

# ANÁLISE IN SÍLICO DO GENE LYS2 PARA IDENTIFICAÇÃO DE FUSARIUM OXYSPORUM F. SP. RAPAE

[Ciências Biológicas, Volume 28 – Edição 133/ABR 2024 SUMÁRIO /](#)  
[21/04/2024](#)

REGISTRO DOI:10.5281/zenodo.11005365

Pedro Victor Da Silva

Ana Verônica Silva do Nascimento

## RESUMO

A batata-doce (*Ipomoea batatas* (L) Lam.) 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. Contudo, perdas significativas na produção têm sido observadas decorrente das infecções de patógenos fúngicos, em destaque a espécie *Fusarium Oxysporum*. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo fazer um estudo in silico do gene *LYS2* *Fusarium Oxysporum* f. sp. *rapae* com o intuito de obter possível oligonucleotídeo específico para kit de diagnóstico molecular. As buscas das sequências gênicas foram realizadas utilizando a plataforma da plataforma do NCBI e ferramenta blast foram selecionadas 15 sequências para em seguida gerar a árvore filogenética com as sequências selecionadas e depois desenhar os marcadores para

qPCR. Os resultados obtidos da árvore filogenética, com o método de inferência *bootstrap*, apresentaram bons resultados de similaridades entre as espécies. Os oligonucleotídeos desenhados com a plataforma primer3Plus demonstraram serem bons marcadores para diagnosticar o *F. oxysporum* na batata doce, sendo um protocolo para técnica qPCR.

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

## 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 batata doce é um alimento fundamental na dieta brasileira, especialmente no Nordeste do país, onde desempenha um papel vital tanto na nutrição quanto na economia regional. Segundo IBGE, (2020) a batata doce é valorizada por sua resistência a condições climáticas adversas, sendo uma escolha robusta para os agricultores da região. Segundo Mota *et al.* (2011) destaca que, além de ser uma fonte rica em carboidratos, vitaminas A e C, a batata doce é também uma importante fonte de renda para pequenos produtores, devido à sua demanda constante nos mercados locais e nacionais. Essas características tornam a batata doce um componente essencial não apenas na dieta dos brasileiros, mas também em seus aspectos socioeconômicos, especialmente no Nordeste, onde a agricultura é uma parte crucial da identidade cultural e econômica.

As doenças da batata doce representam um desafio significativo para os agricultores, impactando diretamente a produtividade e a qualidade dos

cultivos. Dentre as doenças, destaca-se o *Fusarium oxysporum* f. sp. *rapae* sendo um patógeno fúngico que representa uma ameaça significativa à produção de batata doce no estado da Paraíba. A infecção desse fungo ocorre principalmente através do solo, onde o fungo pode persistir por longos períodos mesmo na ausência de plantas hospedeiras, como mencionado por Martins *et al.* (2020), acarretando os sintomas de murcha, amarelecimento e necrose das folhas, comprometendo severamente a qualidade e o rendimento das culturas.

A compreensão do ciclo de vida e da biologia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *rapae* é crucial para o desenvolvimento de métodos de controle mais eficazes e sustentáveis, destacando a importância da pesquisa contínua nesta área. A detecção molecular de *Fusarium oxysporum* em batata doce é uma área crucial para a prevenção e manejo eficaz da murcha de *Fusarium*, uma das doenças mais devastadoras dessa cultura. As técnicas de detecção molecular permitem identificar o patógeno com precisão e rapidez, mesmo em estágios iniciais da infecção, o que é fundamental para o controle eficiente da doença. A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é uma das técnicas mais utilizadas para a detecção de *Fusarium oxysporum*, como destacado por Santos e Almeida (2019). Esta técnica permite a amplificação de segmentos específicos do DNA do patógeno, facilitando sua identificação rápida e precisa. Outra abordagem é a qPCR (PCR quantitativa), que, conforme descrito por Oliveira *et al.* (2020), não apenas detecta, mas também quantifica a carga do patógeno, proporcionando uma avaliação da severidade da infecção. Essas tecnologias não só melhoram a precisão na detecção de doenças, mas também contribuem para a implementação de estratégias de manejo integrado de doenças, reduzindo a dependência de fungicidas e apoiando práticas agrícolas mais sustentáveis. Dessa forma, O desenvolvimento de kits de diagnóstico para *Fusarium*, particularmente para patógenos como *Fusarium oxysporum*, é essencial para o manejo eficaz das doenças em culturas agrícolas. Estes kits oferecem métodos rápidos, precisos e acessíveis para a detecção do patógeno, contribuindo significativamente para a prevenção e controle de surtos de doenças. Portanto, considerando

que o estado da Paraíba se destaca como produtor de batata doce (Soares *et al.*, 2002), e que as técnicas moleculares são ótimas opções para diagnósticos de fitopatógenos, o presente trabalho teve como objetivo analisar *in silico* a filogenia do gene *LYS2* de espécie *Fusarium Oxysporum f sp rapae* e desenvolver oligonucleotídeos para diagnóstico do fungo em batata doce.

## 2- 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*).

### 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).

### ANÁLISE FILOGENÉTICA E AGRUPAMENTO DAS SEQUÊNCIAS

As sequências gênicas 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.

## 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).

## 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 indicado para o kit de extração de DNA, DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Brasil).

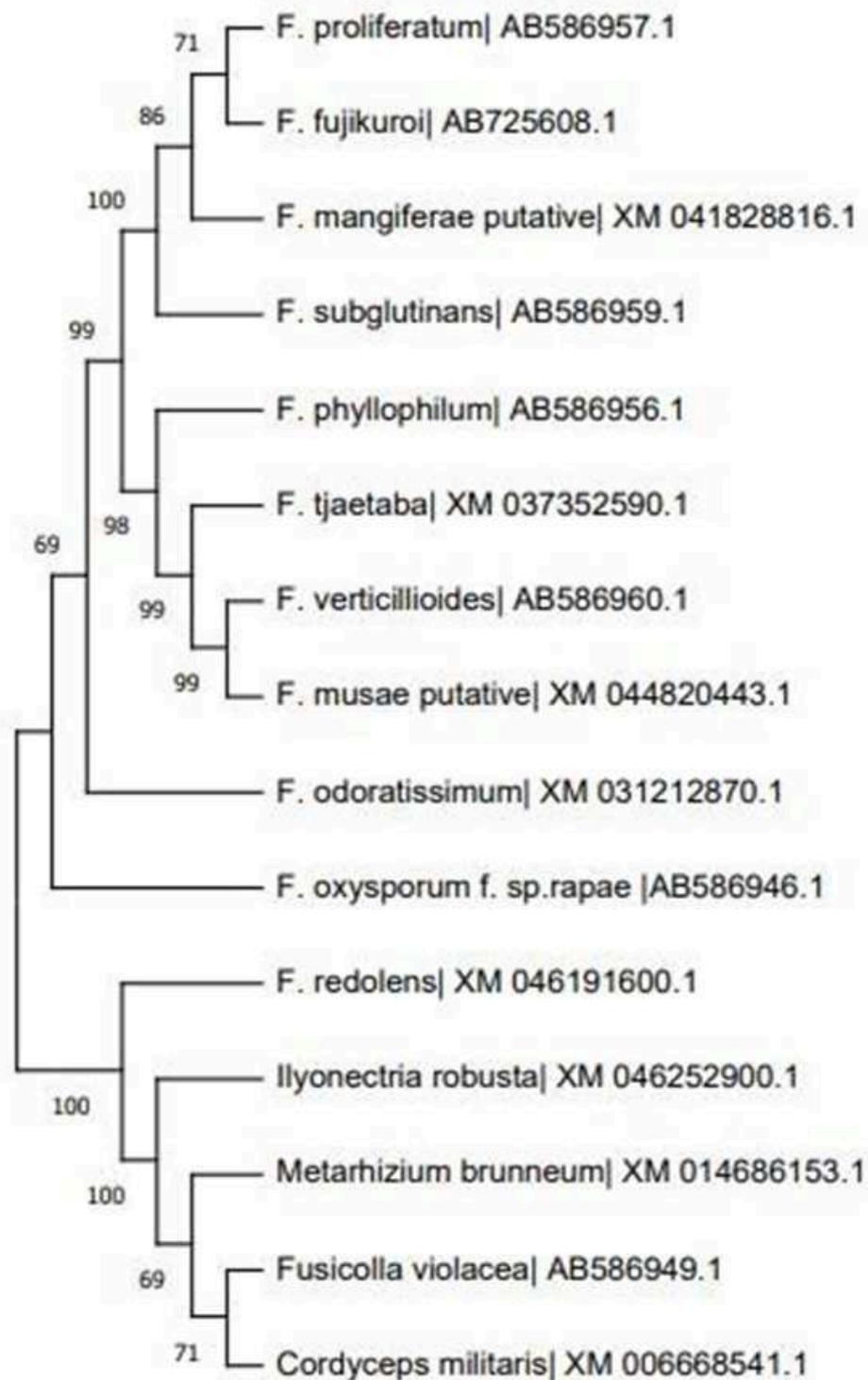
## 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

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 os fungos e o código de acesso das sequências depositadas no banco de dados.

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

<b>Fungo</b>	<b>Código Acesso</b>
<i>Fusarium oxysporum f. sp. rapae</i>	AB586946.1
<i>Fusarium subglutinans</i>	AB586959.1
<i>Fusarium proliferatum</i>	AB586957.1
<i>Fusarium fujikuroi</i>	AB725608.1
<i>Fusarium phyllophilum</i>	AB586956.1
<i>Fusarium verticillioides</i>	AB586960.1
<i>Fusarium musae putative</i>	XM_044820443.1
<i>Fusarium mangiferae putative</i>	XM_041828816.1
<i>Fusarium tjaetaba</i>	XM_037352590.1
<i>Fusarium redolens</i>	XM_046191600.1
<i>Fusarium odoratissimum</i>	XM_031212870.1
<i>Fusicolla violacea</i>	AB586949.1
<i>Ilyonectria robusta</i>	XM_046252900.1
<i>Cordyceps militaris</i>	XM_006668541.1
<i>Metarhizium brunneum</i>	XM_014686153.1

O alinhamento das sequencias com a ferramenta de algoritmo ClustalW do software MEGA XI. Logo após ao alinhamento com a ferramenta de algoritmo ClustalW do software MEGA XI, com a ferramenta de construção de arvores filogenéticas e com o método de máxima parcimônia e de inferência o *bootstrap* de mil réplicas, foi construída a árvore filogenética (Figura 1), para entender o grau de similaridade entres as espécies do gênero *Fusarium spp*, uma vez que há sequencias similares dentre e entre espécies.



Analisando a árvore filogenética, Figura 1, pode-se observar uma homogeneidade grande, já que, dentre as 15 sequências, 11 são do gênero *Fusarium spp.* É possível notar que o grupo existente é muito espesso, possuindo 6 espécies: *F. odoratissimum*, *F. oxysporum f.sp rapae*, *F. redolens*, *Ilyonectria robusta*, *F. phyllophilum*, e *F. subglutinans*. Ademais, os *Fusarium* estão presentes também, formando grupos: *F. proliferatum* e *F. fujikuroi*, *F. verticillioides* e *F. musae putative*, e *Fusicolla violácea* e *Cordyceps militaris*. A análise filogenética demonstra que o grupo da

espécie *Fusarium oxysporum f. sp. rapae*, formou um clado distinto das demais espécies, como ocorreu na árvore filogenética da Figura 1 e nos trabalhos realizados por Watanabe et al., (2011). 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. 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 (Santos, 2021).

Figura 1– Árvore filogenética bootstrap consensus do gene LYS2 do microrganismo *Fusarium oxysporum f. sp. rapae* obtida no MEGA-XI.

Após a análise da árvore filogenética, foi desenhado os oligonucleotídeos específicos das sequências estudadas para a viabilização de possível estudo experimental relacionado ao diagnóstico de *Fusarium* em estudo na espécie de batata-doce (Tabela 2). Na presente tabela 2 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. Desta forma, a sequência do gene foi usada na construção dos oligonucleotídeos, 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 estabelecia 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 (dentre 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.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos do gene *LYS2* de *Fusarium oxysporum f. sp. rapae*

Primers	Tamanho	Sequência 5'→3'	Sentido	Temperatura de anelamento (°C)	%CG (Citosina e Guanina)	RlnK 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	ACCTGTGACGTAAGGCTGTCT	Negativo	55,6	47,8					

A partir da determinação do melhor do oligonucleotídeos, segundo os critérios estabelecidos, é indicado um protocolo de qPCR com as sequências 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). 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) (Tabela 2), 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.

#### 4- CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foi possível observar uma identidade próxima do gene *LYS2* no agrupamento filogenético;
- Os oligonucleotídeos obtidos na plataforma Primer3Plus (3 e 4) foram os mais indicados na análise in silico;
- Foi possível propor um kit diagnóstico utilizando a técnica qPCR com os oligonucleotídeos obtidos in silico diagnóstico do fungo em batata doce.

## 5 REFERÊNCIAS

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

SIDRA, 2020.

KIBBE, W. A. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator.

**Nucleic Acids Research**. v. 35, p. 43 – 46, 2007.

MOTA, J. H. *et al.* 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/JONYEIS\\_HIYURI120](https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/897495/1/JONYEIS_HIYURI120)

[11.pdf](#). Acesso em: 10 mar. 2023.

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.

SANTOS, D. S. MAPEAMENTO E ANÁLISE IN SILICO DAS PROTEÍNAS REFERENTES AO ESTRESSE SALINO EM ESPÉCIES DO GÊNERO DO

## ALGODO

EIRO (*Gossypium spp*). 2021. Monografia. Universidade Federal de Campina Grande.

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 março 2023.

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 abril de 2023.

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.

[← Post anterior](#)

---

### RevistaFT

**A RevistaFT** têm 28 anos. É uma **Revista Científica Eletrônica Multidisciplinar Indexada de Alto Impacto e Qualis “B2”**.

### Contato

**Queremos te ouvir.**

**WhatsApp RJ:**  
(21) 98159-7352

### Conselho Editorial

**Editores Fundadores:**  
Dr. Oston de

Periodicidade mensal e de acesso livre. Leia gratuitamente todos os artigos e publique o seu também [clikando aqui.](#)



ou 98275-4439

**WhatsApp SP:**

(11) 98597-3405

**e-Mail:**

contato@revistaf  
t.com.br

**ISSN:** 1678-0817

**CNPJ:**

48.728.404/0001-  
22

**FI= 5.397 (muito  
alto)**

Fator de impacto é um método bibliométrico para avaliar a importância de periódicos científicos em suas respectivas áreas. Uma medida que reflete o número médio de citações de artigos científicos publicados em determinado periódico, criado por Eugene Garfield, em que os de maior FI

Lacerda Mendes.

Dr. João Marcelo  
Gigliotti.

**Editor**

**Científico:**

Dr. Oston de  
Lacerda Mendes

**Orientadoras:**

Dra. Hevellyn  
Andrade  
Monteiro  
Dra. Chimene  
Kuhn Nobre

**Revisores:**

Lista atualizada periodicamente em [revistaft.com.br/expresspediente](http://revistaft.com.br/expresspediente). Venha fazer parte de nosso time de revisores também!

são considerados  
mais  
importantes.

Copyright © Revista ft Ltda. 1996 -  
2024

Rua José Linhares, 134 - Leblon | Rio  
de Janeiro-RJ | Brasil