

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DOUGLAS ADAMOSKI

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS EFICIENTES DE DIAGNÓSTICO  
MOLECULAR DOS FUNGOS *Phyllosticta citricarpa* E *Phyllosticta capitalensis*

CURITIBA

2012

DOUGLAS ADAMOSKI

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS EFICIENTES DE DIAGNÓSTICO  
MOLECULAR DOS FUNGOS *Phyllosticta citricarpa* E *Phyllosticta capitalensis*

Monografia apresentada à disciplina Estágio Supervisionado em Biologia como requisito parcial à conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Chirlei Glienke

CURITIBA

2012



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas



**PARECER DA COMISSÃO DE AVALIAÇÃO  
DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DA DISCIPLINA  
DE ESTÁGIO CURRICULAR**

Aos 04 dias do mês de Julho de 2012 a Comissão de Avaliação da Monografia de Estágio Curricular do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, composta por Profa. Dra. Chirlei Glienke, Profa. Dra. Lygia Vitoria Galli-Terasawa e a mestre Daiani Cristina Savi, intitulada DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS EFICIENTES DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DOS FUNGOS *Phyllosticta citricarpa* E *P. capitalensis*, de autoria do(a)acadêmico(a) DOUGLAS ADAMOSKI MEIRA.

A Comissão julgou o trabalho e atribui a nota Dez

Prof.(a) Orientador(a)  
CHIRLEI GLIENKE

Membro da Comissão  
LYGIA VITORIA GALLI-TERASAWA

Membro da Comissão  
DAIANI CRISTINA SAVI

Curitiba, 04 de Julho de 2012



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas



## DECLARAÇÃO DE ENTREGA DE VERSÃO CORRIGIDA DA MONOGRAFIA

Na presente data o aluno Douglas Adamoski Meira entregou a versão corrigida da Monografia de Estágio Curricular do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, intitulada DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS EFICIENTES DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DOS FUNGOS *Phyllosticta citricarpa* E *P. capitalensis*, com as correções sugeridas pela comissão de avaliação.

---

Prof.ª Dr.ª Chirlei Glienke  
Orientadora

Curitiba, 01 de agosto de 2012.

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Professora Dr<sup>a</sup> Chirlei Glienke, por dar a oportunidade àquele aluno de primeiro período, permitindo seu crescimento pessoal e científico nos mais de 4 anos de orientação

A professora Dr<sup>a</sup> Vanessa Kava-Cordeiro, por toda amizade e auxílio.

A professora Dr<sup>a</sup> Lygia Vitória Galli-Terasawa, por todo o reconhecimento, apoio e amizade.

Ao professor Dr. Leonardo Magalhães Cruz, pela disponibilização de servidor para a execução de diversas das análises aqui realizadas e pelo auxílio com a criação dos *scripts*.

A todos os professores que tive na graduação que, cada um a sua maneira, colaboraram para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Aos colegas de laboratório, pelo tempo na bancada, oportunidades de aprendizado e momentos felizes. Especialmente Angela Ikeda, Daiani Savi, Felipe Borges, Josiele Polzin, Juliana Marta e Lisandra Maba.

Aos ex-colegas de laboratório, especialmente Andressa Bini, Danyelle Stringari, Douglas Montenegro, Fernando Jung, Thabata Alvarez, Vivian Zecchin e Yuri Maluf.

Aos técnicos do laboratório, Maicon Wons (agora não mais, mas que ainda visito em seu novo lar) e Ana Luiza Mattana, pelo auxílio e amizade. Mas também ao recém-chegado Rodrigo Aluizio – com amizade já comparável aos primeiros.

A todos colegas de turma, especialmente Marina Cotta, Rafaela Bobato e Vanessa Zulkievicz, pela amizade e todas as dificuldades vencidas.

A minha namorada (que muito amo), Bianca Kollross, pela compreensão dos momentos de distância e pouca atenção (tanto os pretéritos quanto os futuros).

A meus pais, Salomão e Wanda, pelo apoio durante toda a graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa e fornecimento de bolsa de estudo.

E, por fim, a todas as *E. coli* e *Phyllosticta* que foram imoladas em prol da conclusão deste trabalho.

## RESUMO

Diversas ferramentas para a detecção e identificação molecular de espécies vem sendo utilizadas no diagnóstico de fitopatógenos. Uma destas doenças, Mancha Preta dos Citros (MPC, agente causal fungo *Phyllosticta citricarpa*), é causa de perdas financeiras ao agronegócio citrícola – graças a depreciação visual e queda prematura dos frutos. Entretanto, outro fungo do gênero, *P. capitalensis*, não é patogênico a citros, mas filogeneticamente relacionado e morfológicamente semelhante, compartilha o mesmo hospedeiro e habita outras lesões similares a da MPC, gerando uma demanda pela distinção entre as duas espécies, dada a existência de barreiras fitossanitárias à primeira. Assim, o presente trabalho visou construir conhecimento sob duas regiões genômicas previamente utilizadas para a detecção de *P. citricarpa* (GCP) – até então não utilizada em qPCR – e *P. capitalensis* (GMF) – com problema de especificidade perante a novas espécies descritas dentro do gênero. Buscou-se a obtenção de sequências homólogas tanto a GCP em *P. capitalensis* quanto a GMF em *P. citricarpa*, *P. brazilianiae*, *G. mangiferae* e *P. citribraziliensis*. Também sua obtenção a partir de DNA extraído de tecidos foliares de pomares com sintomas de MPC e das próprias linhagens obtidas destes, pelo método de isolamento tradicional. Procedeu-se com a extração de ácidos nucleicos do respectivo material (kit MoBio UltraClean™ Microbial DNA Isolation), amplificação do fragmento GCP e GMF (em condições menos restritivas quando em outras espécies), clonagem no vetor pGEM®-T, avaliação dos transformantes e sequenciamento, ou o sequenciamento direto em alguns casos. Em seguida, foram desenhados e avaliados *primers* com base nas sequências obtidas, visando detecção utilizando PCR quantitativa (qPCR) com o sistema TaqMan® para *P. citricarpa* e uma alteração na PCR convencional para *P. capitalensis*, com a substituição do *primer* reverso. Na região GCP foram observados polimorfismos escassos nas diversas linhagens de *P. citricarpa*, porém não foi encontrada uma região com alta homologia em *P. capitalensis* através do método utilizado. Esse resultado demonstra a especificidade destes *primers* para a espécie *P. citricarpa* o que diminui o risco de falsos positivos. Foi observada a amplificação de produtos diversos quando utilizado o material extraído diretamente de folhas cítricas, provavelmente associados a artefatos na reação de PCR, que justificam a tentativa de aperfeiçoamento da detecção, visando mais especificidade e sensibilidade. O ensaio de qPCR proposto mostrou-se mais específico entretanto menos sensível que o previamente disponível na literatura. Para a região GMF foram, igualmente, observados polimorfismos escassos nas linhagens de *P. capitalensis* e não foi encontrado um homólogo em *P. citricarpa* e *P. citribraziliensis* através do método utilizado. Tal ausência reforça a especificidade destes *primers* para *P. capitalensis* e diminui a possibilidade de falsos positivos para *P. citricarpa*. O diagnóstico via PCR convencional proposto foi capaz de distinguir o fungo *P. capitalensis* de todos os demais avaliados. Com o obtido pode-se concluir que os *primers* propostos para a detecção através de qPCR de *P. citricarpa* são uma alternativa aos previamente disponíveis e que a alteração no ensaio de detecção de *P. capitalensis* deixou o mesmo mais específico.

Palavras-chave: *Phyllosticta citricarpa*. *Phyllosticta capitalensis*. Diagnóstico Molecular.

## ABSTRACT

Several molecular tools for detection and identification of species has been used in diagnosis of phytopathogens. One of these diseases, Citrus black spot (CBS, causal agent *Phyllosticta citricarpa*), causes financial losses to the citrus agribusiness - through visual depreciation and premature fruit drop. However, another fungus of the genus, *P. capitalensis*, isn't pathogenic to citrus, but phylogenetically related and morphologically similar, sharing the same host and inhabiting other injuries similar to the CBS, generating a demand for the distinction between the two species, given the existence phytosanitary barriers to the first one. Thus, this study aimed to build knowledge about genomic regions previously used for the detection of *P. citricarpa* (GCP) – actually not used in qPCR - and *P. capitalensis* (GMF) - with specificity problems involving new species described. We attempted to obtain homologous sequences to GCP in *P. capitalensis* and GMF in *P. citricarpa*, *P. brazilianiae*, *G. mangiferae* and *P. citribraziliensis*. Also, obtaining it from DNA extracted from leaf tissues of affected orchards, and fungi from these, obtained by the traditional method of isolation. Proceeded with the extraction of nucleic acids (kit UltraClean™ MoBio Microbial DNA Isolation), GCP and GMF fragment amplification (under less constraining conditions when in other species), cloning in vector pGEM®-T, evaluation of transformants and sequencing - or through direct sequencing in some cases. Then, using the obtained sequences, *primers* were designed and evaluated in order to use quantitative PCR (qPCR) with the TaqMan® system for *P. citricarpa* and a change in conventional PCR for *P. capitalensis*, replacing the reverse *primer*. In the region GCP, few polymorphisms was observed in different strains of *P. citricarpa* and an homology region not found in *P. capitalensis*, with the used method. Multiple non-homologous fragments were obtained from leaves, probably associated with artifacts in the PCR, justifying the attempt to improve the detection, targeting more specificity and sensitivity. The qPCR proposed proved to be more specific, therefore less sensitive, than previous assay available in the literature. In the region GMF, few polymorphisms was observed in different strains of *P. capitalnesis* and an homology region not found in *P. citricarpa* or *P. citribraziliensis*, with the used method. The proposed change in conventional PCR was able to distinguish the fungus *P. capitalensis* from all others evaluated. With the obtained we can be conclude that th proposed *primers* for *P. citricarpa* detection by qPCR are an viable alternative to previously available and the change in detection method of *P. capitalensis* will be even more specific.

Key words: *Phyllosticta citricarpa*. *Phyllosticta capitalensis*. Molecular Diagnostics.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - PRINCÍPIO GERAL DA AVALIAÇÃO DO RESULTADO DA PCR QUANTITATIVA .....	17
FIGURA 2 - DEMONSTRATIVO DOS RESULTADOS DE EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DE MICÉLIO FÚNGICO EM GEL DE AGAROSE 0,8%.....	56
FIGURA 3 - DEMONSTRATIVO DOS RESULTADOS DE EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DE FOLHAS EM GEL DE AGAROSE 0,8% ...	56
FIGURA 4 - PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO GCP EM FOLHAS E LINHAGENS FÚNGICAS EM GEL DE AGAROSE 1,5% .....	58
FIGURA 5 - RESULTADOS DA REAÇÃO DE PCR DE COLÔNIA COM OS CLONES CONTENDO FRAGMENTO AMPLIFICADO COM <i>PRIMERS</i> GCP EM <i>Phyllosticta capitalensis</i> COM GEL DE AGAROSE 1,5% .....	60
FIGURA 6 - RESULTADOS DA REAÇÃO DE PCR DE COLÔNIA COM OS CLONES CONTENDO FRAGMENTO AMPLIFICADO COM <i>PRIMERS</i> GCP NA FOLHA 13 (A), DA PLANTA A, E NA FOLHA 26 (B), DA PLANTA B, EM GEL DE AGAROSE 1,5% .....	61
FIGURA 7 - AVALIAÇÃO DA MINIPREPARAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL DOS INSERTOS DE GCP NOS CLONES SELECIONADOS ORIUNDOS DE LINHAGENS (A, B), FOLHA 13 (B, C) E FL26 (C) EM GEL DE AGAROSE 0,8%.....	62
FIGURA 8 - AVALIAÇÃO DA PCR PARA SEQUÊNCIAMENTO DA REGIÃO GCP UTILIZANDO OS <i>PRIMERS</i> M13.....	64
FIGURA 9 - REGIÃO DO ALINHAMENTO DE GCP DISTINGUINDO AS SEQUÊNCIAS OBTIDAS DOS CLONES DE FOLHA E DE <i>Phyllosticta citricarpa</i> .....	67
FIGURA 10 - CURVAS DE CALIBRAÇÃO UTILIZANDO A LINHAGEM LGMF006 DE <i>Phyllosticta citricarpa</i> DOS ENSAIOS DE QPCR AVALIADOS.....	69
FIGURA 11 - AVALIAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR QUANTITATIVA (ENSAIO PROPOSTO) EM GEL DE AGAROSE 1,5%.....	71
FIGURA 12 - PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO GMF EM FOLHAS E LINHAGENS FÚNGICAS EM GEL DE AGAROSE 1,5%.....	72
FIGURA 13 - RESULTADOS DA REAÇÃO DE PCR DE COLÔNIA COM OS CLONES CONTENDO FRAGMENTO AMPLIFICADO COM <i>PRIMERS</i> GMF EM <i>Phyllosticta capitalensis</i> COM GEL DE AGAROSE 1,5% ...	73
FIGURA 14 - RESULTADOS DA REAÇÃO DE PCR DE COLÔNIA COM OS CLONES CONTENDO FRAGMENTO AMPLIFICADO COM <i>PRIMERS</i> GMF EM <i>Phyllosticta capitalensis</i> (LGMF003) E <i>Guignardia mangiferae</i> (IMI260576) COM GEL DE AGAROSE 1,5%	74
FIGURA 15 - RESULTADOS DA REAÇÃO DE PCR DE COLÔNIA COM OS CLONES CONTENDO FRAGMENTO AMPLIFICADO COM <i>PRIMERS</i>	

	GMF EM <i>Phyllosticta citricarpa</i> (LGMF006) E <i>Phyllosticta citribraziliensis</i> (LGMF011) COM GEL DE AGAROSE 1,5% .....	74
FIGURA 16	- RESULTADOS DA REAÇÃO DE PCR DE COLÔNIA COM OS CLONES CONTENDO FRAGMENTO AMPLIFICADO COM PRIMERS GMF EM <i>Phyllosticta citribraziliensis</i> (LGMF011) E NA FOLHA 08 DE COM GEL DE AGAROSE 1,5% .....	75
FIGURA 17	- AVALIAÇÃO DA MINIPREPARAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL DOS INSERTOS DE GMF NOS CLONES SELECIONADOS ORIUNDOS DAS LINHAGENS DE <i>Phyllosticta capitalensis</i> E <i>Guignardia mangiferae</i> EM GEL DE AGAROSE 0,8%.....	75
FIGURA 18	- AVALIAÇÃO DA MINIPREPARAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL DOS INSERTOS DE GMF NOS CLONES SELECIONADOS ORIUNDOS DA FOLHA 08 E DAS LINHAGENS DE <i>Phyllosticta capitalensis</i> (LGMF006) E <i>Phyllosticta citribraziliensis</i> (LGMF011) EM GEL DE AGAROSE 0,8%.....	76
FIGURA 19	- AVALIAÇÃO DA PCR PARA SEQUÊNCIAMENTO, UTILIZANDO VETOR, DA REGIÃO GMF DAS LINHAGENS DE <i>Phyllosticta capitalensis</i> , <i>Guignardia mangiferae</i> , <i>Phyllosticta citricarpa</i> , <i>Phyllosticta citribraziliensis</i> E FOLHA 08.....	77
FIGURA 20	- AVALIAÇÃO DA PCR PARA SEQUÊNCIAMENTO, DIRETO, DA REGIÃO GMF DAS LINHAGENS DE <i>Phyllosticta capitalensis</i> , <i>Phyllosticta brazilianiae</i> E <i>Guignardia mangiferae</i> .....	79
FIGURA 21	- REGIÃO UTILIZADA PARA O DESENHO DO PRIMER PCPR DISTINGUINDO <i>Guignardia mangiferae</i> (IMI260576) DAS DEMAIS ESPÉCIES AVALIADAS.....	81
FIGURA 22	- GRADIENTE DE TEMPERATURA DE ANELAMENTO UTILIZANDO A LINHAGEM LGMF001 DE <i>Phyllosticta capitalensis</i> COM O PRIMER PCPR PROPOSTO NESTE TRABALHO E GMF1 PREVIAMENTE DISPONÍVEL.....	84
FIGURA 23	- CONTROLE DA QUALIDADE DO DNA UTILIZADO COM A AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1-5,8S-ITS2 DO RDNA RIBOSSOMAL.....	84
FIGURA 24	- AVALIAÇÃO DE DIVERSAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Phyllosticta</i> FRENTE A PCR MULTIPLEX GCP/GMF.....	85
FIGURA 25	- AVALIAÇÃO DE DIVERSAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Phyllosticta</i> FRENTE A PCR PROPOSTA NESTE TRABALHO PARA A DETECÇÃO DE <i>Phyllosticta capitalensis</i> .....	86

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - LISTA DO MATERIAL BIOLÓGICO ENVOLVIDO NO PRESENTE ESTUDO.....	29
QUADRO 2 – DEMONSTRATIVO DOS RESULTADOS DA ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS POR ESPECTROFOTOMETRIA .....	57
QUADRO 3 - RESULTADOS DA ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO DO PRODUTO DE PCR PARA LIGAÇÃO EM VETOR DO FRAGMENTO GCP POR ESPECTROFOTOMETRIA.....	59
QUADRO 4 - RESULTADOS DA ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO DA MINIPREPARAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL DO FRAGMENTO GCP POR ESPECTROFOTOMETRIA.....	63
QUADRO 5 - RESULTADOS DA ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO DO PRODUTO DE PCR DO FRAGMENTO GCP A PARTIR DOS INSERTOS EM PLASMÍDEO AMPLIFICADOS PELOS <i>PRIMERS</i> M13 POR ESPECTROFOTOMETRIA.....	65
QUADRO 6 - RESULTADOS DA ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO DO PRODUTO DE PCR PARA LIGAÇÃO EM VETOR DO FRAGMENTO GMF POR ESPECTROFOTOMETRIA.....	72
QUADRO 7 - RESULTADOS DA ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO DA MINIPREPARAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL DO FRAGMENTO GMF POR ESPECTROFOTOMETRIA.....	76
QUADRO 8 - RESULTADOS DA ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO DO PRODUTO DE PCR DO FRAGMENTO GMF A PARTIR DOS INSERTOS EM PLASMÍDEO POR ESPECTROFOTOMETRIA .....	78
QUADRO 9 - RESULTADOS DA ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO DO PRODUTO DE PCR PARA SEQUENCIAMENTO DIRETO DO FRAGMENTO GMF.....	79
QUADRO 10 - LISTA DE SEQUÊNCIAS DA REGIÃO GMF QUE APRESENTARAM HOMOLOGIA COM A REGIÃO GMF PREVIAMENTE DISPONÍVEL (KAVA-CORDEIRO, 2004).....	80

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - VALORES DE C <sub>T</sub> PARA AS CURVAS DE CALIBRAÇÃO UTILIZANDO A LINHAGEM LGMF006 DE <i>Phyllosticta citricarpa</i> DOS ENSAIOS DE QPCR AVALIADOS.....	68
TABELA 2 - VALORES DE C <sub>T</sub> PARA AS AMOSTRAS DE <i>Phyllosticta citricarpa</i> , <i>Phyllosticta capitalensis</i> , <i>Phyllosticta brazilianae</i> , <i>Phyllosticta citribraziliensis</i> , <i>Guignardia mangiferae</i> E CONTROLE NEGATIVO AVALIADOS.....	70
TABELA 3 - RESULTADO DO BLAST PARA AS SEQUÊNCIAS NÃO-HOMÓLOGAS A REGIÃO GMF DAS LINHAGENS DE <i>Phyllosticta citricarpa</i> (LGMF006) E <i>Phyllosticta citribraziliensis</i> (LGMF011) .....	82
TABELA 4 – COMPARAÇÃO ENTRE O CONTEÚDO GC E A TEMPERATURA DE MELTING ESPERADA DO <i>PRIMER</i> PROPOSTO E SEU PAR NA DETECÇÃO DE <i>Phyllosticta capitalensis</i> .....	83

## LISTA DE FÓRMULAS

FÓRMULA 1 - DEFINIÇÃO DO PHRED VALUE (Q) EM FUNÇÃO DA PROBABILIDADE DA BASE .....	25
FÓRMULA 2 - EQUAÇÃO UTILIZADA PARA ESTIMAR A EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO EM UFC/MICROGRAMAS DE DNA PLASMIDIAL .....	45
FÓRMULA 3 - EQUAÇÃO UTILIZADA PARA O CÁLCULO DA EFICIÊNCIA DA REAÇÃO DA PCR QUANTITATIVA BASEADA NA INCLINAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO .....	52

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
3.1	PCR.....	16
3.1.1	PCR Quantitativa .....	16
3.1.2	PCR para Homologia .....	18
3.2	CITRICULTURA .....	19
3.3	A MANCHA PRETA DOS CITROS .....	20
3.3.1	Diagnóstico da Mancha Preta dos Citros .....	20
3.4	DETECÇÃO DE <i>Phyllosticta capitalensis</i> .....	21
3.5	DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE PATÓGENOS.....	22
3.6	METAGENÔMICA NA DETECÇÃO DE PATÓGENOS.....	23
3.7	ANÁLISE DE CROMATOGRAMAS.....	24
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO .....	28
4.2	SOLUÇÕES E REAGENTES .....	30
4.2.1	Solução de desoxirribonucleotídeos (dNTP).....	30
4.2.2	Tampão de corrida TBE 5X (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).....	30
4.2.3	Tampão de corrida TBE 1X (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).....	31
4.2.4	Gel de Agarose (0,8%).....	31
4.2.5	Gel de Agarose (1,5%).....	31
4.2.6	Tampão de Amostra 6X (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) .....	32
4.2.7	Tampão de Amostra com GelRed® .....	32
4.2.8	DNA de fago $\lambda$ clivado com enzima <i>HindIII</i> 20ng/ $\mu$ L .....	32
4.2.9	Marcador Molecular <i>Ladder</i> 100pb .....	33
4.2.10	Tris-HCl 1 mol/L pH 8,0 (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) .....	33
4.2.11	Cloreto de Sódio (NaCl) 5 mol/L .....	33
4.2.12	EDTA Dissódico 0,5 mol/L pH 8,0 (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) .....	34
4.2.13	SDS 20% pH 7,2 (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).....	34
4.2.14	Clorofane .....	34
4.2.15	Clorofil.....	35
4.2.16	Tampão de Extração Modificado de Raeder e Broda (1985).....	35
4.2.17	Hidróxido de Sódio 2 mol/L .....	35
4.2.18	Acetato de Potássio 5 mol/L .....	36
4.2.19	Cloreto de Cálcio 0,1 mol/L.....	36
4.2.20	Estreptomicina 50 mg/mL .....	36
4.2.21	Ampicilina 100 mg/mL.....	37
4.2.22	Glicerol 50%.....	37
4.2.23	X-Gal 20 mg/mL.....	37
4.2.24	Solução de Lise Alcalina I (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).....	37
4.2.25	Solução de Lise Alcalina II (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).....	38
4.2.26	Solução de Lise Alcalina III (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).....	38
4.2.27	Acetato de Amônio 7,5 mol/L .....	38
4.3	MEIOS DE CULTURA .....	39
4.3.1	Meio BDA (Meio Ágar-Batata-Dextrose) .....	39
4.3.2	Meio Luria-Bertani (LB) .....	39

4.3.3	Meio Luria-Bertani Agar (LA).....	39
4.4	PRODUÇÃO DE PIPELINE DE AVALIAÇÃO DE CROMATOGRAMAS.....	40
4.5	EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS .....	40
4.5.1	Material fúngico em cultura .....	40
4.5.2	Folhas .....	41
4.5.3	Estimativa da Concentração de Ácidos Nucleicos Totais.....	42
4.6	AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO GENÔMICO GCP .....	42
4.7	AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO GENÔMICO GMF .....	43
4.8	SEQUENCIAMENTO UTILIZANDO VETORES .....	43
4.8.1	Estimativa da Concentração do Produto de PCR para Ligação.....	43
4.8.2	Ligação em vetor de Sequenciamento .....	44
4.8.3	Transformação .....	44
4.8.4	Avaliação dos transformantes por PCR de Colônia .....	46
4.8.5	Manutenção das Colônias em Glicerol.....	46
4.8.6	Minipreparação de DNA Plasmidial.....	47
4.8.7	PCR para Sequenciamento.....	48
4.8.8	Purificação do Produto de PCR para Reação de Sequenciamento .....	48
4.8.9	Reação de Sequenciamento .....	48
4.9	SEQUENCIAMENTO DIRETO .....	49
4.10	ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS .....	49
4.10.1	Análise dos Cromatogramas.....	49
4.10.1.1	Utilização do <i>Pipeline</i> de Avaliação .....	49
4.10.1.2	Remoção do Vetor e Análise .....	50
4.10.2	Desenho de Oligonucleotídeos .....	50
4.10.2.1	PCR Quantitativa .....	50
4.10.2.1.1	Avaliação do Ensaio Proposto.....	51
4.10.2.1.1.1	Comparação com Ensaio GcF1/GcR1 .....	51
4.10.2.1.1.2	Condições Utilizadas com a Sonda Proposta.....	52
4.10.2.2	PCR convencional .....	52
4.10.2.2.1	Gradiente de Temperatura .....	52
4.10.2.2.2	Avaliação comparativa entre os Conjuntos de <i>Primers</i> .....	53
4.10.2.2.2.1	Controle com ITS .....	53
4.10.2.2.2.2	PCR Multiplex da Região GCP/GMF .....	53
4.10.2.2.2.3	PCR Proposta para Detecção de <i>Phyllosticta capitalensis</i> .....	54
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
5.1	<i>PIPELINE</i> DE AVALIAÇÃO .....	55
5.2	EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS .....	55
5.2.1	Material Fúngico em Cultura .....	55
5.2.2	Folhas .....	56
5.2.3	Estimativa da Concentração de Ácidos Nucleicos Totais.....	57
5.3	FRAGMENTO GENÔMICO GCP .....	57
5.3.1	Amplificação .....	57
5.3.2	Estimativa da Concentração do Produto de PCR para Ligação.....	58
5.3.3	Ligação em Vetor de Sequenciamento e Transformação .....	59
5.3.4	Avaliação dos Transformantes por PCR de Colônia .....	59
5.3.5	Minipreparação de DNA Plasmidial.....	61
5.3.6	PCR para Sequenciamento e Purificação do Produto de PCR para Reação de Sequenciamento .....	63
5.3.7	Análise das sequências.....	65
5.3.7.1	Variação das sequências Homólogas a GCP .....	66

5.3.7.2	Busca de Similaridade .....	66
5.3.7.2.1	Região GCP.....	66
5.3.7.2.2	Regiões diversas .....	67
5.3.8	Desenho de <i>Primers</i> para PCR quantitativa.....	67
5.3.8.1	Avaliação Comparativa entre os Conjuntos de Ensaios para qPCR.....	68
5.4	FRAGMENTO GENÔMICO GMF .....	71
5.4.1	Sequenciamento Utilizando Vetor .....	71
5.4.1.1	Amplificação.....	71
5.4.1.2	Estimativa da Concentração do Produto de PCR para Ligação.....	72
5.4.1.3	Ligação em Vetor de Sequenciamento e Transformação .....	73
5.4.1.4	Avaliação dos Transformantes por PCR de Colônia.....	73
5.4.1.5	Minipreparação de DNA Plasmidial .....	75
5.4.1.6	PCR para Sequenciamento e Purificação do Produto de PCR para Reação de Sequenciamento .....	77
5.4.2	Sequenciamento Direto.....	78
5.4.2.1	PCR para Sequenciamento e Purificação do Produto de PCR para Reação de Sequenciamento .....	78
5.4.3	Análise das Sequências .....	79
5.4.3.1	Variação das sequências Homólogas a GMF .....	80
5.4.3.2	Busca de Similaridade .....	81
5.4.3.2.1	Região GMF .....	81
5.4.3.2.2	Regiões Diversas.....	82
5.4.4	Desenho de <i>Primers</i> para PCR Convencional .....	83
5.4.4.1	Gradiente de Temperatura.....	83
5.4.4.2	Avaliação Comparativa entre os Conjuntos de <i>Primers</i> .....	84
5.4.4.2.1	Controle com ITS.....	84
5.4.4.2.2	PCR Multiplex das Regiões GCP/GMF .....	85
5.4.4.2.3	PCR para Detecção de <i>Phyllosticta. capitalensis</i> .....	85
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>87</b>
6.1	EXTRAÇÃO DE DNA .....	87
6.2	DETECÇÃO DE <i>Phyllosticta citricarpa</i> .....	87
6.3	DETECÇÃO DE <i>Phyllosticta capitalensis</i> .....	91
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>94</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>95</b>
	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>105</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira, de volumoso montante financeiro envolvido, apresenta importante papel no cenário mundial graças a sua grande competitividade, relacionada ao – proporcional – baixo custo de produção (MURARO *et al.*, 2005). Todavia, tal diferencial vem desaparecendo, por motivos como a desvalorização do dólar e o aumento da venda de propriedades – gerada pela valorização fundiária (BOTEON; PAGLIUCA, 2010).

Não obstante a tais empecilhos, os pomares são atacados por doenças – que geram danos consideráveis aos cultivares (BARBOSA *et al.*, 2006). Dentre as diversas, a Mancha Preta dos Citros (MPC), relacionada ao fungo *Phyllosticta citricarpa* (Teleomorfo *Guignardia citricarpa*) – doença quarentenária A1 na União Européia (WULANDARI *et al.*, 2009) e até recentemente nos Estados Unidos, mas já detectada na Flórida (SCHUBERT *et al.*, 2010) – que leva a queda prematura (SPÓSITO, 2003; MARIN *et al.*, 2011) e a depreciação visual (KOTZÉ, 1981) dos frutos, com menor lucratividade e maior rejeição no mercado *in natura*. As folhas depositadas sobre o solo servem de ponto de produção e disseminação dos esporos (KOTZÉ, 1981), sendo o elo entre o hábito endofítico e a contaminação dos frutos.

Entretanto, percebeu-se a existência de linhagens, dentro do gênero, com a mesma morfologia de *P. citricarpa*, mas que não causavam os sintomas descritos para a doença (MCONIE, 1964). Igualmente, tal linhagem se mostrou menos restrita quanto ao hospedeiro, infectando uma grande quantidade de espécies vegetais (KOTZÉ, 1981). A grande diferença levou à divisão em duas espécies, *P. citricarpa* e *G. mangiferae* (BAAYEN *et al.*, 2002), a última recentemente alocada como *P. capitalensis* (GLIENKE *et al.*, 2011).

Desde então, são buscadas alternativas para a distinção entre as duas espécies, utilizando métodos baseados em cultivo, como a distinção da produção de halo em meio de cultivo específico (BAAYEN *et al.*, 2002), métodos moleculares como a PCR (EVERETT; REES-GEORGE, 2006; MEYER *et al.*, 2006; PERES *et al.*, 2007; STRINGARI *et al.*, 2009) ou a PCR em tempo real (GENT-PELZER *et al.*, 2007). Além disto, dada a necessidade de velocidade, explora-se a detecção direta no tecido afetado, como em lesões em frutos cítricos (MEYER *et al.*, 2006). Assim, percebe-se uma necessidade de precisão, sensibilidade e velocidade. O presente

trabalho visa, com a utilização de métodos moleculares e regiões de detecção previamente conhecidas, desenvolver metodologias de detecção de *P. citricarpa*, utilizando PCR quantitativa, e para *P. capitalensis*, utilizando PCR convencional, que sejam mais eficientes do que as disponíveis. Na realização deste trabalho, para a construção do conhecimento, através do sequenciamento das regiões previamente utilizadas, será desenvolvida uma ferramenta de bioinformática capaz de auxiliar na análise de cromatogramas e a montagem da sequência consenso dos mesmos.

## 2 OBJETIVOS

- Construir conhecimento sobre a região previamente utilizada (GCP) para diagnóstico do fungo fitopatogênico *P. citricarpa*, avaliando possíveis homólogos em *P. capitalensis* e as sequências amplificadas durante a detecção *in planta*;
- Realizar o desenho de um ensaio baseado em PCR quantitativa para a detecção do fungo *P. citricarpa*, utilizando a região previamente utilizada (GCP) em detecção através de PCR convencional, bem como avaliar a sua eficácia *in vitro*;
- Construir conhecimento sobre a região previamente utilizada (GMF) para a detecção do fungo *P. capitalensis*, avaliando possíveis homólogos em espécies filogeneticamente relacionadas e as sequências amplificadas durante a detecção *in planta*;
- Aprimorar o ensaio utilizado para a detecção de *P. capitalensis* de forma a tornar o mesmo mais específico, especialmente frente as espécies *P. citribraziliensis*, *P. brazilianiae* e *G. mangiferae*.
- Desenvolver um *pipeline* de avaliação do resultado de sequenciamentos, que envolva a chamada de bases e a montagem das sequências consenso, bem como a avaliação da qualidade do resultado obtido.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 PCR

A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) consiste na amplificação de fragmentos genômicos lançando mão de uma DNA polimerase, nucleotídeos, um par de *primers* e o DNA molde em condições químicas adequadas, realiza a amplificação exponencial de fragmentos específicos de DNA de forma rápida e prática (WINK, 1994).

Sua criação é creditada a Kary Mullis, em 1983, inicialmente utilizada na detecção da Anemia Falciforme (SAIKI *et al.*, 1985) – trabalho que já credita a publicação, ainda no prelo, de Mullis (MULLIS; FALOONA, 1987) Entretanto, as linhas gerais da técnica já haviam sido delineadas em trabalho publicado 12 anos antes (KLEPPE *et al.*, 1971), onde ocorreu a amplificação de um fragmento utilizando apenas um *primer* e a sugestão do trabalho em pares está colocada na discussão. Entretanto, como nenhum dado prático foi colocado, muito provavelmente pela dificuldade – da utilização de polimerases não-estáveis termicamente, descritas apenas 5 anos depois (CHIEN *et al.*, 1976) – a comunidade científica acabou creditando a Mullis a autoria do método. De qualquer forma, Mullis, no depósito das duas patentes envolvidas com a PCR (MULLIS *et al.*, 1987; MULLIS, 1987) sequer tenta demonstrar que seu trabalho é original perante o de Kleppe, o realizando apenas com outros trabalhos de alguma similaridade.

##### 3.1.1 PCR Quantitativa

Observar o surgimento dos fragmentos amplificados de forma contínua e em tempo real propicia a quantificação precisa do material presente na amostra avaliada (HEID *et al.*, 1996). Não bastando tal vantagem, o método apresenta sensibilidade de detecção superior a PCR tradicional, que esbarra no limite de detecção dos corantes utilizados para a visualização do produto amplificado (AHN *et al.*, 1996). Para sua utilização, duas diferentes metodologias foram estabelecidas e são

usualmente utilizadas: com o corante Sybr Green I (SCHNEEBERGER *et al.*, 1995) ou através do sistema TaqMan (HOLLAND *et al.*, 1991; LIVAK *et al.*, 1995). Ambas consistem na realização da PCR em um equipamento capaz de medir a fluorescência ciclo a ciclo emitida pela reação, sendo a primeira consistindo na utilização de um corante de DNA apenas em fita dupla (mostrando o aumento da quantidade de qualquer região) e o segundo na atividade exonucleásica a jusante da *Taq* DNA polimerase, clivando uma sonda não-extensível cujo ponto de anelamento se dá no meio da região amplificada (aumentando, assim, a sensibilidade do método). Independente do método de escolha, ambas se mostram eficazes na detecção de diminutas quantidades de DNA alvo (como no caso da amplificação de amostras ambientais), na precisa quantificação da presença de um patógeno (HEID *et al.*, 1996) e no próprio diagnóstico (LOUWS *et al.*, 1999).

O resultado obtido ao final do experimento é o valor de  $C_t$  (*Cycle Threshold*) da amostra em questão, que é o ciclo da reação em que a fluorescência observada ultrapassa um valor definido (FIGURA 1). Tal valor é definido acima da linha de base (valor de fluorescência basal das amostras), logo ao início da fase de aumento log-linear da fluorescência, podendo ser a definição realizada de forma manual (onde o próprio pesquisador define o ponto), pelo melhor ajuste de  $R^2$  da curva de calibração (ponto onde o ajuste da curva, com diluições seriadas e conhecidas do DNA, alcance o maior valor) ou utilizando métodos proprietários dos softwares (QIAGEN, 2010).

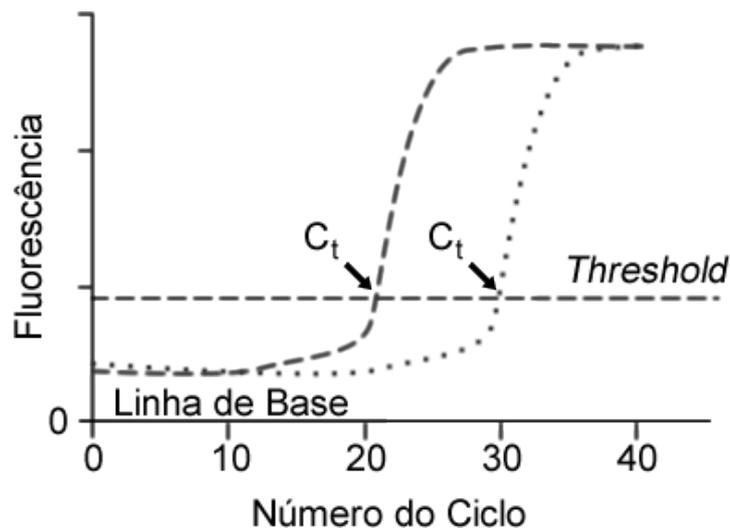


FIGURA 1 - PRINCÍPIO GERAL DA AVALIAÇÃO DO RESULTADO DA PCR QUANTITATIVA  
 FONTE: MODIFICADO DE QIAGEN (2010)

A produção da curva de calibração se dá com a diluição seriada de uma amostra de concentração conhecida (ou desconhecida, mas utilizada como referencial) que é amplificada concomitantemente as demais amostras e, a partir dos valores de  $C_t$  obtidos para ela, é construído um gráfico relacionando concentração e ciclo em que é detectada a amplificação. Assim, é possível estimar a quantidade relativa de material presente nas amostras desconhecidas (QIAGEN, 2010).

Outro parâmetro avaliado nos resultados da PCR quantitativa é a eficiência da amplificação. Sua estimativa é a porcentagem obtida da amplificação em função do teórico máximo da reação. No início das análises, este próprio teórico máximo era utilizado como padrão, mas percebeu-se que nem todas as reações apresentavam a mesma eficiência. Assim, dois métodos são utilizados: basear a eficiência na tangente do ângulo de inclinação da reta de calibração ou realizar o ajuste amostra-amostra. A primeira abordagem acaba sendo mais generalizada e menos particular de cada amostra, entretanto não sofre com o excesso de desvio gerado pela avaliação de cada amostra (RUIJTER *et al.*, 2009).

Entretanto, a alta sensibilidade pode trazer problemas em determinadas situações como, por exemplo, na detecção de 16S rDNA bacteriano em amostras sob teste de esterilidade. Corless *et al.* (2000) aponta como principal problema os reagentes utilizados para a confecção da reação, principalmente a própria enzima DNA polimerase – obtida de superexpressão heteróloga em *E. coli*, cujo DNA se torna um importante contaminante. Também levantaram os problemas envolvendo o material plástico utilizado que, se não for completamente livre de DNA, pode levar a amplificação inespecífica.

### 3.1.2 PCR para Homologia

De longa data, particularmente desde o início da utilização da PCR, é sabido que os parâmetros envolvendo o anelamento dos *primers* são essenciais para a determinação da especificidade da amplificação de um alvo (SAIKI *et al.*, 1988). Assim, uma estratégia utilizada para a amplificação de fragmentos genômicos homólogos é a PCR em condições menos estridentes, ou seja, com menor temperatura de anelamento ou bases degeneradas. Utilizando esta técnica, espera-se que, os três últimos nucleotídeos do *primer* são essenciais para a amplificação e

precisam anelar, os demais não apresentam necessidade de homologia completa, com até 64% de *mismatch* (SOMMER; TAUTZ, 1989).

### 3.2 CITRICULTURA

O gênero *Citrus*, pertencente a família Rutaceae e é um dos cultivares frutícolas mais importantes do mundo, sendo produzido em regiões tropicais e subtropicais (TALON; GMITTER, 2008). Acredita-se que o cultivo humano de Citros iniciou-se na China e no Sudeste Asiático, onde seu manejo já data de mais de 4000 anos (SINGH; RAJAM, 2009).

O Brasil, importante produtor mundial de Citros, respondeu por 17,2% da produção mundial em toneladas em 2010. Desde 1983 o país ultrapassou os, na época maiores produtores mundiais, Estados Unidos - em toneladas produzidas por ano – sendo que somente em 2008 a China assumiu a liderança da produção mundial. No ano de 2010, os cinco maiores produtores mundiais foram a China (23,9 Milhões de Toneladas), o Brasil (21,3 Milhões de Toneladas), a Índia (10,3 Milhões de Toneladas), os Estados Unidos (9,9 milhões de Toneladas) e o México (6,8 milhões de Toneladas) (FAO, 2012). Tal produção representa uma grande importância econômica, não só para o país, como para todo o mundo (TALON; GMITTER, 2008).

Entretanto, tamanha produção não simboliza uma alta produtividade. Igualmente no ano de 2010, a produtividade brasileira foi de 225.039,89 hg/ha, cerca de 60% dos 350.460,34 hg/ha alcançados pela Indonésia, país com a maior produtividade no ano (FAO, 2012). Tal produtividade baixa pode ser explicada pelo clima inadequado - com a grande presença de choques climáticos - e pelos problemas fitossanitários presentes no país (BOTEON; PAGLIUCA, 2010).

### 3.3 A MANCHA PRETA DOS CITROS

Dentre os problemas fitossanitários que assolam os cultivares cítricos está a Mancha Preta dos Citros (MPC), causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa* (Teleomorfo: *Guignardia citricarpa*), cuja fase sexual foi descrita por Kiely em 1948 (KOTZÉ, 1981). Seus hospedeiros são espécies do gênero *Citrus*, lesionando a casca dos frutos e, também, ramos e folhas. O principal problema ocasionado é a depreciação visual dos frutos para a comercialização no mercado interno, a queda prematura e as barreiras fitossanitárias pelo fruto ser considerado praga Quarentenária A1 na União Europeia. (SPÓSITO, 2003). Até recentemente, a doença apresentava a mesma classificação nos Estados Unidos, entretanto, foi detectada na Flórida (SCHUBERT *et al.*, 2010).

Kotzé (1981) ressalta a importância econômica da doença pela depreciação visual dos frutos – que se tornariam inaceitáveis à exportação. Entretanto, como os efeitos não comprometeriam a porção interna do fruto, Kotzé (1981) comenta que (em tradução livre) “a importância econômica da MPC tem muito a ver com a psicologia humana. Se laranjas manchadas tornarem-se moda, a MPC vai perder a maior parcela de seu efeito econômico como doença”. Todavia, a queda prematura, já elencada, é um importante fator de perdas financeiras ao produtor (SPÓSITO, 2003).

O ciclo de vida do fungo contém sua fase sexual nas folhas caídas ao solo, onde ocorre a formação dos ascósporos e os mesmos são levados pelo vento até a planta. Lá, infectam principalmente os frutos, causando lesões com 1-5mm de diâmetro e também habitam as folhas - sem causar lesões quando a pressão de inoculo é baixa. Nestas lesões são produzidos picnídios que podem ser espalhados com o impacto da chuva para outras folhas e frutos (SCHUBERT *et al.*, 2010).

#### 3.3.1 Diagnóstico da Mancha Preta dos Citros

O diagnóstico da MPC se mostra complexo. Relatos da existência de linhagens patogênicas e não-patogênicas (KOTZÉ, 1981) habitando lesões, que não da MPC,

são conhecidos de longa data. Há apenas uma década explicou-se a existência dessa variedade não virulenta com a existência de uma espécie distinta, de múltiplos hospedeiros e não patogênica - no momento denominada *Guignardia mangiferae* (BAAYEN *et al.*, 2002). A partir de então, diversos estudos foram realizados na tentativa de desenvolvimento de um ensaio utilizando ferramentas moleculares (ADAMOSKI *et al.*, 2010a; EVERETT; REES-GEORGE, 2006; GENT-PELZER *et al.*, 2007; MEYER *et al.*, 2006; PERES *et al.*, 2007) a fim de distingui-las, visto que são morfológicamente idênticas, mas de consequências distintas para a produção citrícola.

Recentemente, Glienke. *et al.* (2011), utilizando sequenciamento multigênico, demonstrou que o grupo de espécies do gênero *Phyllosticta* associadas a patogenicidade em citros seria ainda mais complexo. *G. mangiferae* tornou-se distinta do até então proposto, postulando-se uma terceira nomenclatura, a ser utilizada com este organismo, de amplo espectro e não patogênico em citros, agora *Phyllosticta capitalensis*. O trabalho também definiu outras espécies como *P. brazilinae*, compartilhando o ancestral comum com o clado *G. mangiferae*-*P. capitalensis* além de *P. citribraziliensis*, mais próxima a *P. citricarpa*. Assim, a detecção das espécies de *Phyllosticta* associadas a citros tornou-se mais complexa e necessária a revisão dos métodos disponíveis.

#### 3.4 DETECÇÃO DE *Phyllosticta capitalensis*

O fungo *P. capitalensis* fora inicialmente colocado como uma linhagem de *P. citricarpa* não-patogênica a citros (KOTZÉ, 1981), dada a grande similaridade morfológica observada. Entretanto, com a realização de sequenciamento de introns de espaçadores da região de rDNA (ITS) e a análise das sequências obtidas, pode-se elevar a, então, linhagem ao nível de espécie (BAAYEN *et al.*, 2002). Inicialmente, o nome dado ao fungo fora *G. mangiferae*, dada a crença de o mesmo ser uma espécie previamente descrita isolada de manga, na Índia (BAAYEN *et al.*, 2002), entretanto, análises multigênicas posteriores demonstraram a existência de outra espécie habitando folhas de manga naquele país, então denominada *G. mangiferae*, necessitando distinguir a mesma desta espécie que habita folhas

cítricas de forma não prejudicial, renomeada novamente para *P. capitalensis* (GLIENKE *et al.*, 2011). Também, assume-se que a espécie é a responsável por ocasionar lesões em Orquídeas (OKANE *et al.*, 2003).

Desde então a distinção entre as duas linhagens mostra-se complicada, dada a possibilidade de *P. capitalensis* coabitar lesões de *P. citricarpa* ou até mesmo de outros patógenos não quarentenários (FABRIS, 2009). Baayen *et al* (2002) propuseram um ensaio morfológico utilizando um marcador em meio de cultura, que demonstrou ineficiência quando avaliado contra uma grande quantidade de isolados (STRINGARI, 2009). Assim, foram propostos ensaios mais rápidos, baseados em PCR, utilizando uma sequência obtida através de análises de RAPD, denominada GMF (KAVA-CORDEIRO, 2004) e sequências ITS (MEYER *et al.*, 2006). Entretanto, tais ensaios não foram avaliados perante a real espécie *G. mangiferae*, e sua eficiência de detecção de *P. capitalensis* sobre a mesma ainda são desconhecidas.

### 3.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE PATÓGENOS

De longa data, reconhece-se a utilidade das ferramentas moleculares para a detecção de patógenos diversos, inclusive em ambientes agrônomicos (HENSON; FRENCH, 1993). Desde o advento da amplificação direcionada e seletiva de fragmentos de DNA através da PCR, tal abordagem é largamente utilizada em situações acadêmicas e em penetração em situações reais de diagnóstico, graças à eficiência e velocidade, esbarrando na lenta redução dos custos frente a técnicas menos sensíveis – mas ainda aceitáveis em situações agrônomicas (MARTIN *et al.*, 2000) e em substituição em situações clínicas (MCCARTNEY *et al.*, 2003).

A PCR é uma técnica que rapidamente se espalha na detecção de patógenos pela sua versatilidade superior quando comparada a outros métodos de detecção. Por exemplo, podem ser desenhados ensaios para a detecção de um único ou vários patógenos, inclusive simultaneamente (HENSON; FRENCH, 1993).

Há, entretanto, uma grande variação dentro da própria técnica. Por exemplo, podem ser utilizados pequenos oligonucleotídeos randômicos que geram um padrão de amplificação distinto frente a distintas espécies de organismos, técnica denominada como *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD), de utilização

como marcador molecular (WELSH; MCCLELLAND, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1990). Pode ser utilizado para a avaliação da variação intraespecífica e interespecífica de fitopatógenos (MUNAUT *et al.*, 1998), para a identificação de espécies (STRINGARI, 2009) ou para o desenho de ensaios baseados nas sequências obtidas, como PCR espécie-específica (STRINGARI *et al.*, 2009; ADAMOSKI *et al.*, 2010b). Entretanto, a técnica falha ao necessitar do DNA de cada indivíduo isolado, ou seja, de passos envolvendo o cultivo do micro-organismo (HENSON; FRENCH, 1993).

Outra utilização de método baseado na mesma técnica é a PCR espécie-específica, largamente utilizada na pesquisa, que seria capaz de amplificar um fragmento de DNA específico utilizando sequências flanqueadoras conservadas unicamente na espécie em estudo, de uso na área clínica (POLLARD *et al.*, 1990; TZINABOS *et al.*, 1989) e agrônômica (STRINGARI, *et al.*, 2009).

Outra modificação da técnica, consistindo na utilização de sondas (LIVAK, *et al.*, 1995) ou substâncias (WITTEWER *et al.*, 1997) fluorescentes, denominada PCR em Tempo Real, pode alcançar alta sensibilidade, já sendo utilizada em situações agrônômicas (SCHAAD, 2002).

### 3.6 METAGENÔMICA NA DETECÇÃO DE PATÓGENOS

É conhecido de longa data que, a diversidade da microbiota ainda desconhecida - pela incapacidade dos meios de cultivo disponíveis suprirem as necessidades fisiológicas dos microrganismos - é colossal (HUGENHOLTZ; PACE, 1996), tanto tratando-se de bactérias como de fungos (RONDON *et al.*, 2000). Consideram-se as possibilidades desse universo desconhecido auxiliar na manutenção dos problemas já existentes envolvidos com patógenos (AMINOV *et al.*, 2001) ou no surgimento de genes de resistência, por exemplo, a antibióticos (RIESENFELD *et al.*, 2004).

Sabe-se que, graças à dinâmica de diversas doenças, exige-se a detecção rápida e segura dos patógenos. Para tanto, é necessário reduzir o tempo entre a coleta da amostra e a emissão do resultado, objetivo alcançado com a remoção das longas etapas de cultivo dos organismos. Tal feito é realizado com abordagens independentes de cultivo, onde o material genético é obtido diretamente do meio possivelmente infectado. Esta abordagem já é, de longa data, explorada em situações clínicas (ESPINOZA *et al.*, 1996), mas também em ambientes de

agricultura comercial (WALSH *et al.*, 2011), demonstrando a viabilidade da técnica na detecção de fitopatógenos – o que já fora proposto, mas não praticado, anteriormente (HENSON; FRENCH, 1993). A detecção independente de cultivo de *P. citricarpa* se mostrou plausível com amostras provenientes das lesões na casca do fruto (MEYER *et al.*, 2006), todavia, em tal abordagem a doença já está causando danos e a detecção não apresenta caráter preventivo, apenas confirmativo, fazendo-se necessária a detecção do organismo quando ainda latente, em forma endofítica (ADAMOSKI *et al.*, 2010b). Portanto, desenvolveram-se metodologias capazes de detectar o fungo diretamente do tecido foliar, como Adamoski *et al.* (2011a), adaptando a metodologia previamente disponível (STRINGARI *et al.*, 2009), ou Meyer *et al.* (2012), igualmente adaptando metodologia previamente disponível (MEYER *et al.*, 2006). Entretanto, a primeira proposta utiliza as folhas recebidas do campo e liofilizadas, enquanto a segunda – pela reduzida sensibilidade – demanda de um protocolo de enriquecimento micelial que pode levar até 10 dias envolvendo laborioso processo de secar-e-umedecer as folhas a serem processadas além da realização de duas PCR seguidas para a detecção.

### 3.7 ANÁLISE DE CROMATOGRAMAS

A análise de cromatogramas gerados por sequenciadores automáticos de DNA é um ponto crítico de qualquer trabalho envolvendo a técnica, visto a importância que tais dados têm assumido (CHOU; HOLMES, 2001). Qualquer metodologia utilizada terá pontos fracos e erros, como a lentidão e imparcialidade da análise visual ou a demanda de conhecimento técnico relacionado às análises com apoio estatístico e os tipos de erro associados. Fruto do trabalho do grupo liderado por Phil Green, o PHRED (EWING; GREEN, 1998; EWING *et al.*, 1998), sigla para *Phil's revised editor* (BROWNLIE, 2004) foi e ainda é amplamente utilizado na avaliação da qualidade de bases e contorno do problema em questão.

O pacote PHRED introduziu o conceito de “valores de qualidade” para cada uma das bases, ou simplesmente o “PHRED value”, que associa uma probabilidade a cada pico do sequenciamento. Todavia, a idéia de um valor de qualidade para cada uma das bases não foi criação do grupo de Green. Seis anos antes, o grupo liderado por Rodger Staden, já postulava que tal abordagem poderia ampliar a

qualidade da análise de cromatogramas, principalmente na montagem de genomas (DEAR & STADEN, 1992). O desenvolvimento do pacote de análise foi mais lento e a publicação oficial (STADEN, 2000) do pacote Staden (formado por pregap4, trev, gap4 e spin) só aconteceu 2 anos depois do pacote PHRED. Mesmo pioneiros, o pregap4, que realiza a chamada de bases, acabou por utilizar o próprio PHRED para a definição destas probabilidades de erro. Curiosamente, o artigo do grupo de Phil Green omite que o grupo de Rodger Staden foi o primeiro a postular a utilização de qualidade de base para a avaliação e montagem de sequencias consenso (EWING; GREEN, 1998; EWING *et al.*, 1998).

A determinação do *PHRED value* é em escala logaritmica, ou seja, um valor 10 implica em 90% de probabilidade da chamada de base estar correta, enquanto 20 nos dá 99%, 30 representa 99,9% e assim por diante. Para iniciar a análise, o PHRED acaba por ignorar qualquer chamada de base anterior (por exemplo, realizada pelo programa do seu sequenciador) e gera os próprios resultados. Após uma breve normalização dos traços, o processo de *basecalling* é composto de 4 partes (EWING; GREEN, 1998; EWING *et al.*, 1998), essencialmente:

1 – Definir um traço ideal, com posições ideais. O programa encontra os picos de forma generalizada, definindo “pico” como a flutuação no traço de um dos nucleotídeos que a) tenha um sinal de ao menos 10% da intensidade do pico imediatamente anterior e b) obrigatoriamente seja maior que o sinal das outras bases na mesma região. Com o traço geral produzido, os picos “ideais” são gerados com uma largura de 25% da distância pico-a-pico.

2 – Chamada de bases de cada um dos traços, de forma completa. Todos os traços são chamados, incluindo picos que não seguem as regras a e b acima colocadas.

3 – Comparação do traço ideal com o traço real. Busca-se traçar um paralelo entre ambos, ocorrendo a omissão de bases ou a junção de picos, por exemplo.

4 – Encaixe das bases que não foram chamadas no passo 3.

Com as bases chamadas, o programa pode então partir para a definição do *PHRED value*, ponto de grande importância para as análises subsequentes. O valor da qualidade é definido por (FÓRMULA 1):

$$q = -10 \log_{10}(p)$$

FÓRMULA 1 - DEFINIÇÃO DO PHRED VALUE (Q) EM FUNÇÃO DA PROBABILIDADE DA BASE

Onde 'q' é a qualidade e 'p' a probabilidade de erro da base. O motivo da utilização de logaritmo é para facilitar a visualização do valor, visto que probabilidades são comumente associadas a valores diminutos, com muitos decimais.

A determinação do valor de 'p' é realizada por um algoritmo complexo, lançando mão de uma tabela de aprendizado virtual utilizando conjuntos de dados de mais de 25 milhões de picos envolvidos em mais de 40 mil sequenciamentos de cosmídeos de sequência previamente conhecida (EWING *et al.*, 1998). Com o aprendizado, foram definidos os parâmetros (EWING; GREEN, 1998) indicados para a avaliação da qualidade de uma base:

1 – Espaçamento entre os picos. É definido por uma razão entre a maior distância e a menor distância entre dois picos adjacentes, quando observadas 7 bases (3 a montante e 3 a jusante da base em questão). Quanto mais próximo de 1, menor é a diferença e mais homogênea é a região.

2 – Taxa de bases Não-chamadas/Chamadas, observando 7 bases. Faz-se uma proporção – agora – entre a maior intensidade de uma base não-chamada e a menor intensidade de uma base chamada. Na ausência de bases não-chamadas na região é utilizada a maior intensidade de traço não considerado base na região. Agora temos a melhor qualidade quando o valor chega a 0.

3 - Taxa de bases Não-chamadas/Chamadas, observando 3 bases. Análoga a anterior.

4 – Resolução do Pico. É o número de bases entre a atual e a base "N" (Não resolvida) mais próxima. É multiplicado por -1 para que seu menor valor seja o menor (que representa a metade do número de bases no traço).

O programa consulta uma "tabela", criada com o mecanismo de aprendizagem virtual, que contém o valor de probabilidade associado com os escores submetidos.

Entretanto, apenas chamar as bases não é suficiente para a montagem de uma sequência consenso a partir de diversas leituras, seja qual for o tamanho da mesma. O próximo programa do pacote é denominado PHRAP, de *Phragment Assembly Program* ou *Phil's Revised Assembly Program* (BROWNLEE, 2004). Ele realiza o alinhamento das 'n' sequências ditas como parte de um único fragmento e nos dá o consenso ou *contig* (quando falamos de diversos fragmentos unidos

montando uma longa porção genômica). É um pacote composto por ele próprio (PHRAP), Cross\_match e o Swat. O Phrap tem o objetivo de montar as sequências com base nos cromatogramas fornecidos. Cross\_match é uma versão própria similar a um BLAST, que serve para buscar uma sequência menor numa maior. Swat é uma implementação de dois algoritmos de alinhamento - Smith-Waterman e Needleman-Wunsch - que faz o encaixe de sequências. Tudo funciona em conjunto para a produção da consenso. Curiosamente, só é disponibilizado o manual do programa, sem nenhuma publicação associada (GREEN, 1999).

O algoritmo basicamente busca pares de sequências que alinhem, eliminando as leituras duplicadas e gerando um escore de cada alinhamento. Nesse processo, também pode realizar a indicação de prováveis trechos de vetores (caso a origem das sequências seja de material clonado) que não serão utilizados na montagem. São eliminadas as que alinham consigo mesmas e que não alinharam de forma sólida. Após isso, a sequência consenso final é montada e algumas das leituras descartadas são encaixadas.

Para a visualização do resultado, o último programa do pacote Consed (*Consensus editor*) (BROWNLEE, 2004) e do Autofinish, tem por objetivo a visualização gráfica e edição do resultado da análise (GORDON *et al.*, 1998).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

As linhagens fúngicas utilizadas estão depositadas na coleção de culturas de microrganismos do Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM) da Universidade Federal do Paraná.

Para os ensaios utilizando a sequência GCP, do diagnóstico de *P. citricarpa*, e a sequência GMF, da detecção de *P. capitalensis*, foram utilizadas as linhagens do QUADRO 1. As folhas 08, 13 e 26 foram coletadas das mesmas plantas dos isolados indicados e foram remetidas com o prefixo FL.

Os isolados tiveram sua identificação por PCR Multiplex (FABRIS, 2009) e sequenciamento das regiões ITS do rDNA (STRINGARI, 2009) e, posteriormente, validados por análise filogenética multilocus (GLIENKE *et al.*, 2011), especialmente das espécies *P. citribraziliensis*, *G. mangiferae* e *P. brazilianiae*.

Para a realização das clonagens, utilizou-se a linhagem TOP10 (Genótipo: F-endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL  $\Delta$ lacX74  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 araD139  $\Delta$ (ara,leu)7697 mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\lambda$ -) de *Escherichia coli*, de resistência cromossômica a Estreptomicina, conferida pela alteração na proteína S12 da subunidade ribossomal 30S (rpsL).

Hospedeiro	Origem	Tecido	Espécie	Linhagem
Lima Ácida "Tahiti"	Conchal - SP	Fruto	<i>P. capitalensis</i>	LGMF001 <sup>a,d</sup>
	Conchal - SP	Fruto	<i>P. capitalensis</i>	LGMF002 <sup>a,d</sup>
	Conchal - SP	Fruto	<i>P. capitalensis</i>	LGMF003 <sup>a,d</sup>
	Conchal - SP	Folha	<i>P. citricarpa</i>	LGMF004 <sup>a,d</sup>
	Conchal - SP	Fruto	<i>P. citricarpa</i>	LGMF005 <sup>a,d</sup>
	Conchal - SP	Fruto	<i>P. citricarpa</i>	LGMF006 <sup>a,d</sup>
Limão	Rio Negro - PR	Folha	<i>P. citribraziliensis</i>	LGMF011 <sup>e</sup>
Laranja	Cerro Azul - PR	Fruto	<i>P. citricarpa</i>	LGMF025 <sup>b</sup>
Tangerina Mexerica	Cerro Azul - PR	Fruto	<i>P. citricarpa</i>	LGMF041 <sup>b</sup>
	Doutor Ulysses - PR	Fruto	<i>P. citricarpa</i>	LGMF052 <sup>b</sup>
Tangerina Montenegrina	Cerro Azul - PR	Fruto	<i>P. citricarpa</i>	LGMF076 <sup>b</sup>
	Doutor Ulysses - PR	Fruto	<i>P. citricarpa</i>	LGMF092 <sup>b</sup>
Tangerina Ponkan - Planta A	Cerro Azul - PR	Folha 13		
	Cerro Azul - PR	Fruto	<i>P. citricarpa</i>	LGMF152 <sup>b</sup>
	Cerro Azul - PR	Fruto	<i>P. citricarpa</i>	LGMF153 <sup>b</sup>
	Cerro Azul - PR	Fruto	<i>P. citricarpa</i>	LGMF154 <sup>b</sup>
Tangerina Ponkan - Planta B	Cerro Azul - PR	Folha 26		
	Cerro Azul - PR	Fruto	<i>P. citricarpa</i>	LGMF186 <sup>b</sup>
	Cerro Azul - PR	Fruto	<i>P. citricarpa</i>	LGMF187 <sup>b</sup>
	Cerro Azul - PR	Fruto	<i>P. citricarpa</i>	LGMF189 <sup>b</sup>
	Cerro Azul - PR	Fruto	<i>P. citricarpa</i>	LGMF191 <sup>b</sup>
	Cerro Azul - PR	Folha	<i>P. citricarpa</i>	LGMF309 <sup>c</sup>
Manga	Índia	Folha	<i>G. mangiferae</i>	IMI 260576 <sup>f</sup>
	Pompéia - SP	Folha	<i>P. brazilianiae</i>	LGMF330 <sup>c</sup>
	Pompéia - SP	Folha	<i>P. capitalensis</i>	LGMF332 <sup>c</sup>
Tangerina Ponkan	Cerro Azul - PR	Folha	<i>P. capitalensis</i>	LGMF303 <sup>c</sup>
	Cerro Azul - PR	Folha	<i>P. capitalensis</i>	LGMF304 <sup>c</sup>
	Cerro Azul - PR	Folha	<i>P. capitalensis</i>	LGMF305 <sup>c</sup>
Laranja	Cerro Azul - PR	Folha 08		
	Cerro Azul - PR	Folha	<i>P. capitalensis</i>	LGMF218 <sup>c</sup>
	Cerro Azul - PR	Folha	<i>P. capitalensis</i>	LGMF219 <sup>c</sup>
	Cerro Azul - PR	Folha	<i>P. capitalensis</i>	LGMF220 <sup>c</sup>
	Cerro Azul - PR	Folha	<i>P. capitalensis</i>	LGMF221 <sup>c</sup>
	Cerro Azul - PR	Folha	<i>P. capitalensis</i>	LGMF222 <sup>c</sup>
	Cerro Azul - PR	Folha	<i>P. capitalensis</i>	LGMF223 <sup>c</sup>
	Cerro Azul - PR	Folha	<i>P. capitalensis</i>	LGMF224 <sup>c</sup>

QUADRO 1 - LISTA DO MATERIAL BIOLÓGICO ENVOLVIDO NO PRESENTE ESTUDO

NOTA: A - Isolados gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Antonio de Goes (BALDASSARI *et al.*, 2007); B - Isolados pertencentes ao LabGeM e obtidos por Fabris (2009); C - Isolados pertencentes ao LabGeM e obtidos por Stringari (2009); D - Isolados com teste de patogenicidade realizado (BALDASSARI *et al.*, 2007); E - Isolado pertencente ao LabGeM e obtido por Glienke (1999); F - Linhagem isolada por M.V. Leksshmi e adquirida da Coleção do *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS) *Fungal Diversity Centre*.

## 4.2 SOLUÇÕES E REAGENTES

### 4.2.1 Solução de desoxirribonucleotídeos (dNTP)

Desoxiadenosina trifosfato (dATP)	25 µL
Desoxitimidina trifosfato (dTTP)	25 µL
Desoxiguanosina trifosfato (dGTP)	25 µL
Desoxicitosina trifosfato (dCTP)	25 µL
Água ultrapura autoclavada	q.s.p. 1000 µL

As soluções estoque a 100 mmol/L de cada um dos quatro desoxirribonucleotídeos (Ludwig Biotec) foram homogeneizadas utilizando ponteiras com filtro e a água ultrapura autoclavada foi adicionada. A concentração final de cada um dos dNTPs na solução foi de 2,5 mmol/L. A solução foi fracionada e armazenada a -20°C até o uso.

### 4.2.2 Tampão de corrida TBE 5X (SAMBROOK; RUSSELL, 2001)

Tris	54 g
Ácido Bórico	27,5 g
EDTA Dissódico	4,65 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

Os componentes foram adicionados a 800 mL de água, a solução autoclavada, o volume ajustado para 1000 mL com água destilada e mantida a temperatura ambiente até o momento do uso.

#### 4.2.3 Tampão de corrida TBE 1X (SAMBROOK; RUSSELL, 2001)

TBE 5X (Item 4.2.2)	200 mL
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

A solução foi mantida a temperatura ambiente até o momento do uso.

#### 4.2.4 Gel de Agarose (0,8%)

Agarose	0,8 g
Tampão TBE 1X (Item 4.2.3)	100 mL

A agarose foi adicionada ao tampão TBE 1X e aquecida em micro-ondas até a completa dissolução da mesma.

#### 4.2.5 Gel de Agarose (1,5%)

Agarose	1,5 g
Tampão TBE 1X (Item 4.2.3)	100 mL

O procedimento foi igual ao item 4.2.4.

#### 4.2.6 Tampão de Amostra 6X (SAMBROOK; RUSSELL, 2001)

Azul de Bromofenol (Sal de Sódio)	250 mg
Xileno Cianol	250 mg
Glicerol	30 mL
Água	q.s.p. 100 mL

A solução teve o pH ajustado para 8,0 com Hidróxido de Sódio 0,1M e foi mantida a 4°C até a utilização.

#### 4.2.7 Tampão de Amostra com GelRed®

Tampão de amostra (Item 4.2.6)	990 µL
GelRed® em DMSO (10.000x)	10 µL

A solução foi mantida a -20°C e protegida da luz até a utilização.

#### 4.2.8 DNA de fago λ clivado com enzima *Hind*III 20ng/µL

DNA de λ/ <i>Hind</i> III 0.5 µg/µL	0,4 µL
Tampão de Amostra (It. 4.2.6 ou 4.2.7)	3 µL
Água ultrapura	6,8 µL

A solução foi preparada utilizando ponteiras com filtro e mantida a -20°C até a utilização. Quando indicado, foi utilizado o Tampão de Amostra com GelRed®.

#### 4.2.9 Marcador Molecular *Ladder* 100pb

<i>Ladder</i> 100pb Ludwig Biotec	2,5 $\mu$ L
Tampão de Amostra (It. 4.2.6 ou 4.2.7)	3 $\mu$ L
Água ultrapura	4,5 $\mu$ L

A solução foi preparada utilizando ponteiras com filtro e mantida a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a utilização. Quando indicado, foi utilizado o Tampão de Amostra com GelRed® (Item 4.2.7). Aplicando o volume total, segundo o fabricante, a banda mais intensa (500 pb) contém 45 ng de DNA.

#### 4.2.10 Tris-HCl 1 mol/L pH 8,0 (SAMBROOK; RUSSELL, 2001)

Tris	121,1 g
Ácido Clorídrico 37%	42 mL
Água ultrapura	q.s.p. 1000 mL

O Tris foi adicionado a 800 mL de água ultrapura e dissolvido. A seguir, os 42 mL de Ácido Clorídrico foram adicionados e o pH ajustado para 8,0 com mais Ácido Clorídrico 37%, caso necessário. O volume foi completado para 1000 mL com Água ultrapura e os ajustes finais do pH realizados. A solução foi mantida a  $4^{\circ}\text{C}$  até a utilização.

#### 4.2.11 Cloreto de Sódio (NaCl) 5 mol/L

NaCl	292,21 g
Água ultrapura	q.s.p. 1000 mL

O NaCl foi dissolvido em 800 mL de água ultrapura e o volume completado para 1000 mL. A solução foi esterilizada em autoclave por 20 minutos a 1 atm e armazenada em temperatura ambiente.

#### 4.2.12 EDTA Dissódico 0,5 mol/L pH 8,0 (SAMBROOK; RUSSELL, 2001)

EDTA Dissódico	186,1 g
NaOH	20 g
Água ultrapura	q.s.p. 1000 mL

O EDTA foi dissolvido em 800 mL de água ultrapura sob agitação e com a adição de pérolas de NaOH, até a obtenção de pH 8,0. A solução foi esterilizada em autoclave por 20 minutos a 1 atm e armazenada em temperatura ambiente.

#### 4.2.13 SDS 20% pH 7,2 (SAMBROOK; RUSSELL, 2001)

Dodecil Sulfato de Sódio	200 g
Água ultrapura	q.s.p. 1000 mL

O SDS foi dissolvido em 900 mL de água ultrapura aquecida a 68°C sob baixa agitação. O pH foi ajustado para 7,2 com auxílio de HCl 0,1 mol/L e o volume completado para 1000 mL. A solução não foi esterilizada e foi armazenada a temperatura ambiente.

#### 4.2.14 Clorofane

Clorofórmio	100 mL
Fenol Saturado	100 mL

O clorofórmio foi adicionado ao fenol saturado em capela de exaustão. A quantia que bastasse de Tris-HCl 1 mol/L pH 8,0 foi adicionada para cobrir a porção

em contato com o ar. A solução não foi esterilizada e foi armazenada a temperatura ambiente.

#### 4.2.15 Clorofil

Clorofórmio	96 mL
Alcool Isoamílico	4 mL

O clorofórmio foi adicionado ao álcool isoamílico em capela de exaustão. A solução não foi esterilizada e foi armazenada a temperatura ambiente.

#### 4.2.16 Tampão de Extração Modificado de Raeder e Broda (1985)

Tris-HCl 1 mol/L pH 8,0 (Item 4.2.10)	125 $\mu$ L
NaCl 5 mol/L (Item 4.2.11)	200 $\mu$ L
EDTA 0,5 mol/L pH 8,0 (Item 4.2.12)	100 $\mu$ L
SDS 20% pH 7,2 (Item 4.2.13)	50 $\mu$ L
Água ultrapura	525 $\mu$ L

Todos os componentes foram adicionados e a solução aquecida a 60°C para a solubilização dos componentes que viessem a precipitar. A solução foi produzida no momento do uso.

#### 4.2.17 Hidróxido de Sódio 2 mol/L

Hidróxido de Sódio	8 g
Água ultrapura	q.s.p. 100 mL

A solução foi preparada e mantida em recipiente plástico a temperatura ambiente.

#### 4.2.18 Acetato de Potássio 5 mol/L

Acetato de Potássio	49,075 g
Água ultrapura	q.s.p. 100 mL

A solução foi esterilizada em autoclave e mantida a 4°C até a utilização.

#### 4.2.19 Cloreto de Cálcio 0,1 mol/L

Cloreto de Cálcio Tetra Hidratado	1,830 g
Água ultrapura	q.s.p. 100 mL

A solução foi esterilizada em autoclave e mantida a 4°C até a utilização.

#### 4.2.20 Estreptomicina 50 mg/mL

Estreptomicina	500 mg
Etanol Absoluto	10 mL

A solução foi mantida a 4°C até a utilização.

#### 4.2.21 Ampicilina 100 mg/mL

Ampicilina	1000 mg
Etanol Absoluto	10 mL

A solução foi mantida a 4°C até a utilização.

#### 4.2.22 Glicerol 50%

Glicerol	50 mL
Água ultrapura	q.s.p. 100 mL

A solução foi esterilizada em autoclave e mantida a 4°C até a utilização.

#### 4.2.23 X-Gal 20 mg/mL

X-Gal	20 mg
Dimetilsulfóxido (DMSO)	q.s.p. 1 mL

A solução foi fracionada em alíquotas de uso único e mantida a -20°C protegida da luz até o momento do uso.

#### 4.2.24 Solução de Lise Alcalina I (SAMBROOK; RUSSELL, 2001)

Glicose Anidra	0,901 g
Tris-HCl 1 mol/L pH 8,0 (Item 4.2.10)	2,5 mL
EDTA 0,5M pH 8,0 (Item 4.2.12)	2,0 mL
Água ultrapura	q.s.p. 100 mL

A solução foi esterilizada em autoclave e mantida a 4°C até a utilização.

#### 4.2.25 Solução de Lise Alcalina II (SAMBROOK; RUSSELL, 2001)

Hidróxido de Sódio 2 mol/L (Item 4.2.17)	100 µL
SDS 20% pH 7,2 (Item 4.2.13)	50 µL
Água ultrapura	850 µL

A solução foi preparada no momento do uso.

#### 4.2.26 Solução de Lise Alcalina III (SAMBROOK; RUSSELL, 2001)

Ácido Acético Glacial	11,5 mL
Acetato de Potássio 5 mol/L (Item 4.2.18)	60 mL
Água ultrapura	q.s.p. 100 mL

A solução foi preparada e mantida a 4°C.

#### 4.2.27 Acetato de Amônio 7,5 mol/L

Acetato de Amônio	57,75 g
Água ultrapura	q.s.p. 100 mL

A solução foi preparada, filtrada com membrana 0.22 µM e mantida a -20°C.

### 4.3 MEIOS DE CULTURA

#### 4.3.1 Meio BDA (Meio Ágar-Batata-Dextrose)

Batata	200,0 g
Dextrose	20,0 g
Agar	15,0 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

O caldo da cocção das batatas picadas e descascadas, em 500 mL de água de água destilada por 15 minutos, foi completado com água destilada para 1000 mL. O pH foi ajustado para 5,8, seguido da adição do ágar. O meio foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a 1 atm.

#### 4.3.2 Meio Luria-Bertani (LB)

Triptona	10,0 g
Extrato de Levedura	5,0 g
Cloreto de Sódio	10,0 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

O meio foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a 1 atm.

#### 4.3.3 Meio Luria-Bertani Agar (LA)

Triptona	10,0 g
Extrato de Levedura	5,0 g
Cloreto de Sódio	10,0 g
Agar	15,0 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

O meio foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a 1 atm.

#### 4.4 PRODUÇÃO DE PIPELINE DE AVALIAÇÃO DE CROMATOGRAMAS

Para a execução sequencial dos programas envolvidos na chamada de bases, PHRED versão 0.020425.c (EWING; GREEN, 1998; EWING *et al.*, 1998), no alinhamento dos cromatogramas, PHRAP versão 1.080812 (GREEN, 1999), e na visualização do resultado final, CONSED versão 20.0 (GORDON *et al.*, 1998), foi utilizada a linguagem de script *Shell script*, implementada em ambiente Linux com o interpretador *Bash*. A distribuição utilizada para os testes e a execução dos scripts foi a CentOS 5.8 Final rodando um Kernel 2.6.18-308.4.1.el5PAE.

Para a execução do script foram utilizados comandos do editor de texto sed versão 4.1.5, compactador tar versão 1.15.1 e o GNU coreutils (Incluindo mkdir, rm, mv, ls, chmod, cd, cp, cat) versão 5.97.

#### 4.5 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

##### 4.5.1 Material fúngico em cultura

A extração de ácidos nucleicos foi realizada seguindo o protocolo previamente publicado (RAEDER; BRODA, 1985), adaptado por Glienke (1999) e modificado neste trabalho.

O micélio de crescimento fúngico em BDA por 4 dias a 27°C foi removido do ágar com o auxílio de espátula e liofilizado. O material, então, foi macerado com o auxílio de nitrogênio líquido e de 10 a 100 mg, valor impreciso dada a indisponibilidade de uma balança analítica somada a baixa densidade do material, adicionados a um tubo de microcentrífuga. Adicionou-se 1000 µL do Tampão de Extração Modificado de Raeder e Broda (1985) (Item 4.2.16), previamente aquecido a 60°C, e os tubos agitados horizontalmente por 5 minutos em *vortex*.

Após a agitação, os tubos foram incubados por 20 minutos no banho-maria e homogeneizados por inversão a cada 5 minutos. Posteriormente, realizou-se uma incubação a 0°C por 10 minutos e uma centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado o mesmo volume de clorofane (cerca de 1000 µL, item 4.2.14), homogeneizado por inversão e novamente centrifugado, por 5 minutos a 10.000 x g.

A seguir foram transferidos 850 µL do sobrenadante para um novo tubo, ao qual foi adicionado o mesmo volume de Clorofil (Item 4.2.15), homogeneizado por inversão e novamente centrifugado, por 5 minutos a 10.000 x g.

A seguir foram transferidos 700 µL do sobrenadante para um novo tubo, ao qual foi adicionado o mesmo volume de Etanol Absoluto, homogeneizado por inversão e novamente centrifugado, por 20 minutos a 10.000 x g.

O sobrenadante foi vertido e 500 µL de Etanol 70% adicionados, agitou-se brevemente o tubo e centrifugou-se por 10 minutos a 12.000 x g. Novamente, verteu-se o sobrenadante e os tubos foram secos durante 30 minutos em estufa a 37°C. A ressuspensão dos Ácidos Nucléicos se deu com 50 µL água ultrapura, durante uma hora.

#### 4.5.2 Folhas

Para a extração dos ácidos nucleicos dos fungos habitando tecidos vegetais, folhas, previamente coletadas e liofilizadas, foram maceradas em nitrogênio líquido – com auxílio de cadinho e pistilo. Deste material, cerca de 20 mg foi utilizado com o “UltraClean Microbial DNA Isolation Kit”, seguindo o protocolo do fabricante com modificações (ADAMOSKI *et al.*, 2011a).

O macerado de folha foi diretamente adicionado ao “MicroBead Tube”, com a normal adição de “Bead Solution” e “MD1 Solution”. O resultado foi homogeneizado em agitador tipo “vortex” por 10 minutos e mantido em banho maria a 60°C por mais 10 minutos. A segunda modificação ocorreu no passo de adição da “MD2 Solution”, que seria incubada a 4°C, mas foi mantida a 0°C, pelo mesmo período de tempo.

#### 4.5.3 Estimativa da Concentração de Ácidos Nucleicos Totais

A qualidade do material obtido foi acessada em gel de agarose 0,8% em TBE 1X (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) (Item 4.2.4). A visualização se deu diretamente em luz ultravioleta, dada a utilização do Tampão de Amostra com GelRed (Item 4.2.7). A concentração foi estimada com espectrofotômetro de luz ultravioleta (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). O material oriundo de folhas foi utilizado na concentração obtida – dada a incapacidade técnica de se quantificar, em um primeiro momento, apenas o DNA das espécies-alvo –, e o DNA obtido de micélio foi diluído a 10 ng/μL.

#### 4.6 AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO GENÔMICO GCP

O fragmento genômico GCP, com cerca de 300 pares de base, amplificado pelos *primers* GCP1 (5'AAGTGTGAGTGTCGAAGGTGG3') e GCP2 (5'GACGACTCGCTTTTCTACGGC3') previamente descritos (STRINGARI *et al.*, 2009), cuja detecção caracteriza a presença de *P. citricarpa*, foi amplificado em uma reação contendo 1X de Tampão de PCR, 0,2mM de cada nucleotídeo, 1,5mM de cloreto de magnésio, 0,3μM de cada *primer* e 0,8U de *Taq* DNA Polimerase, com volume final de 20μL e 10 ng de DNA molde. Os ciclos utilizados para a obtenção foram 94°C por 4 minutos, seguido de dois conjuntos de amplificação: um primeiro, de 15 ciclos com 30 segundos a 94°C, 2 segundos (aumentando 2 segundos a cada passo do ciclo) na temperatura de anelamento do *primer* e 16 segundos (aumentando 1 segundo a cada passo do ciclo) a 72°C; e um segundo, de 25 ciclos com 30 segundos a 94°C, 30 segundos na temperatura de anelamento do *primer* e 30 segundos a 72°C. Ao fim, um ciclo único de 30 segundos a 94°C, 30 segundos na temperatura de anelamento do *primer* e uma extensão final de 4 minutos a 72°C (ADAMOSKI *et al.*, 2011a). A avaliação do resultado da amplificação foi realizada em eletroforese com gel de agarose 1,5% (m/v, item 4.2.5), como previamente descrito.

Para a amplificação em material obtido de *P. citricarpa* sob cultura e de folhas cítricas, nas condições mais específicas do par de oligonucleotídeos, a temperatura de anelamento utilizada foi de 68°C. Para os ensaios de amplificação do fragmento homólogo a GCP em material obtido de *P. capitalensis* sob cultura, a temperatura de anelamento utilizada foi de 40°C, em uma condição menos estridente já demonstrada como capaz de gerar amplificação em *P. capitalensis* (ADAMOSKI *et al.*, 2011a).

#### 4.7 AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO GENÔMICO GMF

O fragmento genômico GMF, com cerca de 600 pares de base, amplificado pelos *primers* GMF1 (5'TGTCATGGACTGCATAGAGGG3') e GMR2 (5'TCGAAGCAAGACCAGCTGTAC3') previamente descritos (KAVA-CORDEIRO, 2004) foi amplificado com parâmetros idênticos aos do fragmento GCP em *P. citricarpa*, apenas alterando a temperatura de anelamento para 62°C (FABRIS, 2009) e os próprios *primers*. A avaliação do resultado da amplificação foi realizada em eletroforese com gel de agarose 1,5% (m/v, item 4.2.5), como previamente descrito.

Para os ensaios de amplificação do fragmento homólogo a GCP em material obtido de *P. capitalensis* sob cultura, a temperatura de anelamento utilizada foi de 45°C, em uma condição menos estridente, capaz de gerar amplificação em *P. citricarpa* e *P. citribraziliensis*.

#### 4.8 SEQUENCIAMENTO UTILIZANDO VETORES

##### 4.8.1 Estimativa da Concentração do Produto de PCR para Ligação

A realização da estimativa da concentração do produto de PCR para a ligação em vetor de sequenciamento, foi realizada uma eletroforese em agarose 1,5% (item

4.2.5) e a intensidade da banda obtida foi comparada, por densitometria, com o padrão de massa molecular Ladder (Ludwig Biotec) utilizando o software LabWorks v4.6 (UVP, 2000). Quando necessário, os produtos foram diluídos a concentração suficiente para a manutenção da proporção 3 moléculas de inserto para 1 molécula de vetor.

#### 4.8.2 Ligação em vetor de Sequenciamento

Para realizar o sequenciamento dos produtos amplificados, foi utilizado o vetor de clonagem pGEM-T Vector (Promega) seguindo o protocolo do fabricante, modificado. A reação foi montada com 50% do volume final sugerido, reduzindo as quantidades para a manutenção da concentração. Cada reação de ligação foi montada com 2,5  $\mu\text{L}$  de *2X Rapid Ligation Buffer*, 0,5  $\mu\text{L}$  de pGEM-T Vector, 0,5  $\mu\text{L}$  de T4 DNA Ligase, 0,5  $\mu\text{L}$  de água e 1  $\mu\text{L}$  do produto de PCR diluído. Para o fragmento GCP, com cerca de 300 pb, o produto foi diluído a 7,5 ng/ $\mu\text{L}$ . Para o fragmento GMF, com cerca de 600 pb, o produto foi diluído a 12,5 ng/ $\mu\text{L}$ . A reação foi incubada a 4°C por 72 horas.

#### 4.8.3 Transformação

A transformação foi realizada em linhagens TOP10, através de choque térmico, seguindo protocolo previamente desenvolvido (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) e modificado neste trabalho.

Uma pré-cultura de TOP10 foi produzida com 1 mL de meio LB (Item 4.3.2) adicionado de 1,6  $\mu\text{L}$  de Estreptomicina (50 mg/mL, Item 4.2.20), mantida a 37°C com rotação constante de 250rpm, por 16 horas. Desta, 300  $\mu\text{L}$  foram adicionados a 30 mL de meio LB (Item 4.3.2) adicionado de 48  $\mu\text{L}$  de Estreptomicina (50 mg/mL, Item 4.2.20) e incubou-se a 37°C com rotação constante de 250rpm até a obtenção de OD600 próxima a 0,4 UA.

O frasco contendo a cultura foi então imediatamente refrigerado em gelo e transferidos 1,5 mL para tubos de microcentrífuga previamente resfriados. Os mesmos foram centrifugados a 1600 x g por 1 minuto, em centrífuga refrigerada a 4°C e com o freio desativado.

O meio de cultura foi descartado e os tubos secos invertidos em papel toalha. Adicionou-se 100 µL de Cloreto de Cálcio 0,1 mol/L (Item 4.2.19) gelado e as células foram ressuspensas delicadamente. Adicionou-se 5 µL de cada ligação a seu respectivo tubo e 1 µL do plasmídeo pUC19 10 ng/ µL como controle positivo. Igualmente, a um tubo não foi adicionado nenhum material, como controle negativo. Os tubos foram mantidos no gelo por 20 minutos.

Com a utilização de um banho-maria, os tubos foram mantidos a 42°C por 45 segundos e prontamente recolocados em gelo e lá mantidos por 10 minutos. Ao final do tempo, foi adicionado 900 µL de meio LB (Item 4.3.2) livre de antibióticos e os tubos mantidos sob agitação por 90 minutos a 37°C.

Ao final do tempo, os tubos foram centrifugados a 1600 x g por 30 segundos e 800 µL do meio de cultura foi removido. O restante foi utilizado para ressuspender e espalhar as mesmas em placas pré-aquecidas a 37°C contendo meio LA (Item 4.3.3) adicionado de 250 µg/µL de Ampicilina (25 µL para cada 10 mL de meio, adicionado ao meio a temperatura de 45°C, item 4.2.21) e 80 µg/µL de Estreptomicina (16 µL para cada 10 mL de meio, adicionados da mesma maneira, item 4.2.20), além de 40 µL X-Gal (espalhados sobre a placa já pronta, antes do espalhamento da transformação, item 4.2.23). As placas foram, então, invertidas e incubadas por 16 horas a 37°C.

Para a estimativa da Eficiência de Transformação foi utilizada a fórmula proposta por Hanahan (1983) (FÓRMULA 2)

$$\frac{\text{Colônias Contadas}}{\frac{\text{Volume DNA } (\mu\text{l}) \cdot \text{Concentração } (\mu\text{g}/\mu\text{l})}{\text{Volume total Transformação } (\mu\text{l})} \cdot \text{Volume da Aliquota Plaqueada } (\mu\text{l})} = \text{UFC}/\mu\text{g de DNA}$$

FÓRMULA 2 - EQUAÇÃO UTILIZADA PARA ESTIMAR A EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO EM UFC/MICROGRAMAS DE DNA PLASMIDIAL

#### 4.8.4 Avaliação dos transformantes por PCR de Colônia

Quando oriundas dos experimentos de clonagem do fragmento a partir de folhas e do micélio, as colônias que apresentaram coloração branca foram repicadas com uma ponteira em uma nova placa, e a mesma ponteira foi “lavada” em uma mistura para PCR pré-produzida (Tampão de PCR 1X, 0,2 mM de cada nucleotídeo, 1,5 mM de Cloreto de Magnésio, 0,2  $\mu$ M do *primer* pUC19/M13 Verso-24mero (5'CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC3'), 0,2  $\mu$ M do *primer* pUC19/M13 Reverso-22mero (5'TCACACAGGAAACAGCTATGAC) e 0,4U de *Taq* DNA Polimerase, num volume final de 15  $\mu$ L). A amplificação foi realizada em termociclador nas seguintes condições: 94°C por 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. A avaliação do resultado foi realizada em gel de agarose 1,5% (m/v, item 4.2.5) como já descrito.

#### 4.8.5 Manutenção das Colônias em Glicerol

Para a manutenção das colônias obtidas em um estoque de longa duração, 100  $\mu$ L de meio LB (item 4.3.2) foram adicionados em cada um dos 96 poços de uma microplaca previamente esterilizada, sendo o repique realizado com palito esterilizado. A mesma foi selada e incubada sob agitação de 250 rpm por 16 horas a 37°C.

Ao final deste período, foram adicionados 100  $\mu$ L de Glicerol 50% (Item 4.2.22) e o conteúdo dos poços homogeneizado por aspiração-expiração com micropipeta, levando a uma concentração final de 25% de glicerol. As placas foram, então, mantidas a -20°C.

#### 4.8.6 Minipreparação de DNA Plasmidial

As colônias que foram selecionadas para o sequenciamento foram crescidas em meio LB (Item 4.3.2) adicionado de Ampicilina (Concentração final de 250 µg/mL) e de Estreptomicina (Concentração final de 80 µg/mL) durante 16 horas a 37°C. A partir deste cultivo, realizou-se a minipreparação por lise alcalina como previamente estabelecido (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Adicionou-se a um tubo de microcentrífuga 2ml da cultura de *E. coli* por 1 minuto a 10.000 x g. O sobrenadante foi descartado e a borda do tubo seca em papel toalha. Então, 200 µL da solução de Lise Alcalina I (Item 4.2.24) foram adicionados e o tubo homogeneizado em Vortex. Posteriormente, 400 µL da Solução de Lise Alcalina II (Item 4.2.25) são adicionados e o tubo homogeneizado lentamente, por inversão. Por fim, 300 µL da solução de Lise Alcalina III (Item 4.2.26) são adicionados, o tubo invertido lentamente e mantido a 0°C por 5 minutos.

Centrifugou-se por 8 minutos a 10.000 x g e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado meio volume de Clorofane (Item 4.2.14), homogeneizado por inversão e centrifugado por 5 minutos a 10.000 x g.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionado novamente meio volume de Clorofil (Item 4.2.15), homogeneizado por inversão e centrifugado por 5 minutos a 10.000 x g.

O sobrenadante, novamente, foi transferido para um novo tubo e adicionado 0,6 volume de isopropanol. O tubo foi homogeneizado e centrifugado por 5 minutos a 10.000 x g. A fase líquida foi descartada e 200 µL de Etanol 70% foram adicionados. O tubo foi agitado e centrifugado por 5 minutos a 10.000 x g. A fase líquida foi descartada e as bordas do tubo secas em papel toalha.

O tubo foi seco em estufa por 30 minutos a 37°C e o DNA foi ressuspendido com 50 µL de água ultrapura por uma hora.

A avaliação da concentração foi idêntica a “Estimativa da Concentração de Ácidos Nucleicos Totais” previamente descrita.

#### 4.8.7 PCR para Sequenciamento

As condições da primeira PCR foram similares àsquelas da PCR de Colônia, variando o volume final (25 µL) e os 10 ng de plasmídeo adicionado. A ciclagem foi igual a da PCR de Colônia.

#### 4.8.8 Purificação do Produto de PCR para Reação de Sequenciamento

O produto de PCR foi purificado com acetato de amônio. Foram adicionados 0,5 volumes de Acetato de Amônio 7,5 mol/L (Item 4.2.27) a todo o volume da PCR para Sequenciamento e o tubo centrifugado por 15 minutos a 12.000 x g. A fase líquida foi transferida para outro tubo e adicionados 2,5 volumes de Etanol Absoluto, para uma incubação em gelo por 1 hora.

Após a incubação, o material foi centrifugado por 1 hora a 12.000 x g, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 µL de Etanol 70%. Os tubos foram novamente centrifugados por 5 minutos a 12.000 x g, o líquido foi descartado e a borda seca em papel toalha. Os tubos foram secos em estufa a 37°C e o DNA ressuspendido em 12 µL de água ultrapura por 1 hora.

Para a estimativa da concentração do produto de PCR foi realizada uma eletroforese em agarose 1,5% (m/v, item 4.2.5) e a intensidade da banda obtida foi comparada, por densitometria, com o padrão de massa molecular Ladder (Ludwig Biotec) utilizando o software LabWorks v4.6 (UVP, 2000).

#### 4.8.9 Reação de Sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada com 50 ng ou menos do produto de PCR purificado, de acordo com protocolo previamente estabelecido (STRINGARI, 2009).

Cada reação foi montada com 2  $\mu\text{L}$  de ET Dye Terminator, 2 pmol do *primer*, 2,8  $\mu\text{L}$  de água ultrapura e 5  $\mu\text{L}$  do produto de PCR purificado a, no máximo, 10 ng/ $\mu\text{L}$ . A amplificação foi realizada em termociclador nas seguintes condições: 35 ciclos de 94°C por 20 segundos e 60°C por 1 minuto.

A eletroforese capilar foi realizada em um equipamento MegaBACE (GE Healthcare).

#### 4.9 SEQUENCIAMENTO DIRETO

As condições da primeira PCR foram similares àsquelas da PCR para o fragmento GMF, variando apenas volume final (20  $\mu\text{L}$ ) e a quantidade de DNA adicionada (30ng). A ciclagem foi igual a da PCR para o fragmento GMF.

Para os passos de "Purificação do Produto de PCR para Reação de Sequenciamento", "Estimativa da Concentração do Produto de PCR Purificado para Reação de Sequenciamento" e "Reação de Sequenciamento", as condições foram idênticas as do "Sequenciamento Utilizando Vetores".

#### 4.10 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

##### 4.10.1 Análise dos Cromatogramas

###### 4.10.1.1 Utilização do *Pipeline* de Avaliação

Os arquivos de saída do sequenciador foram analisados através da adaptação de um *pipeline* de montagem de genomas previamente desenvolvido. Para cada sequência, com suas duas leituras, o programa PHRED (EWING; GREEN, 1998; EWING *et al.*, 1998) foi utilizado para chamar as bases e definir a qualidade de cada pico. Posteriormente, com o auxílio do programa PHRAP (GREEN *et al.*, 1999), a

montagem adequada das sequências e a produção de uma sequência consenso foi realizada. A inspeção visual se deu com o programa CONSED (GORDON *et al.*, 1998). A produção deste *pipeline* se deu como indicado no item “Produção de *Pipeline* de Avaliação de Cromatogramas”.

#### 4.10.1.2 Remoção do Vetor e Análise

A remoção dos trechos do vetor sequenciados foi realizada manualmente, utilizando o programa MEGA versão 5 (TAMURA *et al.*, 2011) e o alinhamento das sequências foi realizado com o programa MUSCLE (EDGAR, 2004), embarcado no primeiro. Utilizou-se como referência a sequência completa do plasmídeo pGEM-T Vector e a sequência da região GCP (GLIENKE, 1999) ou GMF (KAVA-CORDEIRO, 2004) previamente obtidas.

Para comparar as sequências obtidas com o banco de dados foi utilizada a plataforma *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) do NCBI (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

#### 4.10.2 Desenho de Oligonucleotídeos

##### 4.10.2.1 PCR Quantitativa

A análise *in silico* para o desenho dos *primers* para PCR quantitativa, ensejando a detecção de *P. citricarpa*, foi realizada utilizando-se o programa AlleleID (PREMIER BIOSOFT, 2010). A presença de estruturas secundárias (como grampos, heterodímeros e homodímeros) foi avaliada com o programa *AutoDimer* (VALLONE; BUTLER, 2004) e a compatibilidade das temperaturas de anelamento confirmadas com o pacote *Biomath* (PROMEGA, 2011).

#### 4.10.2.1.1 Avaliação do Ensaio Proposto

##### 4.10.2.1.1.1 Comparação com Ensaio GcF1/GcR1

Para medidas comparativas, o ensaio previamente proposto para a detecção de *P. citricarpa*, utilizando o sistema TaqMan com a Sonda GcP1 (FAM5'AAAAGCCGCCCGACCTACCTTCA3'TAMRA), *Primer* Verso GcF1 (5'GGTGATGGAAGGGAGGCCT3') e *Primer* Reverso GcR1 (5'GCAACATGGTAGATACACAAGGGT3'), baseado em sequências de ITS (GENT-PELZER *et al.*, 2007) foi realizado. Na indisponibilidade do kit para qPCR da Applied Biosystems e da Takara Bio Europe, utilizados pelo autor, e do material plástico da Applied Biosystems, foram utilizados reagentes da Invitrogen (*Taq* DNA Polimerase *Platinum* e conjunto de dNTPs) e plásticos da Axygen.

O conjunto foi amplificado em uma reação contendo 1X de Tampão de PCR, 0,2mM de cada nucleotídeo, 3mM de cloreto de magnésio, 0,2µM de cada *primer* (GcF1 e GcR1), 0,1µM da Sonda (GcP1) e 0,8U de *Taq* DNA Polimerase *Platinum*, com volume final de 25µL e 1 µL de DNA molde – sendo o mesmo a 10 ng/µL, salvo nas diluições seriadas. Os ciclos utilizados para a obtenção foram 94°C por 2 minutos, seguido de 45 ciclos com 15 segundos a 94°C e 60 segundos a 60°C – passo no qual ocorria a leitura da fluorescência. Uma segunda avaliação do resultado da amplificação foi realizada em eletroforese com gel de agarose 1,5% (m/v), como previamente descrito.

Uma curva de calibração indo de 10 ng até 10<sup>-6</sup> ng foi produzida, com a diluição do DNA de LGMF006 em água ultrapura na proporção de 1 parte de DNA para 9 partes de água, em sequência. Na realização do ensaio, a mesma foi produzida em triplicata – para a realização da regressão linear necessária. Em duplicata – apenas para a dupla confirmação do resultado, sem intuito estatístico - foram utilizadas linhagens de *P. capitalensis* (LGMF001, LGMF002), *G. mangiferae* (IMI260576), *P. brazilianiae* (LGMF330), *P. citricarpa* (LGMF004 e LGMF005) e *P. citribraziliensis* (LGMF007, LGMF010 e LGMF011), além de reações sem DNA em quadruplicata – novamente sem fim estatístico, apenas para a confirmação da não-amplificação por contaminação.

Para a avaliação dos resultados do ensaio proposto, também, a reação foi avaliada em gel de agarose 1,5% (Item 4.2.5), como previamente descrito.

Para a avaliação da eficiência da reação, foi utilizada a FÓRMULA 3.

$$Eficiência(\%) = (10^{(-1/S)} - 1) \cdot 100$$

FÓRMULA 3 - EQUAÇÃO UTILIZADA PARA O CÁLCULO DA EFICIÊNCIA DA REAÇÃO DA PCR QUANTITATIVA BASEADA NA INCLINAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

FONTE: QIAGEN (2010)

NOTA: O valor de S na equação é a tangente do ângulo de inclinação da reta ajustada para a curva de calibração.

#### 4.10.2.1.1.2 Condições Utilizadas com a Sonda Proposta

Para a utilização da sonda Proposta, as condições de reação e amplificação foram as mesmas utilizadas para o ensaio GcF1/GcR1.

#### 4.10.2.2 PCR convencional

O desenho dos *primers* para PCR Convencional, ensejando a detecção de *P. capitalensis*, foi realizado manualmente e avaliado da mesma maneira que para a PCR Quantitativa.

##### 4.10.2.2.1 Gradiente de Temperatura

Visando avaliar a melhor temperatura de anelamento para o par de *primers* proposto, foi realizada uma PCR com gradiente de temperatura de anelamento. Para tanto, o fragmento foi amplificado em uma reação contendo 1X de Tampão de PCR, 0,2mM de cada nucleotídeo, 1,5mM de cloreto de magnésio, 0,2µM de cada *primer* (GMF1 e o *Primer* proposto) e 0,5U de *Taq* DNA Polimerase, com volume final de 10µL e 10 ng de DNA molde. Os ciclos utilizados para a obtenção foram 94°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos com 30 segundos a 94°C, 30 segundos na

temperatura de anelamento (Variando de acordo com a capacidade do equipamento Eppendorf Mastercycler Gradient, entre 58°C e 70°C) e 30 segundos a 72°C, e uma extensão final por 4 minutos a 72°C. A avaliação do resultado da amplificação foi realizada em eletroforese com gel de agarose 1,5% (m/v, 4.2.5), como previamente descrito.

#### 4.10.2.2.2 Avaliação comparativa entre os Conjuntos de *Primers*

##### 4.10.2.2.2.1 Controle com ITS

Para assegurar a amplificação do DNA extraído utilizado nos testes, foi realizada uma PCR com *primers* para o gene do espaçador interno de transcrição 1 – 5,8S rDNA – espaçador interno de transcrição 2 para fungos em geral, já disponíveis (WHITE *et al.*, 1990), ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC3'). A amplificação ocorreu em uma reação contendo 1X de Tampão de PCR, 0,2mM de cada nucleotídeo, 1,5mM de cloreto de magnésio, 0,2µM de cada *primer* (ITS1 e ITS4) e 0,5U de *Taq* DNA Polimerase, com volume final de 10µL e 10 ng de DNA molde. Os ciclos utilizados para a obtenção foram 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos com 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 45 segundos a 72°C, e uma extensão final por 2 minutos a 72°C.

##### 4.10.2.2.2.2 PCR Multiplex da Região GCP/GMF

A PCR Multiplex da Região GCP/GMF (FABRIS, 2009), ferramenta disponível para a distinção entre as espécies *P. citricarpa* e *P. capitalensis*/*G. magiferae*, mas ineficaz em distinguir *P. capitalensis* de *G. mangiferae*, foi realizada para a confirmação destes resultados prévios. A amplificação ocorreu em uma reação contendo 1X de Tampão de PCR, 0,2mM de cada nucleotídeo, 1,5mM de cloreto de magnésio, 0,2µM de cada *primer* (GCP1, GCP2, GMF1, GMR2) e 0,8U de *Taq* DNA Polimerase, com volume final de 10µL e 10 ng de DNA molde. Os ciclos utilizados

para a obtenção foram 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos com 60 segundos a 94°C, 60 segundos a 55°C e 60 segundos a 72°C, e uma extensão final por 4 minutos a 72°C.

#### 4.10.2.2.2.3 PCR Proposta para Detecção de *Phyllosticta capitalensis*

A PCR proposta, utilizando o *primer* previamente disponível GMF1 em conjunto com o criado no presente trabalho, PCPr, ocorreu em uma reação contendo 1X de Tampão de PCR, 0,2mM de cada nucleotídeo, 1,5mM de cloreto de magnésio, 0,2µM de cada *primer* (GMF1 e PCPr) e 0,5U de *Taq* DNA Polimerase, com volume final de 10µL e 10 ng de DNA molde. Os ciclos utilizados para a obtenção foram 94°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos com 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 64°C e 30 segundos a 72°C, e uma extensão final por 4 minutos a 72°C.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PIPELINE DE AVALIAÇÃO

O *pipeline* de avaliação foi produzido em duas etapas: Uma primeira, denominada “Organizador.sh” (APÊNDICE 1), responsável por separar os cromatogramas já renomeados em pastas, de acordo com o material biológico sequenciado (nome definido pelo conjunto de caracteres até o primeiro ponto), e outra, denominada “phredPhrapMulti.sh” (APÊNDICE 2), responsável por adentrar cada pasta a ser montada, realizar a chamada de bases novamente, executar a montagem da consenso, e extrair a mesma para um arquivo texto único, em todas as pastas de material envolvidas.

### 5.2 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

#### 5.2.1 Material Fúngico em Cultura

A extração dos Ácidos Nucléicos totais foi realizada para o Material Fúngico em Cultura em diversos momentos, dada a necessidade de produzir mais material para a continuidade dos experimentos Na FIGURA 2 está exposto um demonstrativo dos resultados obtidos em uma das extrações realizadas. Observa-se o sucesso em todas, com uma visível variação de concentração entre as amostras.

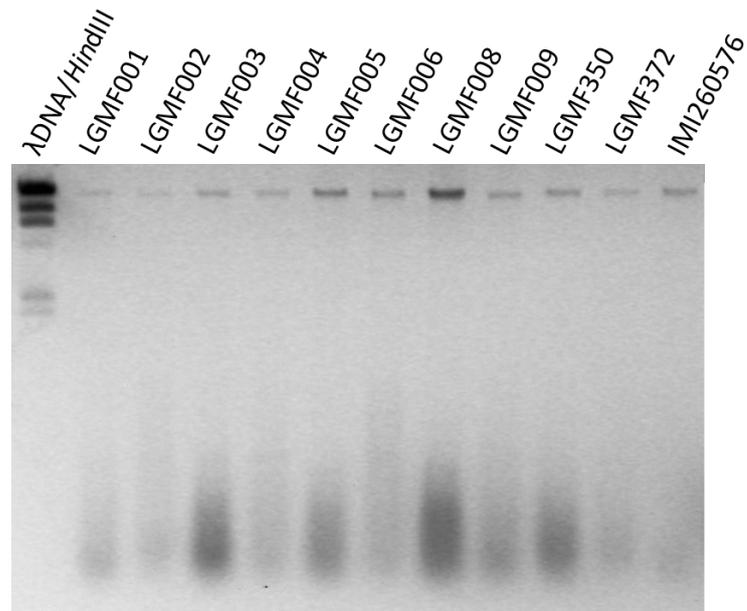


FIGURA 2 - DEMONSTRATIVO DOS RESULTADOS DE EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DE MICÉLIO FÚNGICO EM GEL DE AGAROSE 0,8%

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Foram aplicados 2  $\mu$ L de cada amostra e 200 ng totais do marcador  $\lambda$ DNA/*Hind*III.

### 5.2.2 Folhas

A extração dos Ácidos Nucléicos Totais realizada para as folhas coletadas ocorreu com pouca eficiência, dada a degradação observada em gel de agarose (FIGURA 3).

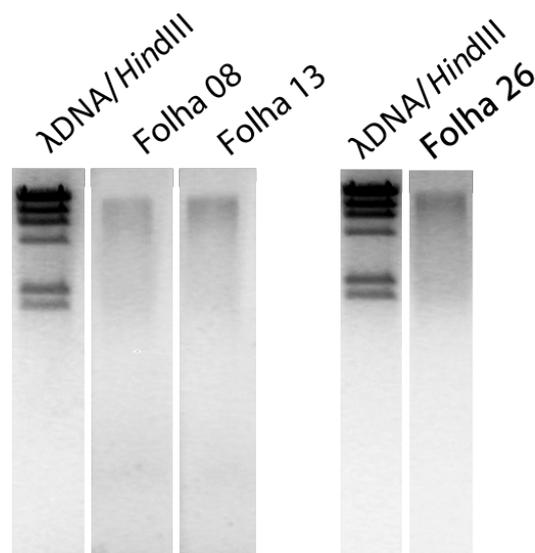


FIGURA 3 - DEMONSTRATIVO DOS RESULTADOS DE EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DE FOLHAS EM GEL DE AGAROSE 0,8%

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Foram aplicados 10  $\mu$ L de cada amostra e 200 ng totais do marcador  $\lambda$ DNA/*Hind*III.

### 5.2.3 Estimativa da Concentração de Ácidos Nucleicos Totais

Os ácidos nucleicos totais foram quantificados em espectrofotômetro, da forma já descrita. No QUADRO 2 está disponível a quantificação referente ao material extraído e demonstrado no gel de agarose da FIGURA 2. As concentrações obtidas variaram de 35 a 420 ng/μL.

<b>Linhagem</b>	<b>Concentração</b>
LGMF001	83 ng/μL
LGMF002	35 ng/μL
LGMF003	161 ng/μL
LGMF004	48,9 ng/μL
LGMF005	172 ng/μL
LGMF006	104 ng/μL
LGMF008	420 ng/μL
LGMF009	134 ng/μL
LGMF350	251 ng/μL
LGMF372	106 ng/μL
IMI260576	116 ng/μL

QUADRO 2 – DEMONSTRATIVO DOS RESULTADOS DA ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS POR ESPECTROFOTOMETRIA  
 FONTE: O autor (2012)

## 5.3 FRAGMENTO GENÔMICO GCP

### 5.3.1 Amplificação

Os resultados da amplificação do fragmento genômico, utilizando os *primers* GCP e DNA obtido a partir de material vegetal e de linhagens de *P. citricarpa* e *P. capitalensis*, estão indicados na FIGURA 4. Todas as linhagens de *P. citricarpa* avaliadas apresentaram a banda esperada de aproximadamente 300pb (FIGURA 4). Fragmento correspondente pode ser observado quando o DNA da Folha FL26 foi utilizado. Entretanto, nenhuma amplificação pode ser observada a partir de DNA da Folha L13. A FIGURA 4 também revela a presença de múltiplas bandas quando DNA das linhagens de *P. capitalensis* e um controle de *P. citricarpa* foram utilizados

em condições de PCR menos estridentes (40°C), previamente definidas (ADAMOSKI *et al.*, 2011a).

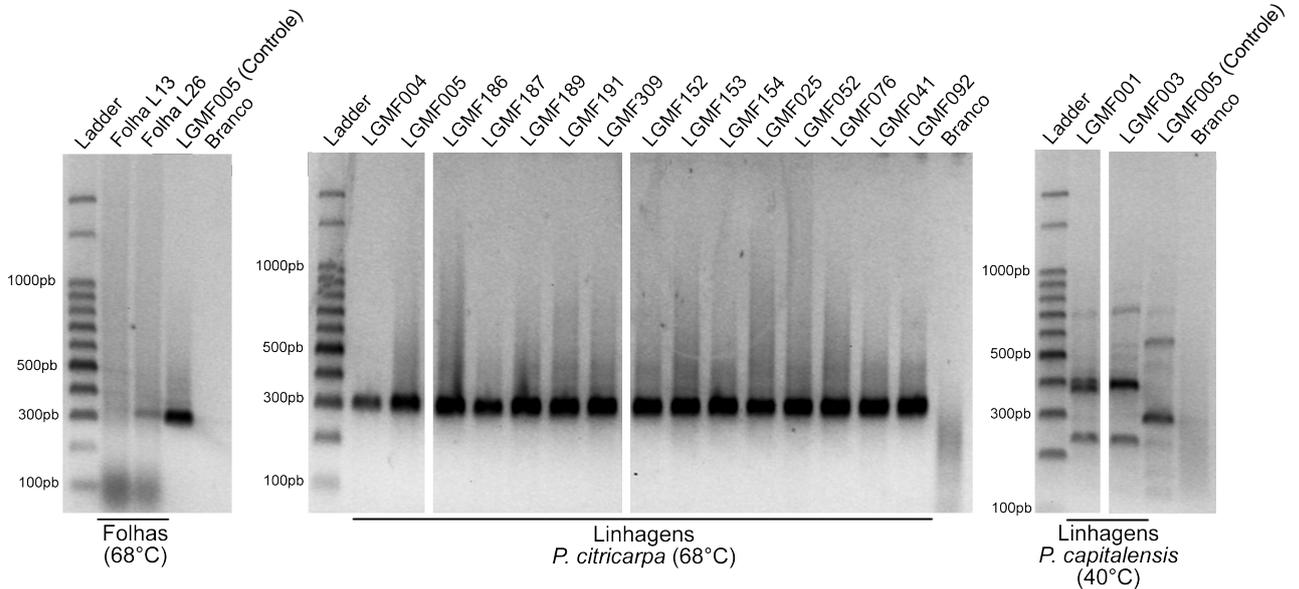


FIGURA 4 - PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO GCP EM FOLHAS E LINHAGENS FÚNGICAS EM GEL DE AGAROSE 1,5%

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Foram aplicados 3  $\mu$ L de cada amostra e a banda de 500 pb do marcador Ladder contém 45ng.

### 5.3.2 Estimativa da Concentração do Produto de PCR para Ligação

As amostras presentes na FIGURA 4 tiveram sua concentração de Ácidos Nucléicos estimada através de espectrofotometria (Resultado demonstrativo no QUADRO 3), com concentrações variando de 11 a 20 ng/ $\mu$ L.

<b>Linhagem</b>	<b>Concentração</b>
LGMF004	13,8225 ng/ $\mu$ L
LGMF005	11,6225 ng/ $\mu$ L
LGMF186	21,557 ng/ $\mu$ L
LGMF187	13,1553 ng/ $\mu$ L
LGMF189	22,3223 ng/ $\mu$ L
LGMF191	20,3735 ng/ $\mu$ L
LGMF309	20,3458 ng/ $\mu$ L
LGMF152	18,5325 ng/ $\mu$ L
LGMF153	19,7175 ng/ $\mu$ L
LGMF154	20,7925 ng/ $\mu$ L
LGMF025	15,8215 ng/ $\mu$ L
LGMF052	20,8993 ng/ $\mu$ L
LGMF076	19,3778 ng/ $\mu$ L
LGMF041	17,4103 ng/ $\mu$ L
LGMF092	18,368 ng/ $\mu$ L

QUADRO 3 - RESULTADOS DA ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO DO PRODUTO DE PCR PARA LIGAÇÃO EM VETOR DO FRAGMENTO GCP POR ESPECTROFOTOMETRIA  
 FONTE: O autor (2012)

### 5.3.3 Ligação em Vetor de Sequenciamento e Transformação

A avaliação da eficiência de transformação foi realizada e estimada em  $10^4$  Unidades Formadoras de Colônia/ $\mu$ g de Plasmídeo, o que garante a eficiência das células em internalizar plasmídeos.

### 5.3.4 Avaliação dos Transformantes por PCR de Colônia

Os transformantes obtidos a partir de fragmentos GCP de *P. capitalensis* foram avaliados através de PCR de Colônia e os resultados estão dispostos na FIGURA 5. Para os transformantes de *P. citricarpa*, apenas um clone foi utilizado diretamente. Foram selecionados os clones com tamanhos pertencentes a distintos grupos, visando avaliar os possíveis fragmentos distintos presentes.

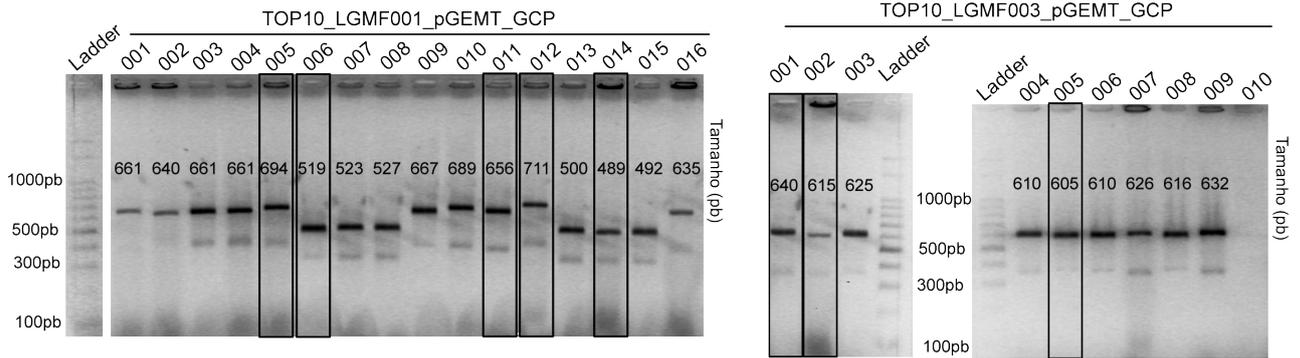


FIGURA 5 - RESULTADOS DA REAÇÃO DE PCR DE COLÔNIA COM OS CLONES CONTENDO FRAGMENTO AMPLIFICADO COM *PRIMERS* GCP EM *Phyllosticta capitalensis* COM GEL DE AGAROSE 1,5%

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Foram aplicados 15  $\mu$ L, o volume total da reação, de cada amostra e a banda de 500 pb do marcador Ladder contém 22,5ng. Os números indicados na imagem representam o tamanho estimado das bandas. As canaletas circundadas por retângulos foram selecionadas.

Os transformantes obtidos com fragmento GCP das Folhas 13 e 16 foram avaliados através de PCR de Colônia e os resultados são mostrados na FIGURA 6. Foram selecionados os clones com tamanhos pertencentes a distintos grupos, visando – novamente – avaliar os possíveis fragmentos distintos presentes.

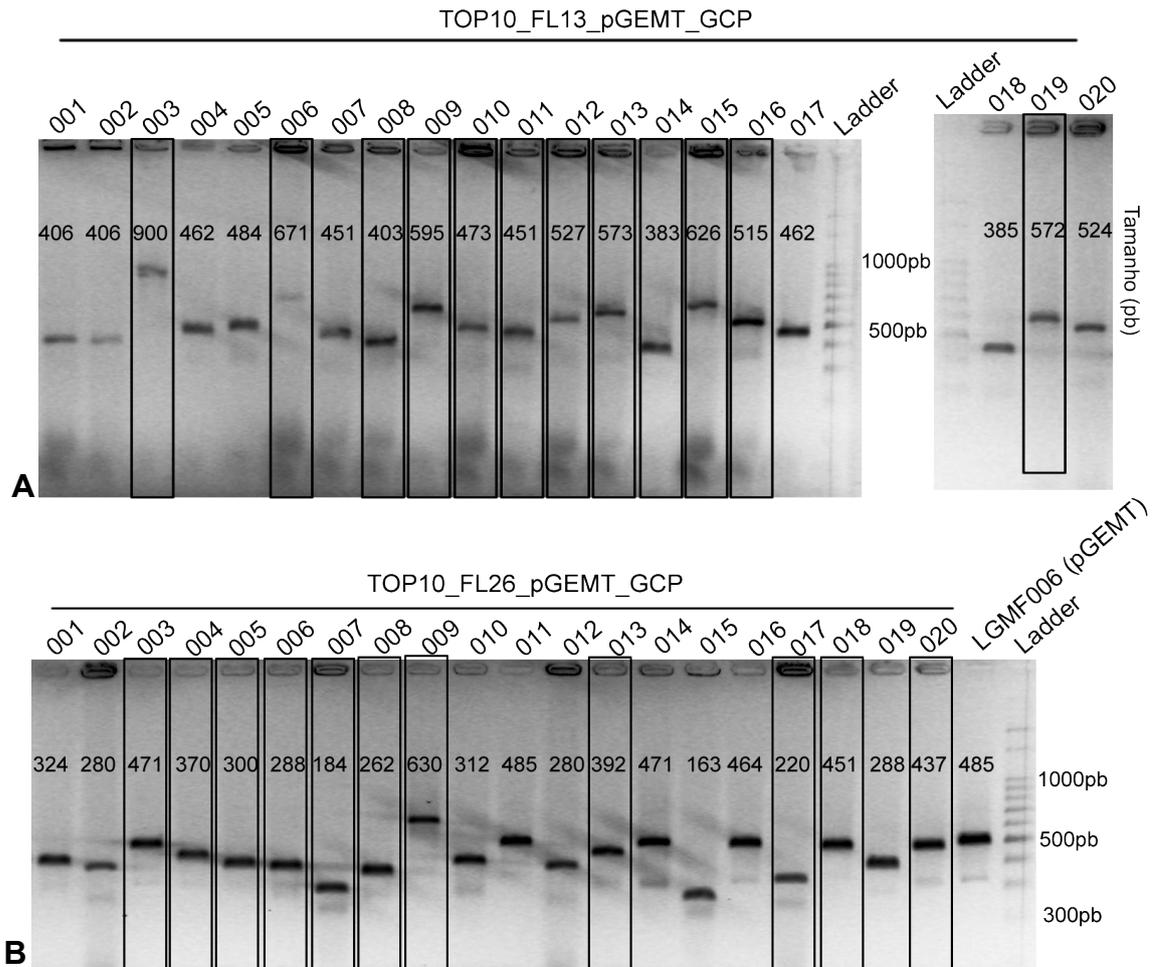


FIGURA 6 - RESULTADOS DA REAÇÃO DE PCR DE COLÔNIA COM OS CLONES CONTENDO FRAGMENTO AMPLIFICADO COM *PRIMERS* GCP NA FOLHA 13 (A), DA PLANTA A, E NA FOLHA 26 (B), DA PLANTA B, EM GEL DE AGAROSE 1,5%

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Foram aplicados 15  $\mu$ L, o volume total da reação, de cada amostra e a banda de 500 pb do marcador Ladder contém 22,5ng. Os números indicados na imagem representam o tamanho estimado das bandas. As canaletas circundadas por retângulos foram selecionadas.

### 5.3.5 Minipreparação de DNA Plasmidial

Na FIGURA 7 observa-se o resultado geral obtido das minipreparações de DNA plasmidial dos clones contendo insertos GCP. Percebe-se a presença de uma banda de alto peso molecular, provavelmente contaminação com DNA genômico – relativamente significativa em algumas amostras – e a banda do plasmídeo em estado super-enovelado – de menor peso molecular – em menor proporção com relação a banda imediatamente superior – do plasmídeo linearizado – indicando alto grau de degradação.

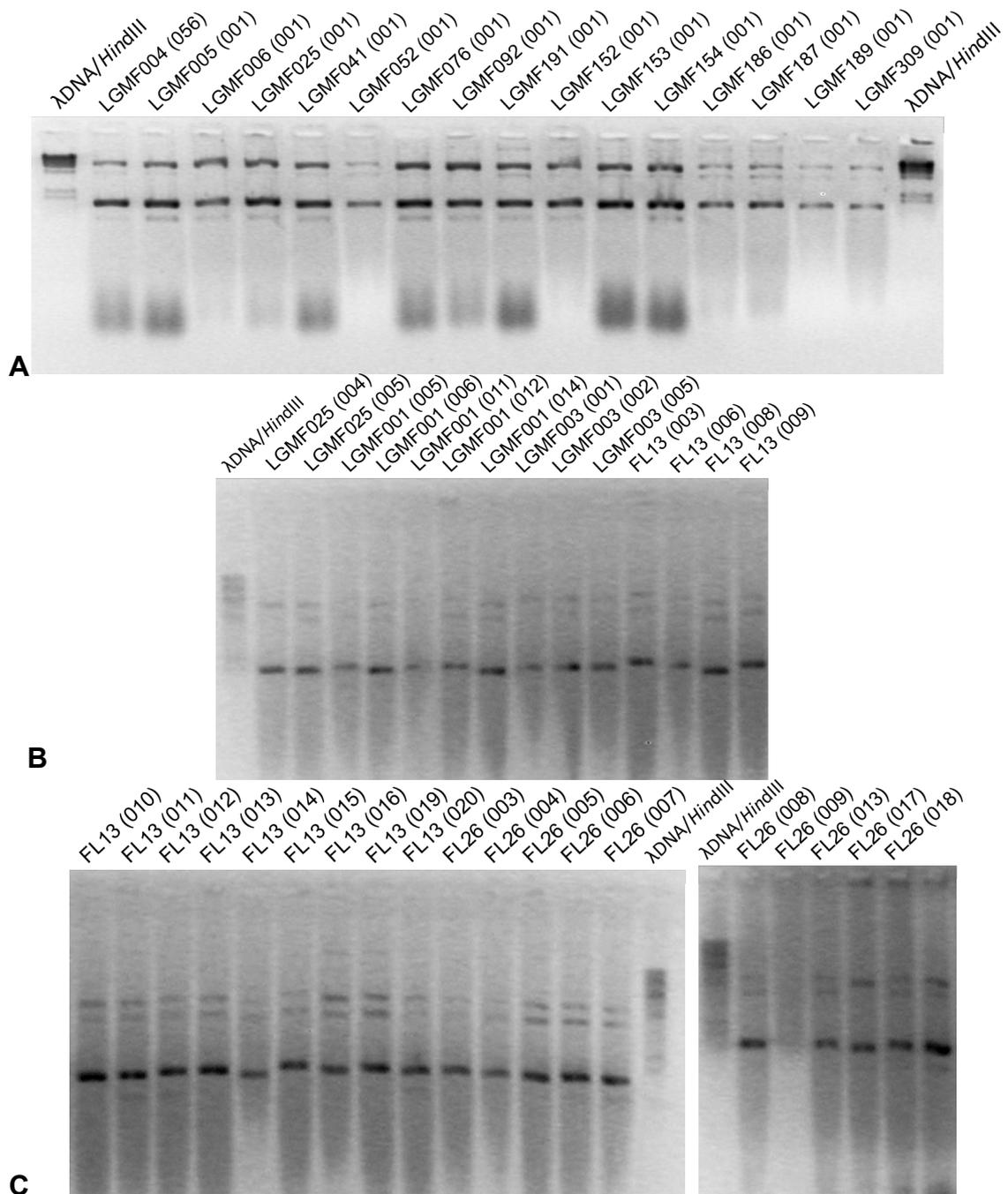


FIGURA 7 - AVALIAÇÃO DA MINIPREPARAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL DOS INSERTOS DE GCP NOS CLONES SELECIONADOS ORIUNDOS DE LINHAGENS (A, B), FOLHA 13 (B, C) E FL26 (C) EM GEL DE AGAROSE 0,8%

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Foram aplicados 10  $\mu$ L de cada amostra e 200 ng totais do marcador  $\lambda$ DNA/HindIII.

No QUADRO 4 estão indicadas as quantificações por espectrofotômetro do material avaliado por gel de agarose. As concentrações obtidas oscilaram entre 116 e 1663 ng/ $\mu$ L – indicando pouca reprodutibilidade no protocolo utilizado.

Clone		Concentração	Clone		Concentração
LGMF004	056	826,4 ng/μL	LGMF003	005	736,8 ng/μL
LGMF005	001	1027,4 ng/μL	FL13	003	1237,6 ng/μL
LGMF006	001	291,7 ng/μL	FL13	006	1663,9 ng/μL
LGMF025	001	493,4 ng/μL	FL13	008	910,4 ng/μL
LGMF041	001	747,2 ng/μL	FL13	009	639,3 ng/μL
LGMF052	001	116,6 ng/μL	FL13	010	1164,3 ng/μL
LGMF076	001	1114,2 ng/μL	FL13	011	927,9 ng/μL
LGMF092	001	652,3 ng/μL	FL13	012	1206,3 ng/μL
LGMF191	001	943,6 ng/μL	FL13	013	1160,7 ng/μL
LGMF152	001	267,8 ng/μL	FL13	014	391,4 ng/μL
LGMF153	001	1221,5 ng/μL	FL13	015	861,1 ng/μL
LGMF154	001	1193 ng/μL	FL13	016	538,9 ng/μL
LGMF186	001	246,7 ng/μL	FL13	019	1235,0 ng/μL
LGMF187	001	398,4 ng/μL	FL13	020	1558,0 ng/μL
LGMF189	001	170 ng/μL	FL26	003	857,8 ng/μL
LGMF309	001	176,5 ng/μL	FL26	004	709,2 ng/μL
LGMF025	004	1332,3 ng/μL	FL26	005	1051,8 ng/μL
LGMF025	005	885,3 ng/μL	FL26	006	1037,5 ng/μL
LGMF001	005	504,9 ng/μL	FL26	007	828,4 ng/μL
LGMF001	006	1037,0 ng/μL	FL26	008	908,0 ng/μL
LGMF001	011	1176,0 ng/μL	FL26	009	900,0 ng/μL
LGMF001	012	1032,1 ng/μL	FL26	013	1039,8 ng/μL
LGMF001	014	948,1 ng/μL	FL26	017	930,9 ng/μL
LGMF003	001	622,5 ng/μL	FL26	018	958,7 ng/μL
LGMF003	002	807,7 ng/μL	FL26	020	1148,9 ng/μL

QUADRO 4 - RESULTADOS DA ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO DA MINIPREPARAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL DO FRAGMENTO GCP POR ESPECTROFOTOMETRIA  
 FONTE: O autor (2012)

### 5.3.6 PCR para Sequenciamento e Purificação do Produto de PCR para Reação de Sequenciamento

Na FIGURA 8 estão demonstrados os resultados das reações de PCR com os *primers* M13 após etapa de purificação.

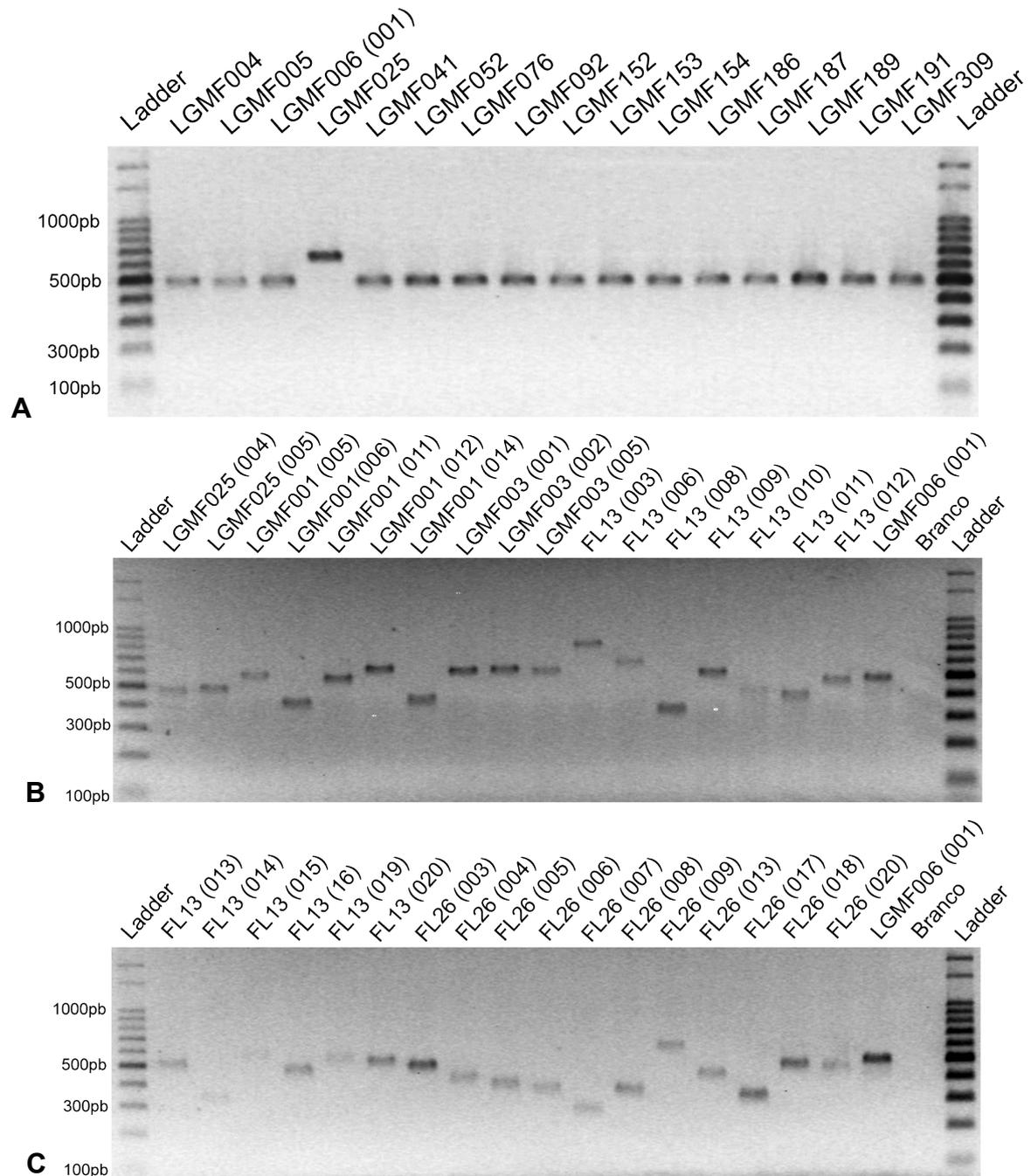


FIGURA 8 - AVALIAÇÃO DA PCR PARA SEQUÊNCIAMENTO DA REGIÃO GCP UTILIZANDO OS PRIMERS M13

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Foram aplicados 2  $\mu$ L de cada amostra e a banda de 500 pb do marcador Ladder contém 22,5ng. Os números indicados na imagem representam o tamanho estimado das bandas. Linhagens de *P. capitalensis*: LGMF001, LGMF002, LGMF003; linhagens de *P. citricarpa*: LGMF004, LGMF005, LGMF006, LGMF025, LGMF041, LGMF052, LGMF076, LGMF092, LGMF152, LGMF153, LGMF154, LGMF186, LGMF187, LGMF189, LGMF191, LGMF309.

O resultado da avaliação da FIGURA 8 por densitometria encontra-se no QUADRO 5. As concentrações obtidas oscilaram desde 3 até 32,5 ng/ $\mu$ L, nem sempre sendo necessária a diluição a 10 ng/ $\mu$ L.

Clone		Concentração		Clone		Concentração	
LGMF004	056	9,6	ng/μL	LGMF003	005	11,3	ng/μL
LGMF005	001	8,9	ng/μL	FL13	003	10,6	ng/μL
LGMF006	001	16,4	ng/μL	FL13	006	7,2	ng/μL
LGMF025	001	16,3	ng/μL	FL13	008	10	ng/μL
LGMF041	001	14,8	ng/μL	FL13	009	10,4	ng/μL
LGMF052	001	13,4	ng/μL	FL13	010	7,2	ng/μL
LGMF076	001	12,5	ng/μL	FL13	011	14	ng/μL
LGMF092	001	14,2	ng/μL	FL13	012	12,6	ng/μL
LGMF152	001	11,6	ng/μL	FL13	013	20	ng/μL
LGMF153	001	14,1	ng/μL	FL13	014	4	ng/μL
LGMF154	001	13	ng/μL	FL13	015	3	ng/μL
LGMF186	001	13,4	ng/μL	FL13	016	9,7	ng/μL
LGMF187	001	12,8	ng/μL	FL13	019	6,8	ng/μL
LGMF189	001	18	ng/μL	FL13	020	13	ng/μL
LGMF191	001	14,3	ng/μL	FL26	003	16	ng/μL
LGMF309	001	13	ng/μL	FL26	004	25,7	ng/μL
LGMF025	004	8,6	ng/μL	FL26	005	14,7	ng/μL
LGMF025	005	11,7	ng/μL	FL26	006	13,3	ng/μL
LGMF001	005	10,1	ng/μL	FL26	007	16,1	ng/μL
LGMF001	006	7,1	ng/μL	FL26	008	16,5	ng/μL
LGMF001	011	14,5	ng/μL	FL26	009	13,1	ng/μL
LGMF001	012	15,7	ng/μL	FL26	013	10,1	ng/μL
LGMF001	014	32,5	ng/μL	FL26	017	16	ng/μL
LGMF003	001	14,6	ng/μL	FL26	018	12,9	ng/μL
LGMF003	002	14	ng/μL	FL26	020	9,9	ng/μL

QUADRO 5 - RESULTADOS DA ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO DO PRODUTO DE PCR DO FRAGMENTO GCP A PARTIR DOS INSERTOS EM PLASMÍDEO AMPLIFICADOS PELOS PRIMERS M13 POR ESPECTROFOTOMETRIA

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Linhagens de *P. capitalensis*: LGMF001, LGMF002, LGMF003; linhagens de *P. citricarpa*: LGMF004, LGMF005, LGMF006, LGMF025, LGMF041, LGMF052, LGMF076, LGMF092, LGMF152, LGMF153, LGMF154, LGMF186, LGMF187, LGMF189, LGMF191, LGMF309.

### 5.3.7 Análise das sequências

Após a passagem do *pipeline* de avaliação, as sequências obtidas para os clones 010, 011, 015 e 020 da folha 13, e de LGMF153 foram descartadas porque não apresentaram qualidade superior a linha de corte estipulada pelo pacote PHRAP. As demais foram consideradas para avaliação.

### 5.3.7.1 Variação das sequências Homólogas a GCP

Das 10 sequências obtidas da Folha 13, apenas 1 (Clone 016) apresentou-se homóloga a GCP previamente obtida (GLIENKE, 1999). Igualmente, dos 11 clones analisados da Folha 26, apenas 1 apresentou homologia (Clone 003). Dos clones de *P. capitalensis*, nenhum apresentou sequência com homologia a GCP. Inclui-se aqui a amostra LGMF025, que apresentou sequência de tamanho normal, mesmo com a alteração observada na FIGURA 8

### 5.3.7.2 Busca de Similaridade

#### 5.3.7.2.1 Região GCP

A região GCP, quando comparada com as sequências presentes no GenBank, não apresentou similaridade quando comparada com o banco de dados de nucleotídeos, com o banco de dados de proteína (após tradução nos seis quadros) e com o banco de dados de nucleotídeos traduzido em proteína com a sequência igualmente traduzida. Apenas contra o banco de dados de genomas fúngicos uma região de similaridade baixa e com probabilidade de ter ocorrido ao acaso elevada (E-value 0,61) foi encontrada no genoma de *Aspergillus niger*, em uma região não anotada.

Apenas uma região do alinhamento mostrou distinção clara entre as sequências dos fragmentos obtidos das folhas cítricas e dos isolados fúngicos de *P. citricarpa*. A sequência obtida dos isolados demonstrou que nenhum dos isolados de *P. citricarpa* presentes no laboratório contém exatamente a mesma sequência obtida a partir dos fragmentos de ambas as folhas (FIGURA 6).

```

FL13 pGEMT GCP 016      GCGCTGCAACAGGGAAGGTTAGACTTTC AATTGAGCCGGAGCTGGAG
FL26 pGEMT GCP 003      .....G.....
Insero Glienke (1999) .....
LGMF006 pGEMT GCP 001      .....A.....
LGMF309 pGEMT GCP 001      .....A.....
LGMF025 pGEMT GCP 004      .....A.....
LGMF005 pGEMT GCP 001      .....A.....
LGMF004 pGEMT GCP 056      .....A.....
LGMF076 pGEMT GCP 001      .....A.....
LGMF041 pGEMT GCP 001      .....A.....
LGMF092 pGEMT GCP 001      .....A.....
LGMF154 pGEMT GCP 001      .....A.....
LGMF191 pGEMT GCP 001      .....A.....
LGMF025 pGEMT GCP 005      .....A.....
LGMF052 pGEMT GCP 001      .....A.....
LGMF186 pGEMT GCP 001      .....A.....
LGMF187 pGEMT GCP 001      .....A.....
LGMF189_pGEMT_GCP_001    .....A.....

```

FIGURA 9 - REGIÃO DO ALINHAMENTO DE GCP DISTINGUINDO AS SEQUÊNCIAS OBTIDAS DOS CLONES DE FOLHA E DE *Phyllosticta citricarpa*  
 FONTE: O autor (2012)

### 5.3.7.2.2 Regiões diversas

Em *P. capitalensis*, foram observadas 4 distintas regiões amplificadas: Região 01 (LGMF001 clone 005 e LGMF003 clones 001 e 002) – similar a diversas proteínas hipotéticas fúngicas –, Região 02 (LGMF001 clones 006 e 014) – sem similaridade observadas nos bancos de dados –, Região 03 (LGMF001 clone 011 e LGMF003 clone 005 ) – similar a diversas proteínas hipotéticas fúngicas – e a Região 04 (LGMF001 clone 012) – similar a diversas proteínas hipotéticas fúngicas.

Em clonagens de fragmentos obtidos das folhas cítricas, não foram observadas regiões como as obtidas em *P. capitalensis* ou repetidas entre si, e os resultados da busca nos bancos de dados não resultaram em nenhuma similaridade.

### 5.3.8 Desenho de *Primers* para PCR quantitativa

Com o auxílio dos programas indicados, um conjunto de *primers* e sonda para a utilização do sistema TaqMan foi desenvolvido (Sonda: 5'TCCTATTTCCAGAGCACCCATCTAAA3'; *Primer* Verso: 5'GAGAGTGGAAGGAGACAG3'; *Primer* Reverso: 5'CTACGGCAGATAGTAATAACC3'). Durante as análises para a formação de

estruturas secundárias que pudessem atrapalhar a amplificação, nenhuma das mesmas apresentou energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) inferior a  $-7,8$  kcal/mol (a  $37^\circ\text{C}$ ) (APÊNDICE 3).

### 5.3.8.1 Avaliação Comparativa entre os Conjuntos de Ensaios para qPCR

Na TABELA 1 estão elencados os valores de  $C_t$  para a curva de calibração com diluições seriadas do DNA de LGMF006.

TABELA 1 - VALORES DE  $C_t$  PARA AS CURVAS DE CALIBRAÇÃO UTILIZANDO A LINHAGEM LGMF006 DE *Phyllosticta citricarpa* DOS ENSAIOS DE QPCR AVALIADOS

QUANTIDADE DE MATERIAL	VALOR DE $C_t$	
	ENSAIO PRÉVIO	ENSAIO PROPOSTO
10ng	25,54	31,71
	25,26	30,86
	25,49	30,57
	26,66	34
1ng	27,29	32,65
	27,69	33,4
	29,2	36,1
0,1ng (100 pg)	30,36	35,94
	30,25	35,9
	31,97	-
0,01ng (10 pg)	32,08	-
	32,1	-
	32,84	-
0,001ng (1 pg)	33,34	-
	33,55	-
	33,58	-
0,0001ng (100 fg)	33,03	-
	-	-
	35,49	-
0,00001ng (10 fg)	35,91	-
	34,87	-
	-	-
0,000001ng (1 fg)	-	-
	-	-
	-	-

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Por ensaio prévio entende-se o proposto por Gent-Pelzer (2007) e por Ensaio Proposto o colocado neste trabalho.

Tais valores foram definidos pelo Método do melhor  $R^2$ , disponível no software realex versão 1.5 (EPPENDORF, 2008) que acompanha o equipamento, foram definidos os valores de  $C_t$  para as amplificações obtidas nas reações realizadas, tanto no Ensaio Previamente Disponível quanto no Proposto.

Na FIGURA 10 os valores da TABELA 1 foram ordenados em forma gráfica e realizadas regressões lineares com os valores de  $R^2$  indicados próximo ao gráfico correspondente. Para os valores de regressão obtidos, temos uma eficiência de 305% para o Ensaio Prévio e 154% para o Ensaio Proposto.

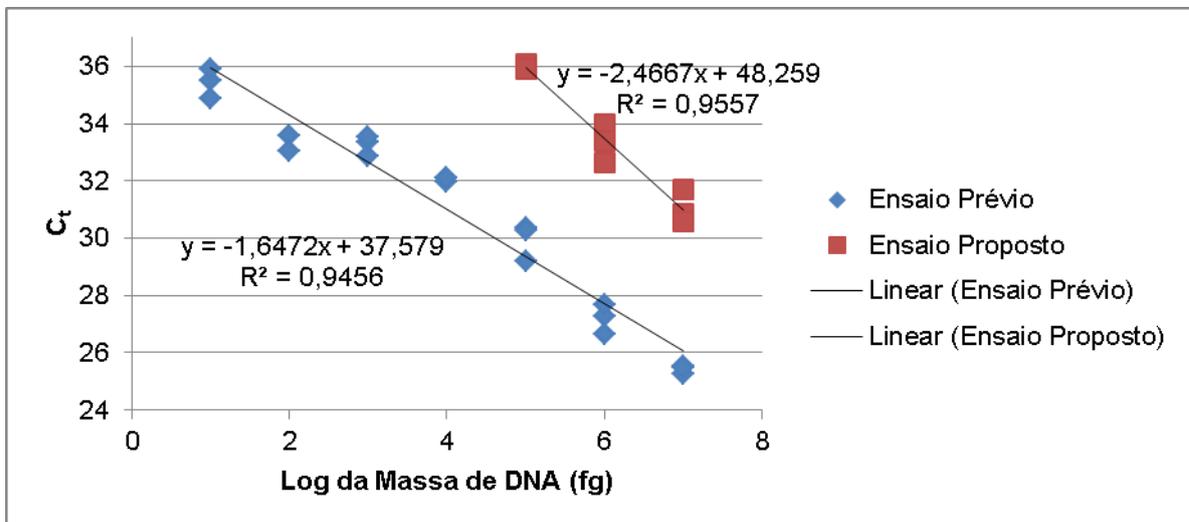


FIGURA 10 - CURVAS DE CALIBRAÇÃO UTILIZANDO A LINHAGEM LGMF006 DE *Phyllosticta citricarpa* DOS ENSAIOS DE QPCR AVALIADOS

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Por ensaio prévio entende-se o proposto por Gent-Pelzer (2007) e por Ensaio Proposto o colocado neste trabalho. Em **negrito** encontram-se os valores de  $C_t$  abaixo de 40 que seriam esperados superiores a 40 ou nulos.

Os valores de  $C_t$  para as demais amostras estão indicados na TABELA 2, juntamente com o nome das linhagens e a espécie a qual pertencem.

TABELA 2 - VALORES DE  $C_t$  PARA AS AMOSTRAS DE *Phyllosticta citricarpa*, *Phyllosticta capitalensis*, *Phyllosticta brazilianiae*, *Phyllosticta citribrasiliensis*, *Guignardia mangiferae* E CONTROLE NEGATIVO AVALIADOS

ESPÉCIE	LINHAGEM	VALOR DE $C_t$	
		ENSAIO PRÉVIO	ENSAIO PROPOSTO
<i>P. citricarpa</i>	LGMF004	22.72	29.74
	LGMF004	22.99	29.83
	LGMF005	21.63	28.48
	LGMF005	21.83	28.70
	LGMF001	<b>39.96</b>	44.13
<i>P. capitalensis</i>	LGMF001	<b>39.78</b>	42.57
	LGMF002	<b>34.61</b>	43.82
	LGMF002	<b>35.09</b>	40.92
	LGMF003	<b>37.10</b>	
	LGMF003	<b>37.95</b>	<b>39.46</b>
<i>P. brazilianiae</i>	LGMF330	<b>34.51</b>	<b>38.45</b>
	LGMF330	<b>36.39</b>	41.44
	LGMF007	<b>35.68</b>	<b>38.14</b>
<i>P. citribrasiliensis</i>	LGMF007	<b>35.90</b>	<b>37.46</b>
	LGMF010	40.80	-
	LGMF010	40.72	-
	LGMF011	-	41.18
<i>G. mangiferae</i>	LGMF011	39.60	<b>38.53</b>
	IMI260576	-	-
	IMI260576	-	41.62
Controle Negativo	Branco	-	<b>39.75</b>
	Branco	-	41.95
	Branco	-	-
	Branco	-	-

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Por ensaio prévio entende-se o proposto por Gent-Pelzer (2007) e por Ensaio Proposto o colocado neste trabalho. Em negrito encontram-se os valores de  $C_t$  abaixo de 40 que seriam esperados superiores a 40 ou nulos.

Os produtos de PCR do ensaio proposto foram avaliados em gel de agarose, e expostos na FIGURA 11. Observa-se a ausência de amplificação no Branco (2) que resultou em percepção de um  $C_t$  e a presença de amplificação no Branco (3 e 4) que não resultaram em um  $C_t$  detectável.

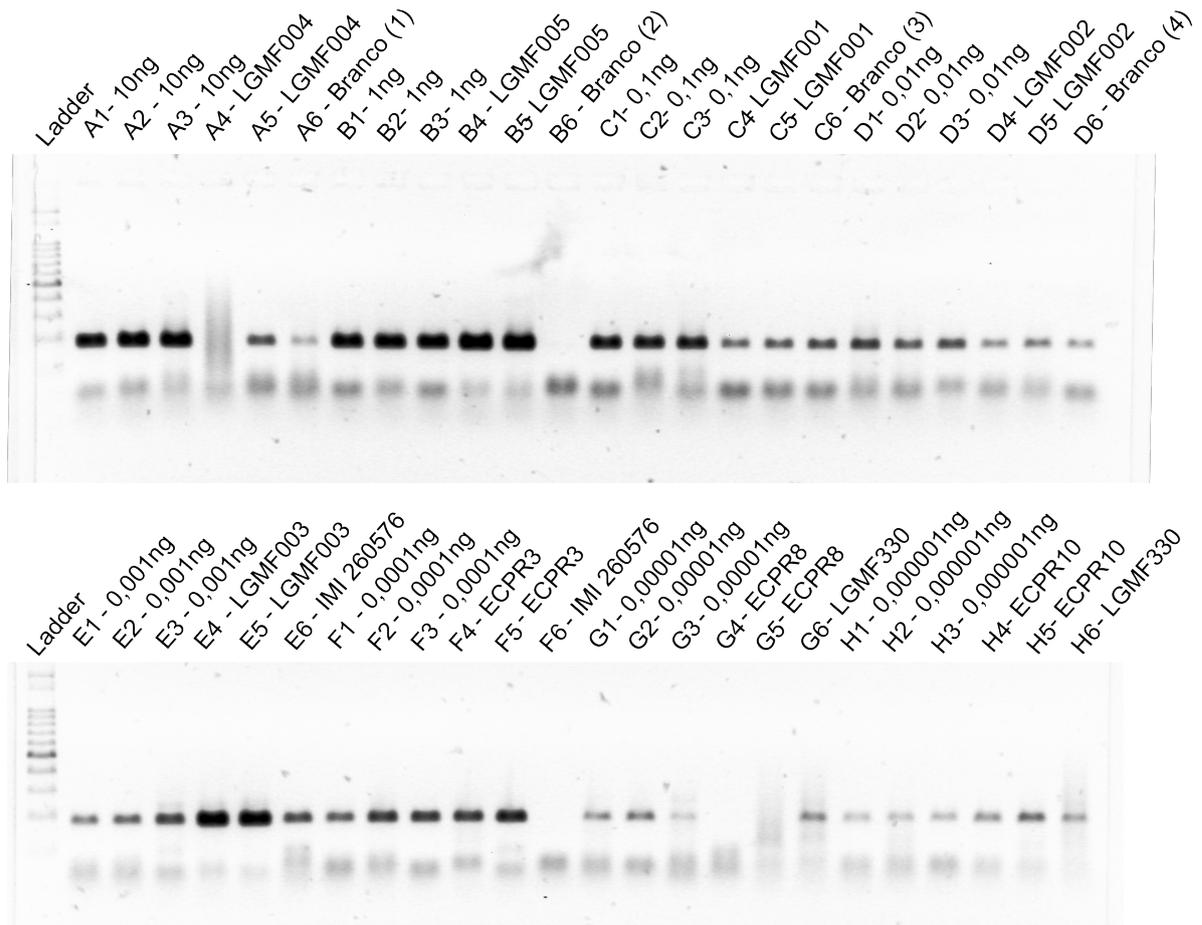


FIGURA 11 - AVALIAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR QUANTITATIVA (ENSAIO PROPOSTO) EM GEL DE AGAROSE 1,5%

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Quando em repetição, as canaletas se referem a tabela, com os valores de  $C_t$  em ordem sequencial.

## 5.4 FRAGMENTO GENÔMICO GMF

### 5.4.1 Sequenciamento Utilizando Vetor

#### 5.4.1.1 Amplificação

Os resultados da amplificação do fragmento genômico, utilizando os *primers* GMF e DNA obtido a partir de material vegetal e de linhagens de *P. citricarpa*, *P. citribraziliensis*, *G. magiferae* e *P. capitalensis*, estão indicados na FIGURA 12. As linhagens de *P. capitalensis*, *P. citricarpa* e Folha FL08 apresentaram o fragmento

de 700pb esperado Enquanto as linhagens de *P. citricarpa* e *P. citribraziliensis* só apresentaram amplificação em condições menos estridentes.

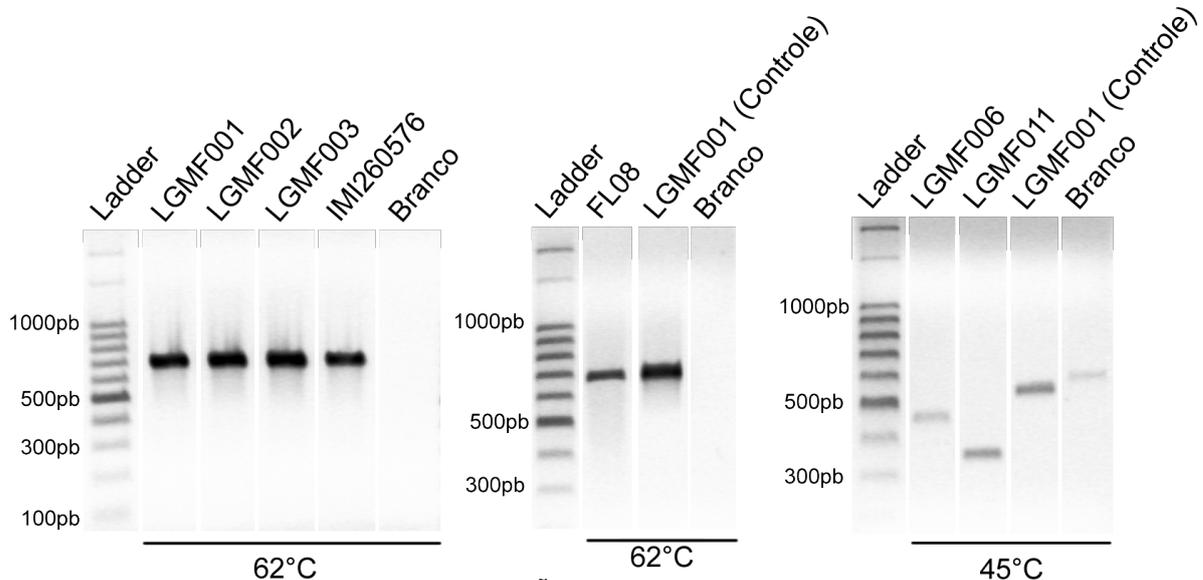


FIGURA 12 - PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO GMF EM FOLHAS E LINHAGENS FÚNGICAS EM GEL DE AGAROSE 1,5%.

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Foram aplicados 5  $\mu$ L de cada amostra e a banda de 500 pb do marcador Ladder contém 45ng. Isolados de *P. capitalensis*: LGMF001, LGMF002, LGMF003; *G. mangiferae*: IMI 260576; *P. citribraziliensis*: LGMF011 e *P. citricarpa*: LGMF006.

#### 5.4.1.2 Estimativa da Concentração do Produto de PCR para Ligação

Todas as amostras presentes na FIGURA 12 tiveram sua concentração de Ácidos Nucléicos oscilando entre 1 e 46 ng/ $\mu$ L (QUADRO 6), não sendo necessária a diluição a 12,5 ng/ $\mu$ L para todas.

Linhagem	Concentração
LGMF001	37,468 ng/ $\mu$ L
LGMF002	45,244 ng/ $\mu$ L
LGMF003	46,932 ng/ $\mu$ L
IMI260576	32,06 ng/ $\mu$ L
LGMF006	1,869 ng/ $\mu$ L
LGMF011	4,3498 ng/ $\mu$ L
FL08	9,4656 ng/ $\mu$ L

QUADRO 6 - RESULTADOS DA ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO DO PRODUTO DE PCR PARA LIGAÇÃO EM VETOR DO FRAGMENTO GMF POR ESPECTROFOTOMETRIA

FONTE: O autor (2012)

#### 5.4.1.3 Ligação em Vetor de Sequenciamento e Transformação

A avaliação da eficiência de transformação foi realizada e estimada em  $10^4$  Unidades Formadoras de Colônia/ $\mu$ g de Plasmídeo, garantindo a eficiência das células em internalizar plasmídeos.

#### 5.4.1.4 Avaliação dos Transformantes por PCR de Colônia

Os transformantes obtidos a partir de fragmentos GMF foram avaliados através de PCR de Colônia e os resultados para as linhagens de LGMF001 e LGMF002 – de *P. capitalensis* – estão dispostos na FIGURA 13, indicando alguma variação de tamanho. Na FIGURA 14 estão apresentados os isolados LGMF003 – de *P. capitalensis* – e IMI260576 – de *G. mangiferae* –, com similar variação de tamanho. Foram selecionados dois clones com tamanhos pertencentes a distintos grupos, indicados com retângulos.

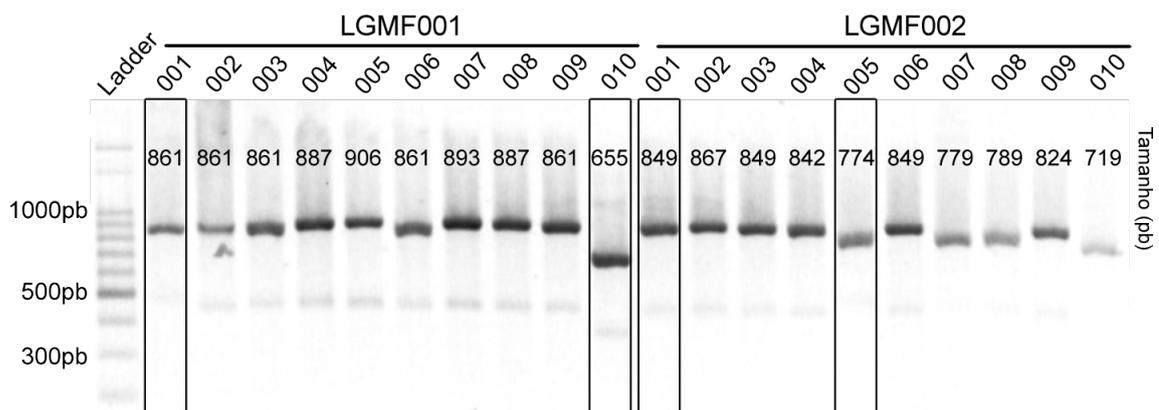


FIGURA 13 - RESULTADOS DA REAÇÃO DE PCR DE COLÔNIA COM OS CLONES CONTENDO FRAGMENTO AMPLIFICADO COM PRIMERS GMF EM *Phyllosticta capitalensis* COM GEL DE AGAROSE 1,5%

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Foram aplicados 15  $\mu$ L, o volume total da reação, de cada amostra e a banda de 500 pb do marcador Ladder contém 22,5ng. Os números indicados na imagem representam o tamanho estimado das bandas. As canaletas circundadas por retângulos foram selecionadas.

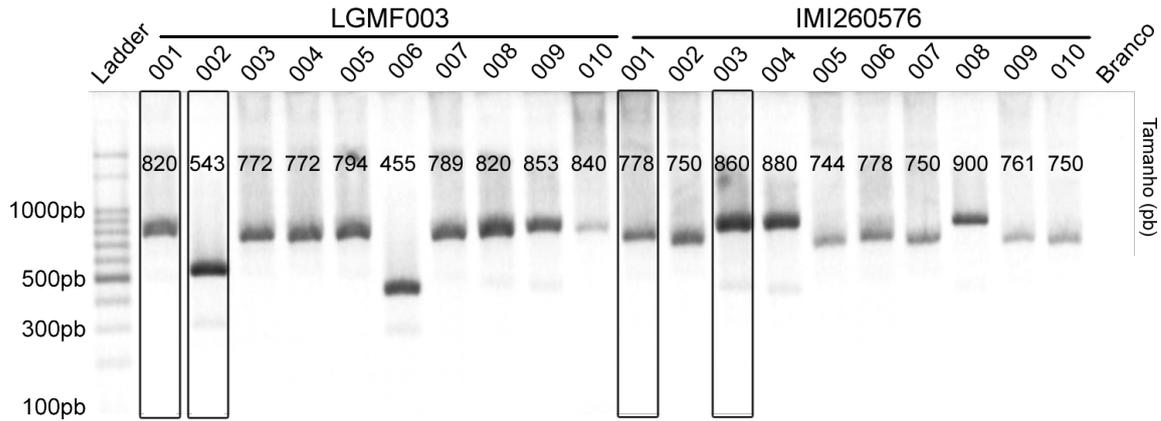


FIGURA 14 - RESULTADOS DA REAÇÃO DE PCR DE COLÔNIA COM OS CLONES CONTENDO FRAGMENTO AMPLIFICADO COM PRIMERS GMF EM *Phyllosticta capitalensis* (LGMF003) E *Guignardia mangiferae* (IMI260576) COM GEL DE AGAROSE 1,5%

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Foram aplicados 15  $\mu$ L, o volume total da reação, de cada amostra e a banda de 500 pb do marcador Ladder contém 22,5ng. Os números indicados na imagem representam o tamanho estimado das bandas. As canaletas circundadas por retângulos foram selecionadas.

Procedimento similar foi tomado com o material oriundo de linhagens de *P. citricarpa* e *P. citribraziliensis* (FIGURA 15 e FIGURA 16), que – igualmente – apresentaram variação de tamanho.

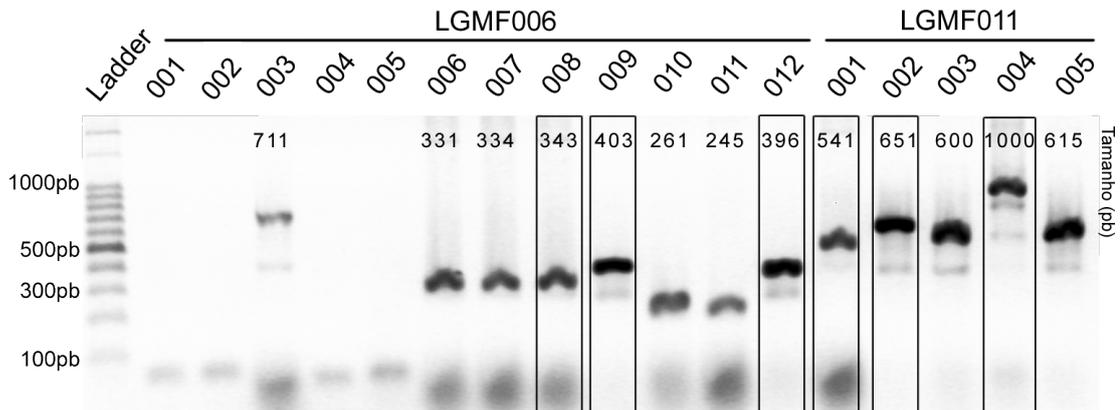


FIGURA 15 - RESULTADOS DA REAÇÃO DE PCR DE COLÔNIA COM OS CLONES CONTENDO FRAGMENTO AMPLIFICADO COM PRIMERS GMF EM *Phyllosticta citricarpa* (LGMF006) E *Phyllosticta citribraziliensis* (LGMF011) COM GEL DE AGAROSE 1,5%

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Foram aplicados 15  $\mu$ L, o volume total da reação, de cada amostra e a banda de 500 pb do marcador Ladder contém 22,5ng. Os números indicados na imagem representam o tamanho estimado das bandas. As canaletas circundadas por retângulos foram selecionadas.

Por fim, para o material obtido da Folha FL08, 10 clones foram selecionados, excetuando-se o de maior tamanho, dada a baixa eficiência na PCR de colônia (FIGURA 16).

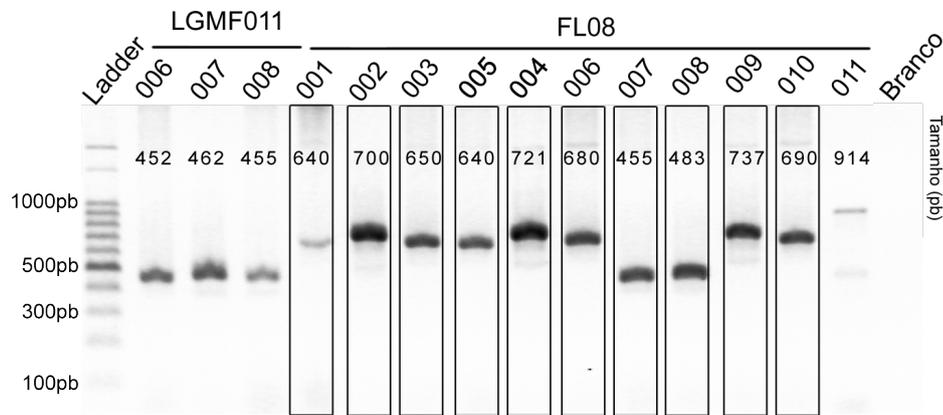


FIGURA 16 - RESULTADOS DA REAÇÃO DE PCR DE COLÔNIA COM OS CLONES CONTENDO FRAGMENTO AMPLIFICADO COM *PRIMERS* GMF EM *Phyllosticta citribraziliensis* (LGMF011) E NA FOLHA 08 DE COM GEL DE AGAROSE 1,5%

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Foram aplicados 15  $\mu$ L, o volume total da reação, de cada amostra e a banda de 500 pb do marcador Ladder contém 22,5ng. Os números indicados na imagem representam o tamanho estimado das bandas. As canaletas circundadas por retângulos foram selecionadas.

#### 5.4.1.5 Minipreparação de DNA Plasmidial

Os clones selecionados foram inoculados em 2 mL de meio LB para a realização da Minipreparação de DNA Plasmidial, podendo ser observado o resultado obtido (FIGURA 17 e FIGURA 18).

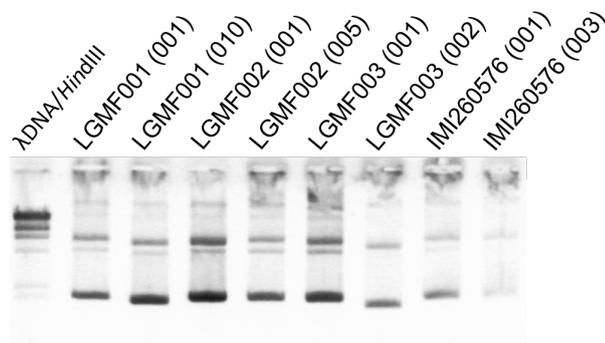


FIGURA 17 - AVALIAÇÃO DA MINIPREPARAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL DOS INSERTOS DE GMF NOS CLONES SELECIONADOS ORIUNDOS DAS LINHAGENS DE *Phyllosticta capitalensis* E *Guignardia mangiferae* EM GEL DE AGAROSE 0,8%

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Foram aplicados 10  $\mu$ L de cada amostra e 200 ng totais (ou 10 $\mu$ L da solução preparada) do marcador  $\lambda$ DNA/*Hind*III. Linhagens de *P. capitalensis*: LGMF001, LGMF002 e LGMF003; *G. mangiferae*: IMI260576.

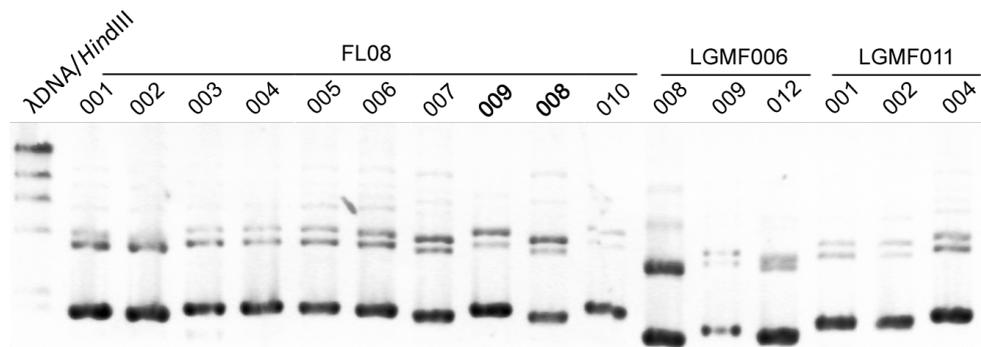


FIGURA 18 - AVALIAÇÃO DA MINIPREPARAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL DOS INSERTOS DE GMF NOS CLONES SELECIONADOS ORIUNDOS DA FOLHA 08 E DAS LINHAGENS DE *Phyllosticta capitalensis* (LGMF006) E *Phyllosticta citribraziliensis* (LGMF011) EM GEL DE AGAROSE 0,8%

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Foram aplicados 10  $\mu$ L de cada amostra e 200 ng totais (ou 10 $\mu$ L da solução preparada) do marcador  $\lambda$ DNA/HindIII.

No QUADRO 7 estão indicadas as quantificações por espectrofotômetro do material avaliado por gel de agarose, cujas concentrações oscilaram entre 108 e 417 ng/ $\mu$ L, sendo indispensável a diluição a 10 ng/ $\mu$ L.

Material	Concentração	Material	Concentração
LGMF001 (001)	218,4 ng/ $\mu$ L	FL08 (005)	166,2 ng/ $\mu$ L
LGMF001 (010)	294,7 ng/ $\mu$ L	FL08 (006)	227,2 ng/ $\mu$ L
LGMF002 (001)	331,1 ng/ $\mu$ L	FL08 (007)	161,1 ng/ $\mu$ L
LGMF002 (005)	218,9 ng/ $\mu$ L	FL08 (008)	126,7 ng/ $\mu$ L
LGMF003 (001)	272,5 ng/ $\mu$ L	FL08 (009)	249,6 ng/ $\mu$ L
LGMF003 (002)	187,1 ng/ $\mu$ L	FL08 (010)	109,5 ng/ $\mu$ L
IMI260576 (001)	189,3 ng/ $\mu$ L	LGMF006 (008)	417,5 ng/ $\mu$ L
IMI260576 (003)	162,4 ng/ $\mu$ L	LGMF006 (009)	147,7 ng/ $\mu$ L
FL08 (001)	389,7 ng/ $\mu$ L	LGMF006 (012)	288,0 ng/ $\mu$ L
FL08 (002)	363,4 ng/ $\mu$ L	LGMF011 (001)	161,9 ng/ $\mu$ L
FL08 (003)	260,8 ng/ $\mu$ L	LGMF011 (002)	108,1 ng/ $\mu$ L
FL08 (004)	214,1 ng/ $\mu$ L	LGMF011 (004)	238,3 ng/ $\mu$ L

QUADRO 7 - RESULTADOS DA ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO DA MINIPREPARAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL DO FRAGMENTO GMF POR ESPECTROFOTOMETRIA

FONTE: O autor (2012)

#### 5.4.1.6 PCR para Sequenciamento e Purificação do Produto de PCR para Reação de Sequenciamento

Na FIGURA 19 estão demonstrados os resultados das reações de PCR com os *primers* M13 após etapa de purificação. Observa-se a presença de algum artefato na eletroforese ou na própria reação de PCR, com o leve borrado em algumas bandas.

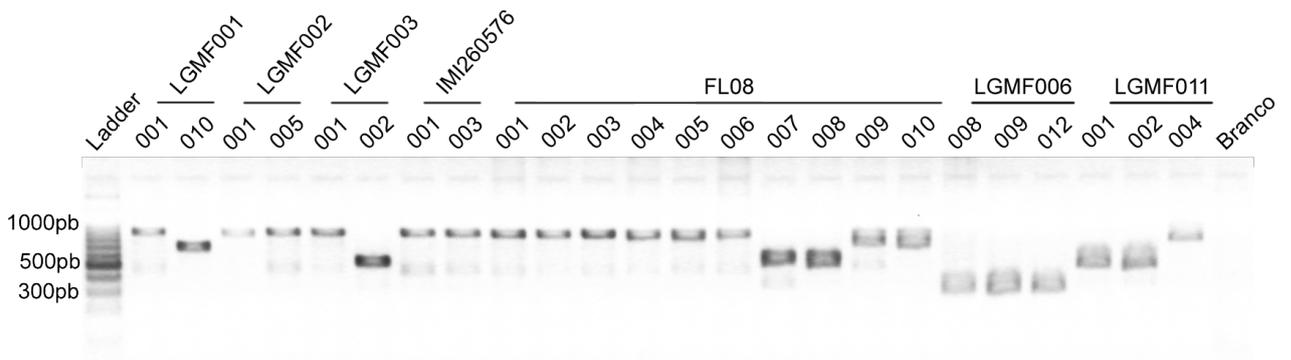


FIGURA 19 - AVALIAÇÃO DA PCR PARA SEQUÊNCIAMENTO, UTILIZANDO VETOR, DA REGIÃO GMF DAS LINHAGENS DE *Phyllosticta capitalensis*, *Guignardia mangiferae*, *Phyllosticta citricarpa*, *Phyllosticta citribraziliensis* E FOLHA 08

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Foram aplicados 2  $\mu$ L, o volume total da reação, de cada amostra e a banda de 500 pb do marcador Ladder contém 22,5ng. Os números indicados na imagem representam o tamanho estimado das bandas. Linhagens de *P. capitalensis*: LGMF001, LGMF002 e LGMF003; *P. citricarpa*: LGMF006; Linhagem de *P. citribraziliensis*: LGMF011.

O resultado da avaliação da FIGURA 19 por densitometria se encontra no QUADRO 8. As concentrações variaram entre 11 a 52 ng/ $\mu$ L, sendo imprescindível a diluição à concentração de 10 ng/ $\mu$ L.

Material	Concentração	Material	Concentração
LGMF001 (001)	11,4 ng/ $\mu$ L	FL08 (005)	23,3 ng/ $\mu$ L
LGMF001 (010)	30,2 ng/ $\mu$ L	FL08 (006)	14,1 ng/ $\mu$ L
LGMF002 (001)	52,9 ng/ $\mu$ L	FL08 (007)	47,0 ng/ $\mu$ L
LGMF002 (005)	14,2 ng/ $\mu$ L	FL08 (008)	51,3 ng/ $\mu$ L
LGMF003 (001)	18,6 ng/ $\mu$ L	FL08 (009)	25,8 ng/ $\mu$ L
LGMF003 (002)	46,0 ng/ $\mu$ L	FL08 (010)	26,9 ng/ $\mu$ L
IMI260576 (001)	16,3 ng/ $\mu$ L	LGMF006 (008)	20,3 ng/ $\mu$ L
IMI260576 (003)	16,2 ng/ $\mu$ L	LGMF006 (009)	31,1 ng/ $\mu$ L
FL08 (001)	20,9 ng/ $\mu$ L	LGMF006 (012)	24,5 ng/ $\mu$ L
FL08 (002)	16,3 ng/ $\mu$ L	LGMF011 (001)	32,7 ng/ $\mu$ L
FL08 (003)	25,6 ng/ $\mu$ L	LGMF011 (002)	34,3 ng/ $\mu$ L
FL08 (004)	17,8 ng/ $\mu$ L	LGMF011 (004)	12,3 ng/ $\mu$ L

QUADRO 8 - RESULTADOS DA ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO DO PRODUTO DE PCR DO FRAGMENTO GMF A PARTIR DOS INSERTOS EM PLASMÍDEO POR ESPECTROFOTOMETRIA  
 FONTE: O autor (2012)

#### 5.4.2 Sequenciamento Direto

##### 5.4.2.1 PCR para Sequenciamento e Purificação do Produto de PCR para Reação de Sequenciamento

Na FIGURA 20 estão demonstrados os resultados das reações de PCR com os *primers* GMF1/GMR2 para linhagens de *P. capitalensis*, *P. brazilianiae* e *G. mangiferae* após etapa de purificação. Algumas bandas apresentam borrões, entretanto, apenas LGMF002 não sinalizou amplificação.

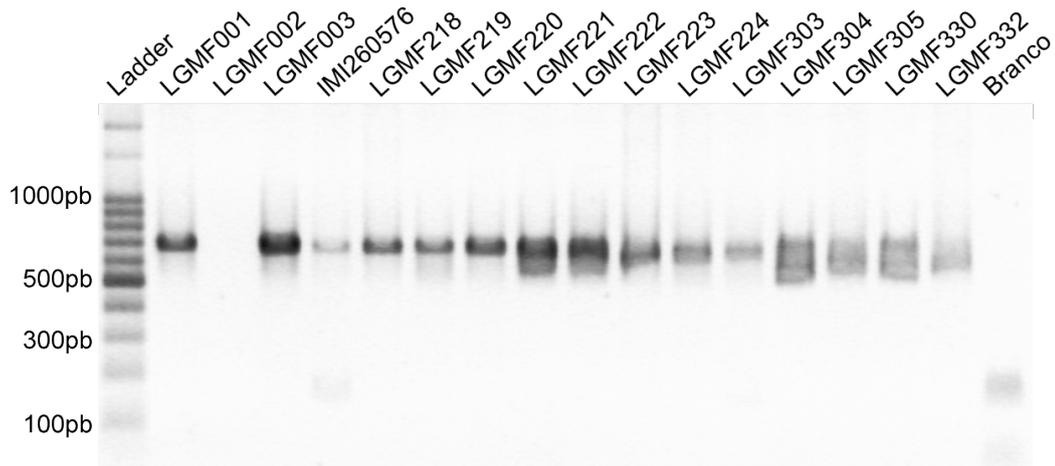


FIGURA 20 - AVALIAÇÃO DA PCR PARA SEQUENCIAMENTO, DIRETO, DA REGIÃO GMF DAS LINHAGENS DE *Phyllosticta capitalensis*, *Phyllosticta brazilianiae* E *Guignardia mangiferae*  
 FONTE: O autor (2012)

NOTA: Foram aplicados 2  $\mu$ L, o volume total da reação, de cada amostra e a banda de 500 pb do marcador Ladder contém 45ng. Os números indicados na imagem representam o tamanho estimado das bandas. Linhagens de *P. capitalensis*: LGMF001, LGMF002, LGMF003, LGMF218, LGMF219, LGMF220, LGMF221, LGMF222, LGMF223, LGMF224, LGMF303, LGMF304, LGMF305, LGMF332; Linhagem de *G. mangiferae*: IMI 260576; Linhagem de *P. brazilianiae*: LGMF330

O resultado da densitometria realizada com a FIGURA 20 está disponível no QUADRO 9. As concentrações variaram desde 0 até 97 ng/ $\mu$ L, o que implicou na necessidade de diluir algumas amostras à 10 ng/ $\mu$ L.

Material	Concentração	Material	Concentração
LGMF001	56,5 ng/ $\mu$ L	LGMF222	90,1 ng/ $\mu$ L
LGMF002	0,0 ng/ $\mu$ L	LGMF223	59,3 ng/ $\mu$ L
LGMF003	88,8 ng/ $\mu$ L	LGMF224	41,1 ng/ $\mu$ L
IMI260576	12,3 ng/ $\mu$ L	LGMF303	23,8 ng/ $\mu$ L
LGMF218	40,2 ng/ $\mu$ L	LGMF304	73,9 ng/ $\mu$ L
LGMF219	40,7 ng/ $\mu$ L	LGMF305	43,5 ng/ $\mu$ L
LGMF220	52,7 ng/ $\mu$ L	LGMF330	51,0 ng/ $\mu$ L
LGMF221	97,3 ng/ $\mu$ L	LGMF332	27,8 ng/ $\mu$ L

QUADRO 9 - RESULTADOS DA ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO DO PRODUTO DE PCR PARA SEQUENCIAMENTO DIRETO DO FRAGMENTO GMF  
 FONTE: O autor (2012)

#### 5.4.3 Análise das Sequências

Após a passagem do pipeline de avaliação, as sequências obtidas para o clone 001 de LGMF001 e do sequenciamento direto de LGMF002 foram descartadas

porque não apresentaram qualidade superior a linha de corte estipulada pelo pacote PHRAP. As demais foram consideradas para avaliação. Dentro de uma mesma linhagem, as sequências obtidas através de sequenciamento direto ou através de clonagem demonstraram-se idênticas.

#### 5.4.3.1 Variação das sequências Homólogas a GMF

Das sequências obtidas de Folha, *P. capitalensis*, *P. brazilianiae* e *G. maniferae*, 32 apresentaram homologia com a região GMF previamente descrita (KAVA-CORDEIRO, 2004) e estão indicadas no QUADRO 10.

<b>Sequências Homólogas a GMF</b>	
LGMF001	LGMF305
LGMF001 (010)*	LGMF330
LGMF002 (001)	LGMF332
LGMF002 (002)	IMI260576
LGMF003	IMI260576 (003)
LGMF003 (001)	IMI260576 (001)
LGMF003 (002)*	FL08 (001)
LGMF218	FL08 (002)
LGMF219	FL08 (003)
LGMF220	FL08 (004)
LGMF221	FL08 (005)
LGMF222	FL08 (006)
LGMF223	FL08 (007)*
LGMF224	FL08 (008)*
LGMF303	FL08 (009)
LGMF304	FL08 (010)

QUADRO 10 - LISTA DE SEQUÊNCIAS DA REGIÃO GMF QUE APRESENTARAM HOMOLOGIA COM A REGIÃO GMF PREVIAMENTE DISPONÍVEL (KAVA-CORDEIRO, 2004)

FONTE: O autor (2012)

NOTA: As sequências indicadas sem números entre parêntesis foram obtidas do sequenciamento direto, já as com numeração foram sequenciadas utilizando vetores e o número corresponde ao clone sequenciado. As sequências com um asterisco apresentavam homologia, entretanto estavam truncadas em seu início ou final.

Com relação ao tamanho, as sequências selecionadas de clones com inserto menor que os cerca de 600 pb esperados, LGMF003 (002), L08A (007), L08A (008),

LGMF001 (010), apresentaram-se truncadas em seu final, mas com homologia na porção inicial. Os pontos de truncagem foram distintos para as 4 sequências.

As regiões apresentavam pouca variação entre si, com algumas variações de ponto não compartilhadas entre as sequências, ao menos dentro de *P. capitalensis* e *P. brazilianiae* (LGMF330). A sequência de *G. mangiferae* (IMI260576) apresentava uma região com 4 nucleotídeos distintivos, utilizada para o desenho do *primer* PCPr, utilizando conjuntamente a GMF1 (FIGURA 21).

```

IMI260576          GAAGACCTCGGCC.T.....C.....G....CATCCAAGCTAGG
L08A pGEMT GMF 001 GAagacctCGGCC.....ATCCAAGCTAGG
L08A pGEMT GMF 002 GAAGACCTCGGCC.....ATCCAAGCTAGG
L08A pGEMT GMF 003 GAAGACCTCGGCC.....ATCCAAGCTAGG
L08A pGEMT GMF 004 GAAGACCTCGGCC.....ATCCAAGCTAGG
L08A pGEMT GMF 005 GAAGACCTCGGCC.....ATCCAAGCTAGG
L08A pGEMT GMF 006 GAAGACCTCGGCC.....ATCCAAGCTAGG
L08A pGEMT GMF 009 GAAGACCTCGGCC.....ATCCAAGCTAGG
L08A pGEMT GMF 010 GAAGACCTCGGCC.....ATCCAAGCTAGG
LGMF001           GAAGACCTCGGCC.....ATCCAAGCTAGG
LGMF002 pGEMT GMF 001 GaagacctCGGCC.....ATCCAAGCTagg
LGMF002 pGEMT GMF 005 GAAGACCTCGGCC.....ATCCAagctaGG
LGMF003           GAAGACCTCGGCC.....ATCCAAGCTAGG
LGMF003 pGEMT GMF 001 GAAGACCTCGGCC.....ATCCAAGCTAGG
LGMF218           GAAGACCTCGGCC.....ATCCAAGCTAGG
LGMF219           GAAGACCTCGGCC.....ATCCAAGCTAGG
LGMF220           GAAGACCTCGGCC.....ATCCAAGCTAGG
LGMF221           GAAGACCTCGGCC.....ATCCAAGCTAGG
LGMF222           GAAGACCTCGGCC.....ATCCAAGCTAGG
LGMF223           GAAGACCTCGGCC.....ATCCAAGCTAGG
LGMF224           GAAGACCTCGGCC.....ATCCAAGCTAGG
LGMF303           GAAGACCTCGGCC.....ATCCAAGCTAGG
LGMF304           GAAGACCTCGGCC.....ATCCAAGCTAGG
LGMF305           GAAGACCTCGGCC.....ATCCAAGCTAGG
LGMF330           GAAGACCTCGGCC.....ATCCAAGCTAGG
LGMF332           GAAGACCTCGGCC.....ATCCAAGCTAGG
PCPr_ (RevComp)  -----TCGAAGACGGTGACGTGATCATG-----

```

FIGURA 21 - REGIÃO UTILIZADA PARA O DESENHO DO *PRIMER* PCPr DISTINGUINDO *Guignardia mangiferae* (IMI260576) DAS DEMAIS ESPÉCIES AVALIADAS  
FONTE: O autor (2012)

#### 5.4.3.2 Busca de Similaridade

##### 5.4.3.2.1 Região GMF

A região GMF, quando comparada com as sequências presentes no banco de dados de nucleotídeos (BLASTn), não apresentou similaridade. Entretanto, com o banco de dados de proteína (após tradução nos seis quadros, BLASTx), diversos

retornos Aspartil-tRNA sintetase fúngica foram encontrados, com cobertura de 92%, identidade máxima de 59% e *E-value* inferior a  $10^{-50}$ .

#### 5.4.3.2.2 Regiões Diversas

As regiões não-homólogas a GMF foram avaliadas através da ferramenta BLAST (TABELA 3).

Em *P. citricarpa*, foi observada apenas (Clones 008, 009 e 012, todos os avaliados) a amplificação de fragmento com sequência similar a Proteína Quinase dependente de AMP-cíclico de *Mycosphaerella graminicola*.

Já os fragmentos obtidos de *P. citribraziliensis*, foi observada apenas (Clones 001, 002 e 004, todos os avaliados) uma região que não demonstrou similaridade com nenhuma existente nos bancos de dados.

Em ambos os casos, foi utilizada uma temperatura de anelamento de 45°C, inferior aos 62°C inicialmente propostos.

TABELA 3 - RESULTADO DO BLAST PARA AS SEQUÊNCIAS NÃO-HOMÓLOGAS A REGIÃO GMF DAS LINHAGENS DE *Phyllosticta citricarpa* (LGMF006) E *Phyllosticta citribraziliensis* (LGMF011)

SEQUÊNCIA	RESULTADO	E-VALUE	IDENTIDADE	COBERTURA
LGMF006 (008)	Nada Significativo (E-Value <0) em BLASTn, BLASTx e tBLASTx			
LGMF006 (009)	Nada Significativo (E-Value <0) em BLASTn, BLASTx e tBLASTx			
LGMF006 (012)	Nada Significativo (E-Value <0) em BLASTn, BLASTx e tBLASTx			
LGMF011 (001)	Proteína Quinase dependente de AMP-cíclico de <i>Mycosphaerella graminicola</i> (DQ432033) – BLASTx	$4.10^{-68}$	76%	86%
LGMF011 (002)	Proteína Quinase dependente de AMP-cíclico de <i>Mycosphaerella graminicola</i> (DQ432033) – BLASTx	$6.10^{-72}$	77%	86%
LGMF011 (004)	Proteína Quinase dependente de AMP-cíclico de <i>Mycosphaerella graminicola</i> (DQ432033) – BLASTx	$9.10^{-70}$	89%	74%

FONTE: O autor (2012)

#### 5.4.4 Desenho de *Primers* para PCR Convencional

Com o auxílio dos programas indicados, desenhou-se um *primer* reverso para ser utilizado em conjunto com o, já disponível, GMF1, denominado PCPr (5'CATGATCACGTCACCGTCTTCGA3'), indicado na FIGURA 21, gerando um fragmento de aproximadamente 500 pb.

Durante as análises para a formação de estruturas secundárias que pudessem atrapalhar a amplificação, nenhuma das mesmas apresentou energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) inferior a -10 kcal/mol (a 37°C) com a inexistência de bases não-pareadas (APÊNDICE 4).

A temperatura de anelamento estimada e o conteúdo GC dos *primers* foi similar (TABELA 4), apresentando uma variação pequena, indicando o possível sucesso na utilização simultânea em uma reação de PCR.

TABELA 4 – COMPARAÇÃO ENTRE O CONTEÚDO GC E A TEMPERATURA DE MELTING ESPERADA DO *PRIMER* PROPOSTO E SEU PAR NA DETECÇÃO DE *Phyllosticta capitalensis*

	GMF1	PCPr	$\Delta$
Conteúdo GC	52,38 %	52,17 %	0,21 %
$T_m$	65 °C	68 °C	-3 °C

FONTE: O autor (2012)

NOTA: A  $T_m$  dos *primers* foi estimada levando em consideração a ordem das bases e uma concentração de 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>. A equação aplicada (RYCHLIK; RHOADS, 1989) é a implementada em ferramenta disponibilizada pela Promega (2011).

##### 5.4.4.1 Gradiente de Temperatura

O gradiente de temperatura realizado com a linhagem LGMF001 de *P. capitalensis* (FIGURA 22), com 10 distintas temperaturas de anelamento, sugeriu um valor ótimo entre os pontos de 62,7°C e 65,2°C, sendo selecionada a temperatura de 64°C, compatível com o estimado para o conjunto de *primers* (TABELA 4).

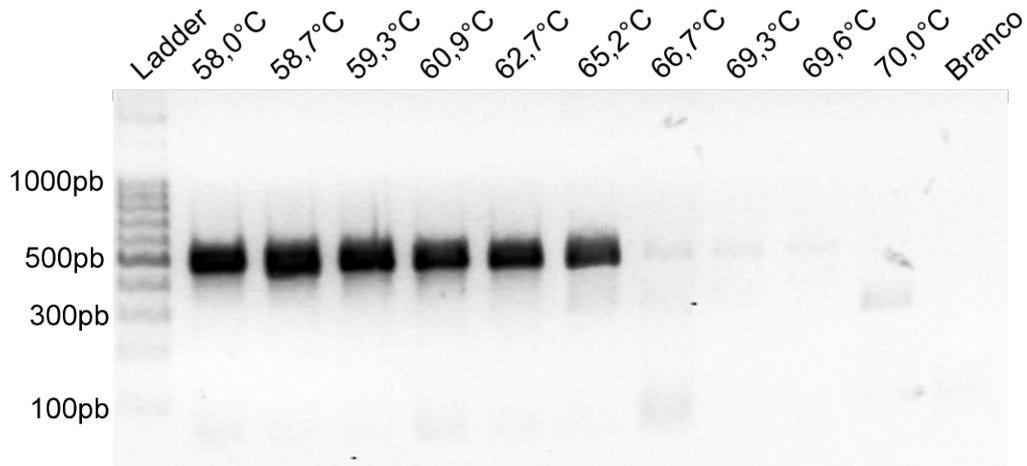


FIGURA 22 - GRADIENTE DE TEMPERATURA DE ANELAMENTO UTILIZANDO A LINHAGEM LGMF001 DE *Phyllosticta capitalensis* COM O PRIMER PCPR PROPOSTO NESTE TRABALHO E GMF1 PREVIAMENTE DISPONÍVEL

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Foram aplicados 10  $\mu$ L, o volume total da reação, de cada amostra e a banda de 500 pb do marcador Ladder contém 45ng. Os valores sobre a canaleta simbolizam a temperatura de anelamento que a amostra foi exposta.

#### 5.4.4.2 Avaliação Comparativa entre os Conjuntos de *Primers*

##### 5.4.4.2.1 Controle com ITS

Na avaliação do material utilizado com os *primers* para a região ITS1-5,8S-ITS2, todas as amostras apresentaram amplificação adequada (FIGURA 23).

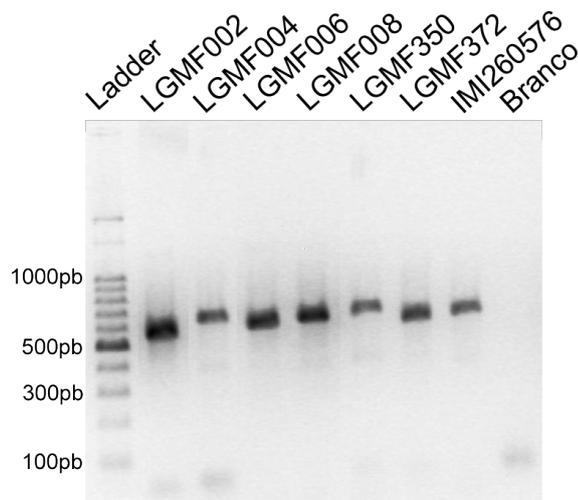


FIGURA 23 - CONTROLE DA QUALIDADE DO DNA UTILIZADO COM A AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1-5,8S-ITS2 DO rDNA RIBOSSOMAL

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Foi aplicado o volume total da reação (20  $\mu$ L), e a banda de 500 pb do marcador Ladder contém 45ng.

#### 5.4.4.2.2 PCR Multiplex das Regiões GCP/GMF

Na avaliação da PCR Multiplex GCP/GMF (FIGURA 24), observou-se a amplificação de um fragmento com aproximadamente 700 pb para *P. capitalensis* (LGMF002), de 300 pb para *P. citricarpa* (LGMF004 e LGMF006), de 350 pb para *P. citribraziliensis* (LGMF008), nenhuma banda visível para *P. brazilianiae* (LGMF350 e LGMF372) e uma banda de 700pb para *G. mangiferae* (IMI260576), como já descrito por (FABRIS, 2009).

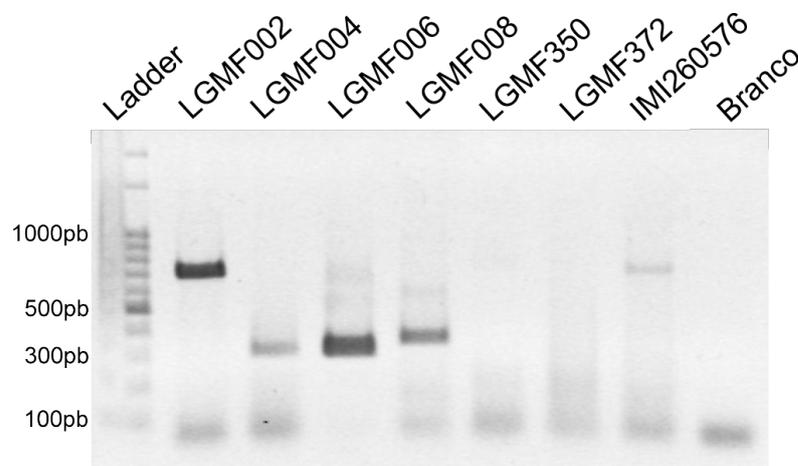


FIGURA 24 - AVALIAÇÃO DE DIVERSAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Phyllosticta* FRENTE A PCR MULTIPLEX GCP/GMF

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Foi aplicado o volume total da reação (20  $\mu$ L), e a banda de 500 pb do marcador Ladder contém 45ng.

#### 5.4.4.2.3 PCR para Detecção de *Phyllosticta capitalensis*

Na avaliação da PCR proposta para a detecção de *P. capitalensis* (FIGURA 25), observou-se a amplificação de um fragmento – indicado pela seta – com aproximadamente 500 pb para *P. capitalensis* (LGMF002), e de 600 pb para *P. citribraziliensis* (LGMF008). *P. citricarpa* (LGMF004 e LGMF006), *P. brazilianiae* (LGMF350 e LGMF372) e *G. mangiferae* (IMI260576) não apresentaram nenhuma amplificação visível.

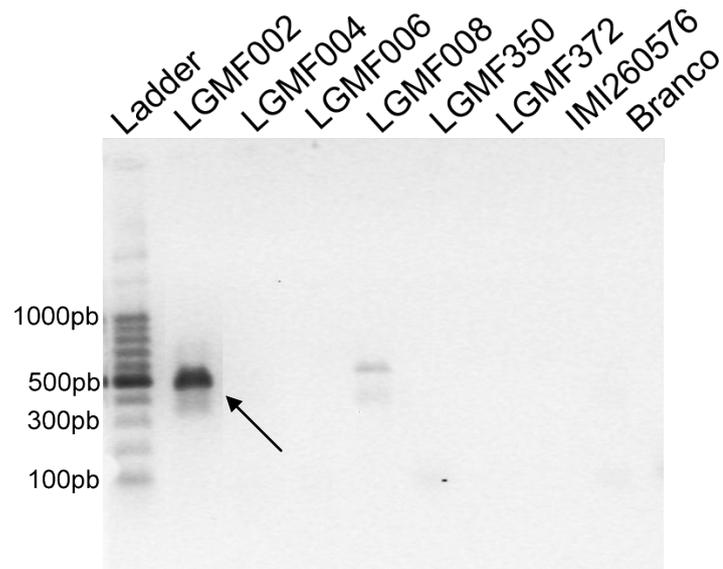


FIGURA 25 - AVALIAÇÃO DE DIVERSAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Phyllosticta* FRENTE A PCR PROPOSTA NESTE TRABALHO PARA A DETECÇÃO DE *Phyllosticta capitalensis*

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Foi aplicado o volume total da reação (20  $\mu$ L), e a banda de 500 pb do marcador Ladder contém 45ng.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração dos ácidos nucleicos em avaliações metagenômicas é um passo crucial na análise (TRINGE; RUBIN, 2005), mesmo a PCR demandando de uma quantidade ínfima de material para ocorrer (MULLIS *et al.*, 1987). Em análises de materiais diversos, a presença de contaminantes químicos é o problema, enquanto em materiais biológicos os problemas são a contaminação com o DNA do hospedeiro e a baixa concentração do inóculo, o que leva a pouca ou nenhuma quantidade de material presente na amostra (TRINGE; RUBIN, 2005). Os resultados do presente trabalho, que corroboram o previamente obtido (ADAMOSKI *et al.*, 2011a), indicam um sucesso na metodologia utilizada para a extração – pela qualidade do material adequado para a realização da PCR –, a despeito da grande degradação (FIGURA 3) observada na visualização em agarose, quando comparada a extração de material fúngico (FIGURA 2). Por exemplo, Meyer *et al.* (2006) necessitaram de um longo processo de enriquecimento de micélio endofítico de *P. citricarpa* utilizando as folhas, previamente à extração de DNA, para alcançar sucesso na amplificação do fragmento desejado. Assim, com a grande redução de tempo ocasionada pela alta sensibilidade do método, o mesmo torna-se mais robusto para avaliações independentes de cultivo dentro do gênero *Phyllosticta*.

### 6.2 DETECÇÃO DE *Phyllosticta citricarpa*

O gênero *Phyllosticta* apresenta uma grande diversidade de espécies associadas a citros, em situação de patogenia ou endofitismo. Dada à importância comercial da cultura, ser capaz de identificar rápida e seguramente tais espécies é uma necessidade do agronegócio mundial – tanto para validar pomares como livres de doença ou assegurar a sanidade de frutos e mudas.

Durante os passos de amplificação do fragmento GCP das amostras de *P. citricarpa*, observou-se o já descrito em literatura, com a presença do fragmento com

300 pb esperado para a confirmação da espécie (GLIENKE, 1999; STRINGARI *et al.*, 2009). Igualmente, em condições menos estridentes, tanto em *P. citricarpa* quanto em *P. capitalensis*, observou-se a amplificação de múltiplas bandas ao ser utilizada temperatura 28°C inferior – de 40°C (ADAMOSKI *et al.*, 2011a). Entretanto, pelos resultados obtidos, sugere-se que a amplificação observada em *P. capitalensis* não corresponde a uma região homóloga a GCP de *P. citricarpa*, dada a plural quantidade de bandas de distintos tamanhos. Associando tal informação com o resultado obtido no sequenciamento, percebe-se que não há homologia nessas regiões obtidas com GCP - mesmo em LGMF001, que teve fragmentos de diversos tamanhos avaliados. Isto, *a priori*, é um resultado positivo, pois indica que os *primers* utilizados não correm risco de, com poucas substituições acontecendo em sua região de anelamento, amplificar em *P. capitalensis*, confirmando o potencial de distinção das duas espécies buscado pelo ensaio. Tendo em vista a problemática de identificação das duas espécies, morfologicamente similares, este é um excelente resultado e possibilita a utilização com maior segurança destes *primers* em um contexto onde o conteúdo genômico de *P. capitalensis* pode estar presente, como nas avaliações independentes de cultivo. Entretanto, é necessário também tomar cautela, dado que a ausência de amplificação pode ser resultado de uma pequena variação na porção terminal 3' do sítio de anelamento dos *primers*, o que inviabilizaria a amplificação segundo o descrito na literatura (SOMMER; TAUTZ, 1989).

Abordagens metagenômicas, entretanto, esbarram não somente na presença do material genético de fungos conhecidos, mas também na presença – no caso de organismos que habitam outros – do material do hospedeiro e seus co-hóspedes. No caso da comunidade microbiana, em sua maior parte desconhecida (RAPPÉ; GIOVANNONI, 2003), espécies que sequer foram cultivadas podem compartilhar regiões similares e gerar amplificações inadequadas em ensaios diretos. Nos resultados dos experimentos, percebeu-se que dos fragmentos clonados - a partir de folha - avaliados (20), apenas 10% (2) realmente apresentavam similaridade de sequência com a região GCP de *P. citricarpa*. A presença de grande proporção de amplificações espúrias pode levar a depleção prematura de *primers* e nucleotídeos, contribuindo para a não detecção da região alvo pela redução da sensibilidade do método. Ou seja, a presença desses fragmentos indica que, mesmo a reação da amplificação de GCP apresentando alta sensibilidade (ADAMOSKI *et al.*, 2010b), tal

metodologia poderia apresentar melhores resultados, estes artefatos não consumissem os insumos da polimerização. Também, graças ao pequeno conhecimento disponível nos bancos de dados acerca dos genomas fúngicos, o fato de nenhuma destas regiões ser encontrada é apenas um indício – e não uma confirmação – de que tais fragmentos seriam artefatos da reação de PCR. A hipótese de serem erros gerados é corroborada pela ausência de similaridade entre os próprios fragmentos. Artefatos, e seus consequentes vieses, são problemas recorrentes em abordagens metagenômicas (ACINAS *et al.*, 2005; THORNHILL *et al.*, 2007). Como o genoma do hospedeiro está em processo avançado de caracterização (CHFS, 2011), também podemos afirmar que os fragmentos não são porção do mesmo, dado que não foram encontrados nas bases de dados específicas do genoma cítrico.

Observando o obtido com os diversos isolados de *P. citricarpa*, a origem dos mesmos (de folha ou fruto), variedade do hospedeiro ou região geográfica não implicaram em observação de substituições na região estudada. Como não há conhecimento robusto sobre a função da região estudada (pela ausência de similares nos bancos públicos – como indicado pelos resultados de BLAST), imagina-se que a mesma não seja parte de proteína importante, regulatória ou sofra pressão seletiva grande, visto que nenhum motivo foi reconhecido como similar e presente nos organismos sobre os quais já se tem melhor conhecimento sobre o genoma. Assim sendo, esperava-se uma variação intraespecífica na mesma, não observada, colaborando com análises prévias demonstrando baixa variabilidade em *P. citricarpa* (STRINGARI, 2009). Todavia, é interessante indicar que o fragmento observado previamente (GLIENKE, 1999) apresentou-se mais similar aos fragmentos obtidos de folha (Folha 13, com uma diferença no outro nucleotídeo para a Folha 26) e não aos isolados de *P. citricarpa* sequenciados obtidos das mesmas plantas (LGMF152, LGMF 153 e LGMF154 da Folha 13; LGMF186, LGMF187, LGMF189, LGMF191 e LGMF309, da Folha 26). Também, graças à diferença entre as sequências obtidas da folha para as obtidas dos isolados, pode-se inferir que ao menos duas distintas variantes do patógeno *P. citricarpa* estavam na planta, uma exclusivamente obtida no isolamento e outra exclusivamente obtida no sequenciamento da região GCP, dado o tamanho amostral avaliado.

A detecção de patógenos, tanto na área agrônômica quanto na clínica, demanda cada vez mais de velocidade, praticidade e baixo custo. Entretanto, a precisão

continua como uma necessidade primordial. Com os resultados descritos aqui, observa-se a necessidade em aprimorar a detecção independente de cultivo de *P. citricarpa* nas primeiras necessidades – velocidade, praticidade e baixo custo – dada a satisfatória precisão, distinguindo adequadamente o fungo em questão dos demais já conhecidos e detentores de relação filogenética próxima, já demonstrada em outros trabalhos (ADAMOSKI *et al.*, 2010b, 2011a; STRINGARI *et al.* 2009, 2010).

Justamente para aprimorar a amplificação dos fragmentos, evitando a presença de amplificações espúrias e ampliando a sensibilidade, foi proposto o desenho do ensaio utilizando qPCR. Com as análises *in silico* apresentadas, a detecção de *P. citricarpa* através de PCR quantitativa mostrou-se promissora e possível, o que levou a síntese dos *primers* e sonda e sua posterior avaliação, em comparação ao previamente disponível na literatura (GENT-PELZER *et al.*, 2007). Observando os resultados obtidos, o ensaio proposto apresenta uma sensibilidade quatro ordens de grandeza menor (TABELA 1) por um maior sucesso no desenho do ensaio mas, também, por utilizar regiões ribossomais para a detecção, presentes em múltiplas cópias nos genomas fúngicos - como em *Aspergillus niger*, com 4 cópias (PEL *et al.*, 2007). Entretanto, ao observar-se a TABELA 2, percebemos que – no ensaio prévio – a escolha da região implicou em um maior número de eventos de falso-positivo, com um limite de amplificação detectável no ciclo 40, indicando *P. brazilianiae* e *P. capitalensis* como amostras altamente diluídas de *P. citricarpa*. Uma hipótese para tal evento pode ser a inferior variação intra- e inter-específica das regiões ribossomais – gerada por processos de evolução em concerto ou seleção purificadora associada a processos de nascimento-e-morte (ROONEY; WARD, 2005). Outro resultado observado foi a presença de uma eficiência superior a esperada para a reação. Os motivos para os 305% obtidos no ensaio prévio, provavelmente, justificam-se pelo alto número de cópias genômicas do DNA alvo. Para o ensaio proposto, com 154% de eficiência, uma possível sugestão são os problemas na definição da linha de base e de *threshold*, inerentes a qPCR (RUIJTER *et al.*, 2009). O valor de R<sup>2</sup> obtido para ambas as reações (cerca de 0,95), é alto mas não comparável a outros estudos utilizando qPCR. A justificativa para isto pode ser relacionada com a não utilização de uma fluorescência de referência (por incapacidade do equipamento), o próprio equipamento, ep realplex, que demonstra resultados inferiores a dispositivos concorrentes (REITER; PFAFFL, 2008), a qualidade do material plástico e selantes utilizados (REITER; PFAFFL, 2008) ou a

descalibração dos dispositivos de mensuração líquida. O preparo da mistura da reação no próprio laboratório, aparentemente, não se justifica, dado que uma comparação com kit comercial foi realizada e os resultados foram similares (dados não mostrados), e o fator humano também pode ter influenciado, entretanto, não se realizou comparação com outro experimentador. A presença da amplificação detectável – tanto pelo  $C_t$  (TABELA 2) quanto pelo gel de agarose (FIGURA 11) – de alguns dos controles negativos sem DNA utilizados corrobora com a hipótese de problemas de manipulação. Entretanto, a presença de controles negativos que amplificaram apenas no gel de agarose indica que outros problemas podem estar relacionados, que não apenas o erro de manipulação – como artefatos gerados por eventos estocásticos, problemas de síntese com a presença de baixas concentrações de sondas com sequências incorretas entre outros.

A utilização do ensaio prévio, então, seria indicada para situações livres de contaminação interespecífica no DNA, onde a sensibilidade – apenas – é um fator importante. O ensaio aqui proposto tem maior adequação quando utilizado em situação na qual existe o risco da presença de material genético de outras espécies – dada sua maior especificidade.

### 6.3 DETECÇÃO DE *Phyllosticta capitalensis*

A reação utilizando os *primers* GMF1 e GMR2 resultou na amplificação do fragmento com cerca de 700pb em *P. capitalensis*, como o esperado (KAVA-CORDEIRO, 2004), mas também em *G. mangiferae* e *P. brazilianiae*, espécies não descritas à época do desenho do ensaio, o que justifica o desconhecimento da amplificação até então. A importância da distinção das duas espécies não se restringe a necessidade científica, mas também a aplicação fitopatológica no diagnóstico da doença causada em orquídeas por *P. capitalensis* (OKANE *et al.*, 2003). Na situação de utilização Multiplex com GCP1 e GCP2 (FIGURA 24), não ocorre a amplificação em *P. brazilianiae*, entretanto, percebe-se um grande arrasto na PCR, que pode simbolizar a amplificação de diversos fragmentos com a disponibilidade de mais *primers*. Já *P. citricarpa* e *P. citribraziliensis* amplificaram apenas em condições menos estridentes, com 17°C abaixo da temperatura de

anelamento ideal, entretanto, tal qual na avaliação do fragmento GCP, tais sequências não se assemelham a uma região de possível homologia, ao avaliar-se o alinhamento em ambas as direções possíveis. Igualmente, os resultados de BLAST reforçam a hipótese, dado que as sequências de *P. citricarpa* não apresentaram nenhum resultado significativo, enquanto *P. citribraziliensis* remeteu-se a uma proteína Quinase Dependente de AMP-cíclico (TABELA 3). Além disto, o tamanho dos fragmentos obtidos era incompatível com o esperado – fato que não impediu a continuação da avaliação graças a possibilidade da presença de inserções em *P. capitalensis* ou deleções nas outras espécies.

Também foram realizados dois tipos de procedimentos distintos para a avaliação das sequências: realizando um passo prévio de clonagem ou sequenciando diretamente – utilizando como controles as linhagens LGMF001 e LGMF003 de *P. capitalensis* e IMI260576 de *G. mangiferae*, avaliadas em ambos os métodos. Comparando as sequências, obtiveram-se resultados idênticos, sugerindo que não incorreríamos em erro ao realizar o sequenciamento direto das linhagens que amplificam na temperatura adequada, como esperado. Cabe a ressalva quanto a LGMF001 (Clone 010) e LGMF003 (Clone 002), ambas truncadas, o que – muito provavelmente – resultou algum problema durante a PCR, como a interrupção abrupta da polimerização. Tal observação pode levantar suspeitas quanto a criação de quimeras com o excesso de sequências truncadas obtidas. Tais eventos – onde um fragmento prematuramente terminado serve de *primer* para a amplificação, as vezes, de uma sequência parcialmente homóloga e acabam por fundir distintas sequências – são conhecidos e visualizados em ampliações de amostras ambientais (GONZALEZ *et al.*, 2005). Assim, as sequências obtidas de folha poderiam estar sofrendo deste tipo de viés. Entretanto, graças a igualdade entre as sequências obtidas de folha (salvo as truncadas, FL08 clones 007 e 008), sugere-se que – mesmo na ocorrência de eventos desta ordem - as quimeras formadas são entre sequências iguais e não interferem no resultado da análise. Tal resultado também implica que as variações de tamanho do inserto não avaliadas representem apenas sequências com algum tipo de truncamento.

Observou-se uma baixa variação intraespecífica da região GMF, pelo fato da mesma estar – provavelmente – envolvida na síntese da proteína Aspartil tRNA Sintetase (Responsável pela síntese do RNA transportador para Aspartato), como já indicado (KAVA-CORDEIRO, 2004). Isto justifica o fato das três espécies do mesmo

clado, em análise filogenética prévia (GLIENKE *et al.*, 2011), amplificarem em condição de estringência reduzida. Entretanto, a similaridade maior observada entre *P. capitalensis* e *P. brazilianiae* é atípica, dada a maior similaridade esperada seria entre *P. capitalensis* e *G. mangiferae*, que compartilham um ancestral comum mais próximo que *P. brazilianiae*. Tal resultado pode ser explicado por possível artefato na filogenia proposta (THORNE; KISHINO, 1992) ou por algum tipo de seleção diferencial envolvendo a Aspartil tRNA Sintetase. Em achado recente, Coelho *et al.* (2010) avaliou biblioteca subtrativa de cDNA do fungo *Hydnangium* sp., basidiomiceto associado a raízes de eucalipto, do estágio pré-micorrízico e do não simbiótico. Dos 45 genes identificados como diferencialmente expressos, apenas 4 estavam relacionados com a síntese proteica e, um destes, codificava para a Aspartil tRNA Sintetase. Tal fato pode indicar que a proteína apresenta importância em processos associativos fungo-planta, além da sua função na síntese proteica, e, confirmada tal hipótese, tais processos de associação podem estar diferenciados entre *G. mangiferae* e as duas demais espécies.

Assim, conseguiu-se apenas uma região capaz de distinguir *P. capitalensis* – *P. brazilianiae* de *G. mangiferae* (FIGURA 21) e, nesta, foi proposto um *primer* a complementar-se com GMF1. A avaliação da temperatura de anelamento utilizando fórmulas menos antiquadas e mais precisas (RYCHLIK; RHOADS, 1989) propiciou o acerto praticamente exato da temperatura de anelamento entre o estimado (TABELA 4) e o observado na prática (FIGURA 22). Previamente à avaliação do novo par de *primers* foram realizadas PCR para a região ITS (FIGURA 23) e a própria PCR Multiplex (FIGURA 24) previamente descrita (FABRIS, 2009). A primeira visava assegurar a amplificação de todas as amostras utilizadas, o que ocorreu sem pormenores, e a segunda a confirmar os resultados prévios, observando a inespecificidade dos *primers* perante as novas espécies. Assim, com a avaliação do novo conjunto proposto (FIGURA 25), observou-se a amplificação do fragmento de tamanho esperado apenas na espécie *P. capitalensis* e de uma amplificação fraca de fragmento com tamanho cerca de 100 pb superior em *P. citribraziliensis*. Evitar esta banda não seria possível, dado o insucesso em capturar tal sequência homóloga na espécie. Já a não amplificação em *P. brazilianiae* caracteriza-se como um fato inesperado, dada a sequência igual dos nucleotídeos na posição do anelamento. A hipótese mais provável é que o *primer* GMF1 que definiu a especificidade com o auxílio do aumento de 2°C na temperatura de anelamento em

relação ao previamente utilizado (FABRIS, 2009). Assim, o ensaio caracterizou-se específico e preciso ao distinguir *P. capitalensis* de todas as demais espécies avaliadas. Não foi realizada uma avaliação da eficiência do método proposto frente a uma abordagem independente de cultivo dada a indisponibilidade de material de orquídeas para a avaliação, dada a patogenia do fungo às mesmas (OKANE *et al.*, 2003). Avaliar a mesma utilizando folhas cítricas não iria representar uma aplicação prática do ensaio, apenas científica – o que justifica a avaliação dos clones oriundos de folhas.

## 7 CONCLUSÃO

O presente trabalho cumpriu o objetivo de aumentar o conhecimento disponível sobre as regiões utilizadas para detecção de *P. citricarpa*, agente causal da Mancha Preta dos Citros (MPC), e *P. capitalensis*, fungo de morfologia similar e co-habitante de lesões similares a da MPC. Também, com a produção de um *pipeline* adaptado a análise dos resultados de sequenciamento de DNA em projetos de sequenciamento à avaliações de fragmentos pontuais, permite uma maior velocidade na realização deste tipo de tarefa, associada a uma confiabilidade maior.

Para o fungo *P. citricarpa*, o ensaio proposto utilizando qPCR demonstrou menor sensibilidade do que o previamente disponível na literatura, entretanto, maior especificidade, com a redução da amplificação prematura em amostras de outras espécies. Para a agregação de sensibilidade, outros parâmetros podem ser reavaliados, como a utilização de um estudo similar com os *primers* propostos e não mais com GCP1/GCP2, como aqui realizado. Avaliar se a amplificação obtida é gerada por artefatos ou por anelamento em regiões homólogas nas outras espécies é importante para compreender os motivos da baixa sensibilidade.

Para o fungo *P. capitalensis*, o ensaio utilizando PCR convencional foi capaz de distinguir o mesmo de todas as outras espécies avaliadas, mostrando um indiscutível avanço em relação ao ensaio previamente disponível. Como metas futuras, uma possível avaliação da utilização em Multiplex dos novos *primers* e GCP1/GCP2 é interessante, visando à distinção simultânea entre as duas espécies.

## 8 REFERÊNCIAS

ACINAS, S. G.; SARMA-RUPAVTARM, R.; KLEPAC-CERAJ, V.; POLZ, M. F. PCR-Induced Sequence Artifacts and Bias: Insights from Comparison of Two 16S rRNA Clone Libraries Constructed from the Same Sample. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8966–8969, 2005.

ADAMOSKI, D.; FABRIS, JULIANA; NISHIMURA, R. C. et al. Detecção do fitopatógeno *Guignardia citricarpa* utilizando PCR independente de cultivo. Livro de resumos do 18º Evento de Iniciação Científica e do 3º Evento de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação. **Anais...** p.184–184, 2010. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PRPPG) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

ADAMOSKI, D.; FABRIS, JULIANA; STRINGARI, DANYELLE; BINI, A. P.; GLIENKE, CHIRLEI. Desenvolvimento de Metodologia Eficiente de Diagnóstico Molecular do Fungo Fitopatogênico *Guignardia citricarpa*. 19º Evento de Iniciação científica e 4º Evento de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação. **Anais...** v. 0, p.185–185, 2011. Curitiba: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PRPPG) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

ADAMOSKI, D.; KAVA-CORDEIRO, V.; CHRISTO, DANIEL; et al. Design and validation of a molecular diagnostic through ciPCR using SCARs for *Guignardia citricarpa* detection. Resumos do 56º Congresso Brasileiro de Genética. **Anais...** p.140–140, 2010. Guarujá.

ADAMOSKI, D.; STRINGARI, DANYELLE; FABRIS, JULIANA; et al. Desenvolvimento de uma metodologia eficiente para detecção molecular do fungo fitopatogênico *Guignardia citricarpa*. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. Suplemento, p. 173–173, 2011.

AHN, S. J.; COSTA, J.; EMANUEL, J. R. PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR. **Nucleic acids research**, v. 24, n. 13, p. 2623–2625, 1996. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=145983&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A A; et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=146917&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

AMINOV, R. I.; GARRIGUES-JEANJEAN, N.; MACKIE, R. I. Molecular Ecology of Tetracycline Resistance: Development and Validation of Primers for Detection of Tetracycline Resistance Genes Encoding Ribosomal Protection Proteins. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 1, p. 22–32, 2001.

BAAYEN, R. P.; BONANTS, P. J. M.; VERKLEY, G. et al. Nonpathogenic Isolates of the Citrus Black Spot Fungus, *Guignardia citricarpa*, Identified as a Cosmopolitan Endophyte of Woody Plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, v. 92, n. 5, p. 464–477, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18943020>>. .

BALDASSARI, R. B.; WICKERT, E.; GOES, A. Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from Citrus spp. **European Journal of Plant Pathology**, v. 120, n. 2, p. 103–110, 2007. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10658-007-9182-0>>. Acesso em: 10/8/2011.

BARBOSA, C. D. J.; FILHO, H. P. S.; SANTOS, E. E. S. DOS. **Principais Doenças dos Citros Transmitidas por Borbulhas no Brasil**. 2006.

BOTEON, M.; PAGLIUCA, L. G. Análise da sustentabilidade econômica da citricultura paulista. **Citrus Research & Technology**, v. 31, n. 2, p. 101–106, 2010. Disponível em: <[http://citrusrt.centrodecitricultura.br/edicoes/down.php?idedicao=26&arquivo=v31\\_2\\_01.pdf](http://citrusrt.centrodecitricultura.br/edicoes/down.php?idedicao=26&arquivo=v31_2_01.pdf)>. .

BROWNLEE, C. Biography of Phil Green. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 39, p. 13991–13993, 2004. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=521110&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

CHFS. Citrus sinensis Annotation Project. Disponível em: <<http://citrus.hzau.edu.cn/orange/index.php>>. Acesso em: 1/6/2012.

CHIEN, A.; EDGAR, D. B.; TRELA, J. M. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. **Journal of bacteriology**, v. 127, n. 3, p. 1550–1557, 1976. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=232952&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

CHOU, H.; HOLMES, M. H. DNA sequence quality trimming and vector removal. **Bioinformatics**, v. 17, n. 12, p. 1093–1104, 2001. Disponível em: <<http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/17/12/1093.short>>. Acesso em: 27/5/2012.

COELHO, I. DA S.; DE QUEIROZ, M. V.; COSTA, M. D.; KASUYA, M. C. M.; DE ARAÚJO, E. F. Identification of differentially expressed genes of the fungus *Hydnangium* sp. during the pre-symbiotic phase of the ectomycorrhizal association with *Eucalyptus grandis*. **Mycorrhiza**, v. 20, n. 8, p. 531–40, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20177718>>. Acesso em: 4/6/2012.

CORLESS, C. E.; GUIVER, M.; BORROW, R. et al. Contamination and Sensitivity Issues with a Real-Time Universal 16S rRNA PCR Contamination and Sensitivity

Issues with a Real-Time Universal 16S rRNA PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 1747–1752, 2000.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792–7, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15034147>>. .

EPPENDORF. realplex Software. ,2008.

ESPINOZA, A. G.; TAIBI, A.; BILLAUT-MULOT, O.; OUAISSI, A. PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* useful for specific diagnosis of human Chagas' disease. **Journal of clinical microbiology**, v. 34, n. 2, p. 485–6, 1996. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=228831&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

EVERETT, K.; REES-GEORGE, J. Species-specific PCR primers for *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae*. **New Zealand Plant Protection**, v. 59, p. 141–145, 2006. CAXTON PRESS. Disponível em: <[http://www.nzpps.org/journal/59/nzpp\\_591410.pdf](http://www.nzpps.org/journal/59/nzpp_591410.pdf)>. Acesso em: 19/6/2011.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error Probabilities. **Genome research**, v. 8, p. 186–194, 1998. Disponível em: <<http://genome.cshlp.org/content/8/3/186.short>>. Acesso em: 10/8/2011.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I . Accuracy Assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175–185, 1998.

FABRIS, JULIANA. **Diagnóstico Molecular e distribuição de *Guignardia citricarpa* nos estados do Paraná e São Paulo**, 2009. Universidade Federal do Paraná.

FAO. FAOSTAT: Production Crops, Citrus Fruit, Total, 1961-2010. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 3/6/2012.

VAN GENT-PELZER, M.; VAN BROUWERSHAVEN, I.; KOX, L.; BONANTS, P. A TaqMan PCR method for routine diagnosis of the quarantine fungus *Guignardia citricarpa* on citrus fruit. **Journal of Phytopathology**, v. 155, p. 357–363, 2007. Disponível em: <<http://en.scientificcommons.org/36205635>>. Acesso em: 18/3/2011.

GLIENKE, C.; PEREIRA, O. L.; STRINGARI, D. et al. Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 26, p. 47– 56, 2011. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/nhn/pimj/pre-prints/110>>. Acesso em: 23/4/2011.

GLIENKE, CHIRLEI. ***Guignardia citricarpa* Kiely: Análise Genética, Cariotípica e Interação com o Hospedeiro**, 1999. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

GONZALEZ, J. M.; ZIMMERMANN, J.; SAIZ-JIMENEZ, C. Evaluating putative chimeric sequences from PCR-amplified products. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 21, n. 3, p. 333–7, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15347575>>. Acesso em: 15/3/2012.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A Graphical Tool for Sequence. **Genome Research**, v. 8, p. 195–202, 1998.

GREEN, P. Program, PHRAP: Phil's revised assembly. ,1999. Disponível em: <[http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html#block\\_phrap](http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html#block_phrap)>. .

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of molecular biology**, v. 166, n. 4, p. 557–580, 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6345791>>. Acesso em: 28/3/2012.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, KENNETH J; WILLIAMS, P. M. Real Time Quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, n. 10, p. 986–994, 1996. Disponível em: <<http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.6.10.986>>. Acesso em: 10/6/2011.

HENSON, J. M.; FRENCH, R. The Polymerase Chain Reaction and Plant Disease Diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 31, p. 81–109, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18643762>>. .

HOLLAND, P. M.; ABRAMSON, R. D.; WATSON, R.; GELFAND, D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'->3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 16, p. 7276–7280, 1991. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=52277&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

HUGENHOLTZ, P.; PACE, N. R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **Trends in Biotechnology**, v. 14, n. 6, p. 190–197, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8663938>>. .

KAVA-CORDEIRO, V. **Guignardia citricarpa, G. mangiferae e Phyllosticta spinarum: caracterização morfológicas, SCARs e RNA dupla fita**, 2004. Universidade Federal do Paraná.

KLEPPE, K.; OHTSUKA, E.; KLEPPE, R.; MOLINEUX, I.; KHORANA, H. G. Studies on polynucleotides: XCVI. Repair Replication of Short Synthetic DNA's as catalyzed by DNA Polymerases. **Journal of Molecular Biology**, v. 56, n. 2, p. 341–361, 1971. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022283671904694>>. Acesso em: 2/5/2012.

KOTZÉ, J M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, v. 65, n. 12, p. 945–950, 1981. Disponível em: <[http://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1981Articles/PlantDisease65n12\\_945.pdf](http://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1981Articles/PlantDisease65n12_945.pdf)>. Acesso em: 9/8/2011.

LIVAK, KENNETH J; FLOOD, S. J. A.; MARMARO, J.; GIUSTI, W.; DEETZ, K. Oligonucleotides with fluorescein dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. **Genome Research**, v. 4, p. 357–362, 1995.

LOUWS, F.; RADEMAKER, J.; DE BRUIJN, F. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytopathogens: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, n. 1, p. 81–125, 1999. Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.phyto.37.1.81>>. Acesso em: 17/8/2011.

MARIN, D. R.; OLIVETTI, M.; SPÓSITO, M B; SILVA-JUNIOR, G. J. Correlação entre a Localização dos Sintomas nos Frutos e a Vulnerabilidade à Queda Prematura de Frutos de Laranja “Pêra” Afetados pela Mancha Preta dos Citros. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. Suplemento, 2011.

MARTIN, R. R.; JAMES, D.; LÉVESQUE, C. A. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. **Annual Review of Phytopathology**, v. 38, n. 1, p. 207–239, 2000. Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.phyto.38.1.207>>. Acesso em: 17/8/2011.

MCCARTNEY, H. A.; FOSTER, S. J.; FRAAIJE, B. A; WARD, E. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. **Pest Management Science**, v. 59, n. 2, p. 129–142, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12587866>>. Acesso em: 17/8/2011.

MCONIE, K. The latent occurrence in citrus and other hosts of a *Guignardia* easily confused with *G. citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology**, v. 54, p. 40–43, 1964.

MEYER, L; SANDERS, G.; JACOBS, R; KORSTEN, L. A one-day sensitive method to detect and distinguish between the citrus black spot pathogen *Guignardia citricarpa* and the endophyte *Guignardia mangiferae*. **Plant disease**, v. 90, n. 1, p. 97–101, 2006. Am Phytopath Society. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PD-90-0097>>. Acesso em: 18/3/2011.

MEYER, LINDA; JACOBS, RENÉ; KOTZÉ, JAN M.; TRUTER, M.; KORSTEN, LISE. Detection and molecular identification protocols for *Phyllosticta citricarpa* from citrus matter. **South African Journal of Science**, v. 108, n. 3/4, p. 1–6, 2012. Disponível em: <<http://www.sajs.co.za/index.php/SAJS/article/view/602>>. .

MULLIS, K B; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in enzymology**, v. 155, p. 335–50, 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3431465>>. Acesso em: 3/6/2012.

MULLIS, KARY B. Process for Amplifying Nucleic Acid Sequences. ,1987.

MULLIS, KARY B; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, NORMAN; et al. Process for Amplifying, Detecting And/Or-Cloning Nucleic Acid Sequences. ,1987.

MUNAUT, F.; HAMAIDE, N.; STAPPEN, J. V.; MARAITE, H. Genetic relationships among isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes* spp. in Africa and Australia using RAPD and ribosomal DNA markers. **Plant Pathology**, v. 47, p. 641–648, 1998. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-3059.1998.00287.x/full>>. Acesso em: 13/2/2012.

MURARO, R. P.; SPREEN, T. H.; POZZAN, M. **Comparative Costs of Growing Citrus in Florida and Sao Paulo (Brazil) for the 2000-01 Season**. Florida, 2005.

OKANE, I.; LUMYONG, S.; NAKAGIRI, A.; ITO, T. Extensive host range of an endophytic fungus, *Guignardia endophyllicola* (anamorph: *Phyllosticta capitalensis*). **Mycoscience**, v. 44, n. 5, p. 353–363, 2003. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article&id=doi:10.1007/s10267-003-0128-x>>. Acesso em: 30/7/2012.

PEL, H. J.; DE WINDE, J. H.; ARCHER, D. B. et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 221–31, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17259976>>. Acesso em: 7/3/2012.

PERES, N. A.; HARAKAVA, R.; CARROLL, G. C.; ADASKAVEG, J. E.; TIMMER, L. W. Comparison of Molecular Procedures for Detection and Identification of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae*. **Plant Disease**, v. 91, n. 5, p. 525–531, 2007. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-91-5-0525>>. .

POLLARD, D. R.; JOHNSON, W. M.; LIOR, H.; TYLER, S. D.; ROZEE, K. R. Detection of the aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 11, p. 2477–2481, 1990.

PREMIER BIOSOFT. AlleleID. ,2010. Disponível em: <<http://www.premierbiosoft.com/bacterial-identification/index.html>>. .

PROMEGA. BioMath Calculators. Disponível em: <<http://www.promega.com/resources/tools/biomath-calculators>>. Acesso em: 13/6/2011.

QIAGEN. Critical Factors for Successful Real-Time PCR. ,2010.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 1, p. 17–20, 1985. Wiley Online Library. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.1985.tb01479.x/pdf>>. Acesso em: 18/3/2011.

RAPPÉ, M. S.; GIOVANNONI, S. J. The uncultured microbial majority. **Annual review of microbiology**, v. 57, p. 369–94, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14527284>>. Acesso em: 29/2/2012.

REITER, M.; PFAFFL, M. W. Effects of plate position, plate type and sealing systems on real-time PCR results. **Biotechnol Biotechnol Equip**, v. 22, n. 3, p. 824–828, 2008. Disponível em: <[http://diagnosisp.com/dp/journals/view\\_abstract.php?journal\\_id=1&archive=1&issue\\_id=19&article\\_id=511](http://diagnosisp.com/dp/journals/view_abstract.php?journal_id=1&archive=1&issue_id=19&article_id=511)>. Acesso em: 4/6/2012.

RIESENFELD, C. S.; GOODMAN, ROBERT M; HANDELSMAN, JO. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 981–989, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15305923>>. Acesso em: 19/7/2011.

RONDON, M. R.; AUGUST, P. R.; BETTERMANN, A D. et al. Cloning the Soil Metagenome: a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2541–2547, 2000. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=110579&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

ROONEY, A. P.; WARD, T. J. Evolution of a large ribosomal RNA multigene family in filamentous fungi: birth and death of a concerted evolution paradigm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 14, p. 5084–9, 2005. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=555991&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

RUIJTER, J. M.; RAMAKERS, C.; HOOGAARS, W. M. H. et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic acids research**, v. 37, n. 6, p. e45, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2665230&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 12/3/2012.

RYCHLIK, W.; RHOADS, R. E. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. **Nucleic acids research**, v. 17, n. 21, p. 8543–51, 1989. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=335026&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 30/5/2012.

SAIKI, R K; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 239, n. 4839, p. 487–91, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2448875>>. .

SAIKI, R.; SCHARF, S.; FALOONA, F. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350–1354, 1985. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.2999980>>. Acesso em: 8/3/2012.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHAAD, N. W.; FREDERICK, R. D. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 24, n. 3, p. 250–258, 2002. Canadian Phytopathological Society. Disponível em: <<http://cisticist.nrc-cnrc.gc.ca/journals.old/tcjpp/tcjpp24/k02-043.pdf>>. Acesso em: 17/8/2011.

SCHNEEBERGER, C.; SPEISER, P.; KURY, F.; ZEILLINGER, R. Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. **Genome Research**, v. 4, n. 4, p. 234–8, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8574192>>. .

SCHUBERT, T.; SUTTON, B.; JEYAPRAKASH, A. Citrus Black Spot (*Guignardia citricarpa*) discovered in Florida. **Pest Alert**, v. DACS-P-017, p. 3, 2010.

SINGH, S.; RAJAM, M. V. Citrus biotechnology: Achievements, limitations and future directions. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 15, n. 1, p. 3–22, 2009. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s12298-009-0001-2>>. Acesso em: 3/6/2012.

SOMMER, R.; TAUTZ, D. Minimal Homology requirements for PCR primers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 16, p. 6749–6749, 1989.

SPÓSITO, MARCEL BELLATO. **Dinâmica Temporal e Espacial da Mancha Preta (*Guignardia citricarpa*) e Quantificação dos Danos Causados à Cultura dos Citros**, 2003. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11135/tde-19042004-133413/publico/marcel.pdf>>. .

STRINGARI, DANYELLE. **Sistemática e Diversidade Genética de Isolados de *Guignardia* spp. e *Phyllosticta* sp. nos Estados do Paraná e São Paulo**, 2009. Universidade Federal do Paraná. Disponível em: <[http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/20900/Tese\\_Danyelle\\_Stringari\\_%28biblioteca%29.pdf?sequence=1](http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/20900/Tese_Danyelle_Stringari_%28biblioteca%29.pdf?sequence=1)>. .

STRINGARI, DANYELLE; FABRIS, JULIANA; ADAMOSKI, D. et al. Mancha Preta dos Citros: Distribuição e variabilidade genética do patógeno no Estado do Paraná. **Tropical Plant Pathology. Anais...** v. 35, p.S298–S298, 2010.

STRINGARI, DANYELLE; GLIENKE, CHIRLEI; CHRISTO, D.; MACCHERONI JR, W.; AZEVEDO, J.L. High molecular diversity of the fungus *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae* and new primers for the diagnosis of the citrus black spot. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 5, p. 1063–1073, 2009. SciELO Brasil. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-89132009000500002&amp;script=sci\\_arttext&amp;tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-89132009000500002&amp;script=sci_arttext&amp;tlng=pt)>. Acesso em: 2/6/2011.

TALON, M.; GMITTER, F. G. Citrus genomics. **International journal of Plant Genomics**, v. 2008, p. 528361, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2396216&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 29/3/2012.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. Submitted, 2011.

THORNE, J. L.; KISHINO, H. Freeing phylogenies from artifacts of alignment. **Molecular biology and evolution**, v. 9, n. 6, p. 1148–62, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1435239>>. .

THORNHILL, D. J.; LAJEUNESSE, T. C.; SANTOS, S. R. Measuring rDNA diversity in eukaryotic microbial systems: how intragenomic variation, pseudogenes, and PCR artifacts confound biodiversity estimates. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 24, p. 5326–5340, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17995924>>. Acesso em: 14/6/2011.

TRINGE, S. G.; RUBIN, E. M. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. **Nature reviews Genetics**, v. 6, n. 11, p. 805–14, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16304596>>. Acesso em: 2/3/2012.

TZIANABOS, T.; ANDERSON, B. E.; MCDADE, J. E. Detection of *Rickettsia rickettsii* DNA in clinical specimens by using polymerase chain reaction technology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 12, p. 2866–2868, 1989.

UVP. LabWorks. ,2000. Estados Unidos.

VALLONE, P. M.; BUTLER, J. M. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. **Biotechniques**, v. 37, n. 2, p. 226–231, 2004. Citeseer. Disponível em: <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.109.3169&rep=rep1&type=pdf>>. Acesso em: 13/6/2011.

WALSH, F.; INGENFELD, A.; ZAMPICOLLI, M. et al. Real-time PCR methods for quantitative monitoring of streptomycin and tetracycline resistance genes in agricultural ecosystems. **Journal of Microbiological Methods**, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21549164>>. Acesso em: 27/6/2011.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 24, p. 7213–7218, 1990. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/nar/18.24.7213>>. Acesso em: 13/2/2012.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. A. Innis; D. H. Gelfand; J. J. Sninsky; T. J. White (Eds.); **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. p.315–322, 1990. New York: Academic Press, Inc.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A R.; LIVAK, K J; RAFALSKI, J. A; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic acids research**, v. 18, n. 22, p. 6531–5, 1990. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=332606&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

WINK, M. Importance of the Polymerase Chain Reaction (PCR) for Plant Science. *BIOforum Extra. Anais...* p.5–11, 1994. Praga.

WITTEWER, C. T.; HERRMANN, M. G.; MOSS, A. A.; RASMUSSEN, R. P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, v. 22, n. 1, p. 130–139, 1997. [Natick, MA: Eaton Pub. Co., c1983-. Disponível em: <[http://www.biotechniques.com/multimedia/archive/00010/97221bi01\\_10206a.pdf](http://www.biotechniques.com/multimedia/archive/00010/97221bi01_10206a.pdf)>. Acesso em: 13/2/2012.

WULANDARI, N.; TO-ANUN, C.; HYDE, K. et al. *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of Citrus tan spot of *Citrus maxima* in Asia. *Fungal Diversity*, v. 34, p. 23–39, 2009. Disponível em: <<http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD34-2.pdf>>. Acesso em: 9/8/2011.

## APÊNDICES

### APÊNDICE 1 – SCRIPT ORGANIZADOR.SH

```
#!/bin/bash
#
# Organizador - Script para organização de diversos "reads" de
# sequenciadores automáticos
#
# Douglas Adamoski
# douglas.adamoski@gmail.com
#
# Este script agrupa os arquivos .esd em pastas de acordo com as linhagens
#
# Para tanto, utiliza uma pequena simplificação do padrão de nomenclatura
# St. Louis, adaptada para o output da
# ferramenta "Renomeador de Arquivos do MegaBACE v0.6.xls"
#
# Atente para a versão do Renomeador compatível: v0.6
#
# Utilização com outras versões pode ocasionar erros!
#
# nomelinhagemqualquertamanho.z.ObsYYY.XXXX.Inj#.esd
# -> e z é a identificação de verso (z) / reverso (y). Isto o script
# phredPhrap utiliza como informação
# quando rodado com o padrão de nomenclatura St. Louis.
# -> onde YYY é uma observação qualquer sobre aquele cromatograma, três
# letras/números
# -> XXXX é a identificação do primer, com 4 dígitos alfanuméricos,
# obrigatoriamente
# -> Inj# é o número da injeção da placa, sendo o # substituído por 1, 2
# (reinjeção), 3 (re-reinjeção)...
# o software não utiliza essa nomenclatura para nada, serve apenas para
# você se organizar
#
# Tenha certeza no preenchimento.
#
# Ele criará os diretórios com os nomes até o ".z.ObsYYY.XXXX.Inj#.esd"
# tudo que vier antes será considerado nome da linhagem e, portanto, irá
# para um diretório exclusivo
#
# Os arquivos .esd irão para a subpasta "chromat_dir", e também serão
# criadas as pastas "phd_dir",
# "edit_dir" e "poly_dir"
#
# Boa Sorte e boas análises!
#

# Diretório a partir do qual estão todas as montagens
basedir=`pwd`

# -----> INÍCIO DA ORGANIZAÇÃO DAS PASTAS

# Salva uma lista de diretórios
ls --format single-column >listasequencias.txt

# Execução do sed para remover a porção do nome que não pertence para a
# linhagem
```

```

sed "s/[y z].Obs[a-zA-Z0-9][a-zA-Z0-9][a-zA-Z0-9].[a-zA-Z0-9][a-zA-Z0-9][a-zA-Z0-9].Inj[0-9].esd//g"
listasequencias.txt>listalinhagensduplicadas.txt

# Remove, com o sed, as possíveis linhas sequenciais duplicadas

sed '$!N;                                /\^(.*)\n\1$/!P;                                D'
listalinhagensduplicadas.txt>listalinhagens.txt

# Loop para execução criação dos diretórios e mover os arquivos
for montagem in `cat listalinhagens.txt`
do
# Criação dos diretórios
mkdir $basedir/$montagem/ # Cria as subpastas para cada linhagem
mkdir $basedir/$montagem/edit_dir/# Cria o edit_dir em todas as linhagens
mkdir $basedir/$montagem/phd_dir/ # Cria o phd_dir em todas as linhagens
mkdir $basedir/$montagem/chromat_dir/
# Cria o chromat_dir em todas as linhagens

mkdir $basedir/$montagem/poly_dir/# Cria o poly_dir em todas as linhagens
# Movendo os arquivos
mv $basedir/$montagem*.esd $basedir/$montagem/chromat_dir/
# Move cada linhagem para sua respectiva pasta
done

# Remove os arquivos com as lista de sequências e linhagens
rm $basedir/listasequencias.txt
rm $basedir/listalinhagensduplicadas.txt
rm $basedir/listalinhagens.txt

# -----> Término da organização das pastas

# -----> Início da criação do Backup

tar -zcvf backup_antes_phredPhrap.tar.gz $basedir/*

# -----> Fim da criação do Backup

# Fecha o Script
exit 0

```

## APÊNDICE 2 – SCRIPT PHREDPHRAPMULTI.SH

```
#!/bin/bash
#
# phredPhrapMulti - Script para leitura e processamento de "reads" de
# sequenciadores automáticos, adaptado para
# sequenciamento das duas fitas de múltiplos isolados,
# para uma região pequena e não um genoma
#
# Douglas Adamoski
# douglas.adamoski@gmail.com
#
# Esta versão irá ler todos os subdiretórios de onde for rodada, ingressar
# na pasta "edit_dir" e rodar o script
# phredPhrap com as linhas determineReads.perl descomentadas, ou seja,
# utilizando o padrão St. Louis de nomenclatura
#
# É importante frisar que a organização de pastas deve ser a gerada pela
# ferramenta "organizador.sh", que é:
#
# Basedir
# | Linhagem 1
# | | _edit_dir
# | | _phd_dir
# | | _chromat_dir (local dos .esd da Linhagem 2)
# | | _poly_dir
# | Linhagem 2
# | | _edit_dir
# | | _phd_dir
# | | _chromat_dir (local dos .esd da Linhagem 2)
# | | _poly_dir
# e assim sucessivamente
#
# Ao fim, ela gera um arquivo .fas no diretório onde foi rodada com todas
# as sequências que o programa analisou
#
# Boa Sorte e boas análises!
#

# Diretório a partir do qual estão todas as montagens
basedir=`pwd`

# -----> Início do Script phredPhrap

# Libera o uso e Edição do script phredPhrap com as linhas do
# determineReads.perl descomentadas
chmod 777 $basedir/StLouis

# Salva uma lista de diretórios
cd $basedir
ls --format single-column >lista.txt

# Retira os nomes dos arquivos que devem estar presentes e não são pastas
sed "s/backup_antes_phredPhrap.tar.gz//g" lista.txt>lista1.txt
sed "s/organizador.sh//g" lista1.txt>lista2.txt
sed "s/StLouis//g" lista2.txt>lista3.txt
sed "s/lista.txt//g" lista3.txt>lista4.txt

# Remove as listas geradas para retirar os nomes
rm lista.txt
```

```

rm lista1.txt
rm lista2.txt
rm lista3.txt

# Loop para execução do phredPhrap com o padrão de nomenclatura St. Louis
ativado
for montagem in `cat lista4.txt`
do
  cd $basedir/$montagem/edit_dir/      # Entra nos diretórios
  $basedir/StLouis                    # Executa o phredPhrap
done

# Cria um diretório "contigs"
mkdir $basedir/contigs

# Salva todos os contigs no diretório acima criado
cd $basedir
for montagem in `cat lista4.txt`
do
  cd $basedir/$montagem/edit_dir/      # Entra nos diretórios
  cp *.contigs $basedir/contigs      # Copia os contigs
done

# Remove os contigs no formato FASTA sem a padronização minúscula/maiuscula
rm $basedir/contigs/*.fasta.screen.contigs

# Gera lista de Arquivos para o sed trabalhar
cd $basedir/contigs
ls --format single-column >listacontigs.txt

# Loop para execução do sed
for contigsbrutos in `cat listacontigs.txt`
do
  sed "s/Contig1/$contigsbrutos/g" $contigsbrutos>$contigsbrutos.1.fas
# Coloca os nomes dos arquivos Fasta depois do "maior que",
# dentro do próprio arquivo, ao invés de "Contig1"

  sed      "s/.[0-9][0-9][0-9][0-9][0-9][0-9].[0-9][0-9][0-9][0-9][0-9][0-9]
[0-9].contigs//g" $contigsbrutos.1.fas>$contigsbrutos.fas
# Remove a timestamp do nome da linha
done

# Cria a pasta contigs/fasta
mkdir fasta

# Move os .fas criados para a pasta acima
mv *.fas fasta

# Remove os arquivos com as lista de diretórios e contigs
rm $basedir/lista4.txt
rm $basedir/contigs/listacontigs.txt
rm $basedir/contigs/fasta/listacontigs.txt.fas
rm $basedir/contigs/fasta/*.1.fas

# Junta os Contigs em um único arquivo fasta
cd $basedir/contigs/fasta
cat *.fas> sequencias.fas

# Move o arquivo com todas as sequências para a pasta $basedir
mv $basedir/contigs/fasta/sequencias.fas $basedir

```

```
# -----> Término do Script phredPhrap  
# Fecha o Script  
exit 0
```

### APÊNDICE 3 – AVALIAÇÃO COM AUTODIMMER PARA *PRIMERS* DE PCR QUANTITATIVA

Number of Hits = 18  
 Number of Sequences = 3  
 Na+ = 50 Ct = 1.0

TaqMan Probe TCCTATTTCCAGAGCACCCATCTAAA versus TaqMan Probe  
 TCCTATTTCCAGAGCACCCATCTAAA

Matches = 2

Score = 0

TNNA

est. tm = less than zero

DeltaG 20 degrees = greater than zero

3'-AAATCTACCCACGAGACCTTTATCCT-5'

|xx|

5'-TCCTATTTCCAGAGCACCCATCTAAA-3'

TaqMan Probe TCCTATTTCCAGAGCACCCATCTAAA versus TaqMan Probe  
 TCCTATTTCCAGAGCACCCATCTAAA

Matches = 4

Score = 2

TNTANA

est. tm = less than zero

DeltaG 20 degrees = -0,42 kcal/mole

3'-AAATCTACCCACGAGACCTTTATCCT-5'

|x||x|

5'-TCCTATTTCCAGAGCACCCATCTAAA-3'

TaqMan Probe TCCTATTTCCAGAGCACCCATCTAAA versus TaqMan Probe  
 TCCTATTTCCAGAGCACCCATCTAAA

Matches = 8

Score = 0

TNCTNTNNNNANAGNA

est. tm = less than 0 oC

DeltaG 20 degrees = -4,34 kcal/mole

5'-TCCTATTTCCAGAGCACCCATCTAAA-3'

|x||x|xxxx|x||x|

3'-AAATCTACCCACGAGACCTTTATCCT-5'

Sense *Primer* GAGAGTGGAAGGAGACAG versus TaqMan Probe  
 TCCTATTTCCAGAGCACCCATCTAAA

Matches = 2

Score = 2

TC

est. tm = less than 0 oC

DeltaG 20 degrees = -0,52 kcal/mole

5'-TCCTATTTCCAGAGCACCCATCTAAA-3'

||

3'-GACAGAGGAAGGTGAGAG-5'

Sense *Primer* GAGAGTGGAAGGAGACAG versus TaqMan Probe  
 TCCTATTTCCAGAGCACCCATCTAAA

Matches = 2

Score = 0  
 TCNN  
 est. tm = less than 0 oC  
 DeltaG 20 degrees = -1,84 kcal/mole

5'-TCCTATTTCCAGAGCACCCATCTAAA-3'  
 ||xx  
 3'-GACAGAGGAAGGTGAGAG-5'

Sense *Primer* GAGAGTGAAGGAGACAG versus TaqMan Probe  
 TCCTATTTCCAGAGCACCCATCTAAA  
 Matches = 6  
 Score = 3  
 TCCNNTNTC  
 est. tm = 0,2 oC  
 DeltaG 20 degrees = -6,02 kcal/mole

5'-TCCTATTTCCAGAGCACCCATCTAAA-3'  
 |||xx|x||  
 3'-GACAGAGGAAGGTGAGAG-5'

Sense *Primer* GAGAGTGAAGGAGACAG versus TaqMan Probe  
 TCCTATTTCCAGAGCACCCATCTAAA  
 Matches = 5  
 Score = 0  
 TNCNANTNNC  
 est. tm = less than 0 oC  
 DeltaG 20 degrees = -0,01 kcal/mole

5'-TCCTATTTCCAGAGCACCCATCTAAA-3'  
 |x|x|x|xx|  
 3'-GACAGAGGAAGGTGAGAG-5'

Anti Sense *Primer* CTACGGCAGATAGTAATAACC versus TaqMan Probe  
 TCCTATTTCCAGAGCACCCATCTAAA  
 Matches = 3  
 Score = 0  
 NCNTAN  
 est. tm = less than 0 oC  
 DeltaG 20 degrees = -2,61 kcal/mole

5'-TCCTATTTCCAGAGCACCCATCTAAA-3'  
 x|x||x  
 3'-CCAATAATGATAGACGGCATC-5'

Anti Sense *Primer* CTACGGCAGATAGTAATAACC versus TaqMan Probe  
 TCCTATTTCCAGAGCACCCATCTAAA  
 Matches = 8  
 Score = 1  
 TNCTATNTNCNGNNN  
 est. tm = 2,6 oC  
 DeltaG 20 degrees = -6,42 kcal/mole

5'-TCCTATTTCCAGAGCACCCATCTAAA-3'  
 |x| || |x|x|x|xxx  
 3'-CCAATAATGATAGACGGCATC-5'

Sense *Primer* GAGAGTGAAGGAGACAG versus Sense *Primer* GAGAGTGAAGGAGACAG  
 Matches = 2  
 Score = 1  
 CNG

est. tm = less than zero  
DeltaG 20 degrees = greater than zero

3'-GACAGAGGAAGGTGAGAG-5'  
|x|  
5'-GAGAGTGGGAAGGAGACAG-3'

Sense *Primer* GAGAGTGGGAAGGAGACAG versus Anti Sense *Primer*  
CTACGGCAGATAGTAATAACC

Matches = 1

Score = 1

C

est. tm = less than 0 oC  
DeltaG 20 degrees = > 0 kcal/mole

5'-CTACGGCAGATAGTAATAACC-3'  
|  
3'-GACAGAGGAAGGTGAGAG-5'

Sense *Primer* GAGAGTGGGAAGGAGACAG versus Anti Sense *Primer*  
CTACGGCAGATAGTAATAACC

Matches = 1

Score = 1

G

est. tm = less than zero  
DeltaG 20 degrees = greater than zero

3'-CCAATAATGATAGACGGCATC-5'  
|  
5'-GAGAGTGGGAAGGAGACAG-3'

Sense *Primer* GAGAGTGGGAAGGAGACAG versus Anti Sense *Primer*  
CTACGGCAGATAGTAATAACC

Matches = 1

Score = 0

NG

est. tm = less than zero  
DeltaG 20 degrees = greater than zero

3'-CCAATAATGATAGACGGCATC-5'  
x|  
5'-GAGAGTGGGAAGGAGACAG-3'

Sense *Primer* GAGAGTGGGAAGGAGACAG versus Anti Sense *Primer*  
CTACGGCAGATAGTAATAACC

Matches = 2

Score = 1

CTN

est. tm = less than 0 oC  
DeltaG 20 degrees = -1,99 kcal/mole

5'-CTACGGCAGATAGTAATAACC-3'  
||x  
3'-GACAGAGGAAGGTGAGAG-5'

Anti Sense *Primer* CTACGGCAGATAGTAATAACC versus Anti Sense *Primer*  
CTACGGCAGATAGTAATAACC

Matches = 2

Score = 0

NTAN

est. tm = less than 0 oC

DeltaG 20 degrees = -2,21 kcal/mole

```

          5'-CTACGGCAGATAGTAATAACC-3'
              x||x
3'-CCAATAATGATAGACGGCATC-5'

```

Anti Sense Primer CTACGGCAGATAGTAATAACC versus Anti Sense Primer  
 CTACGGCAGATAGTAATAACC  
 Matches = 6  
 Score = 3  
 CTNCNGNAG  
 est. tm = less than 0 oC  
 DeltaG 20 degrees = -3,93 kcal/mole

```

          5'-CTACGGCAGATAGTAATAACC-3'
              ||x|x|x||
3'-CCAATAATGATAGACGGCATC-5'

```

Anti Sense Primer CTACGGCAGATAGTAATAACC versus Anti Sense Primer  
 CTACGGCAGATAGTAATAACC  
 Matches = 6  
 Score = 2  
 NGTNATNACN  
 est. tm = 23,7 oC  
 DeltaG 20 degrees = -7,79 kcal/mole

```

          3'-CCAATAATGATAGACGGCATC-5'
              x||x||x||x
5'-CTACGGCAGATAGTAATAACC-3'

```

Anti Sense Primer CTACGGCAGATAGTAATAACC versus Anti Sense Primer  
 CTACGGCAGATAGTAATAACC  
 Matches = 8  
 Score = 2  
 NGNTANTANTANCN  
 est. tm = 6,6 oC  
 DeltaG 20 degrees = -6,59 kcal/mole

```

          3'-CCAATAATGATAGACGGCATC-5'
              x|x||x||x||x|x
5'-CTACGGCAGATAGTAATAACC-3'

```

Number of Hits = 12  
 Number of Sequences = 3  
 Na+ = 50 Ct = 1.0

TaqMan Probe  
 Matches = 2  
 Score = 0  
 NNGA  
 est. tm = less than zero  
 DeltaG 20 degrees = -1,27 kcal/mole

```

TATCCT-5'
T XX||
TCCAGAGCACCCATCTAAA-3'

```

TaqMan Probe  
 Matches = 4

Score = 2  
 ANAGNA  
 est. tm = 13,4 oC  
 DeltaG @20 degrees = -5,90 kcal/mole

TTTATCCT-5'  
 { |X||X|  
 CCAGAGCACCCATCTAAA-3'

TaqMan Probe  
 Matches = 4  
 Score = 0  
 NNTNNA  
 est. tm = 11,2 oC  
 DeltaG 20 degrees = -5,64 kcal/mole

CGAGACCTTTATCCT-5'  
 A XX|XX|||  
 CCCATCTAAA-3'

TaqMan Probe  
 Matches = 4  
 Score = 1  
 NTCTNNA  
 est. tm = 13,4 oC  
 DeltaG 20 degrees = -5,90 kcal/mole

ACGAGACCTTTATCCT-5'  
 C X|||XX|  
 CCATCTAAA-3'

Anti Sense *Primer*  
 Matches = 2  
 Score = 2  
 AG  
 est. tm = less than zero  
 DeltaG 20 degrees = -1,25 kcal/mole

CATC-5'  
 G ||  
 GCAGATAGTAATAACC-3'

Anti Sense *Primer*  
 Matches = 3  
 Score = 2  
 NTAG  
 est. tm = less than zero  
 DeltaG 20 degrees = -3,50 kcal/mole

GGCATC-5'  
 C X|||  
 AGATAGTAATAACC-3'

Anti Sense *Primer*  
 Matches = 3  
 Score = 0  
 NNGTAN  
 est. tm = less than zero  
 DeltaG @20 degrees = -3,47 kcal/mole

ACGGCATC-5'

```
{ XX|||X
GATAGTAATAACC-3'
```

Anti Sense *Primer*  
 Matches = 3  
 Score = 0  
 ATNNNC  
 est. tm = less than zero  
 DeltaG @20 degrees = -3,68 kcal/mole

```
GATAGACGGCATC-5'
{ ||XXX|
TAATAACC-3'
```

Anti Sense *Primer*  
 Matches = 3  
 Score = 1  
 TANCN  
 est. tm = less than zero  
 DeltaG @20 degrees = -3,52 kcal/mole

```
TGATAGACGGCATC-5'
{ ||X|X
AATAACC-3'
```

Anti Sense *Primer*  
 Matches = 2  
 Score = 0  
 NANC  
 est. tm = less than zero  
 DeltaG 20 degrees = -1,27 kcal/mole

```
TGATAGACGGCATC-5'
A X|X|
ATAACC-3'
```

Anti Sense *Primer*  
 Matches = 2  
 Score = 1  
 ACN  
 est. tm = less than zero  
 DeltaG @20 degrees = -1,22 kcal/mole

```
AATGATAGACGGCATC-5'
{ ||X
TAACC-3'
```

Anti Sense *Primer*  
 Matches = 1  
 Score = 0  
 NC  
 est. tm = less than zero  
 DeltaG 20 degrees = greater than zero

```
AATGATAGACGGCATC-5'
T X|
AACC-3'
```

### APÊNDICE 3 – AVALIAÇÃO COM AUTODIMMER PARA PRIMERS GMF1 E PCPR

GMF1 TGTCATGGACTGCATAGAGGG versus GMF1 TGTCATGGACTGCATAGAGGG  
 Matches = 4  
 Score = 3  
 TGNCA  
 est. tm = less than 0 oC  
 DeltaG 37 degrees = -2,96 kcal/mole

```

                    5'-TGTCATGGACTGCATAGAGGG-3'
                        ||x||
3'-GGGAGATACGTCAGGTACTGT-5'
```

GMF1 TGTCATGGACTGCATAGAGGG versus GMF1 TGTCATGGACTGCATAGAGGG  
 Matches = 6  
 Score = 1  
 NGTCNNGACN  
 est. tm = 51,6 oC  
 DeltaG 37 degrees = -9,36 kcal/mole

```

                    5'-TGTCATGGACTGCATAGAGGG-3'
                        x||xxx||x
3'-GGGAGATACGTCAGGTACTGT-5'
```

GMF1 TGTCATGGACTGCATAGAGGG versus PCPr CATGATCACGTCACCGTCTTCGA  
 Matches = 2  
 Score = 2  
 CA  
 est. tm = less than 0 oC  
 DeltaG 37 degrees = -0,48 kcal/mole

```

                    5'-CATGATCACGTCACCGTCTTCGA-3'
                        ||
3'-GGGAGATACGTCAGGTACTGT-5'
```

GMF1 TGTCATGGACTGCATAGAGGG versus PCPr CATGATCACGTCACCGTCTTCGA  
 Matches = 5  
 Score = 3  
 CATGANN  
 est. tm = 30,3 oC  
 DeltaG 37 degrees = -7,25 kcal/mole

```

                    5'-CATGATCACGTCACCGTCTTCGA-3'
                        ||||xx
3'-GGGAGATACGTCAGGTACTGT-5'
```

GMF1 TGTCATGGACTGCATAGAGGG versus PCPr CATGATCACGTCACCGTCTTCGA  
 Matches = 4  
 Score = 1  
 TNGANGN  
 est. tm = less than zero  
 DeltaG 37 degrees = -2,96 kcal/mole

```

                    3'-AGCTTCTGCCACTGCACTAGTAC-5'
                        |x||x|x
5'-TGTCATGGACTGCATAGAGGG-3'
```

GMF1 TGTCATGGACTGCATAGAGGG versus PCPr CATGATCACGTCACCGTCTTCGA  
 Matches = 6

Score = 2  
 NCNNAGANGG  
 est. tm = 21,4 oC  
 DeltaG 37 degrees = -6,78 kcal/mole

3'-AGCTTCTGCCACTGCACTAGTAC-5'  
 x|xx|||x||  
 5'-TGTCATGGACTGCATAGAGGG-3'

PCPr CATGATCACGTCACCGTCTTCGA versus PCPr CATGATCACGTCACCGTCTTCGA  
 Matches = 4  
 Score = 4  
 CATG  
 est. tm = less than 0 oC  
 DeltaG 37 degrees = -3,45 kcal/mole

5'-CATGATCACGTCACCGTCTTCGA-3'  
 ||||  
 3'-AGCTTCTGCCACTGCACTAGTAC-5'

PCPr CATGATCACGTCACCGTCTTCGA versus PCPr CATGATCACGTCACCGTCTTCGA  
 Matches = 4  
 Score = 4  
 TCGA  
 est. tm = 2,9 oC  
 DeltaG 37 degrees = -4,33 kcal/mole

3'-AGCTTCTGCCACTGCACTAGTAC-5'  
 ||||  
 5'-CATGATCACGTCACCGTCTTCGA-3'

PCPr CATGATCACGTCACCGTCTTCGA versus PCPr CATGATCACGTCACCGTCTTCGA  
 Matches = 4  
 Score = 1  
 NATNATN  
 est. tm = less than 0 oC  
 DeltaG 37 degrees = -4,42 kcal/mole

5'-CATGATCACGTCACCGTCTTCGA-3'  
 x||x||x  
 3'-AGCTTCTGCCACTGCACTAGTAC-5'

PCPr CATGATCACGTCACCGTCTTCGA versus PCPr CATGATCACGTCACCGTCTTCGA  
 Matches = 4  
 Score = 1  
 TCNNNGA  
 est. tm = less than zero  
 DeltaG 37 degrees = -2,81 kcal/mole

3'-AGCTTCTGCCACTGCACTAGTAC-5'  
 ||xxx||  
 5'-CATGATCACGTCACCGTCTTCGA-3'

PCPr CATGATCACGTCACCGTCTTCGA versus PCPr CATGATCACGTCACCGTCTTCGA  
 Matches = 8  
 Score = 6  
 CNTGATCANG  
 est. tm = 42,8 oC  
 DeltaG 37 degrees = -8,68 kcal/mole

5'-CATGATCACGTCACCGTCTTCGA-3'

|x|||||x|  
3'-AGCTTCTGCCACTGCACTAGTAC-5'

PCPr CATGATCACGTCACCGTCTTCGA versus PCPr CATGATCACGTCACCGTCTTCGA  
Matches = 10  
Score = 2  
NANGNTNACGTNANCNTN  
est. tm = 83,6 oC  
DeltaG 37 degrees = -11,13 kcal/mole

5'-CATGATCACGTCACCGTCTTCGA-3'  
x|x|x|x|||x|x|x|x  
3'-AGCTTCTGCCACTGCACTAGTAC-5'

GMF1  
Matches = 1  
Score = 0  
NA  
est. tm = less than zero  
DeltaG 37 degrees = greater than zero

CTGT-5'  
A X|  
TGGACTGCATAGAGGG-3'

GMF1  
Matches = 2  
Score = 1  
ACN  
est. tm = less than zero  
DeltaG 37 degrees = -1,00 kcal/mole

ACTGT-5'  
T ||X  
GGACTGCATAGAGGG-3'

GMF1  
Matches = 1  
Score = 0  
NG  
est. tm = less than zero  
DeltaG 37 degrees = greater than zero

ATACGTCAGGTACTGT-5'  
G X|  
AGGG-3'

PCPr  
Matches = 2  
Score = 1  
ANG  
est. tm = less than zero  
DeltaG @37 degrees = -1,05 kcal/mole

AGTAC-5'  
{ |X|  
TCACGTCACCGTCTTCGA-3'

PCPr  
Matches = 2  
Score = 0

CNTN  
 est. tm = less than zero  
 DeltaG @37 degrees = -1,05 kcal/mole

TAGTAC-5'  
 { |X|X  
 CACGTCACCGTCTTCGA-3'

PCPr  
 Matches = 3  
 Score = 1  
 TCANN  
 est. tm = less than zero  
 DeltaG 37 degrees = -3,30 kcal/mole

CTAGTAC-5'  
 A |||XX  
 CGTCACCGTCTTCGA-3'

PCPr  
 Matches = 5  
 Score = 1  
 CGTNNTCNN  
 est. tm = 46,2 oC  
 DeltaG @37 degrees = -8,45 kcal/mole

CTGCACTAGTAC-5'  
 { |||XX||XX  
 ACCGTCTTCGA-3'

PCPr  
 Matches = 2  
 Score = 0  
 NNGA  
 est. tm = less than zero  
 DeltaG 37 degrees = -1,05 kcal/mole

GCCACTGCACTAGTAC-5'  
 T XX||  
 CTTCGA-3'

PCPr  
 Matches = 2  
 Score = 1  
 CGN  
 est. tm = less than zero  
 DeltaG @37 degrees = -1,92 kcal/mole

CTGCCACTGCACTAGTAC-5'  
 { ||X  
 TTCGA-3'