte: Google imagens, (2021).

- **MANCHA DE ALTERNARIA** (*Alternaria spp*):

Ataca o limbo foliar das folhas mais velhas, formando lesões necróticas circulares ou irregulares, de cor marrom e halos amarelados (Figura 3). No pecíolo, forma lesões

escuras e alongadas. Esta doença só tem importância quando cultivares suscetíveis são plantadas sob alta temperatura e umidade (EMBRAPA, 2021).

Figura 3- *Alternaria spp* atacando a superfície da folha, formando várias lesões nas cores marrom e amarela.



Fonte: Agrolink, (2021).

- **MURCHA-DE-CERATOCYSTIS** (*Ceratocystis fimbriata*):

Causa, na raiz tuberosa, necroses secas de cor cinza ou preta e mudando o sabor para um amargo muito forte e característico (Figura 4). Associado ao ataque por brocas, o fungo pode atingir camadas mais profundas das raízes, tornando muitas vezes o produto não comestível, sendo rejeitado até por animais (EMBRAPA, 2021).

Figura 4 - *Ceratocystis fimbriata* infectando o tecido vegetal da batata-doce.



Fonte: Google Imagens, (2021).

- **ELSINOË BATATAS** (*Sphaceloma batatas*):

Conhecida como sarna, é considerada como uma das doenças mais destrutivas da batata-doce nas regiões subtropicais e tropicais do mundo (Figura 5). O patógeno causa pequenas lesões circulares a elípticas ou alongadas de cor marrom no caule (EMBRAPA, 2021).

Figura 5- Folha da sarna causada por *Sphaceloma batatas*. Folhas em concha, distorcidas e eretas mostrando as lesões escamosas.



Fonte: Sperimentazione, (2021).

- **PODRIDÃO-SECA** (*Fusarium spp*):

As causas desse patógenos são: manchas e podridões nas raízes e na base das brotações (Figura 6). Em pós-colheita, tais sintomas provocados pelo patógeno, causa frequentemente manchas e podridões. *F. oxysporum f. sp. batatas* pode causar infecção vascular, independentemente da contaminação das batatas-semente, causando amarelecimento das folhas e murcha (EMBRAPA, 2021).

Figura 6 – Contaminação *F. oxysporum* f. sp. batatas em tecidos vegetais. A figura superior apresenta amarelecimento das folhas seguido de murcha e na figura inferior o caule arroxeadado com tecido afetado marrom a preto.



Fonte: Sperimentazione, (2021).

- **SARNA DA BATATA-DOCE** (*Monilochaetes infuscans*):

Suas principais causas são as manchas escuras roxas ou marrom-acinzentadas a pretas restritas à epiderme (casca) das raízes. As raízes afetadas também podem desenvolver pequenas rachaduras e encolher no armazenamento (Figura 7). Em Geral, apenas algumas lesões dispersas são vistas na raiz. A doença é favorecida pela alta umidade do solo, principalmente na estação chuvosa (EMBRAPA, 2021).

Figura 7– Infecção por *Monilochaetes infuscans*. Uma colina de batata-doce mostrando lesões de escamas que estão espalhadas pelo caule da planta.



Fonte: Sperimentazione, (2021).

- MOFO CINZENTO (*Sclerotium rolfsii*:

Como principais consequência, apresenta lesões necróticas na base das brotações e nas raízes-sementes, formando um micélio branco e pequenos escleródios esféricos que podem ser vistos da base dos brotos infectados em desenvolvimentos (Figura 8). O desenvolvimento da doença geralmente é em reboleiras e pode se disseminar para todo o canteiro (EMBRAPA, 2021). A doença se desenvolve em períodos de alta umidade, com condições de alta temperatura.

Figura 8– Manchas causadas por *Sclerotium rolfsii*. Do lado esquerdo há Hifas e escleródios de de *Sclerotium rolfsii* em brotos infectados e decomposição parcial da raiz. Do lado direito apresenta manchas circulares em uma raiz.



Fonte: Sperimentazione, (2021).

3.2 O GÊNERO *Fusarium spp.*

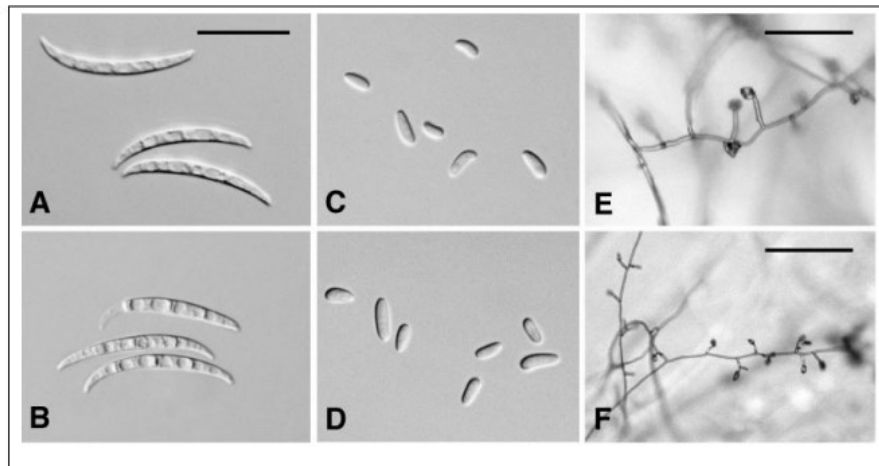
O *Fusarium* é um fungo imperfeito, que teve sua primeira descrição em 1809. O gênero, segundo Index Fungorum (2012), é pertencente ao Reino Fungi, divisão Ascomycota, Subdivisão Pezizomycotina, Classe Sordariomycetes, Sub-classe Hypocreomycetidae, Ordem Hypocreales e Família Nectriaceae.

No presente gênero, há um alto grau de diversidade em relação aos atributos morfológicos, fisiológicos e ecológicos, e não é surpreendente que representantes desse gênero ocorram, na maioria dos nichos ecológicos, em diversas regiões geográficas do planeta (BURGESS *et al.*, 1997; LAZAROTTO, 2013). É o terceiro gênero de fungos com maior número de espécies que causam doenças em plantas, além de produzirem uma ampla gama de toxinas e metabólitos secundários que causam doenças em plantas como também danos à saúde humana e animal (LESLIE, 2006).

Sua ocorrência, em especial, é em locais de climas tropicais e subtropicais, sendo capaz de sobreviver por longos períodos no solo pela formação das estruturas chamadas clamidósporos (MILANESI, 2009). Considerado um fungo pode colonizar ramos, folhas, inflorescências e frutos através de seus conídios. Ressalta-se que a variabilidade genética dentro do gênero *Fusarium* é amplamente alta.

A classificação do gênero é baseada nas suas características morfológicas, como pigmentação, a morfologia da colônia, taxa de crescimento, especificidade do hospedeiro, e dentre outras. As espécies desse gênero apresentam fíalides perpendiculares aos filamentos fúngicos, isoladas ou ramificadas, evidenciando-se ou não sobre estas, macrofialoconídios ou microfialoconídios. A características das suas colônias são de textura algodonosa e tom branco que podem adquirir diferentes tonalidades com o decorrer do tempo (LESLEI, 2006). Na Figura 9 pode-se observar a micromorfologia do fungo.

Figura 9– Micromorfologia a do *Fusarium oxysporum* por microscopia óptica. Nas figuras A,B,C,D E, e F são macroconidia. A escala são de: A – D= 25 µm; E – F = 50 µm.



Fonte: Leslei (2006).

Devido sua adaptabilidade, algumas espécies de *Fusarium* foram encontradas em praticamente todos os solos examinados em áreas da América Central, classificando-os como habitantes do solo. Entretanto, outras foram verificadas apenas em locais específicos, classificadas como invasoras do solo, dentre as quais, está o *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, conhecido como o agente causal do mal-do-panamá (LAZAROTTO, 2013). Ainda, alguns autores literários como o Lazarotto (2013), relata que espécies do gênero têm a tendência de atacar sementes em tempos úmidos durante a maturação dos grãos, colheita e/ou armazenamento, que resulta em sementes podres ou aumento da podridão após o plantio.

Associadas a doenças de grande importância, as espécies de *Fusarium* apresentam os agentes: *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, como causador do mal-do-panamá em bananeira; *Fusarium solani* causador da podridão do caule em café, da podridão de fusário em *Citrus* sp. e da podridão-radicular-vermelha em soja; *Fusarium oxysporum* f.sp. *glycines* infectante da murcha-do-fusário em soja; *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* - murcha-do-fusário em feijão, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* causador da murcha-do-fusário em tomateiro (MICHEREFF *et al.*, 2005). Ademais, a espécie *F. oxysporum* apresenta inúmeras *formae specialis*, que tem funções especializadas em atacar diversos hospedeiros.

Além de serem bastante associados as doenças de raízes e colo, o gênero também pode causar sintomas na parte aérea. Conforme Bastos e Santos (2001) observaram sintomas de desenvolvimento anormal de superbrotamento das inflorescências a partir do eixo floral, com algumas partes de inchamento dos talos florais, queda prematura de flores e frutos jovens, com a seca dos talos em plantas de limão-de-caieira (*Averrhoa bilimbi*), acometida por *Fusarium decemcellulare*. Com a planta Nogueira-pecan, Alvidrez-Villareal *et al.*, (2012), isolaram fungos de uma praga (*Euplatypus segnis*) da espécie e fizeram a testagem de sua patogenicidade, sendo que encontraram dentro dos organismos testados o *Fusarium solani* e *F. oxysporum* como patógenos para a doença que causa murcha de ramos.

Assim, o *Fusarium* tem sua classificação como um patógeno necrotrófico, ou seja, destroem os tecidos vegetais por meio da ação de toxinas ou enzimas que promovem a lise e morte da célula hospedeira, permitindo o acesso a nutrientes e o crescimento do patógeno (AGRIOS, 2005).

Em seus estudos, O'Donnell *et al.* (2012) realizaram um estudo sobre diversidade filogenética utilizando espécies do gênero *Fusarium* e conseguiram distribuir as espécies em nove complexos distintos: *Gibberella fujikuroi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium concolor*, *Fusarium tricinctum*, *Fusarium incarnatum-equiseti*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium chlamydosporum*, *Fusarium lateritium*, *Fusarium solani* e *Fusarium coccophilum*, usando como referência as sequências do banco de dados FUSARIUM ID e Fusarium MLST

Ademais, com sua alta plasticidade e as variações de característica fenotípicas do gênero do fungo, os marcadores morfológicos são considerados insuficientes, o que tem levado a vários pesquisadores a muitas discordâncias na especiação desses fungos (OLIVEIRA; COSTA, 2002). Logo, a sistemática molecular, por base filogenética, é considerada uma ferramenta que oferece uma considerável segurança no estabelecimento de um sistema de classificação para diversos fungos, além de auxiliar na definição de alguns grupos taxonômicos

e na designação precisa das posições desses microrganismos (ONO *et al.*, 2010; LAZAROTTO, 2013).

3.3 *Fusarium oxysporum f.sp. rapae*

Fusarium oxysporum é um patógeno ubíquo que em geral causa a murcha vascular e outras doenças radiculares de maneira ampla nas culturas economicamente importantes, como banana, tomate, melão e a batata-doce. Suas cepas patogênicas individuais de *F. oxysporum* são restritas a uma ou algumas espécies hospedeiras e são divididas em mais de 90 formas, com referência a base em sua especificidade de hospedeiro (EDEL-HERMANN E LECOMTE, 2019).

Assim, *Fusarium oxysporum* apresenta várias f. spp que infectam muitos hospedeiros causando diversas doenças, sendo assim considerada uma espécie com variações morfológicas e fisiológicas, como é o caso do *F. oxysporum f. sp Rapae*. Logo, o interesse pelo estudo desse patógeno dar-se pela sua grande habilidade de causar doenças em plantas de grande importância econômica. Ainda mais, o fungo é um saprofítico ativo e abundante do solo e matéria orgânica, sendo algumas formas específicas para patogenicidades. Essa habilidade de ser saprofítica torna o agente infeccioso um sobrevivente em solos durante o ciclo da colheita (MONTEIRO, 2004).

Desta forma, o conhecimento sobre a infecção radicular por *F. oxysporum* foi revisado recentemente (GORDON 2017). As cepas identificadas até o momento de *F. oxysporum* são responsáveis por dois tipos de sintomas, onde geralmente é apresentado uma murcha vascular e, em alguns casos, apodrecimento.

A infecção dessa espécie acontece por meio do micélio ou esporos, em que o fungo infecta as raízes da planta hospedeira no ponto em que a raiz lateral emerge da raiz principal ou nos machucados (GORDON 2017). Seu crescimento é entre as células da raiz e sobe até o caule, e quando os vasos são alcançados, o fungo expande-se até as seivas devido à segregação de micélio, esporos e goma pela planta como uma reação imunológica (MONTEIRO,2004). A transmissão pode ocorrer via semente podendo ter sido pela infecção da semente, e também pelo uso de ferramentas e outros materiais infectados (SYNGENTA, 2022).

As identificações das espécies desse gênero são atualmente por meio das técnicas moleculares. Desta maneira, para que possa ocorrer uma comparação evolutiva das sequências parciais de DNA (ácido desoxirribonucleico) de um ou mais genes, as análises moleculares surgem de maneira a contribuir na identificação de novas espécies, como por exemplo no

complexo de espécies *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. tricinctum* e *F. decemcellulare*, que são identificadas pelo uso de estudos filogenéticos. ((BROWN; PROCTOR, 2013).

Assim, há genes que codificam as regiões específicas, como é o caso do gene TEF-1 α , conhecido como um dos marcadores mais usuais para diferenciação de espécies de *Fusarium*. Este fator possui alto valor filogenético e é responsável por codificar um fragmento essencial do mecanismo de tradução de proteínas (VARGAS, 2020). Há ainda outro gene com forte potencial em estudo para regiões específicas de patógenos fúngicos, que é o caso do gene LYS2 Aminoaciltransferase, uma vez que esse é específico em fungos e importante para a biossíntese da lisina, sendo bastante indicado como um possível marcador genético para identificação de isolados do gênero *Fusarium spp* (WATANABE *et al*, 2011).

3.4 KIT DIAGNOSTICO – qPCR E LAMP

Os diagnósticos de organismos responsáveis por doenças que atingem as mais diferentes culturas são de grande importância e a base da fitopatologia. Com essa habilidade é possível compreender e controlar as doenças. Estudos de propagação de uma doença com a estimativa de perda de rendimento da produção e implementação de procedimentos para doenças quarentenárias, são considerados alguns exemplos que requerem a identificação e o diagnóstico do agente etiológico (MCCARTNEY *et al.*, 2003; CARNIELLI, 2014).

Dentre os meios existentes de diagnósticos desses agentes infecciosos de plantações estão as técnicas moleculares. As técnicas de base molecular vêm ganhando espaço nos diagnósticos de fitopatógenos. Além de terem contribuído com a detecção e identificação dos fitopatógenos, as análises moleculares também ampliaram nossos conhecimentos sobre a epidemiologia e ecologia destes organismos. Segundo Carnielli (2014), o meio mais comum para identificação de patógenos. Entretanto, os diagnósticos moleculares vêm revolucionando e têm sido bastante utilizadas, uma vez que são métodos que trazem resultados seguros e específicos, além de garantir vantagens em relação ao método convencional por serem mais precisas, rápidas, confiáveis e não necessitarem de uma interpretação subjetiva, como a PCR e suas derivações (Multiplex, BIO, Quantitativa em tempo real (q-RT), LAMP e outras) (CARNIELLI, 2014).

A reação em cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica molecular que obtém resultados muito específicos, pois utiliza-se iniciadores exclusivos a cada patógeno, com resultados gerados em um a dois dias e não necessita de confirmação pela microbiologia convencional (PLETTIG *et al.*, 2015). Atualmente, apesar de não ter muitos estudos

moleculares envolvendo espécies do gênero *Fusarium* relacionados às análises filogenéticas e diagnósticos moleculares, é notável que há uma necessidade de enfatizar estudos nessas áreas com espécies de desse gênero, especialmente o *Fusarium Oxysporum* e seus complexos, pois são de grande incidência em plantações de bata-doce. E para isso existem as diversidades de teste moleculares baseados na PCR.

A qPCR ou PCR quantitativa em tempo real consiste em uma multiplicação enzimática de sequências de DNA e detecção do produto amplificado por meio da fluorescência. A qPCR utiliza os princípios básicos da PCR tradicional em conjunto com sondas fluorescentes e detecção dos produtos (GONÇALVES, 2009). Essa técnica molecular tem sido o foco principal no mercado na área de diagnósticos e dentre suas vantagens, incluem: reação executada de maneira rápida, detecção imediata do produto dentro de placas fechadas, a opção de detecção de mais de um patógeno ao mesmo tempo e a não necessidade de eletroforese em gel após a PCR, evitando a contaminação do ambiente com produtos tóxicos e teratogênicos, como o brometo de etídeo, ainda sendo possível quantificar o patógeno atuante em determinada amostra (LEE *et al.*, 2014; RUBIO, 2017).

A tecnologia TaqMan desse método é mais específico na medida que aumenta diretamente ao DNA amplificado, por meio de uma sonda fluorescente específica para a sequência alvo ladeada por um par de primers. Na medida que a sonda se encontra intacta, a molécula *quencher* absorve toda a fluorescência produzida pela molécula *reporter*, entretanto, no segundo em que esta hibrida com a região alvo e se dá a inicialização à polimerização pela DNA Polimerase a sua atividade exonucleotídica, sentido 5' – 3', leva à hidrólise da sonda, libertará a molécula *reporter* da ação da molécula *quencher* com subsequente soltura de fluorescência que será lida pelo equipamento. Logo, com o acumular do material amplificado é possível visualizar um aumento da fluorescência emitida (Mortarino *et al.*, 2004). Com o decorrer da amplificação é possível observar em gráficos (fluorescência versus números de ciclos), onde será permitindo a monitorizar, em tempo real, a cinética da reação de amplificação (RIBEIRO, 2014).

Já com SYBR Green, detecta a presença do DNA amplificado por meio da ligação do corante com moléculas dupla fita de DNA, emitindo fluorescência, que é detectada pelo equipamento. É considerada uma técnica muito sensível, visto que várias moléculas de corante se ligam a cada molécula de DNA alvo, amplificando-o. Entretanto, as moléculas do corante se ligam a qualquer DNA dupla-fita, tanto os dímeros de iniciadores e produtos de amplificação inespecífica (ESPY *et al.*, 2006). Para corrigir esse problema, é feita a análise de uma curva de

dissociação (*melting curve*), na qual a temperatura é aumentada até que todo o DNA se desnature e o corante pare de emitir fluorescência (NUNES, 2015).

Em resumo, a classificação da PCR em tempo real é dividida em dois grupos principais, que se baseiam em reações que utilizam sondas como fluoróforo e reações que utilizam intercalantes de DNA, como o fluoróforo SYBr Green I. Em geral, as sondas de hidrólise (TaqMan) são produtos caros e exigem mais tempo e conhecimento para serem sintetizadas, enquanto as reações que utilizam a SYBr Green I como intercalante de DNA, que é um fluoróforo universalmente aplicável a qualquer sequência alvo representam uma opção mais barata para o desenvolvimento de protocolos de qPCR. Além disso, é atraente para aqueles que possuem metodologias padronizadas para a PCR tradicional e desejam converter para o formato em tempo real (RUBIO, 2017).

Assim, a qPCR é considerada uma técnica adequada e melhorada em comparação a PCR convencional em diagnósticos laboratoriais moleculares, visto que possui caráter quantitativo, tem-se maior sensibilidade e realiza em ensaios com menores riscos de contaminação cruzada (sem a etapa de pós-PCR) (CANKAR *et al.*, 2006). Além disso, possibilita o aumento do grau de automação e reduziu o tempo de análise.

Outra técnica que vem ganhando força em diagnósticos de fitopatógenos é a LAMP. O desenvolvimento da LAMP foi feito por Notomi *et al.*, (2000) onde era possível fazer uma combinação de sensibilidade, especificidade e eficiência no tempo de execução com baixo custo e facilidade no diagnóstico molecular, disponibilizando tecnologia de ponta para laboratórios com recursos limitados. Essa técnica, também conhecida como Loop mediated isothermal amplification (LAMP), é caracterizada por amplificar rapidamente o DNA alvo sob temperaturas constantes, sendo necessário apenas um banho seco para que ocorra sua reprodutibilidade (NJIRU *et al.*, 2008; TEXEIRA, 2016). Suas vantagens sobre a PCR são resultados da redução de custos e etapas para obtenção dos produtos.

Isso só é possível devido capacidade de deslocamento de cadeia da enzima Bst DNA Polymerase Large Fragment, pois a metodologia dispensa as variações de temperaturas exigidas no processo de PCR para abertura das fitas, anelamento dos iniciadores e extensão da fita (TEXEIRA, 2016), possibilitando, assim a realizar e interpretar o diagnóstico molecular no local da infecção ou contaminação (*in situ*), neste caso em laboratórios de baixa condição tecnológica, ou mesmo condições primitivas, necessitando apenas de um “banho seco” para a amplificação.

Os componentes necessários para a utilização da LAMP são bem parecidos com a PCR, pois baseia-se no processo de replicação *in vivo*. É composta basicamente pelo conjunto

de iniciadores internos e externos F3/B3; FIP/BIP, pela *Bst* DNA Polymerase e o tampão (ThermoPol Reaction Buffer: 20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100, pH 8,8), MgSO₄ doador de íons que podem também interagirem no processo de detecção visual (GOTO *et al.*, 2009; DASA *et al.*, 2012) e dNTP (Adenina, Timina, Citosina, Guanina) em concentrações maiores em comparação a PCR convencional (LI *et al.*, 2011).

A amplificação desse método é composta pela etapa não cíclica, seguida da etapa cíclica a partir da estrutura formada na primeira etapa. A etapa não cíclica se inicia por meio do deslocamento da *Bst* DNA Polymerase sobre as fitas, durante o deslocamento a fita dupla se abre e ocorre o anelamento dos iniciadores começando pela extremidade 3', na qual o FIP (F1c - F2) se liga a região F2c, deixando livre a extremidade F1c, em seguida F3 se liga a região F3c iniciando uma nova síntese da fita formada anteriormente, liberando a fita com extremidade F1c que se unirá a região correspondente F1 formando uma das partes do loop. O mesmo ocorre na extremidade 5' em que BIP (B2 - B1c) se liga a B2c, seguida da inserção de B3 liberando a extremidade B1c que será hibridizada com B1 formando a estrutura com os dois loops assemelhando a um grampo (TEXEIRA, 2016).

A partir da estrutura formada da amplificação, é iniciada a fase cíclica na extremidade 3', a ligação se inicia com a adesão dos iniciadores internos FIP ou BIP, com o deslocamento da enzima *Bst* DNA Polymerase sobre os loops ocorre a hibridização das novas fitas. Essa etapa é conhecida como alongamento e reciclagem (*elongation and recycling step*), em que é amplificado somente a região alvo, e vários loops são formados em uma mesma fita (PARIDA *et al.*, 2008; NOTOMI *et al.*, 2000; USHIKUBO, 2004). Os produtos da LAMP podem ser observados por meio da eletroforese, ou mesmo por meio da observação direta em tubos transparentes em amostras com o DNA alvo com o uso de corantes não carcinogênicos (NOTOMI *et al.*, 2000). Os corantes mais usados que facilitam as visualizações dos resultados a olho nu são que necessitem de luz UV SYTO-82 (WATTS *et al.*, 2014), PicoGreen, Calceína (WASTLING *et al.*, 2010), Iodeto de Propídeo (HILL *et al.*, 2008), Brometo de Etídio, SYBR Green I (TEXEIRA, 2016); e os que não necessitam de iluminação UV - Phenol red, Cresol red, Neutral red, M-Cresol purple (TANNER *et al.*, 2015) e HYDROXYNAPHTHOL BLUE (GOTO *et al.*, 2009).

4 METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado inteiramente *in silico*, com uso de ferramentas de softwares e servidores para obter e manipular os dados referentes ao gene LYS2 (acesso GenBank - AB586946.1) relacionado ao patógeno fúngico *Fusarium oxysporum* em batata-doce (*Ipomoea batatas*).

4.1 TRIAGEM E OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

Foram feitas pesquisas na plataforma do NCBI com a ferramenta PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) com o intuito de encontrar o gene de conservação dentro do *Fusarium oxysporum*, e como resultado foi escolhido o gene da LYS2, visto que é o mais promissor relacionado com conservação dentro da espécie de estudo e demais espécies do gênero. A sequência do gene foi obtida com a mesma plataforma, mas com a ferramenta do GenkBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Para encontrar as sequências similares com o gene da LYS2, foi utilizado a ferramenta do mesmo servidor, o BlastG (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=gene>), sendo coletado 15 sequências juntamente com a pesquisa. Nas sequências da pesquisa, foram adicionadas na triagem tanto espécies do *Fusarium spp* quanto de outros microrganismos, levando em consideração o grau de similaridade entre o gene escolhido (SANTOS, 2021).

4.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA E AGRUPAMENTO DAS SEQUÊNCIAS

As sequências genicas obtidas, foram primeiramente alinhadas pelo algoritmo ClustalW do software MEGA XI para visualização dos dados e em seguida, usando o mesmo software, a produção da árvore filogenética (SANTOS, 2021). A construção da árvore filogenética deu-se pelo método de máxima parcimônia com bootstrap de mil réplicas, modelo de substituição padrão do programa, realizado um total de 15 sequências para análises.

4.3 PRODUÇÃO E VALIDAÇÃO DE PRIMERS

Com o uso do servidor NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>), foi coletado a sequência de DNA do gene da lisina (LYS2). Posterior, os primers foram desenhados nos servidores Primer-blast no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) e Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) (VILHENA, 2015). Para validação dos primers, foi usado o servidor Oligo Cal (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) (KIBBE, 2007; SANTOS, 2021). Enquanto para a técnica LAMP, foi usado a sequência do gene LYS2 (acesso AB586946.1) para desenhar os iniciadores no programa disponibilizado na página (<http://primerexplorer.jp/e/>), Primer Explorer (versão cinco), recomendado pelo Eiken GENOME SITE, que concebe iniciadores exclusivos do teste LAMP. (TEIXEIRAS, 2016).

4.4 PROCOTOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA E TÉCNICA RT-qPCR e LAMP

Foram feitas triagens na literatura de protocolos de extração de DNA de fitopatógenos fúngicos para a extração de DNA visando qual teria maior custo benefício e menor tempo de processo, e assim foi determinado que o kit de extração de DNA, DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Brasil) apresentava maior benefício de extração (VILAR, 2015).

Já para as técnicas moleculares, a metodologia qPCR descrita por Chai *et al.*, (2020) foi adaptada para o presente trabalho utilizando os primers desenhados com a sequência do gene da lisina. Para o protocolo do método LAMP, foi adaptada a metodologia descrita por Teixeira (2016), utilizando os iniciadores desenvolvidos pelo respectivo gene de interesse.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das buscas de dados feitas na plataforma no NCBI, foram coletadas sequências depositadas até o ano de 2022 que fosse similar com a sequência do gene de interesse, lisina – LYS2, usando a ferramenta Blast presente na plataforma. A Tabela 1 demonstra algumas propriedades que cada sequência tinha relacionada com a sequência do gene da lisina.

Tabela 1 – Informações relacionadas com as sequências do Gene LYS2. Dados coletadas com a ferramenta Blast da plataforma NCBI.

Espécie	Código de acesso	E-value	Per. Ident.(%)
<i>Fusarium oxysporum f. sp. rapae</i>	AB586946.1	0.0	100,00
<i>Fusarium subglutinans</i>	AB586959.1	0.0	93,71
<i>Fusarium proliferatum</i>	AB586957.1	0.0	93,53
<i>Fusarium fujikuroi</i>	AB725608.1	0.0	93,64
<i>Fusarium phyllophilum</i>	AB586956.1	0.0	94,70
<i>Fusarium verticillioides</i>	AB586960.1	0.0	93,67
<i>Fusarium musae putative</i>	XM_044820443.1	0.0	93,63
<i>Fusarium mangiferae putative</i>	XM_041828816.1	0.0	93,33
<i>Fusarium tjaetaba</i>	XM_037352590.1	0.0	93,33
<i>Fusarium redolens</i>	XM_046191600.1	0.0	93,18
<i>Fusarium odoratissimum</i>	XM_031212870.1	0.0	96,26
<i>Fusicolla violacea</i>	AB586949.1	0.0	83,28
<i>Ilyonectria robusta</i>	XM_046252900.1	0.0	87,92
<i>Cordyceps militaris</i>	XM_006668541.1	1 ⁻¹⁵⁰	82,53
<i>Metarhizium brunneum</i>	XM_014686153.1	2 ⁻¹⁰⁷	92,58

Fonte: Próprio autor.

Assim, na Tabela 1 é observado que todos os valores referentes ao E-value estão com um resultado plausível com a sequência do gene de interesse, visto que esse parâmetro reflete

à probabilidade de se obter com outra sequência aleatória de mesmo tamanho e composição de letras, outro alinhamento com score igual ou superior, sendo que quanto mais próximo de zero, mais confiável é a consulta da sequência (VICENTE, 2020; OSC, 2005). Ainda é notado que as espécies XM_006668541.1 e XM_014686153.1 apresentam um valor diferente de zero (0), mas, visto que o número é bem próximo de zero é considerado válido como valor de E-valor. Já o Per. Ident (Percentual de identidade) é de referência aos números de resíduos (aminoácidos e nucleotídeos) que são igualmente em posição entre a consulta e o banco de dados (query e subject) (VICENTE, 2020). Nesse parâmetro de interesse é observado que todas as espécies de *Fusarium* apresentam um percentual acima de 90%. Entretanto, as espécies que não pertencem ao gênero de interesse representam valores abaixo de 90%, mas com uma variação de percentualidade boa, acima de 80%, com exceção da espécie XM_014686153.1, que tem um percentual de identidade acima de 90% como nas espécies de *Fusarium*.

Posterior a coleta de dados na ferramenta Blast, fez-se o alinhamento das sequências com a ferramenta de algoritmo ClustalW do software MEGA XI. Logo após ao alinhamento, com o mesmo software, mas com a ferramenta de construção de árvores filogenéticas e com o método de máxima parcimônia e de inferência o bootstrap de mil réplicas, foi construída a árvore filogenética (Figura 10), para entender o grau de similaridade entre as espécies do gênero *Fusarium spp*, uma vez que há sequências similares dentro e entre espécies.

Em uma árvore filogenética pode-se observar as relações evolutivas entre várias espécies de acordo com as sequências de genes, proteínas, DNA, RNA, e até características fenotípicas. Desta forma, em uma árvore, quanto mais próximo um nó do outro (chamado de intersecções), mais recente é o antepassado. Já os ramos indicam que menor é a mudança e tempo evolutivo. A partir da estrutura da árvore, pode-se inferir a possibilidade de saber se há um ancestral comum a todos, e caso tenha, esta é enraizada e caso contrário ela não é enraizada (SANTOS, 2021; SAKAMOTO, 2016).

A determinação de enraizamento tem grande influência nas sequências escolhidas da árvore. Assim, para saber a raiz de uma árvore não-enraizada basta adicionar ao alinhamento um outro grupo de táxon, resultando em uma maior consistência da análise, como foi realizado ao incluir sequências com baixa similaridade junto com as de alto grau e ainda incluir organismos diferentes (PEREIRA, 2010; SAKAMOTO, 2016). Portanto, este método é validado quando existe um ganho separado desde o início do ramo principal, o que pode ser observado na estrutura da árvore filogenética da Figura 10, inferindo-se que esta não está enraizada.

O método de inferência, o de máxima parcimônia, é baseado em uma matriz com caracteres de interesse táxons e linhas nas colunas, que o programa escolhido irá percorrer os locais da árvore, pesquisando critérios que atingem resultados plausíveis, considerando cada aminoácido como um caráter particular no cálculo. Apesar de ser um método coerente, é passível de artefactos, justificados pelo fato da evolução lateral, seleção convergente e muitos outros. Apesar dessa desvantagem, foi acrescentado o método bootstrap para medir a confiabilidade de uma árvore.

O teste bootstrap reconstrói a árvore com base na matriz $n \times m$ (n aminoácidos com m sequências), sendo as colunas da matriz escolhidas aleatoriamente e duplicadas em uma segunda matriz, gerando um novo alinhamento com mesmo tamanho, inferindo-se novas sequências com os mesmos métodos e parâmetros (PEREIRA, 2010; SAKAMOTO, 2016; SANTOS, 2021). O teste irá apresentar um resultado que será comparado com a árvore original, gerando para cada ramo interior um valor percentual em relação a sua qualidade, uma vez que este método verifica a distribuição obtida em uma amostra para inferir a distribuição (SANTOS; 2021). Dessa maneira, para que seja confiável, biologicamente, o resultado deve ser igual ou superior a 95% (SANDERSON, 1995), mas, segundo Pereira (2010), é correto dizer que este método infere os próprios dados, não podendo ser comparáveis entre filogenias distintas.

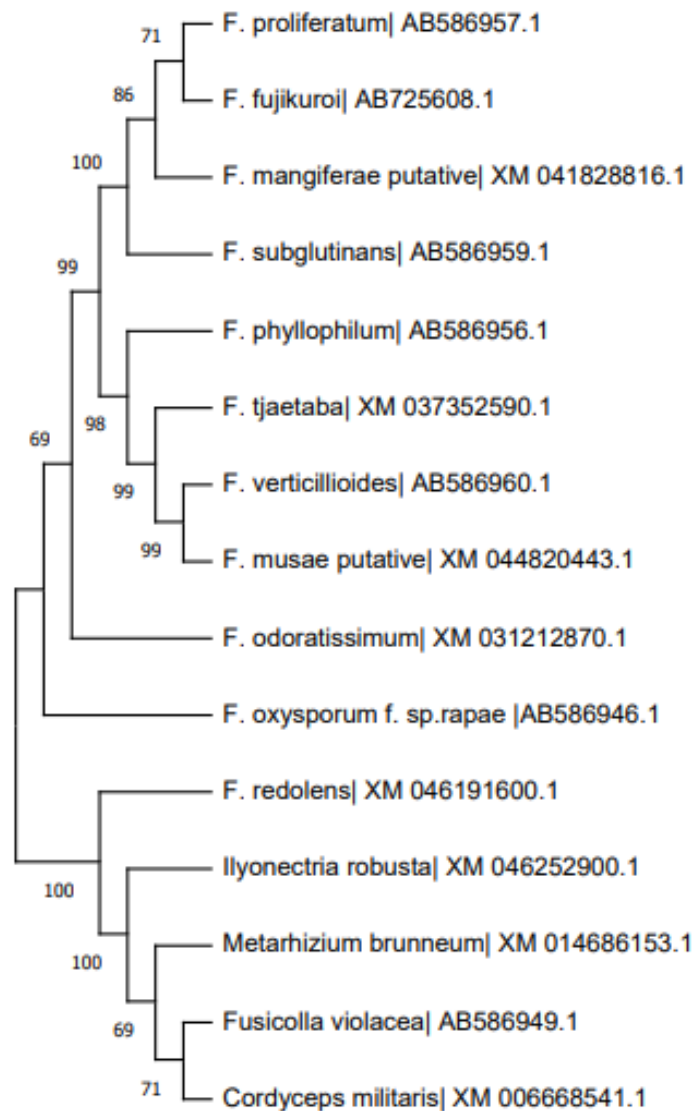
A história evolutiva foi inferida com o método de Máxima parcimônia, de consenso bootstrap inferida a partir de 1000 réplicas para analisar a evolução dos táxons. Os ramos das árvores do método são correspondentes ao menos de 50 % de réplicas de bootstrap. O algoritmo que é usado para construção da filogenia é o Subtree-Pruning- Regrafting (SPR), com adição aleatória das sequências (NEI & KUMAR (2000); TAMURA (2021); FELSENSTEIN (1985)). Na análise do estudo, envolveu 15 sequências de nucleotídeos, com um total de 4030 posições no conjunto final de dados.

Ainda mais, o índice de consistência (CI) apresentado pelo método da máxima parcimônia apresentou um valor de 0,85. Essa atribuição do índice de consistência revela que a árvore possui um alto grau de ancestralidade comum, visto que quanto maior seu valor menor será o número de homoplasias presentes nos cladogramas, e um valor baixo pode indicar um erro de interpretação dos caracteres. Outro índice bastante relevante é o de retenção (RI), que mede quantas das sinapomorfias (características evolutivas de uma origem.) aparentes são reais, e assim, quando o RI for um (1) significa que os caracteres não é autapomórfico e não sofre nenhuma homoplasia. O RI apresentou um valor de 0,73, representando um índice considerável para presente árvore (SOARES, 2001).

Analisando a árvore filogenética, Figura 10, pode-se observar uma homogeneidade grande, já que, dentre as 15 sequências, 11 são do gênero *Fusarium spp.* É possível notar que o outgroup existente é muito espesso, possuindo 6 espécies: *F. odoratissimum* (99), *F. oxysporum f.sp rapae* (69), *F. redolens* (100), *Ilynoctria robusta* (100), *F. phyllophilum*,(98) e *F. subglutinans* (100). Ademais, os ingroup estão presentes também, formando grupos (clusters): *F. proliferatum* e *F. fujikuroi* (71), *F. verticillioides* e *F. musae putative* (99), e *Fusicolla violácea* e *Cordyceps militaris* (71). Desta forma, a similaridade entre espécies é de possível associação dessas espécies serem classificadas como teleomorfos pertencente ao gênero *Gibberella* (O'DONNELL *et al.*, 2012; WATANABE *et al.*, 2011).

A análise filogenética demonstra que o outgroup da espécie *Fusarium oxysporum f. sp. rapae* (69) pode ser justificado visto que o complexo dessa espécie tende a se agrupar com sequências de mesmas espécies, formando um clado distinto das demais espécies, como ocorreu na árvore filogenética da Figura 10 e nos trabalhos realizados por Watanabe *et al.*, (2011) (ARAUJO, 2015).

Figura 10– Árvore filogenética bootstrap consensus do gene LYS2 do microrganismo *Fusarium oxysporum* f. *sp. rapae* obtida no MEGA-XI.



Fonte: Próprio autor.

Ocasionalmente, a filogenia molecular e a inferência da classificação taxonômicas das espécies é uma concepção plausível, visto que a árvore filogenética de gene atribui sua construção em um conjunto de homólogos, isso a partir de dados moleculares que podem ter representação de uma espécie várias vezes dentro da árvore ou a exclusão. Em uma árvore de espécie que é inferida por sequência de genes em DNA, RNA, detém de uma topologia da real história evolutiva das espécies estudadas e só pode aparecer cada espécie uma vez, ao contrário da árvore de gene, que não pode representar a de espécie, visto que é rasteiro considera o estudo de genes em espécies como suficiente para estudo de evolução, pois cada gene,

consequentemente, retrata passos evolutivos diferentes, como fluxos gênicos e mutações (SAKAMOTO, 2016; SANTOS 2021).

Desta maneira, de acordo com a árvore filogenética e o teste bootstrap, pode-se ver que nos galhos internos alguns com altas porcentagens acima de 95%, valor de referência, onde estão no valor de 69%, dentro deles, nos galhos mais internos, unidades taxonômicas, e a medida vai aumentando, chegando aos galhos terminais com 99% (*F. odoratissimum*), 98 % (*F. phyllophilum*), 99% (*F. tjaetaba*), 99% (*F. verticillioides* e *F. musae putative*), 96% (*F. subglutinans*) e 100% (*F. subglutinans*). Ainda há dois outgroup com altas porcentagens acima do valor de referência, que estão no valor de 100% (*F. redolens*) e 100% (*Ilyonectria robusta*) sem apresentar galhos internos. Portanto, é possível inferir que tais espécies de *Fusarium spp* estão evolutivamente mais próximas biologicamente, além de inferir que pode existir outras espécies de outros Gênero que pode estar envolvida na evolução biológica das espécies do fungo em estudo, como é o caso do *Ilyonectria robusta*, visto que uma espécie de *Fusarium* estar relacionado com a evolução de espécies de outros gêneros. Aos demais ramos e nós terminais, os valores de porcentagem de bootstrap estão abaixo do valor de referência, ocasionando não validação para inferir relação taxonômica evolutiva com base no critério estabelecido, mas apresentando boa variação acima de 69% de bootstrap.

Os valores abaixo do valor de referência de bootstrap podem ser atribuídos ao baixo grupo de táxons com baixa similaridade da sequência alvo do *Fusarium oxysporum F. sp. rapae*. Outro fator considerado que segundo Pereira (2010) relata, são as possibilidades de inferências incorretas em valores altos de bootstrap, ocorrendo taxas de mudanças muito variável.

Ainda, Watanabe *et al.*, (2011) apresentam resultados de filogenia com as espécies do *Fusarium* com bastante similaridade usando o método da máxima verossimilhança envolvendo mais um gene, incluindo o gene da LYS2. Diante dos resultados obtidos destes autores, um clado na árvore filogenética apresentou uma relação de espécies que estão presente neste trabalho, com o teste de confiabilidade de mais de 90% em relação ao método utilizado pelos autores. Além disso, os autores enfatizam a importância do estudo filogenético com o *Fusarium*, visto que os conhecimentos taxonômicos possibilitam conhecer a evolução de um organismo de importância socioeconômica.

Após a análise da árvore filogenética, foi desenhado os primers específicos das sequências estudadas para a viabilização de possível estudo experimental relacionado ao

diagnóstico de *Fusarium Oxusporum* na espécie de bata-doce (Tabela 2). Na presente tabela é possível observar a sua sequência, sentido, tamanho e outras informações de relevância para realização do trabalho em bancada (*in situ*) na parte de execução da qPCR, para que encontre a região de interesse do gene na sequência do *Fusarium* que irá diagnosticar a *Ipomoea batatas* como infetada ou não. Além disso, é necessário à validação dos primers, apresentados por fatores físicos, como o RInK, deltaS, deltaG e detalH, interligados com as propriedades termodinâmicas de entropia e energia de cada primer.

Desta forma, a sequência do gene foi usada na construção dos primers, uma vez que o gene LYS2 está relacionado com a síntese de lisina e é altamente específico em fungos, e tem uma relação positiva dentro do gênero *Fusarium* (WATANABE *et al.*, 2011), razão pela qual foi escolhido o referido gene. Com a sequência do DNA do gene, foi possível determinar os primers e quais deles se estabelecem dentro dos parâmetros estimados. Assim, após a construção dos devidos primers, pode-se analisar os três parâmetros relacionados a sua qualidade: parâmetro 1 - tamanho (desejável de 18 a 28 bases – específicos e estáveis); parâmetro 2 - temperatura de anelamento (dentro 50 a 60 °C); e parâmetro 3 – porcentagem de guaninas e citosinas (preferível entre 45 a 55%). Diante de todos esses parâmetros quanto mais próximo dos resultados desejáveis, mais específico, eficiente e seguro será o primer (MENDOÇA, 2016; QUEIROZ *et al.*, 2017).

Portanto, analisando a Tabela 2 é possível observar que há primers de dois servidores mais usados para construção dos mesmos. Assim, os parâmetros específicos de tamanho, temperatura de anelamento e porcentagem de guanina, de todos os marcadores do servidor Primer3Plus apresentaram resultados plausíveis, mas com o servidor Primer-Blat-NCBI o parâmetro de temperatura se apresentava fora dos critérios estabelecidos e assim nenhum primer foi considerado. Já no servidor Primer3Plus, observa-se que todos os fatores impostos para os marcadores estão dentro do esperado, sendo o 3 e 4 os mais promissores diante dos parâmetros determinados.

Tabela 2 – Primers do gene LYS2.

Primers	Tamanho	Sequência 5'→3'	Sentido	Temperatura de anelamento (°C)	%CG (Citosina e Guanina)	RInK Cal/(°K *mol)	DeltaS Kcal. Mol	Delta Kcal.Mol	DeltaH Kcal.Mol	Plataforma																																																																																																																																					
Primer 1	20	ATATCCAGCACGTAAGGTTG	Positivo	55,3	45	33,404	419	24,4	159,3	Primer3Plus																																																																																																																																					
	23	GGACTTAGCTGACTAAGACTCCT	Negativo	55,3	47,8						Primer 2	20	GCACGTAAGGTTGAGTGAAT	Positivo	55,3	45	33,404	427,9	24,7	162,9	Primer3Plus	23	GGACTTAGCTGACTAAGACTCCT	Negativo	55,3	47,8	Primer 3	23	GCTGTATCCTACTTTGAGGTCAC	Positivo	57,1	47,8	33,404	480,1	28,2	182,1	Primer3Plus	22	GGATATAGATCTCTCCAACCAC	Negativo	54,4	45,5	Primer 4	22	GAAGATCACACCAAGATCTGTC	Positivo	56,2	45,5	33,404	453,3	26,1	171,7	Primer3Plus	22	ACCTGTGACGTAAAGTCTGTCT	Negativo	55,6	47,8	Primer 5	20	GATATCCAGCACGTAAGGTT	Positivo	54,3	45	33,404	421,5	24,2	159,9	Primer3Plus	23	GGACTTAGCTGACTAAGACTCCT	Negativo	55,3	47,8	Primer A	20	TAGTCAGCTAAGTCCCGCCT	Positivo	60,03	55,00	33,404	426,7	26,9	164,3	Primer-Blast-NCBI	20	GGGAATAGAGTCGCCGAGTG	Negativo	59,97	60,00	Primer B	20	GCAAGCCCTGGTTCGAAGA	Positivo	59,97	55	33,404	419,9	26,2	161,5	Primer-Blast-NCBI	20	GAGACTTGAGGGTGGTCTCGC	Negativo	60,11	60,00	Primer C	20	TGCTGGTCTTGCCAAACTGA	Positivo	60,11	50,00	33,404	427,5	26,4	164	Primer-Blast-NCBI	20	AGTACTCACGCCAAGGTTTCG	Negativo	60,04	55,00	Primer D	20	CCAACGATAAGGGCGAACCT	Positivo	60,11	55,00	33,404	449,1	27,4	171,7	Primer-Blast-NCBI	20	GTTCAATGCGGAATCCACGG	Negativo	59,90	55,00		20	GCCTGCCATGGGACAAATTC	Positivo	59,82
Primer 2	20	GCACGTAAGGTTGAGTGAAT	Positivo	55,3	45	33,404	427,9	24,7	162,9	Primer3Plus																																																																																																																																					
	23	GGACTTAGCTGACTAAGACTCCT	Negativo	55,3	47,8						Primer 3	23	GCTGTATCCTACTTTGAGGTCAC	Positivo	57,1	47,8	33,404	480,1	28,2	182,1	Primer3Plus	22	GGATATAGATCTCTCCAACCAC	Negativo	54,4	45,5	Primer 4	22	GAAGATCACACCAAGATCTGTC	Positivo	56,2	45,5	33,404	453,3	26,1	171,7	Primer3Plus	22	ACCTGTGACGTAAAGTCTGTCT	Negativo	55,6	47,8	Primer 5	20	GATATCCAGCACGTAAGGTT	Positivo	54,3	45	33,404	421,5	24,2	159,9	Primer3Plus	23	GGACTTAGCTGACTAAGACTCCT	Negativo	55,3	47,8	Primer A	20	TAGTCAGCTAAGTCCCGCCT	Positivo	60,03	55,00	33,404	426,7	26,9	164,3	Primer-Blast-NCBI	20	GGGAATAGAGTCGCCGAGTG	Negativo	59,97	60,00	Primer B	20	GCAAGCCCTGGTTCGAAGA	Positivo	59,97	55	33,404	419,9	26,2	161,5	Primer-Blast-NCBI	20	GAGACTTGAGGGTGGTCTCGC	Negativo	60,11	60,00	Primer C	20	TGCTGGTCTTGCCAAACTGA	Positivo	60,11	50,00	33,404	427,5	26,4	164	Primer-Blast-NCBI	20	AGTACTCACGCCAAGGTTTCG	Negativo	60,04	55,00	Primer D	20	CCAACGATAAGGGCGAACCT	Positivo	60,11	55,00	33,404	449,1	27,4	171,7	Primer-Blast-NCBI	20	GTTCAATGCGGAATCCACGG	Negativo	59,90	55,00		20	GCCTGCCATGGGACAAATTC	Positivo	59,82	55,00															
Primer 3	23	GCTGTATCCTACTTTGAGGTCAC	Positivo	57,1	47,8	33,404	480,1	28,2	182,1	Primer3Plus																																																																																																																																					
	22	GGATATAGATCTCTCCAACCAC	Negativo	54,4	45,5						Primer 4	22	GAAGATCACACCAAGATCTGTC	Positivo	56,2	45,5	33,404	453,3	26,1	171,7	Primer3Plus	22	ACCTGTGACGTAAAGTCTGTCT	Negativo	55,6	47,8	Primer 5	20	GATATCCAGCACGTAAGGTT	Positivo	54,3	45	33,404	421,5	24,2	159,9	Primer3Plus	23	GGACTTAGCTGACTAAGACTCCT	Negativo	55,3	47,8	Primer A	20	TAGTCAGCTAAGTCCCGCCT	Positivo	60,03	55,00	33,404	426,7	26,9	164,3	Primer-Blast-NCBI	20	GGGAATAGAGTCGCCGAGTG	Negativo	59,97	60,00	Primer B	20	GCAAGCCCTGGTTCGAAGA	Positivo	59,97	55	33,404	419,9	26,2	161,5	Primer-Blast-NCBI	20	GAGACTTGAGGGTGGTCTCGC	Negativo	60,11	60,00	Primer C	20	TGCTGGTCTTGCCAAACTGA	Positivo	60,11	50,00	33,404	427,5	26,4	164	Primer-Blast-NCBI	20	AGTACTCACGCCAAGGTTTCG	Negativo	60,04	55,00	Primer D	20	CCAACGATAAGGGCGAACCT	Positivo	60,11	55,00	33,404	449,1	27,4	171,7	Primer-Blast-NCBI	20	GTTCAATGCGGAATCCACGG	Negativo	59,90	55,00		20	GCCTGCCATGGGACAAATTC	Positivo	59,82	55,00																															
Primer 4	22	GAAGATCACACCAAGATCTGTC	Positivo	56,2	45,5	33,404	453,3	26,1	171,7	Primer3Plus																																																																																																																																					
	22	ACCTGTGACGTAAAGTCTGTCT	Negativo	55,6	47,8						Primer 5	20	GATATCCAGCACGTAAGGTT	Positivo	54,3	45	33,404	421,5	24,2	159,9	Primer3Plus	23	GGACTTAGCTGACTAAGACTCCT	Negativo	55,3	47,8	Primer A	20	TAGTCAGCTAAGTCCCGCCT	Positivo	60,03	55,00	33,404	426,7	26,9	164,3	Primer-Blast-NCBI	20	GGGAATAGAGTCGCCGAGTG	Negativo	59,97	60,00	Primer B	20	GCAAGCCCTGGTTCGAAGA	Positivo	59,97	55	33,404	419,9	26,2	161,5	Primer-Blast-NCBI	20	GAGACTTGAGGGTGGTCTCGC	Negativo	60,11	60,00	Primer C	20	TGCTGGTCTTGCCAAACTGA	Positivo	60,11	50,00	33,404	427,5	26,4	164	Primer-Blast-NCBI	20	AGTACTCACGCCAAGGTTTCG	Negativo	60,04	55,00	Primer D	20	CCAACGATAAGGGCGAACCT	Positivo	60,11	55,00	33,404	449,1	27,4	171,7	Primer-Blast-NCBI	20	GTTCAATGCGGAATCCACGG	Negativo	59,90	55,00		20	GCCTGCCATGGGACAAATTC	Positivo	59,82	55,00																																															
Primer 5	20	GATATCCAGCACGTAAGGTT	Positivo	54,3	45	33,404	421,5	24,2	159,9	Primer3Plus																																																																																																																																					
	23	GGACTTAGCTGACTAAGACTCCT	Negativo	55,3	47,8						Primer A	20	TAGTCAGCTAAGTCCCGCCT	Positivo	60,03	55,00	33,404	426,7	26,9	164,3	Primer-Blast-NCBI	20	GGGAATAGAGTCGCCGAGTG	Negativo	59,97	60,00	Primer B	20	GCAAGCCCTGGTTCGAAGA	Positivo	59,97	55	33,404	419,9	26,2	161,5	Primer-Blast-NCBI	20	GAGACTTGAGGGTGGTCTCGC	Negativo	60,11	60,00	Primer C	20	TGCTGGTCTTGCCAAACTGA	Positivo	60,11	50,00	33,404	427,5	26,4	164	Primer-Blast-NCBI	20	AGTACTCACGCCAAGGTTTCG	Negativo	60,04	55,00	Primer D	20	CCAACGATAAGGGCGAACCT	Positivo	60,11	55,00	33,404	449,1	27,4	171,7	Primer-Blast-NCBI	20	GTTCAATGCGGAATCCACGG	Negativo	59,90	55,00		20	GCCTGCCATGGGACAAATTC	Positivo	59,82	55,00																																																															
Primer A	20	TAGTCAGCTAAGTCCCGCCT	Positivo	60,03	55,00	33,404	426,7	26,9	164,3	Primer-Blast-NCBI																																																																																																																																					
	20	GGGAATAGAGTCGCCGAGTG	Negativo	59,97	60,00						Primer B	20	GCAAGCCCTGGTTCGAAGA	Positivo	59,97	55	33,404	419,9	26,2	161,5	Primer-Blast-NCBI	20	GAGACTTGAGGGTGGTCTCGC	Negativo	60,11	60,00	Primer C	20	TGCTGGTCTTGCCAAACTGA	Positivo	60,11	50,00	33,404	427,5	26,4	164	Primer-Blast-NCBI	20	AGTACTCACGCCAAGGTTTCG	Negativo	60,04	55,00	Primer D	20	CCAACGATAAGGGCGAACCT	Positivo	60,11	55,00	33,404	449,1	27,4	171,7	Primer-Blast-NCBI	20	GTTCAATGCGGAATCCACGG	Negativo	59,90	55,00		20	GCCTGCCATGGGACAAATTC	Positivo	59,82	55,00																																																																															
Primer B	20	GCAAGCCCTGGTTCGAAGA	Positivo	59,97	55	33,404	419,9	26,2	161,5	Primer-Blast-NCBI																																																																																																																																					
	20	GAGACTTGAGGGTGGTCTCGC	Negativo	60,11	60,00						Primer C	20	TGCTGGTCTTGCCAAACTGA	Positivo	60,11	50,00	33,404	427,5	26,4	164	Primer-Blast-NCBI	20	AGTACTCACGCCAAGGTTTCG	Negativo	60,04	55,00	Primer D	20	CCAACGATAAGGGCGAACCT	Positivo	60,11	55,00	33,404	449,1	27,4	171,7	Primer-Blast-NCBI	20	GTTCAATGCGGAATCCACGG	Negativo	59,90	55,00		20	GCCTGCCATGGGACAAATTC	Positivo	59,82	55,00																																																																																															
Primer C	20	TGCTGGTCTTGCCAAACTGA	Positivo	60,11	50,00	33,404	427,5	26,4	164	Primer-Blast-NCBI																																																																																																																																					
	20	AGTACTCACGCCAAGGTTTCG	Negativo	60,04	55,00						Primer D	20	CCAACGATAAGGGCGAACCT	Positivo	60,11	55,00	33,404	449,1	27,4	171,7	Primer-Blast-NCBI	20	GTTCAATGCGGAATCCACGG	Negativo	59,90	55,00		20	GCCTGCCATGGGACAAATTC	Positivo	59,82	55,00																																																																																																															
Primer D	20	CCAACGATAAGGGCGAACCT	Positivo	60,11	55,00	33,404	449,1	27,4	171,7	Primer-Blast-NCBI																																																																																																																																					
	20	GTTCAATGCGGAATCCACGG	Negativo	59,90	55,00							20	GCCTGCCATGGGACAAATTC	Positivo	59,82	55,00																																																																																																																															
	20	GCCTGCCATGGGACAAATTC	Positivo	59,82	55,00																																																																																																																																										

Primer E	20	AGGCGGGACTTAGCTGACTA	Negativo	60,03	55,00	33,404	435,4	26,2	166,2	Primer-Blast-NCBI
Primer F	20	GCCTGAGATCGCTGAATGGA	Positivo	59,89	55,00	33,404	420,6	26,7	162,2	Primer-Blast-NCBI
	20	GCGAGACTTGAGGTGGTCTC	Negativo	60,11	60,00					
Primer G	20	GTCCGATTAGCGTGGTTGGA	Positivo	60,11	55,00	33,404	452,4	27,3	172,6	Primer-Blast-NCBI
	20	AGGTTGCGCCCTTATCGTTGG	Negativo	60,11	55,00					
Primer H	20	ATCTATATCCGCGCTGCTGG	Positivo	59,83	55,00	33,404	414,6	27,1	160,7	Primer-Blast-NCBI
	20	CCAAGGTTGCGCCCTTATCGT	Negativo	60,11	55,00					
Primer I	20	GTGACGTCCTCACTACTCGC	Positivo	60,18	60,00	33,404	443,9	27,3	170,0	Primer-Blast-NCBI
	20	TCCAACCACGCTAATCGGAC	Negativo	60,11	55,00					
Primer J	20	TCCGATTAGCGTGGTTGGAG	Positivo	59,83	55,00	33,404	421,5	24,2	159,9	Primer-Blast-NCBI
	20	CCCCTTGTAGTACTCACGCC	Negativo	59,82	60,00					

Fonte: Próprio autor.

Outro meio para determinação do *Fusarium* na bata-doce é com a técnica LAMP. Para isso é necessário que se faça os iniciadores exclusivos dessa técnica. De início, precisa da sequência do interesse, fornecida pelo Genbank (acesso AB586946.1). Desta forma, os iniciadores devem ser desenhados por meio de um programa disponibilizado na página da web (<http://primerexplorer.jp/e/>), designado Primer Explorer, recomendado pelo Eiken GENOME SITE (TEIXEIRA, 2016).

O programa gerará conjuntos de iniciadores, que foram refinados de acordo as normas do Guia para desenho de primers LAMP (Primer explorer V5), e estabelecem quatro principais pontos chaves: a Temperatura de melting (Tm) cerca de 65°C, a estabilidade no final de cada iniciador ($\Delta G < -4\text{kcal}$), conteúdo GC (50% à 60%), e a auto complementariedade. De acordo com os principais pontos, dois dos conjuntos de iniciadores foram desclassificados ao analisar as porcentagens de guanina e citosina, portanto, apenas três conjuntos de iniciadores apresentaram viabilidade, foram selecionados. Portanto, apenas três dos cinco conjuntos gerados apresentaram potencial para ser utilizados (Figura 11).

Figura 11- Iniciadores projetados a partir do gene LYS2 por meio do software Primer Explorer V5 para identificação de *Fusarium Oxysporum f. sp rapae*, pela técnica LAMP. Os Conjuntos estão representados por 1,3 e 5 são compostos por iniciadores externos (F3/B3 e e FIP/BIP)

Primer Information		Save						
1	ID:7	dimer(minimum)dG=-2.34						
label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
F3	101	120	20	59.19	-5.86	-5.16	0.45	TGGGACAAATTCTGGTTGGT
B3	272	290	19	59.28	-6.54	-4.16	0.53	GCGGAAGTGACCTCAAAGT
FIP			41					GTCGCGAGTAGTGAGGACGTCA-CACAGCGCAGTTTCTAGC
BIP			41					TAGTCAGCTAAGTCCCGCTGC-CGCGAGAAGTTTCTGTGGT

Primer Information		Save						
3	ID:29	dimer(minimum)dG=-2.42						
label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
F3	770	789	20	59.97	-4.94	-5.80	0.50	TCCTCTGATCCAAGACTGCA
B3	974	992	19	60.68	-6.28	-5.25	0.58	GCGAGACTTGAGGTGGTCT
FIP			42					ACGCTTCCATTTCAGCGATCTCA-GAGATCGTAATGAGGAGCCG
BIP			40					TTGAGACTCGGGGTCCCCAG-GCGGAACCTCTTGAGGTAGA

Primer Information		Save						
5	ID:22	dimer(minimum)dG=-1.77						
label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
F3	728	747	20	60.01	-6.57	-5.43	0.50	CCGCATTGAACTCAACGAGA
B3	940	957	18	59.62	-6.26	-4.27	0.56	TACGGCGGAACCTCTTGA
FIP			40					GTAGCTGACAAGTGTCCGGCTCC-CCTTGGTGGCAGTCTCT
BIP			42					TGAGATCGCTGAATGGAAAGCGT-GGTCCCATTCTACACCCTC

Fonte: Próprio autor.

5.1 ELABORAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA AS TÉCNICAS MOLECULAR qPCR E LAMP

A partir da determinação do melhor do primer, segundo os critérios estabelecidos, é indicado um protocolo de qPCR com os primers obtidos da sequência do gene da lisina (LYS2). Para a extração de DNA em tecidos vegetais, é utilizado o kit de extração de DNA de fungos DNeasy® Plant Kit (Qiagen Brasil) (GARCIA, 2013; VILAR, 2016), em que será seguido todo o processo já estabelecido pela empresa fornecedora do Kit com as devidas adaptações. Portanto o protocolo de extração inclui os seguintes passos: maceração 0,100 gramas de tecido vegetal jovem e com sintomas de doenças, utilizando cadinho e pistilo, previamente autoclavados, com o auxílio de nitrogênio líquido para uma obtenção de um pó; Com o pó obtido, adicionam-se 400 µl tampão AP1, proveniente do kit, e colocar no Vortex por 1 minuto. Após esse tempo, aquecimento a 65°C por 10 minutos. Em seguida adicionam-se 130 µl de tampão AP2, proveniente do kit, nas amostras, misturados e incubados por 5 minutos com gelo e centrifugados a 13,200 rpm por cinco minutos e meio, - adaptado de VILAR (2016); em seguida adiciona-se o sobrenadante nas Mini colunas lilás (Qiashredder) do kit de extração de DNA. Após isso, é colocado o sobrenadante em tubos de polipropileno de 2 mL e centrifugar por dois minutos e meio; Descarta a coluna e transfere 450 µl do filtrado para novos tubos de polipropileno de 1,5 mL, adicionando e misturando 675 µl de tampão AP3/E; Em seguida, transfere 650 µl com uma pipeta para mini colunas brancas (Dneasy mini spin) do kit, colocado em tubos de polipropilenos de 2 mL e centrifugar por 8000rpm por um minuto. Descarta-se o filtrado, e transfere a mini coluna para um novo tubo de polipropileno de 2 mL, centrifugando novamente por 8000 rpm durante um minuto. Descarta-se o filtrado e transfere novamente a mini coluna para um novo tubo de polipropileno de 2 mL, adicionando 500 µl de tampão AW e centrifugar por dois minutos e meio a 132000 rcf; Em seguida descarta o filtrado, transfere a mini coluna branca para um novo tubo de polipropileno de 1,5 mL, adicionando 50 µl de tampão AE. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida centrifugar a 8000rpm por um minuto para eluir. Após a centrifugação, descartar a mini coluna branca, e o DNA extraído se encontrar no tubo de polipropileno de 1,5 mL.

Para realização da qPCR, é utilizado o DNA extraído das amostras, com o kit de extração de DNA, DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Brasil). O procedimento de detecção de qPCR consistente do método descrito por Chai *et al.* (2020). Assim, 20µL volume de reação contendo 10µL de SuperReal PreMix Plus, 0,2µL de Primers 3/Primers 4 (10µM), 1µL de DNA modelo (210 ng) e 0,4µL de 50×Corante de referência ROX. Para a amplificação é usado o

sistema ABI 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems Brasil). A fluorescência é detectada após cada ciclo, em que será possível fazer o diagnóstico molecular.

Em diagnóstico com o método LAMP, os passos para realização da mesma são mais curtos em comparação a técnica qPCR, uma vez que estejam definidos os devidos iniciadores. Para tanto, para o método molecular LAMP, dos três conjuntos de iniciadores completos (F3/B3 e FIP/BIP), devem ser feitas as avaliações quanto a formação de bandas, com finalidade de selecionar o melhor que representa o padrão de bandas característico da LAMP. Para isso é necessário conduzir a reação com um volume total de 10µl, constituída de 1,4 mM da mistura de dNTP (25mM) (Sigma-Aldrich), 0,2 µM dos iniciadores externos (F3/B3), 1,6 µM de cada iniciador interno (FIP/BIP), 8 U de Bst DNA Polymerase (Fragmento ampliado) (New England BioLabs), 1X do tampão (ThermoPol Reaction Buffer: 20mM Tris-HCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 10mM KCl, 2mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100, pH 8,8) (New England BioLabs), e 25ng de DNA. Após a reação, os conjuntos de iniciadores devem ser submetidos a temperatura de 65°C. Uma alternativa para adaptação da temperatura ideal pode-se usar um termociclador. Para fazer a comparação entre as estruturas geradas pode-se analisar em gel de agarose 1,5% fotodocumentado (TEIXEIRA, 2016).

Para fazer a interpretação direta, a olho nu, dos produtos amplificados da LAMP pode-se usar o corante Hydroxynaphthol blue (HNB) (GOTO *et al*, 2009). A concentração dos corantes HNB na reação é de base de 150 mM respectivamente. O corante deve ser adicionado à mistura da reação antes do processo de amplificação para reduzir o índice de contaminantes. A mudança de coloração ocorre por meio da ação do corante HNB com íons de Mg²⁺, em que amostras positivas mudam de azul violeta para uma tonalidade um pouco mais clara de azul.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Portanto, visto que o Nordeste é um dos grandes cultivadores de batata-doce no Brasil e que o fitopatógeno *Fusarium oxysporum* é um dos grandes causadores de infecções de plantações, faz-se necessário o estudo genético de relação evolutiva dessa espécie e o desenvolvimento de kit diagnóstico moleculares.

Diante disso, este estudo possibilitou o conhecimento do gênero taxonomicamente. Permitiu a inferência da espécie *F. oxysporum* e demais espécies da do gênero *Fusarium spp*, relacionado com o gene de interesse da lisana (LYS2), além de promover o desenvolvimento de primers visando o diagnóstico molecular. E com os primers desenhados e validados, foram submetidos a um protocolo adaptado e exclusivo para a espécie de *F. oxysporum* e seu grupo de complexos.

A partir dos resultados obtidos, é notável que a relação taxonômica apresenta similaridade entre si, visto que há uma ótima identidade entre as espécies, confirmada pelo teste bootstrap. Além disso, os desenhos dos primers da sequência do gene LYS2, obtidos na plataforma Primer3Plus, apresentaram ótimos resultados, sendo os primers 3 e 4 mais indicados visto que estão na média dos parâmetros estabelecidos. E assim, com os devidos marcadores foi possível propor um Kit diagnóstico com a técnica qPCR, projetando um protocolo para diagnosticar o *Fusarium* na batata-doce. Além desta, foi desenvolvido o diagnóstico molecular com a técnica LAMP, projetando um protocolo com 3 conjuntos de iniciadores, visando o diagnóstico molecular do fungo. Assim, com essas ferramentas de estudo *in silico* é possível fundamentar uma realização experimental dos primers desenhados a partir da sequência do gene LYS2 presente no gênero do fungo.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5ª ed. San Diego: Elsevier, p 948, 2005.

AGROLINK. **Mancha alternaria**. S/L,2021. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/problemas/mancha-de-alternaria_1652.html. Acesso em: 26 maio 2022.

ALVIDREZ-VILLAREAL, R. *et al.* Isolation and pathogenicity of fungi associated to ambrosia borer (*Euplatypus segnis*) found injuring pecan (*Carya illinoensis*) wood. **Agricultural Sciences**, v. 3, n.3, p. 405-416, 2012.

ARAÚJO, Gianne Rizzuto. **Caracterização polifásica de *Fusarium lateritium*, *F. oxysporum* e *F. solani* depositadas na micoteca URM e o potencial na degradação de efluentes de lavanderia têxtil do município de Toritama-PE**. 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

BASTOS, C.N.; SANTOS, A.O. Superbrotamento de inflorescências do limão-de-caiena causado por *Fusarium decemcellulare*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p.232, 2001

BROWN, D. W.; PROCTOR, A. *Fusarium: genomics, molecular and cellular biology*. 1. ed. USA: Caister Academic Press, 2013, 194 p.

BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A.; BACKHOUSE, D. *et al.* Biodiversity and population studies on *Fusarium*. In: LOGRIECO, A.; SEIFERT, K. A.; LESLIE, J. F. A. *et al.* Biodiversity of toxigenic *Fusarium* species. **Sydowia**, Horn, v. 30, p. 1-11. 1997.

CANKAR, K. *et al.* Critical points of DNA quantification by real-time PCR - effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. **Bmc Biotechnology**, v. 6, Aug 14 2006.

CARNIELLI, L. Detecção Molecular de *Fusarium guttiforme*, agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro. 2014.

CHAI, A.-li *et al.* Quantification of viable cells of *Pseudomonas syringae* pv. tomato in tomato seed using propidium monoazide and a real-time PCR assay. **Plant disease**, v. 104, n. 8, p. 2225-2232, 2020.

COSTA, R.S. *et al.* Relação entre características morfológicas da cariopse e fusariose em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 1, p. 27- 33, jan. 2003.

DE CASTRO, L. A. S. Instruções para plantio de mudas de batata-doce com alta sanidade. **Embrapa Clima Temperado-Documents (INFOTECA-E)**, 2010.

Edafoclimáticas

DE QUEIROGA, Roberto Cleiton Fernandes *et al.* Fisiologia e produção de cultivares de batata-doce em função da época de colheita. **Hortic. Bras.**, v. 25, n. 3, p 371-374, julset.2007.

Edel-Hermann, V; Lecomte, C.2019. Status atual de *Fusarium oxysporum* fomae speciales e raças. **Fitopatologia** 109:512-530.

EMBRAPA. **Como plantar batata-doce.** S/L, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/hortalicas/batata-doce/introducao2>. Acesso em: 26 maio 2022

FAOSTAT. **Countries by commodity: sweet potatoes.** Disponível em: http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity. Acesso em: 13 jun. 2022.

FELSENSTEIN J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783-791.

GALERIANI, T. M. Batata-doce: uma revisão com ênfase na dinâmica do nitrogênio. **Revista Tocantinense de Geografia** -, Araguaína, v. 19, n. 09, p. 206- 230, 2020.

GARCIA, Júlio César. Diagnóstico fitossanitário por PCR em tempo-real: requisitos básicos para validação de métodos. 2013.

GONÇALVES, Rivadalve Coelho. Biologia molecular aplicada à diagnose de doenças de plantas. **Embrapa Acre: ciência e tecnologia para o desenvolvimento sustentável do Sudoeste da Amazônia. Rio Branco, AC: Embrapa Acre**, v. 16, p. 317-338, 2009.

Gordon, TR 2017 . *Fusarium oxysporum* e a síndrome de murcha de *Fusarium* . Anu. Rev. Phytopathol. 55:23-39.

GOTO, M.; HONDA, E.; OGURA, A.; NOMOTO, A.; HANAKI, K. I. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. **BioTechniques**, Tokyo, v. 46, n. 3, p. 167-172, 2009.

HILL, J.; BERIWAL, S.; CHANDRA, I.; PAUL, V. K.; KAPIL, A.; SINGH, T.; WADOWSKY, R. M.; SINGH, V.; GOYAL, A.; JAHNUKAINEN, T.; JOHNSON, J. R.;

TARR, P. I.; VATS, A. Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of Common Strains of *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, Finlândia v. 46, n. 8, p. 2800–2804, 2008.

IBGE. Produção Agrícola Municipal: Tabela 1612 - Área plantada, área colhida, quantidade produzida e valor da produção da lavoura temporária. Rio de Janeiro: SIDRA, 2020.

INDEX FUNGORUM. 2012. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org>. Acesso em 16 de junho de 2022.

INDEX FUNGORUM. Disponível em: <http://speciesfungorum.org/Names/>. Acesso em 16 de junho de 2022.

JACOBS, A. *et al.* *Fusarium ananatum* sp. nov. in the *Gibberella fujikuroi* species complex from pineapples with fruit rot in South Africa. **Fungal Biology, Oxford**, v. 114, n. 7, p. 515-527, July 2010.

KIBBE, W. A. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research*. v. 35, p. 43 – 46, 2007.

KVAS, M. *et al.* Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. **Fungal Diversity, Chiang Mai**, v. 34, n. 1, p.1-21, Jan. 2009.

LAZAROTTO, Marília. **Identificação e caracterização de *Fusarium* spp. E *Pestalotiopsis* spp. associados a *Carya illinoensis* no Rio Grande do Sul**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.

LEE, Y.; KIM, D.; LEE, K.; CHUN, J.; Single-channel multiplexing without melting curve analysis in real-time PCR. **Nature**, v. 4, p.1-6, 2014.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. & BULLOCK, S. *The Fusarium laboratory manual*. Ames, IA: **Blackwell Pub.**, 2006.

LI, X.; NIE, J.; WARD, L.; NICKERSON, J.; DE BOER, S. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection and identification of *Pectobacterium atrosepticum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Canada, v. 33, p. 447-457, 2011.

MAINO, S. C.; *et al.* Batata doce (*Ipomoea batata*) dentro do contexto de culturas energéticas, uma revisão. *Revista Brasileira Energias Renováveis*, v. 8, n. 4, p. 629- 638, 2019.

- MCCARTNEY, H. A. *et al.* Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. **Pest Management Science, Oxford**, v. 59, p. 129–142, 2003.
- MICHEREFF, S.J. *et al.* Variabilidade de isolados de *Alternaria brassicicola* no estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 6, p. 656-663, nov./dez. 2003.
- MIRANDA, J. E. C.; FRANÇA, F. H.; CARRIJO, O. A.; SOUZA, A. F.; PEREIRA, W.; LOPES, C. A.; SILVA, J. B. C. **A cultura da batata doce**. Brasília: Embrapa, 1995.
- MOTA, J. H.; OLIVEIRA, J. F.; YURI, J. E. Qualidade de raízes de batata-doce comercializadas em Jataí-GO. Congresso Brasileiro de Olericultura. Voçosa, 2011. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/897495/1/JONYEISHIYURI12011.pdf>. Acesso em: 10 Jun. 2022.
- NEI M. and KUMAR S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- NJIRU, Z. K.; MIKOSZA, A. S. J.; ARMSTRONG, T.; ENYARU, J. C.; NDUNG’U, J. M.; THOMPSON, A. R. C. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, Australia, v. 2, n. 1: e147, 2008.
- NOTOMI, T.; OKAYAMA, H.; MASUBUCHI, H.; YONEKAWA, T.; WATANABE, K.; AMINO, N.; HASE, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 28, n. 12, p. 63e, 2000.
- NUNES, Bruno Tardelli Diniz. **Desenvolvimento de técnicas de rt-qpcr e semi-nested rt-pcr para detecção de hantavírus amazônicos**. 2015. Dissertação. Instituto Evandro Chagas.
- NUNES, H. F. Batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Lamm.] nas roças e quintais do litoral paulista: diversidade genética morfoagronômica, com base em morfometria geométrica, descritores e produção de bioetanol. USP. Piracicaba, 2016. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-27092016-174325/publico/Hendrie_Ferreira_Nunes_versao_revisada.pdf. Acesso em: 10 jun. 2022.
- O’DONNELL, K. *et al.* **Phylogenetic diversity of insecticolous fusaria inferred from multilocus DNA sequence data and their molecular identification via FUSARIUM-ID and Fusarium MLST**. *Mycologia*, v.104, n. 2, p. 427-445, 2012.

ONO, E.Y.S., *et al.* *Fusarium verticillioides* strains isolated from corn feed: characterization by fumonisin production and RAPD fingerprinting. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.53, n.4 2010.

OSC, Ohio supercomputer center. **What is the E Value in BLAST?**. [S. l.], 2005. Disponível em: <http://www.biocomp.unibo.it/casadio/LMBIOTEC/evaluate>. Acesso em: 14 ago. 2022.

PAGANI, Ana Paula da Silva *et al.* Occurrence of white rust (*Albugo ipomoeae-panduratae*) on *Ipomoea acuminata* in the Brazilian mid-west. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 306-308, 2012.

PARIDA, M.; SANNARANGAIAH, S.; DASH, P. K.; RAO, P. V. L.; MORITA, K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene 74 amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. **Rev Med Virol**, India, v. 18, p. 407- 421, 2008.

PEREIRA, Hyldo Pereira. **Batata Doce Vira “Ouro” no Sertão e Cidade da Paraíba se torna a 4ª Maior Produtora do Brasil.** Disponível em: <http://www.palestinaonline.com/2013/10/batata-doce-vira-ouro-no-sertao-e.html>. 2013. Acesso em: 13 de jun. de 2022.

PINTO, Ana Carolina de Oliveira. **Cultivo in vitro de meristemas de batata-doce.** 2021. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

PLETTIG, R.; NOWAK, A.; BALAU, V.; HAHNENKAMP, K.; USICHENKO T. Prospective comparison of a PCR assay and a microbiological culture technique for identification of pathogens from blood and non-blood samples in septic patients. **Journal of Intensive Care**, v. 3, n. 51, p.1-8, 2015.

QUEIROZ, J. A. D. S., ALVES, L. S., DALL’ACQUA, D. S. V., & SOUZA, L. F. B. (2017). Desenho e Validação de Primers In Silico para Detecção do Vírus Sincicial Respiratório Humano.

RIBEIRO, Ana Sofia Filipe Franco. **Avaliação de duas Técnicas Serológicas (Ifi e Elisa) e uma Técnica Molecular (Qpcr em Amostra de Pele) no Diagnóstico de Infecção por Leishmania Infantum em Cães.** 2014. Tese de Doutorado. Universidade de Lisboa (Portugal).

RUBIO, Marcela da Silva. **Utilização de PCR em tempo real quantitativo para diagnóstico diferencial entre Salmonella enterica subesp. enterica sorovares Enteritidis,**

Typhimurium e Gallinarum (biovars Gallinarum e Pullorum) em aves domésticas (Gallus gallus). 2017.

SANTOS, D. S. MAPEAMENTO E ANÁLISE IN SILICO DAS PROTEÍNAS REFERENTES AO ESTRESSE SALINO EM ESPÉCIES DO GÊNERO DO ALGODOEIRO (*Gossypium spp*). 2021. Monografia. Universidade Federal de Campina Grande.

SOARES, Elaine Della Giustina. Análise cladística: metodologia, terminologia e aplicação no estudo de Cordiluroides Albuquerque (Diptera: Muscidae). 2001.

SOARES, K.T.; MELO, A.S. de; MATIAS, E.C. **A cultura da batata-doce (*Ipomea batatas (L.) Lam*).** Joao Pessoa: EMEPA-PB, 2002. 26 p. il. (EMEPA-PB. Documentos, 41).

SPERIMENTAZIONE. **Sweetpotato.** S/L,2021. Disponível em: <http://sperimentazione.altervista.org/Sweetpotato.html>. Acesso em: 26 maio 2022.

SYNGENTA. **Fusarium oxysporum.** [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.syngenta.nl/pt/seedcare/vegetables/diseases/fusarium/fusarium-oxysporum>. Acesso em: 26 jul. 2022.

TAMURA K., STECHER G., and KUMAR S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

TANNER, N. A.; ZHANG, Y.; EVANS JR. T. C. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *BioTechniques*, Ipswich v. 58, n. 2, p. 59-68, 2015.

TEIXEIRA, N. C. (2016). Detecção de *Magnaporthe oryzae* em sementes de arroz por meio da técnica LAMP (amplificação isotérmica de ácidos nucleicos).

USHIKUBO, H. Principle of LAMP method - a simple and rapid gene amplification method. **Uirusu**, Tokyo, v. 54, p.107-112, 2004.

VARGAS, Lara Carraro. Patogenicidade e identificação de espécies de *Fusarium* associadas a raízes de plantas com fusariose e sementes em erva-mate, 2020. Dissertação. Universidade Federal do Paraná.

VICENTE, Elisabete José. **Introdução à bioinformática capítulo 3: pesquisa de homologos usando a ferramenta “blast.** SP, 2020. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/5464138/mod_resource/content/2/3.%20Cap%203.%20Bete.Bioinformatica.2019.06.12.pdf. Acesso em: 14 ago. 2022.

VILAR, Luana Pinto *et al.* Levantamento e diagnóstico das principais doenças que ocorrem em orquídeas (Orchidaceae) provenientes das regiões de Campina Grande e brejo paraibano. 2016.

VILHENA, A. P. Brimer: Um sistema web para gerenciamento de primers para o laboratório de tecnologia biomolecular da UFPA. 2015. Monografia (Bacharel em Sistemas de Informação) Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Marabá, 2015, 70p. Disponível em: Acesso em: 09 de ago. de 2022.

WASTLING, S. L.; PICOZZI, K.; KAKEMBO, A. S. L.; WELBURN, S. C. LAMP for Human African Trypanosomiasis: A Comparative Study of Detection Formats. *Plosone*, New York, v, 4, ed. 11, e865, 2010.

WATANABE, Maiko *et al.* Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2011.

WATTS, M. R, JAMES, G.; SULTANA, Y.; GINN, A. N.; OUTHRED, A. C.; KONG, F.; VERWEIJ, J. J.; IREDELL, J. R.; CHEN, S. C-A.; LEE, R. A Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for *Strongyloides stercoralis* in Stool That Uses a Visual Detection Method with SYTO-82 Fluorescent Dye. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Australia, v. 90, p. 306-311, 2014.