

Uso de RFLP-PCR para a detecção de isolados de *Venturia inaequalis* resistentes ao cresoxim metílico do Sul do Brasil

Artur Teixeira de Araújo Junior¹, Paula Longhi¹, Patricia Ritschel², Renata Gava², Rosa Maria Valdebenito Sanhueza³, Kerik Cox⁴

¹Bolsistas de Iniciação Científica, Embrapa Uva e Vinho, Rua Livramento, 515, Bairro Conceição, CEP 95700-000, Bento Gonçalves, RS.; ²Embrapa Uva e Vinho, Rua Livramento, 515, Bairro Conceição, CEP 95700-000, Bento Gonçalves, RS.; ³Proterra Consultoria Agrônômica, BR 116, 7320, Bairro Fátima, CEP 95200-000, Vacaria, RS. Pesquisadora CNPq. ⁴New York Agricultural Experiment Station, Cornell University, Geneva, NY, 14456.

Autor para correspondência: Rosa Maria Valdebenito-Sanhueza (rosamaria@cipnet.com.br)

Data de chegada: 09/03/2015. Aceito para publicação em: 26/06/2015.

10.1590/0100-5405/2085

RESUMO

Araújo Junior, A.T. de, Longhi, P., Ritschel, P., Gava, R.; Sanhueza, R.M.V., Cox, K. Uso de RFLP-PCR para a detecção de isolados de *Venturia inaequalis* resistentes ao cresoxim metílico do Sul do Brasil. *Summa Phytopathologica*, v.41, n.3, p.224-226, 2015.

O principal mecanismo que confere resistência do fungo *Venturia inaequalis* aos inibidores de oxidação (quinol QoIs) é a ocorrência de mutações no gene citocromo b CYTB (G143A). O objetivo do trabalho foi a implementação da metodologia RFLP-PCR para caracterizar a reação de isolados de *V. inaequalis* à presença de QoIs. Foram utilizados sete isolados monospóricos de *V. inaequalis*, coletados em pomares comerciais de Santa Catarina e cedidos pela Estação Experimental da EPAGRI de São Joaquim, Santa Catarina. Os isolados foram classificados como sensíveis ou resistentes após crescimento em meio BDA contendo 10 µg.mL⁻¹ de cresoxim metílico. Para determinação da presença

da mutação G143A foram utilizados os marcadores específicos ViCytB-5F e ViCytB-6071R. O DNA dos isolados foi amplificado em reação de PCR e separado em gel de agarose 1,5%. Os fragmentos foram então digeridos com a enzima de restrição *Fnu4HI* identificadora da mutação e os produtos da digestão foram analisados por eletroforese num gel de agarose 1,0%. Os genótipos revelados estavam associados ao fenótipo estabelecido pelo crescimento dos isolados em presença do fungicida, mostrando que 6 isolados já apresentavam o alelo de resistência. O uso de técnicas de RFLP-PCR permitiram uma avaliação rápida e confiável na detecção da resistência de *V. inaequalis* ao cresoxim metílico.

Palavras-chave: G143A. QoIs. Fungo. Marcador molecular

ABSTRACT

Araújo Junior, A.T.de, Longhi, P., Ritschel, P., Gava, R.; Sanhueza, R.M.V., Cox, K. Use of RFLP-PCR method to detect kresoxim methyl-resistant *Venturia inaequalis* isolates from the South of Brazil. *Summa Phytopathologica*, v.41, n.3, p.224-226, 2015.

The principal mechanism in the fungus *Venturia inaequalis* which confers resistance to oxidation inhibitors (quinol QoIs) is the occurrence of mutations in the cytochrome b gene CYTB (G143A). The aim of this study was to implement the PCR-RFLP methodology to characterize the reaction of *V. inaequalis* isolates to the presence of QoIs. Seven monosporic isolates of *V. inaequalis* were collected from commercial orchards in Santa Catarina and supplied by EPAGRI Experimental Station at São Joaquim, Santa Catarina. The isolates were classified as sensitive or resistant after their growth on PDA medium containing 10 µg.mL⁻¹ kresoxim methyl. To determine the presence

of G143A mutation, the specific markers ViCytB-5F and ViCytB-6071R were used. The DNA of isolates was amplified by PCR and separated on 1.5% agarose gel. The fragments were then digested with the restriction enzyme *Fnu4HI*, mutant identifier, and the digestion products were analyzed by means of electrophoresis on 1.0% agarose gel. The revealed genotypes were associated with the phenotype established by the growth of isolates in the presence of the fungicide, indicating that 6 isolates already had the resistance allele. The use of PCR-RFLP techniques allowed rapid and reliable assessment in the detection of *V. inaequalis* resistance to kresoxim methyl.

Additional keywords: G143A. QoIs. Fungus. Molecular marker.

A macieira (*Malus domestica* Borkh.) é uma frutífera que se desenvolve em clima temperado, no qual possui a maior dispersão, comercialização e consumo como fruta fresca no mundo, estando na quarta posição de frutífera mais produzida (4). No Brasil, ela representa a segunda fruta mais importante de clima temperado. O Rio Grande do Sul é atualmente o segundo maior produtor nacional de maçã, com uma produção média atual de 634.400 toneladas.ano⁻¹, respondendo por cerca de 46,5% da produção brasileira, ficando atrás apenas de Santa Catarina (6).

O fungo *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter é uma das principais doenças da cultura, ocorrendo em grande parte das regiões produtoras de maçãs do mundo (1), sendo considerada uma das doenças economicamente mais devastadoras de macieira (8).

Durante os últimos anos, as formas de controle de várias doenças fúngicas agrícolas têm sido melhoradas devido ao desenvolvimento e uso das estrobilurinas, entre elas o metil cresoxim. Estes fungicidas foram os primeiros membros da classe dos Inibidores de Oxidação Quinol (QoIs), tornando-se rapidamente o mais importante grupo de

fungicidas em todo o mundo (5).

O principal mecanismo que confere aos fungos fitopatogênicos resistência aos QoIs é a modificação local alvo, envolvendo mutações de ponto no gene citocromo b, que correspondem à substituição de um aminoácido e que resultam no impedimento da ligação do inibidor ao produto do gene (7). Entre essas substituições de aminoácidos temos de glicina para alanina na posição 143 ('G143A'). A presença desta mutação específica sempre foi associada com um alto nível de resistência à QoI e ao fracasso do controle da doença em condições práticas de campo (3).

Desta forma, o monitoramento da presença de isolados resistentes à QoI e o nível do alelo mutado na população de agentes patogênicos no campo é importante para o estudo da evolução da resistência e a avaliação da eficiência prática do uso da estrobilurina. Assim, o seguinte estudo tem o objetivo de validar a metodologia RFLP-PCR para caracterizar a reação de isolados de *V. inaequalis* à presença de QoIs.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico

Foram utilizados sete isolados monospóricos de *Venturia inaequalis* dos pomares comerciais de Santa Catarina cedidos pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) de São Joaquim, SC.

Cultivo dos Isolados

O cultivo de *V. inaequalis* foi efetuado no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Uva e Vinho. Com uma agulha retirou-se uma pequena porção de esporos que foram transferidas para placas com BDA (Batata, Dextrose e Ágar). As placas foram incubadas na B.O.D. (Demanda Biológica de Oxigênio), a 20 °C, por 10 dias.

Preservação dos Isolados

Os isolados foram preservados em papel filtro. Tiras de papel filtro foram molhadas em leite em pó desnatado a 1% estéril e depositadas sobre a colônia por alguns segundos. Em seguida as tiras de papel foram retiradas e armazenadas em envelopes de papel de alumínio. Os envelopes, contendo as tiras, foram depositados no dessecador por cinco dias. Após esse período, de cada envelope foi retirada uma tira de papel que foi inoculada em meio BDA. O crescimento do fungo em meio indica que a preservação foi realizada de modo correto. Os envelopes foram então armazenados em geladeira a 4°C.

Isolamento Monospórico

Os fungos preservados foram cultivados em meio BDA, com 10g de dextrose por litro, para estimular a esporulação, até atingirem as bordas da placa e esporularem, o que levou cerca de cinco dias. No isolamento monospórico pequenas quantidades de esporos foram depositadas em gotas d'água e espalhados em Ágar-água. Após 24 horas efetuou-se o isolamento em meio BDA com 10g de dextrose. Este meio continuou sendo usado para que as colônias esporulassem facilitando a preservação que foi realizada em seguida.

Avaliação da Sensibilidade ao Fungicida

Os isolados foram classificados como sensíveis ou resistentes após determinado o seu desenvolvimento em BDA contendo ou não 10 µg.mL⁻¹ de cresoxim metílico e, aqueles que cresceram na placa com fungicida foram classificados como resistentes, enquanto os que não se desenvolveram foram classificados como sensíveis.

Preparo do Micélio para a Extração de DNA

Para a extração de DNA de *V. inaequalis* foi necessário cultivar os isolados em placas de Petri contendo meio BDA, por seis a dez dias sob temperaturas entre 23 a 27°C, com alternância luminosa (12h luz/12h escuro), sendo realizadas repetições para cada isolado.

Extração e quantificação do DNA de *V. inaequalis*

A extração do DNA dos isolados foi realizada segundo o protocolo desenvolvido por Doyle & Doyle (1990) adaptado (2). Posteriormente, o DNA extraído foi quantificado comparativamente, em gel de agarose 1% corada por brometo de etídeo, utilizando-se uma sequência ascendente de um marcador de peso molecular.

Em seguida, as amostras foram diluídas para uma concentração de trabalho de 2,5 ng/µl e o restante da amostra foi armazenado em freezer a temperatura de -20°C.

Determinação da mutação

Para determinar a presença da mutação G143A citocromo b em cada isolado, primers ou iniciadores específicos relacionados com citocromo b de *V. inaequalis*, *ViCytB-5F* (5'-GGA CCA AGT AAT TGG CAC ATG TGT G -3') e *ViCytB-6071R* (5'- TTG AAA GCT AGG CTA GGG CGA ACA -3') foram usados para amplificar um fragmento de 938 bp, que inclui o codon 143.

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de reação de 25 µL, contendo os reagentes: tampão de PCR (1X); iniciadores *ViCytB-5F* (0,4 µM) e *ViCytB-6071R* (0,4 µM); MgCl₂ (2,5 mM); dNTPs (2,5 µM); GoTaq flexi DNA polimerase (0,625 U/µL); e 5 ng de DNA genômico. As amplificações foram realizadas no termociclador BIO-RAD, seguindo o programa: 3 min a 94 ° C, 30 ciclos de 30 s a 94 ° C, 30 s a 55 ° C, 30 s a 72 ° C, seguidos por um passo de extensão final de 5 min a 72 ° C.

Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 2% contendo tampão TBE 1x a 100 V durante 1 h. Fotografias do gel foram tiradas em um Gel Logic 200 Imaging System Kodak. Para digestão do fragmento amplificado por PCR, utilizou-se 5 U de enzima de restrição *Fnu4HI* (New England Biolabs, Ipswich, MA), que detecta a mutação de ponto no gene CytB (9). A reação foi incubada a 37°C durante 12 horas. Após incubação, foi realizada uma etapa de inativação de 25 minutos a 65°C no termociclador BIO-RAD (*My Cycler Thermal Cycler*) e os fragmentos de DNA foram analisados por eletroforese num gel de agarose 1,0%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da sensibilidade dos isolados ao fungicida em meio de cultura

Dentre os sete isolados testados em meio BDA com 10 µg.mL⁻¹ de cresoxim metílico para avaliação da sensibilidade frente a este fungicida, apenas 1 isolado (V23) foi sensível, não crescendo na placa. Todos os outros isolados possuíam o fenótipo de resistência (V1; V2; V3; V4; V5 e VE L1). Por meio desta avaliação podemos perceber que 85,71% dos isolados coletados apresentaram resistência a QoI, tendo um crescimento normal com o fungicida no meio de cultura.

Amplificação do DNA de *Venturia inaequalis* com os marcadores *ViCytB-5F* e *ViCytB-6071R*

O DNA das amostras de *Venturia inaequalis* foi amplificado em uma reação de PCR contendo os marcadores da região de interesse (*ViCytB-5F* e *ViCytB-6071R*). Como resultado da amplificação, obteve-se um

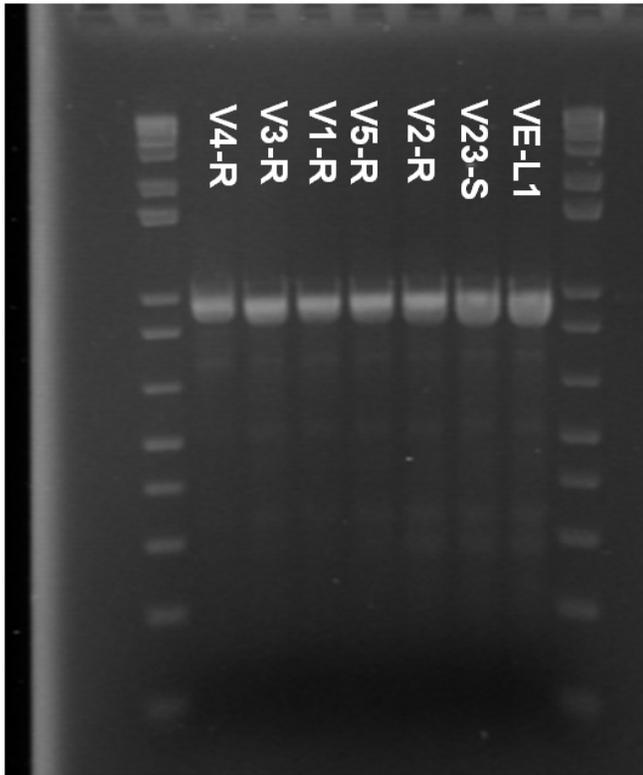


Figura 1. Resultado do gel de agarose 1,5% contendo DNAs de *V. inaequalis* amplificados com os primers ViCytB-5F e ViCytB-6071R.

confiabilidade de que esses fungos representam os fungos de interesse.

Determinação da mutação

Após a confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA das amostras de *V. inaequalis*, estes foram incubados com a enzima de restrição *Fnu4HI* sendo posteriormente separados em um gel de agarose 1,0%. Como resultado, apenas o fragmento do isolado (V23) não foi digerido pela enzima (FIGURA 2), demonstrando que este isolado não possui a mutação G143, e não é resistente ao metil cresoxim. Todos os outros isolados obtiveram fragmentos de 650 pb e 350 pb, confirmando a presença da mutação.

Os genótipos revelados pela amplificação do DNA dos isolados de *Venturia inaequalis*, seguida pela digestão com a enzima de restrição *Fnu4HI*, estavam associados ao fenótipo estabelecido pelo crescimento dos isolados em presença do fungicida, confirmando a confiabilidade do método RFLP-PCR.

Desta forma, pode-se observar que o uso da técnica de RFLP-PCR permitiu uma avaliação rápida e confiável da resistência de *V. inaequalis* ao cresoxim metílico. Entre os sete isolados de *V. inaequalis*, seis apresentaram resistência ao metil cresoxim. Os marcadores ViCytB-5F e ViCytB-6071R juntamente com a enzima de restrição *Fnu4HI* são capazes de determinar a mutação G143 em *V. inaequalis*.

A técnica RFLP-PCR apresenta uma forma segura de detectar a sensibilidade ou resistência do fungo *V. inaequalis*, auxiliando o produtor se deve ou não aplicar o fungicida cresoxim metílico em sua área de produção.

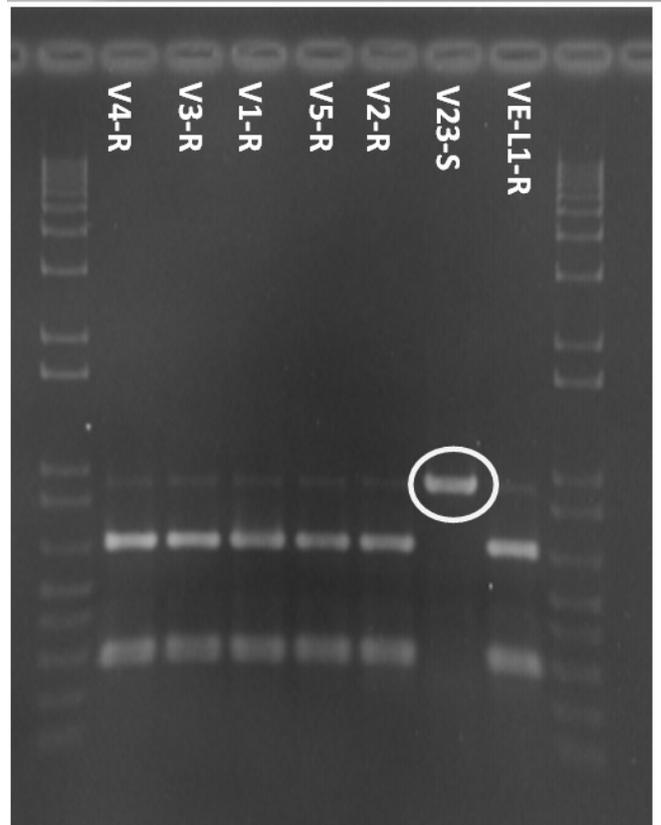


Figura 2. Gel de agarose 1% para visualização da variação no tamanho dos fragmentos. 1Kb Plus DNA Ladder.

REFERÊNCIAS

- Boneti, J. I. S.; Katsurayama, Y.; Sanhueza, R. M. V. **Manejo da sarna na Produção Integrada de Maçã**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2001. (Circular técnica, 30). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/55112/1/cir030.pdf>>. Acesso em: 19 maio 2015.
- Doyle, J. J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Madison, v.12, n.1, p.13-15, 1990.
- Fernandez - Ortuno, D.; Tores, J. A.; de Vicente, A.; Perez-Garcia, A. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. **International Microbiology**, Madrid, v.11, n.1, p.1-9, 2008.
- Hauagge, R.; Bruckner, C. H. Macieira. In: Bruckner, C. H. **Melhoramento de fruteiras de clima temperado**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. cap.2, p.28-88.
- Hollomon, D. W.; Wheeler, I. E. Controlling powdery mildews with chemistry. In: Bélanger, R. R.; Bushnell, W. R.; Dik, A. J.; Caver, T. L. W. (eds). **The powdery mildews**. A comprehensive treatise. St. Paul: APS Press, 2002, p.249-255.
- IBGE. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro, fev. 2012. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo/2012/lspa_201202.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/2012/lspa_201202.pdf)>. Acesso em: 18 maio 2015.
- Lesemann, S. S.; Schimpke, S.; Dunemann, F.; Deising, H. B. Mitochondrial heteroplasmy for the cytochrome b gene controls the level of strobilurin resistance in the apple powdery mildew fungus *Podosphaera leucotricha* (Ell. & Ev.) E.S. Salmon. **J. Plant Dis. Protect**, Stuttgart, v.113, n.6, p.259-266, 2006.
- MacHardy, W. E.; Gadoury, D. M.; Gessler, C. Parasitic and biological fitness of *Venturia inaequalis*: relationship to disease management strategies. **Plant Disease**, Saint Paul, 2001, v.85, n.10, p.1036-1051.
- Vilani, S. M.; Cox, K. D. Heteroplasmy of the cytochrome b Gene in *Venturia inaequalis* and Its Involvement in Quantitative and Practical Resistance to Trifloxystrobin. **Disease Control and Pest Management**, 2014, v.104, n.9, p.945-953.