

NOTA CIENTÍFICA

ANÁLISES *IN SILICO* EMPREGADAS NO DESENHO DE INICIADORES ESPÉCIE-ESPECÍFICOS VISANDO UM DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE FITOPATÓGENOS

***Bruna da Silva Gomes¹, Vanessa Santana Diorato², Sara Pereira Menezes Reis²,
Karina Peres Gramacho²***

¹Programa PIBIC-CNPq na Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), Km 22 rodovia Ilhéus - Itabuna, BA, Brasil - Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Km 16 - Salobrinho, Ilhéus - BA, 45662-900.

²CEPLAC/CEPEC/Seção de Fitossanidade/ Laboratório de Fitopatologia Molecular- FITOMOL; Km 22 Rod. Ilhéus-Itabuna- Ilhéus, BA; brudsgomes@gmail.com

*Autor para correspondência: gramachokp@hotmail.com

O diagnóstico molecular tem viabilizado a detecção antecipada de fitopatógenos. Isso tem permitido o estabelecimento de medidas de mitigação e monitoramento para evitar a transmissão das pragas agrícolas, evitando perdas significativas na produção agrícola. O desafio da técnica é a obtenção de iniciadores espécie-específicos, um processo detalhado que envolve várias etapas. Nesta compilação foram reunidos em um único lugar os critérios de obtenção e análises *in silico* necessárias à obtenção de iniciadores espécie-específicos na PCR visando a detecção precisa da espécie alvo, minimizando falsos positivos e falsos negativos.

Palavras-chave: Bioinformática, detecção precoce, detecção de patógenos, fitopatógenos.

***In silico* analyses and the design of species-specific primers for plant pathogen molecular diagnosis.** The molecular diagnosis has enabled the early detection of phytopathogens. That has allowed the establishment of mitigation and risk measures, avoiding significant losses in agricultural production. The technique's challenge is obtaining species-specific primers, a detailed process involving several steps. This work gathered the criteria for obtaining and *in silico* analyses necessary to get species-specific primers in one place. Using species-specific primers in PCR allows accurate detection of the target species, minimizing false positives and negatives. Therefore, It contributes to preventing the transmission of agricultural pests.

Key words: Bioinformatic, early detection, pathogen detection, plant pathogen.

Nas Américas, as pragas agrícolas são responsáveis por cerca de 40% das perdas de produção e da baixa produtividade das lavouras (FAO, 2021). Estas perdas são na sua maioria atribuídas aos fungos fitopatogênicos. A detecção rápida e precisa destes agentes causais é importante para estabelecer as medidas de mitigação e manejo das doenças. O desenvolvimento de iniciadores espécies-específicos utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), visando a identificação do agente causal da doença, é uma realidade na fitopatologia (GARCIA, 2013). Essa abordagem é especialmente importante para o diagnóstico de doenças causadas por agentes biotróficos, como infecções virais, bacterianas, fúngicas ou parasitárias, e pragas quarentenárias, tais como a monilíase dos gêneros *Theobroma* e *Herrania* (*Moniliophthora roreri*). Essas técnicas moleculares são vitais para a identificação rápida e precisa do agente causal de doenças, e elas também desempenham um papel importante na pesquisa epidemiológica e na vigilância genômica. À medida que a tecnologia avança, essas técnicas tornam-se cada vez mais sensíveis, específicas e acessíveis, beneficiando também a medicina e a saúde pública. Parte superior do formulário

O desenvolvimento de uma metodologia por meio de detecção por PCR convencional ou PCR em tempo real, para identificar uma espécie-alvo, envolve várias etapas críticas. O primeiro passo é escolher a espécie alvo que se deseja detectar e identificar uma região genômica exclusiva que seja altamente específica para essa espécie. Isso pode ser feito por meio de pesquisa genômica e análise de sequências. O segundo passo é o desenho dos iniciadores baseando-se nas regiões selecionadas como promissoras. Para isso, é importante seguir alguns parâmetros básicos, como a Temperatura de melting (T_m) dos iniciadores, evitando estruturas secundárias indesejadas, garantindo a especificidade e uma amplificação eficiente. Uma vez obtidos os iniciadores, segue-se à etapa de otimização e validação. O objetivo deste estudo foi compilar os principais passos e parâmetros para o desenho de iniciadores espécie-específicos e apresentar ferramentas computacionais para as análises dos iniciadores desenvolvidos, as quais são fundamentais para o desenvolvimento de testes de diagnóstico molecular precisos e eficazes. Sendo assim, torna-se imprescindível que se tenha um par de *primers*

específico capaz de se ligar exclusivamente na região genômica de interesse, para se obter um produto de PCR específico à espécie alvo (KUBISTA et al., 2006). As principais ferramentas/passos computacionais que devem ser incluídas no estudo são:

1. Bancos de Dados Genômicos: Existem bancos de dados genômicos que contêm sequências de DNA de várias espécies; esses dados disponíveis devem ser utilizados no desenho de iniciadores, com o estabelecimento das sequências promissoras. Ao desenhar *primers*, deve-se compreender o conceito do alinhamento de sequências, essencial para a realização de tarefas mais complexas. O alinhamento ajuda a identificar regiões específicas que são exclusivas de uma espécie ou grupo de interesse. Isso é crucial ao desenhar *primers* espécie-específicos para diagnóstico molecular (Figura 1A).

2. Análise de Sequências: É necessário utilizar softwares para alinhamento de sequências, como por exemplo, o MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Essa análise permite identificar regiões conservadas e exclusivas no genoma da espécie alvo, e avaliar a probabilidade de amplificação cruzada (Figura 1B).

3. Software de Desenho de Iniciadores: Ferramentas de software que auxiliam no desenho de iniciadores, considerando parâmetros estabelecidos, como T_m e especificidade (Figuras 1C e 1D).

4. Modelagem de Estruturas Secundárias: Ferramentas para prever e avaliar estruturas secundárias dos iniciadores (Figura 1E).

5. Simulações de PCR: Software que permite simular as condições de PCR para verificar a eficácia dos iniciadores (Figura 1E).

6. Bancos de Dados de Sequências de Controle: Sequências de controle para testar a especificidade dos iniciadores computacionalmente (Figura 1G).

Seguindo as etapas estabelecidas na Figura 1, e utilizando as ferramentas da bioinformática apresentadas na Figura 2, é possível realizar um diagnóstico preciso da espécie-alvo. As sequências de interesse devem ser obtidas de uma fonte de dados públicos, como o GenBank do NCBI (*National Center*



Figura 1. Fluxograma visando o desenho de iniciadores espécie-específicos.

for *Biotechnology Information*), que é o mais usual e abrange genomas de diversas espécies. Essas sequências são obtidas por meio de sequenciamento e assim disponibilizadas gratuitamente. Após selecionar os genes de interesse, deve-se estabelecer um alinhamento de sequências entre indivíduos do mesmo gênero, a fim de detectar regiões genômicas similares

e distintas entre a espécie-alvo e não alvo, priorizando assim as regiões exclusivas da espécie-alvo. Existem ferramentas gratuitas geralmente utilizada nos desenhos de iniciadores, um exemplo é o Primer3Plus, em que as sequências promissoras são submetidas aos parâmetros estabelecidos, e então o software oferece alternativas de pares de *primers*.

Os parâmetros básicos e essenciais para o desenho de *primers* eficientes são o seu tamanho, que pode variar de 18 a 23 pares de bases (pb), a temperatura de anelamento dos pares de *primers*, com diferença máxima tolerada de 5°C, o conteúdo GC que deve variar entre 40% a 60%, a ausência de repetição de quatro ou mais nucleotídeos idênticos nos *primers*. É também importante de evitar a formação de estruturas secundárias, como a formação de autodímeros, heterodímeros e hairpins, tendo como referência a Energia Livre de Gibbs (Delta G) acima de -9kcal/mol (GIRARDON et al. 2016). Todos esses parâmetros são definidos no software Primer3Plus (UNTERGASSER et al. 2007).

Após a determinação dos parâmetros, os pares de *primers* são desenvolvidos e os promissores selecionados. Os pares de *primers* selecionados são então analisados no Oligo Analyzer Tool, MFEprimer3.1 e NCBI Primer-Blast (QU et al., 2009; WANG et al., 2019; YE et al., 2012). O Oligo Analyzer fornece dados dos *primers*, como o total de pb, percentual de CG, temperatura de Melting, peso moleculares e quantidade de estruturas secundárias. O MFEprimer-3.1 é um programa para checar a presença de hairpins, dímeros e potenciais amplicons gerados com a utilização dessas sequências. O Primer-Blast – NCBI Blast é uma ferramenta usada para checar a especificidade dos primers. Visando a aplicação desses iniciadores em PCR em tempo real, a análise da curva de Melting pode ser realizada com o Software <https://www.dna-utah.org/umelt/quartz/um.php> (WEBER et al., 2015). O software simula a reação de PCR e a curva melting. Essa análise é fundamental por indicar a presença de dímeros.

Seguindo a *pipeline* aqui descrita, conforme Silva et al. (2022), foram desenhados pares de *primers* altamente específicos à *Moniliophthora perniciosa*, fungo hemibiotrófico e agente causal da vassoura de bruxa do cacauero. Há também estudos em que foram desenvolvidos *primers* eficientes para detecção de

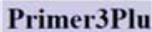
SOFTWARES PARA ANÁLISES <i>IN SILICO</i>			
	NCBI	Banco de dados que fornece sequências de diversas espécies.	NCBI. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ >.
	OLIGOANALIZER	Percentual de CG, temperatura de Melt, peso moleculares e quantidade de estruturas secundárias.	OligoAnalyzer Tool - primer analysis IDT. Disponível em: < https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer/ >.
	PRIMER3PLUS	Desenhos de Primers baseados em parâmetros estabelecidos.	Primer3Plus - Pick Primers. Disponível em: < https://www.primer3plus.com/ >.
	UMELT	Predizer curva de Melting para PCR em tempo real.	uMelt Quartz - DNA-UTAH.ORG - ALL RIGHTS RESERVED 2022. Disponível em: < https://www.dna-utah.org/umelt/quartz/um.php >.
	MFEPRIMER3.1	Indica a presença de hairpins, dímeros e potenciais amplicons gerados.	MFEprimer-3.1: PCR Primer Quality Control - Specificity, Hairpins & Dimers. Disponível em: < https://mfeprimer3.igenetech.com/spec >.
	MEGA	Alinhamento de sequências para detectar regiões exclusivas e conservadas.	Home. Disponível em: < https://www.megasoftware.net/ >.

Figura 2. Lista de Softwares utilizados para o desenho e análises *in silico* de iniciadores espécie-específicos.

subpopulações de *Fusarium oxysporum* (JIMÉNEZ-FERNÁNDES et al., 2010), patógeno que causa a obstrução do sistema vascular do hospedeiro (MICHÉREFF et al., 2005).

Após a validação *in silico*, é necessária a validação experimental, a qual implica em testar os iniciadores em condições laboratoriais, determinando sua eficácia e especificidade. Nesta etapa de validação, é importante testar os iniciadores em diversas condições:

Teste em amostras puras: Os iniciadores devem ser testados em amostras puras de DNA do fitopatógeno alvo para garantir que a amplificação ocorra com sucesso.

Teste em amostras de campo: Os iniciadores também devem ser testados em amostras do campo que contenham o fitopatógeno de interesse, a fim de simular condições reais de detecção.

Obter um bom controle positivo e negativo:

É essencial incluir controles positivos (amostras contendo o fitopatógeno) e negativos (amostras livres do fitopatógeno) em cada reação de PCR a fim de verificar a especificidade e sensibilidade dos iniciadores.

Verificar a amplificação cruzada:

Testar os iniciadores em amostras que contenham outros organismos que possam estar presentes nas plantas ou no ambiente, a fim de garantir que não haja amplificação cruzada com espécies não alvo. Isso é particularmente importante quando se trata de fitopatógenos em culturas onde a transferência horizontal de genes entre diferentes patógenos é uma possibilidade (RANGEL, 2017). No caso dos fungos do cacauero, sabe-se que há transferência horizontal de genes entre *Moniliophthora perniciosa*

(causador da vassoura-de-bruxa) e *Moniliophthora roreri* (causador da monilíase), ou até mesmo fitopatógenos não relacionados como *Phytophthora* spp. (causador da podridão parda). Portanto, ao desenvolver iniciadores para detectar esses patógenos, é essencial garantir que os iniciadores sejam específicos para as cepas-alvo. Também deve-se considerar amostras de campo que possam conter outros fungos, microrganismos e material genético relacionado. Isso ajudará a verificar se os iniciadores produzem ampliações específicas para o patógeno de interesse e não para outras espécies não alvo ou cepas geneticamente distintas.

Apresentar Sensibilidade: Determina a menor quantidade de DNA do fitopatógeno que pode ser detectada usando os iniciadores. Isso ajuda a avaliar a sensibilidade do ensaio.

Repetibilidade: Deve-se repetir o teste várias vezes para verificar a consistência dos resultados e a reprodutibilidade do método.

Realizar a comparação com outros métodos: Compara os resultados da PCR com outros métodos de diagnóstico, se disponíveis, para verificar a concordância entre as técnicas.

Essas etapas contribuem para a precisão e confiabilidade dos testes de diagnóstico molecular, de forma a se obter um diagnóstico precoce e específico para o microrganismo de interesse. Dessa forma, é possível estabelecer medidas para manejo adequado do fitopatógeno, evitando sua disseminação, assegurando a qualidade da produção agrícola e podendo assim se estabelecer medidas de controle sustentáveis.

Literatura Citada

- BAILEY, B. A.; EVANS, H. C.; PHILLIPS-MORA, W.; ALI, S. S.; MEINHARDT, L. W. 2018. *Moniliophthora roreri*, causal agent of cacao frosty pod rot. *Molecular Plant Pathology* 19(7): 1580-1594.
- Da SILVA, N. J. A.; REIS, S. P. M.; DIORATO, V. S.; ROCHA, J. S. A.; BARBOSA, C. S.; CIAMPI-GUILLARDI, M.; GRAMACHO, K. P. 2022. A molecular diagnostic for *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao, that differentiates it from its sister taxon *Moniliophthora roreri*. *Crop Protection* 158: 106003.
- FONSECA Jr, A. A.; GOUVEA, M. V.; ZARONI, M. M. H.; CARVALHO, L. B.; XAVIER, S. M. 2015. Manual de Verificação de Desempenho de Métodos para Diagnóstico Molecular de Doenças Infecciosas na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários. MAPA/ACS, Brasília. 57p.
- GARCIA, J. C. 2013. Diagnóstico fitossanitário por PCR em tempo-real: requisitos básicos para validação de métodos. 116p.
- GIRARDON, L. F.; DOS SANTOS, F. F.; CHAVES, A. L.; OLIVEIRA, A. C. 2016. Importância do Desenho de Primers. 18º Encontro de Pós-Graduação. 4p.
- JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, D.; MONTES-BORREGO, M.; NAVAS-CORTÉS, J. A.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M.; LANDA, B. B. 2010. Identification and quantification of *Fusarium oxysporum* in planta and soil by means of an improved specific and quantitative PCR assay. *Applied Soil Ecology* 46(3): 372-382.
- MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E.; MENEZES, M. 2005. Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. UFRPE, Imprensa Universitária. 400p.
- NIKMATUZAROH, R.; DAN, E.; MAZIYYAH, N. 2019. Manual de procedimentos: Plano Nacional de Prevenção e Vigilância de *Moniliophthora roreri* PNPV/Monilíase. Skripsi. 35p.
- QUEIROZ, J. A. D. S.; ALVES, L. S.; DALL'ACQUA, D. S. V.; SOUZA, L. F. B. 2017. Desenho e Validação de Primers *In Silico* para Detecção do Vírus Sincicial Respiratório Humano.
- RANGEL, L. T. L. D. 2017. O papel de transferência horizontal de genes na história evolutiva de duas classes de genes em bactérias. Tese doutorado. São Paulo, USP. 108p.
- SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS,

- K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. 1985. Enzymatic amplification of α -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732):1350-1354.
- UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J. A. 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research* 35(suppl_2): W71-W74.

