

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**DETECÇÃO DE *Magnaporthe oryzae* EM SEMENTES DE ARROZ  
POR MEIO DA TÉCNICA LAMP (amplificação isotérmica de ácidos  
nucleicos)**

**NARA CRISTINA TEIXEIRA**

GOIÂNIA, GO - BRASIL

2016

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR  
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES  
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico:     Dissertação     Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

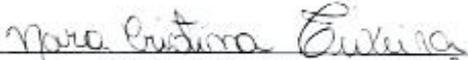
Nome completo do autor: Nara Cristina Teixeira

Título do trabalho: DETECÇÃO DE *Magnaporthe oryzae* EM SEMENTES DE ARROZ POR MEIO DA TÉCNICA LAMP (amplificação isotérmica de ácidos nucleicos).

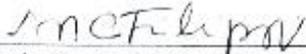
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 27 / 10 / 17

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

<sup>2</sup> A assinatura deve ser escaneada

**NARA CRISTINA TEIXEIRA**

**DETECÇÃO DE *Magnaporthe oryzae* EM SEMENTES DE ARROZ  
POR MEIO DA TÉCNICA LAMP (amplificação isotérmica de ácidos  
nucleicos)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Agronomia.  
Área de concentração: Fitossanidade

Orientador:

**Prof<sup>a</sup> Dra. Marta Cristina Corsi de Fillipi**

Co-orientadora:

**Dra<sup>a</sup>. Adriane Wendland**

Goiânia, GO - Brasil

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

TEIXEIRA, NARA CRISTINA

DETECÇÃO DE *Magnaporthe oryzae* EM SEMENTES DE ARROZ POR MEIO DA TÉCNICA LAMP (amplificação isotérmica de ácidos nucleicos). [manuscrito] / NARA CRISTINA TEIXEIRA. - 2016.

80 f.: il.

Orientador: Prof. MARTA CRISTINA CORSI DE FILIPPI; co orientador ADRIANE WENDLAND.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia (EA), Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Goiânia, 2016.

Bibliografia.

Inclui fotografias, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. *Oryza sativa*. 2. Sementes. 3. Brusone. 4. Diagnóstico molecular.  
I. FILIPPI, MARTA CRISTINA CORSI DE, orient. II. Título.

CDU 631.4



## ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos dezesseis dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e dezesseis (16.02.2016), às 14h00min, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Dr<sup>a</sup>. Adriane Wendland – Co-orientadora/Presidente, Prof. Dr. Marcos Gomes da Cunha e Dr<sup>a</sup>. Regina Melo Sartori Coelho, para, em sessão privada (dados confidenciais da dissertação) realizada no auditório do PPGA da Escola de Agronomia da UFG, procederem à avaliação da defesa de Dissertação intitulada: **“Desenvolvimento de Kits rápidos via Lamp para detecção de *Magnaporthe oryzae* em sementes de arroz”**, de autoria de **Nara Cristina Teixeira**, discente do curso de **Mestrado**, na área de Concentração em **Fitossanidade**, do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela presidente, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e deu início às atividades relativas à defesa da Dissertação. Passou a palavra à mestranda que em quarenta minutos apresentou o seu trabalho. Após a apresentação a candidata foi arguida sucessivamente pelos membros da banca. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. O título da dissertação foi alterado para: **“Detecção de *Magnaporthe oryzae* em sementes de arroz por meio de técnica LAMP (amplificação isotérmica de ácidos nucleicos)”**. De acordo com a Resolução nº 1051, de 09.09.2011 do CEPEC - Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura, que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Agronomia, a Banca Examinadora considerou **APROVADA** a Dissertação, desde que procedidas às correções recomendadas, estando integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de **MESTRE** em Agronomia, na área de concentração em **FITOSSANIDADE**, pela Universidade Federal de Goiás. A mestranda deverá efetuar as modificações sugeridas pela Banca Examinadora e encaminhar a versão definitiva da dissertação à Secretaria do PPGA, no prazo máximo de trinta dias após a data da Defesa. A conclusão do Curso e a emissão do Diploma dar-se-ão após o cumprimento do Artigo 69, § 1º e § 2º, da Resolução CEPEC nº 1051, de 09.09.2011. A Banca Examinadora recomendou a publicação de artigo(s) científico(s), oriundo(s) dessa dissertação, em periódicos de circulação nacional e, ou, internacional, depois de efetuadas as modificações sugeridas. No caso da discente titulada não providenciar a publicação de seu trabalho final em forma de artigo(s) científico(s) no prazo de seis meses, após a data da defesa, serão aplicados os dispositivos do Artigo 70, § 1º e § 2º, da mesma Resolução. Para finalizar, o Presidente agradeceu os membros examinadores, congratulou-se com a mestranda e encerrou a sessão às 17h15min. E para constar, eu Welinton Barbosa Mota, secretário do PPGA, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora, em quatro vias de igual teor.

  
Dr<sup>a</sup>. Adriane Wendland  
Presidente – Embrapa Arroz e Feijão

  
Prof. Dr. Marcos Gomes da Cunha  
Membro – EA/UFG

  
Dr<sup>a</sup>. Regina Melo Sartori Coelho  
Membro – MAPA

**“Suba o primeiro degrau com fé.**

**Não é necessário que você veja toda a escada,**

**apenas dê o primeiro passo.”**

(Martin Luther King)

A minha mãe Cátia Teixeira, pelo amor imensurável e pela esperança transmitida.

A meu pai Jasi Teixeira, que com sua simplicidade me ensinou a ter equilíbrio.

## **DEDICO**

A minha co-orientadora Adriane Wendland, que apostou em mim, e ensinou muito além do profissional, me fez compreender o que é essencial.

## **OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

Ao ser supremo que me concedeu o dom da vida, pelo amor dedicado, pela proteção, pelas alegrias e conquistas, pela graça da evolução, por dar sentido a cada dia que começa, pela oportunidade de crescer e viver cada dia mais entusiasmada por sua beleza.

À todos os membros da Universidade Federal de Goiás e do Programa de Pós-Graduação em Agronomia pelas contribuições diversas.

À Embrapa Arroz e Feijão e Laboratório de Fitopatologia, pelo apoio e oportunidade concedidos para o desenvolvimento profissional durante a condução do projeto.

Ao órgão concesso da bolsa de mestrado CAPES.

À todos que me incentivaram e contribuíram direta e indiretamente durante este processo, principalmente as minhas amigas Bruna Crispim e Waine Carvalho, e a família Fernandes.

À minha orientadora Marta Cristina, pelo exemplo dado, pelos ensinamentos, pela paciência, por aceitar participar do meu processo de aprendizado e crescimento, e pela excelente referência profissional repassada.

A equipe do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Arroz e Feijão: Ronair, Elder, Alécio, Anaíres e Mônica. Em especial ao Marcio pela paciência em ensinar cálculos de química, e em especial também a Lívia pela contribuição no progresso dos trabalhos, pelas emoções compartilhadas diariamente, pelas expectativas e pelas esperanças que se renovam sempre no dia seguinte.

De uma forma especial a Maythsulene, sinceramente você me ensinou bastante, mesmo as vezes eu não merecendo sua generosidade imensa se distorcia e saía sem querer, e de repente você não só tinha me ensinado algo como também já estava lá junto comigo conferindo se eu estava mesmo fazendo certo, você me ensinou também que a vida é muito bonita para se resumir em apenas um momento, você é muito guerreira e nunca desiste, um exemplo para mim, a você devo muito!

Aos companheiros de laboratório que compartilharam momentos de lutas: Fábio Gonçalves, Stella Cristina, Lidiane Lemes, Bárbara Estevan, Lorena, Alaerson, Fernanda Yoshida, Fernanda Rosa, Alan Carlos, Priscila Ferreira, Jordene Aguiar, Bruna Alícia, Eugenio, e Leilane.

Ao Thiago Martins, que esteve comigo em momentos que faltaram forças, sempre me incentivando e mostrando que esta só era uma etapa, que passaria logo, que algo maior me esperava adiante. Sou imensamente grata pelo companheirismo, pela preocupação e apoio, por tudo que fez para que eu mantivesse a concentração e o foco, você merece compartilhar comigo este momento de glória.

A todos minha afetuosa gratidão, esta satisfatória experiência também é de vocês!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	8
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	13
<b>RESUMO</b> .....	14
<b>ABSTRACT</b> .....	15
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
2.1 <i>ARROZ (Oryza sativa)</i> .....	19
2.2 <i>BRUSONE (Magnaporthe oryzae)</i> .....	20
2.3 <b>MÉTODOS DE DETECÇÃO</b> .....	23
2.3.1 <b>Detecção molecular por meio da técnica PCR</b> .....	24
2.3.2 <b>Detecção molecular por meio da técnica LAMP</b> .....	28
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
3.1 <b>DETECÇÃO DE FUNGOS EM SEMENTES</b> .....	33
3.2 <b>OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA</b> .....	34
3.3 <b>PROJEÇÃO DE INICIADORES LAMP</b> .....	37
3.3.1 <b>Compatibilidade os iniciadores externos F3 e B3</b> .....	38
3.3.2 <b>Amplificação isotérmica por meio da metodologia LAMP</b> .....	39
3.3.3 <b>Estabelecimento do tempo e temperatura adequada para o conjunto de iniciadores Py3</b> .....	40
3.3.4 <b>Adição de corantes para análise direta dos produtos gerados por LAMP</b> .....	40
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	42

4.1	AMOSTRAGEM DOS PATÓGENOS IDENTIFICADOS EM SEMENTES DE ARROZ APÓS INCUBAÇÃO EM “ <i>Blotter test</i> ” .....	42
4.2	ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DOS PATÓGENOS.....	44
4.3	IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DAS ESPÉCIES .....	45
4.4	SELEÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA EM SEMENTES ....	46
4.5	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE DETECÇÃO POR LAMP.....	50
4.5.1	<b>Seleção da região do genoma e desenho dos iniciadores.....</b>	50
4.5.2	<b>Compatibilidade dos iniciadores externos para reconhecimento de <i>M. oryzae</i>.....</b>	52
4.5.3	<b>Especificidade dos iniciadores externos .....</b>	52
4.5.4	<b>Teste de seleção entre os conjuntos de iniciadores completos.....</b>	54
4.5.5	<b>Especificidade dos iniciadores pré-selecionados.....</b>	55
4.5.6	<b>Padronização da temperatura de amplificação para o iniciador Py3.....</b>	58
4.5.7	<b>Aprimoramento do tempo necessário para amplificação .....</b>	61
4.5.8	<b>Diagnose molecular observada por colorimetria .....</b>	62
5	<b>CONCLUSÃO.....</b>	67
6	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	69

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Ciclo da doença Brusone em arroz. Processo de infecção do agente causal <i>M. oryzae</i> (Ramos, 2009) .....	21
<b>Figura 2</b>	(A) Lesões elípticas de coloração marrom e centro acinzentado, que evoluem, aumentando em tamanho, tornando-se elípticas; (B) A infecção no primeiro nó, abaixo da panícula; (C) Sintoma denominado quebra de pescoço (Fotos: Cley Donizeti Martins Nunes) .....	22
<b>Figura 3</b>	Ciclos exponenciais de amplificação via PCR.....	25
<b>Figura 4</b>	Esquematização de um ciclo da técnica da PCR (Pelt-Verkuil et al., 2008).....	26
<b>Figura 5</b>	Visualização do produto da PCR em gel de agarose exposto a luz ultravioleta, (Science Photo Library). À direita gel de eletroforese fotodocumentado.....	27
<b>Figura 6</b>	Reagentes que compõem a reação LAMP.....	30
<b>Figura 7</b>	(a) Explicação do processo de amplificação LAMP – Fase não cíclica. Seis regiões (F3c, F2c, F1c, B1c, B2c e B3c) são reconhecidas pelos iniciadores internos (FIP e BIP) externos (F3 e B3). (b) início do processo de amplificação isotérmica por meio da enzima Bst DNA Polymerase para formação do primeiro loop (Fonte:EikenChemicalCo.Ltda).....	31
<b>Figura 8</b>	Processo de amplificação LAMP – Fase cíclica. (8) início da fase cíclica a partir da estrutura em formato de haltere, (9) Síntese iniciada a partir de um dos loops no sentido 3' com adesão dos	

iniciadores internos. (10) Formação da estrutura que inicia o ciclo de alongação, a ligação dos iniciadores a partir de então se dará de forma alternada originando estruturas de formatos e tamanhos variados com base na sequência alvejada (11) Estrutura formada a partir de vários ciclos. (Fonte: Eiken Chemical Co. Ltd.)..... 31

- Figura 9** Comparação entre metodologias de extração rápida de DNA. (A) Metodologia NaOH, extração direta do patógeno crescido em placa por meio da raspagem do micélio, e extração do DNA do patógeno presente na superfície da semente. (B) Cartão Whatman FTA, inserção direta do patógeno na superfície do cartão, e inserção do líquido com o patógeno extraído por meio da maceração da superfície da semente. (C) Dellaporta extraído direto da raspagem do micélio crescido em placa, método comparativo adaptado..... 34
- Figura 10** Sequência Mif23 disponibilizada pelo Genbank, utilizada para projeção dos iniciadores LAMP para detecção de *M. oryzae* em sementes de arroz..... 38
- Figura 11** Método de detecção “*Blotter test*”. (A) Caixa gerbox contendo amostra de sementes de arroz em papel filtro umedecido com água estéril; (B) qualidade das sementes, entre elas sementes deterioradas e sementes aparentemente livres de sinais de contaminação ..... 42
- Figura 12** Estrutura dos principais patógenos fúngicos em sementes de arroz vistos sob aumento de 90x em aparelho estereoscópio. (A) *M. oryzae*; (B) *B. oryzae*; (C) *R. oryzae*; (D) *Curvularia spp.*; (E) *M. albescens* e (F) *P. sorghina* ..... 43
- Figura 13** Meio de cultura com os principais patógenos encontrados no lote de sementes. (A) *M. oryzae*; (B) *B. oryzae*; (C) *R. oryzae*; (D) *Curvularia spp.*; (E) *M. albescens* e (F) *P. sorghina*..... 44
- Figura 14** Identificação em microscópio das estruturas dos patógenos crescidos isoladamente. (A) *M. oryzae*; (B) *B. oryzae*; (C) *R. oryzae*; (D) 45

*Curvularia spp.*; (E) *M. albescens* e (F) *P. sorghina* .....

- Figura 15** Eletroforese em gel de agarose 2% comparando as metodologias NaOH, Cartão Watmam FTA e Dellaporta (controle). (L) Marcador molecular 1kb, T1, T2, T3, T4 e T5 tratamento conduzidos pelo método NaOH e T6, T7 Cartão Watmam FTA, T8 DNA modelo extraído por Dellaporta..... 48
- Figura 16** Iniciadores projetados a partir do gene Mif23 por meio do software Primer Explorer V4 para identificação de *M. oryzae* pela técnica LAMP. Os Conjuntos estão representados por Py1, Py2, Py3, Py4, Py5 e Py6, e são compostos por iniciadores externos (F3/B3 e FIP/BIP)..... 51
- Figura 17** Amplificação específica de DNA de *M. oryzae* pelos iniciadores externos (F3 e B3) de cada um dos conjuntos projetados. (L) Marcador molecular 1kb; Py1, Py2, Py3, Py4, Py5 e Py6 conjuntos de iniciadores externos..... 52
- Figura 18** Teste de especificidade com todos os conjuntos projetados (Py1, Py2, Py3, Py4, Py5, Py6) usando apenas os iniciadores externos F3/B3. Cada iniciador foi testado com (Mo) *M. oryzae* (DNA alvo); e comparado a DNAs de origem diversas (Pyt) *M. oryzae* de trigo; (So) *S. oryzae*; (Tr) *Trichoderma spp.* e (F) *Fusarium sp.*..... 53
- Figura 19** Teste comparativo entre o padrão de bandas formado (escada) com todos os conjuntos de iniciadores completo (FIP/BIP e F3/B3) projetados para a detecção de *M. oryzae* (Py1, Py2, Py3, Py4, Py5, Py6), (L) marcador molecular 1 Kb ..... 55
- Figura 20** Surgimento de falso-positivo em seleção do conjunto de iniciadores com base na detecção específica por LAMP ..... 56
- Figura 21** Reação LAMP sem DNA para verificar a causa do surgimento de ..... 58

falso-positivo. Reagentes e conjunto de iniciadores Py3 e Py6 (mesmos usados no teste anterior), temperatura reduzida, vidrarias e condições de esterilização (L) Marcador molecular 1Kb.....

- Figura 22** Localização do conjunto de iniciadores Py3 no gene *Mif23*. Iniciador F3 representado em amarelo, iniciador B3 correspondendo a região 5' invertida, FIP seguido de quatro Timinas para formação dos loops (localizados no gene em regiões separadas), BIP unido por quatro Timinas. As regiões F1c e B2 invertidas no gene (5') e representadas pela região correspondente, para facilitar o entendimento as regiões foram apresentadas em cores diferentes no quadro acima representando a localização no gene..... 59
- Figura 23** Otimização da temperatura ideal de amplificação para o conjunto Py3 (F3/B3 e Fip/BIP) testados nas temperaturas (55°C, 57°C, 59°C, 61°C). (B) Branco (amostra sem DNA); (Pyt) Dna de *M. oryzae* de trigo; (Mo) *M. oryzae* DNA alvo, (L) Marcador molecular ..... 60
- Figura 24** Otimização do tempo mínimo necessário para a amplificação do Kit LAMP. Testados sob um período de 30', 45' e 60'. (B) Branco/ amostra sem DNA; (Pyt) Dna de *M. oryzae* de trigo; (Mo) *M. oryzae* DNA alvo (L) Marcador molecular 1Kb ..... 62
- Figura 25** Interpretação direta dos produtos LAMP em amostras de *M. oryzae*. (A) Turbidez gerada por meio da formação de pirofosfato de magnésio, sem adição de corantes ou cloreto de cálcio. (B) Hydroxynaphthol blue (HNB), (C) Phenol red, (D) Bromothymol blue (BTB). Sinal positivo representa amostras de *M. oryzae* de arroz, enquanto sinal negativo representa amostras de *M. oryzae* de trigo ..... 64
- Figura 26** Indicador universal de pH. pH<sub>i</sub> caracteriza o pH inicial da reação em torno de 8.8, pH<sub>f</sub> após o processo de amplificação com redução variando em torno de 7.4. As reações foram analisadas em aparelho 65

pHMETRO para exatidão dos valores citados. A observação por meio do indicador universal ilustra da variação gerada.....

**Figura 27**

(L) Marcador molecular 1 Kb; (-) Controle negativo; (+) Amostras com o DNA alvo. Produtos da LAMP vistos por meio da eletroforese em gel de agarose. Visualização direta dos produtos LAMP em microtubos transparentes, por comparação dos corantes BTB (Azul de Bromotimol) e HNB (Hydroxynaphthol blue )..... 66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Adequação do método de extração de DNA de acordo com as condições naturais representadas artificialmente pelos tratamentos...	36
<b>Tabela 2</b>	Especificidade dos iniciadores projetados para detecção de <i>M. oryzae</i> .....	39
<b>Tabela 3</b>	Resultados da extração de DNA de <i>M. oryzae</i> em sementes realizada por diferentes tratamentos e metodologias .....	47

## RESUMO

TEIXEIRA, N. C. **DETECÇÃO DE *Magnaporthe oryzae* EM SEMENTES DE ARROZ POR MEIO DA TÉCNICA LAMP (amplificação isotérmica de ácidos nucleicos)**. 2016. 76 f. Dissertação (Mestrado em: Agronomia) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.<sup>1,2</sup>

Considerada a doença mais destrutiva do arroz (*Oryza sativa*), a Brusone, causada pelo fungo *Magnaporthe. oryzae* é motivo de preocupação no mundo todo. Devido a capacidade de permanência do patógeno no solo e em restos culturais por longos e indeterminados períodos é essencial o monitoramento perante a entrada do patógeno em novas áreas, em razão do comprometimento dos próximos plantios. As sementes são consideradas as principais formas de disseminação da doença devido à capacidade de armazenamento, transporte e introdução em áreas indenes. A metodologia atualmente recomendada pelo Ministério da Agricultura para monitoramento de fungos em sementes é o “*Blotter test*”, entretanto, a caracterização morfológica pode muitas vezes ser incerta devido à invasão de fungos de crescimento rápido e a semelhança entre estruturas de alguns patógenos. Morfologicamente *M. oryzae* pode ser indistinguível de algumas espécies, como é o caso do agente causal da brusone de diversas gramíneas, portanto, a maneira mais adequada para diagnose segura é a detecção molecular. Em sementes, a porcentagem de infestação muitas vezes é baixa, o que não deixa de ser importante devido a capacidade de transmissibilidade da semente para a plântula, no entanto as pequenas concentrações de conídios podem ser insuficientes para a detecção molecular, por meio de técnicas potencialmente utilizadas como a PCR (Reação Polimerase em Cadeia). Tecnicamente mais simples, recentemente foi desenvolvida uma metodologia de amplificação molecular isotérmica LAMP (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*), que permite identificar de forma segura o alvo, em decorrência da projeção de iniciadores específicos, baseados em regiões exclusivas do genoma do organismo. A técnica apresenta vantagens como, alta sensibilidade devido ao reconhecimento pelos iniciadores de seis regiões do alvo, além da especificidade, agilidade e segurança no diagnóstico. É importante considerar a redução de custos em comparação com a PCR, devido ao uso de temperaturas constantes, e interpretação direta dos resultados por meio da turbidez gerada em amostras positivas, ou mudança de coloração no caso da adição de corantes, dispensando o uso de aparelhos, profissionais especializados e manuseio em laboratórios de alto padrão. A interpretação dos resultados a olhos nus facilita o controle de sementes em ambientes como laboratórios, armazéns, cooperativas com estrutura mínima, refletindo positivamente sobre o direcionamento adequado de lotes, seja para o plantio, consumo ou descarte. Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar o levantamento dos principais fungos patogênicos potencialmente destrutivos encontrados em sementes, e desenvolver um kit de detecção rápida por meio da metodologia LAMP para *M. oryzae*.

Palavras-chave: *Oryza sativa*, sementes, Brusone, diagnóstico molecular.

---

<sup>1</sup>Orientadora: Dra. Marta Cristina Corsi de Fillipi

<sup>2</sup>Co-orientadora: Dra. Adriane Wendland

## ABSTRACT

TEIXEIRA, N. C. **DETECTION OF *Magnaporthe oryzae* IN RICE SEEDS BY LAMP TECHNIQUE (nucleic acid amplification isothermal)**. 2016. 76 f. Dissertation (Masters in: Agronomy) - Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.<sup>1,2</sup>

Considered the most destructive disease of rice (*Oryza sativa*), the blast caused by the fungus *M. oryzae* is of concern worldwide. Because the pathogen staying power in the soil and crop residues for long and indeterminate periods is essential monitoring before the pathogen's entry into new areas, due to the commitment of nearby plantations. The seeds are considered the main ways of spread of disease due to storage, transportation and introduction into harmless areas. The methodology currently recommended by the Ministry of Agriculture for fungi monitoring seed is the "*Blotter test*", however, the morphological characterization can often be uncertain due to the rapid growth of fungal invasion and the similarity between structures of some pathogens. Morphologically *M. oryzae* can be indistinguishable from some species, such as the causal agent of rice blast wheat and other grasses therefore the most adequate way for safe diagnosis is the molecular detection. In seeds percentage infestation is often low, which is nevertheless important because the seed of transmission capacity for the seedling, however small conidia concentrations may be insufficient for the molecular detection by techniques potentially used as PCR (Polymerase Chain Reaction). Technically a methodology for molecular amplification isothermal LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) simpler recently been developed, which allows to safely identify the target, due to the projection of specific primers based on exclusive regions of the genome of the organism. The technique has advantages as high sensitivity due to the recognition by the initiators of six regions of the target, in addition to specificity, speed and security in the diagnosis. It is important to consider the cost reduction compared with PCR, due to use of constant temperature and straightforward interpretation of results using turbidity generated in positive samples or color change if the addition of dyes, eliminating the use of devices, specialized professionals in handling high standard laboratories. The interpretation the results with the naked eye makes the seed control in environments such as laboratories, warehouses, cooperatives with minimal structure, reflecting positively on the proper targeting of lots, either for planting, consumption or disposal. Therefore, the aim of this study was to survey the main potentially destructive pathogenic fungi found in seeds, and develop a rapid detection kit by LAMP methodology for *M. oryzae*.

*Key words:* *Oryza sativa*, seeds, rice blast, molecular diagnosis.

---

<sup>1</sup>Advisor: Dra. Marta Cristina Corsi de Fillipi

<sup>2</sup>Co-Advisor: Dra. Adriane Wendland

## 1 INTRODUÇÃO

O arroz é um dos principais cereais destinados a alimentação humana, de acordo com a Conab (2014), o grão é classificado mundialmente como o segundo mais importante alimento, ficando atrás apenas do trigo que é base da alimentação na Ásia. O consumo de arroz em 2014/2015 foi previsto em 2.143,3 milhões de toneladas de acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). A demanda pelo grão aumenta gradualmente, estudos revelam que até o ano de 2030 a produção deve ser elevada em mais de 40% para atender o consumo (Maclean et al., 2002), apontando uma crescente pressão sobre a produtividade do grão, que em contrapartida, é desbalanceada pela pressão declinante nos rendimentos das lavouras, provenientes dos fatores bióticos e abióticos, desafiando os cientistas ao desenvolvimento de novas tecnologias.

As doenças são classificadas como a principal causa de perdas na produtividade da cultura. Entre as doenças que afetam a cultura, as de maior impacto econômico são brusone (*Magnaporthe oryzae*), mancha parda (*Bipolaris oryzae*), mancha-de-grãos (complexo de patógenos) em ordem decrescente de importância. Segundo Pereira, et al. (2002) alguns dos principais patógenos fúngicos encontrados em semente de arroz proveniente do cultivo de terras altas são *M. oryzae*, *B. oryzae*, *Curvularia spp.*, *Monographella albescens* e *Phoma sorghina*, podendo ser transmitidos para a plântula ou mesmo para a área, depositado em restos culturais.

A brusone, agente causal *M. oryzae* anamórfico *Pyricularia oryzae*, por Cavara em 1891, é classificada como a doença de maior impacto negativo sobre o arroz, assim sendo também em outros hospedeiros como mais de 50 espécies de gramíneas como o trigo, aveia, cevada, centeio e gramíneas (Prabhu et al, 2006). Dean et al. (2005) considera esta a doença fúngica mais destrutiva em lavouras de arroz ao redor do mundo, e de acordo com Zeigler, et al. (1994) pode provocar perdas anuais estimativamente comparadas ao abastecimento de 60 milhões de pessoas

Segundo Dean et al. (2012) *M. oryzae* foi considerado o primeiro entre os 10 mais agressivos fungos patogênicos, ordenado com base na importância científica e

econômica. Outra característica importante do patógeno é a capacidade de sobrevivência, sendo observada sua presença em lotes de arroz armazenados por mais de 10 anos em bancos de germoplasma, podendo ser superior ao tempo de vigor da semente (Faiad et al., 1996). Em experimentos conduzidos por Long et al. (2001) por dois anos consecutivos, foi observado que sementes infestadas com *M. oryzae*, e incapacitadas de germinar, quando colocadas em campo no momento de emergência das plântulas, induziram ao surgimento de sintomas após 35 dias.

As sementes são consideradas uma das mais potentes formas de disseminação de doenças devido a capacidade de sobrevivência, transporte e introdução de patógenos em novas áreas. Além da capacidade de introdução de doenças em áreas indenes, foi comprovada a redução do percentual germinativo em sementes contaminadas por fungos, provocando danos de maneira direta e indireta (Chamberlain & Gray, 1974). Manandhar et al. (1998) observaram que, o surgimento de sintomas em panículas foi originado de sementes naturalmente infestadas, os autores constataram também a redução de 4% na emergência de mudas provenientes de lotes com 21% de contaminação com *M. oryzae*. Faire-Rampant et al. (2013) afirmam que panículas com 25% contaminação podem originar sementes doentes capazes de comprometer em cerca de 10% das plântulas provenientes deste lote.

De acordo com a quantidade de danos causados por sementes contaminadas, é indispensável um método para controle fitossanitário de lotes direcionados ao plantio. Atualmente o método adotado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento para análise fúngica é o “Blotter test”, descrito no Manual de Análise Sanitária de Sementes, essa metodologia consiste na incubação seguida da inspeção morfológica dos fungos presentes nas sementes. Esta metodologia permite acompanhar o crescimento fúngico de forma natural (Henning, 2005) e é facilmente executada, no entanto, fungos de desenvolvimento rápido podem encobrir outros de crescimento lento, dificultando a análise morfológica das estruturas, como é o caso do agente causal do míldio *Peronospora manshurica* na soja.

A análise morfológica apresenta-se como barreira devido aos supostos erros de interpretação, além dos organismos invasores que podem dificultar a análise. E ainda existem, também, especializações dentro de uma mesma espécie, as quais podem ser morfológicamente indistinguíveis, como *M. oryzae* do trigo e *M. oryzae* do arroz (Bedendo, 1997). Um outro exemplo são as diferenças entre *Drehslera spp.* e *B. oryzae*

(Farias et al., 2011), nas quais a distinção só é possível por meio de análises moleculares. Portanto, nestes casos a análise estrutural não é válida para separar organismos e consequentemente diagnosticar com exatidão as doenças por estes causadas, mesmo com o auxílio de aparelhos de aumento e de profissionais especializados (Atkins & Clark, 2004).

A tecnologia de amplificação molecular PCR (Reação Polimerase em Cadeia) desenvolvida por Kary Mullis na década de 80, tem sido amplamente utilizada no processo de diagnose de doenças, entretanto, em sementes há poucos relatos de detecção molecular via PCR. A técnica apresenta resultados altamente satisfatórios no processo de identificação de diversos patógenos, no entanto, quando se fala em detecção direta na semente dependendo do nível de infestação, a eficácia do método pode ser contestada (Chadha & Golpalakrishna, 2006). Outro fator limitante para o uso da PCR na detecção de infestantes em sementes, são os altos custos gerados na aquisição de equipamentos e mão-de-obra especializada, sendo indispensável uma estrutura laboratorial de alta tecnologia, o que restringe sua aplicação em laboratórios com poucos recursos.

Recentemente, foi desenvolvida por Notomi et al. (2000), uma técnica que atende aos quesitos sensibilidade, especificidade, praticidade e redução de custos. A LAMP (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*) é, sobretudo um processo de amplificação molecular isotérmica, que permite a detecção de DNA em amostras reduzidas, dentro de 15 a 90 minutos, com a possibilidade da inspeção direta dos resultados por meio da observação da turbidez gerada em amostras positivas, potencializada por meio da adição de corantes que facilitam a interpretação por meio da discrepância de cores.

Em razão da quantidade de danos causados por sementes contaminadas é desejável um diagnóstico confiável de lotes de sementes destinados ao plantio. Diante disso, este estudo teve como objetivo desenvolver um kit rápido para detecção molecular de *M. oryzae* em sementes de arroz. Pela primeira vez uma tecnologia de fácil interpretação será disponibilizada para profissionais de diversos níveis de experiência, com a possibilidade de execução em laboratórios de baixa tecnologia ou armazéns. A disposição do kit para detecção em sementes simplificará diagnósticos, por meio da leitura direta a olho nu, facilitando a decisão sobre o destino apropriado para o lote de sementes, seja sua semeadura, descarte ou consumo, facilitando o reconhecimento do organismo, reduzindo a aplicação de químicos para seu controle, evitando quedas de produtividade e a contaminação de áreas livres do patógeno.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ARROZ (*Oryza sativa*)

Mundialmente considerado o segundo alimento de maior importância na alimentação humana, o arroz (*Oryza sativa*) é assim classificado devido ao suprimento nutricional fornecido, oferecendo cerca de 20% das calorias e 13% das proteínas exigidas nas necessidades diárias (Gnanamanickam, 2009). Países em desenvolvimento na Ásia e Oceania, onde se encontra 70% da população subnutrida, conceituam a relevância do alimento devido o potencial em erradicar a fome e gerar fonte de renda (Camargo, 1995).

A área plantada de arroz no Brasil na safra 2014/2015 foi reduzida em 3,8% em comparação com safra anterior. Em contrapartida, houve aumento na produtividade de 6,6%, passando de 6.545 kg/ha na safra 2013/2014 para 6.942 kg/ha na safra atual, resultando em aumento de 2,6% na produção total, equivalente a 12.432,1 mil toneladas (Conab, 2015). O aumento na produtividade da cultura é decorrente do investimento em pesquisas para melhoria da capacidade produtiva das cultivares, e da redução dos índices de perdas derivado dos fatores bióticos e abióticos.

Considerando a demanda pelo grão, é indispensável reprimir os fatores que reduzem o percentual produtivo. Santos et al. (2005) afirmam que a produtividade do arroz de terras altas comparada ao arroz irrigado é consideravelmente inferior, atingindo médias raramente superiores a 2.000kg/ha. A baixa produtividade do arroz de terras altas é decorrente da irregularidade das chuvas. Este modo de cultivo é predominante nas regiões Centro-Oeste (Mato Grosso e Goiás), Norte (Tocantins, Roraima e Pará) e Nordeste (Maranhão) do Brasil e, em menor proporção, no continente africano e asiático (Lanna & Carvalho, 2013).

Além dos fatores climáticos (abióticos), a cultura sofre principalmente com o ataque de pragas e doenças severas, podendo ser atribuída a esta o rótulo de “cultura de alto risco” (Santos et al., 2005). Segundo Zeigler et al. (1994) as perdas causada por doenças na cultura do arroz são incalculáveis, e para a doença brusone (considerada a

principal doença), estima-se que as perdas anuais equiparam ao abastecimento de 60 milhões de pessoas. Entre as doenças fungicas mais predominantes na cultura do arroz, tanto de terras altas como irrigado estão *M. oryzae*, *B. oryzae*, *Curvularia spp.* *M. albescens* e *P. sorghina*, em ordem decrescente de importância (Pereira, et al.2002).

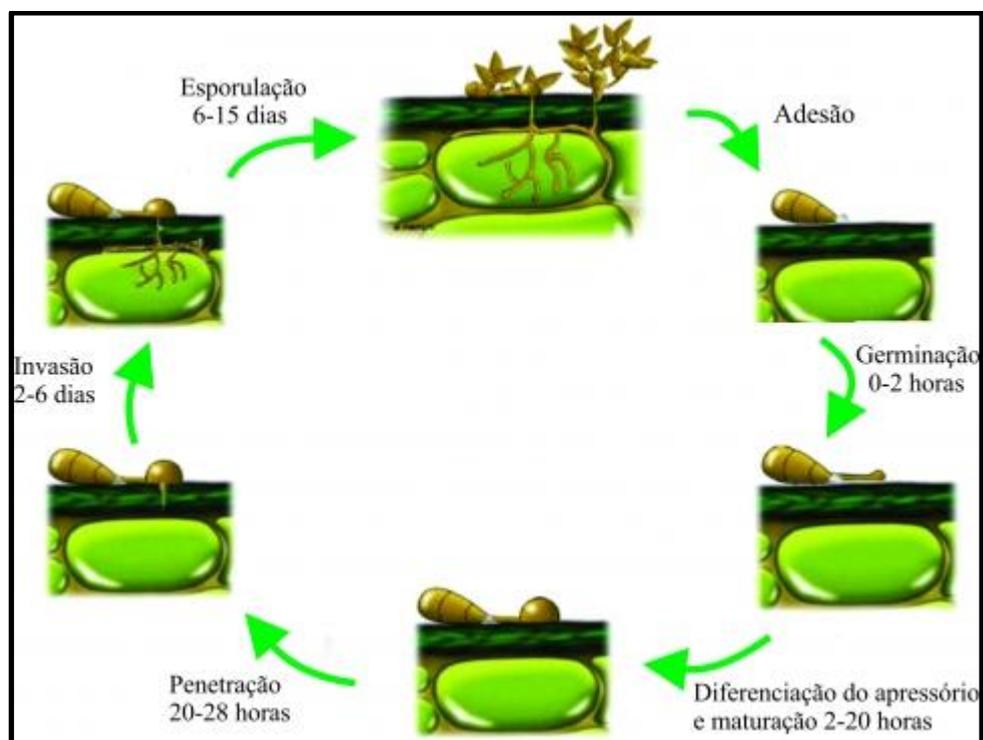
## 2.2 BRUSONE (*Magnaporthe oryzae*)

A brusone causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae* (Cavara), pertence ao Filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, Família Magnaporthaceae e é considerada a doença fúngica de maior impacto econômico sobre as lavouras de arroz no mundo todo (Dean et al., 2005). A presença do fungo foi relatada em 85 países (Santos et al., 2006), e classificada como a maior causa de prejuízos para a cultivo de arroz de terras altas. A doença foi diagnosticada pela primeira vez no Brasil em Santos de Iguapé no Estado de São Paulo, no ano de 1912 (Prabhu et al., 2006). Devido ao potencial destrutivo, campos com mais de 30% de incidência do fungo são abandonados, devido a queda na produtividade, tornando economicamente inviável o controle (Lucas et al., 2009).

A incidência de Brusone (*M. oryzae sp.*) foi reportada em mais de 50 gramíneas, e no Brasil a ocorrência mais frequente é observada em lavouras de trigo e arroz (Prabhu et al, 2006). O patógeno possui uma ampla gama de hospedeiros e pode infectar sete diferentes gêneros de plantas (Dean et al., 2005), sendo cada hospedeiro restrito a um subgrupo específico do agente causal. Apesar da especificidade do fungo, podem ocorrer infecções cruzadas como é o caso da infecção provocada pelo agente causal de brusone de arroz em outras culturas, especialmente o trigo. Segundo Couch et al. (2005), já os isolados de *M. oryzae* provenientes de trigo, ou de outras gramíneas, não são capazes de infectar a cultura do arroz (Oh et al, 2008), essa é uma particularidade importante para estudo da doença devido a capacidade de adaptação da espécie.

A infecção se origina por meio do contato dos conídios (propágulo assexual) à superfície da folha do arroz, que se aderem por meio da mucilagem, e logo após é iniciado o processo germinativo, com a emissão do tubo de germinativo (Howard & Valent, 1996). O tubo de germinativo dá início a uma turgescência no ápice instaurando a formação do apressório, estrutura de penetração responsável por romper a superfície externa da folha. O apressório por meio da força mecânica exigida sobre a cutícula rompe a parede celular e forma a primeira hifa de infecção, que originará outras hifas, colonizando o tecido (Figura

1) e gerando lesões (Prabhu et al, 2006). As lesões começam a surgir após 72 horas de infecção.

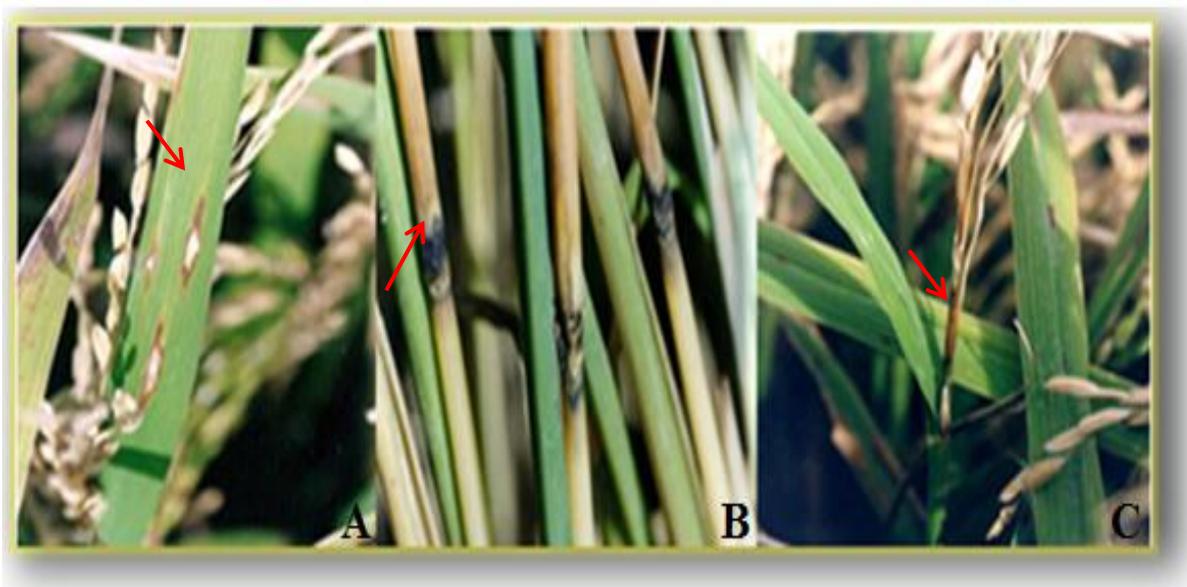


**Figura 1.** Ciclo da doença Brusone em arroz. Processo de infecção do agente causal *M. oryzae* (Ramos, 2009).

Os sintomas são caracterizados por pequenas lesões necróticas, que surgem inicialmente nas folhas, de coloração amarronzada, e posteriormente evoluem, tornando-se o centro acinzentado ou esbranquiçado, em formato elíptico. Em alguns casos, dependendo das condições ambientais e da resistência da cultivar, as lesões podem se alastrar causando a senescência das folhas até a morte da planta. Nós e entrenós também podem ser infectados, e os sintomas surgem na fase de maturação causando a “quebra do pescoço”, bloqueando a passagem da seiva (Prabhu et al., 2006). As infecções geradas antes da fase leitosa do grão podem gerar a morte da panícula e os sintomas podem ser percebidos por meio da cor amarelo-palha nos grãos (Figura 2).

Independentemente do estágio vegetativo, o patógeno infecta todas as partes da planta, e possui a capacidade de sobrevivência em sementes e restos culturais. A época de infecção pode ser determinante, uma vez que, em plantas jovens severamente infectadas é comum a ocorrência de morte das plantas. Quando o ciclo da doença chega a se completar,

o patógeno é capaz de alojar-se nas sementes, internamente ao tegumento (Bedendo, 1997). Infecções tardias geram danos menores, e os sintomas podem ser apenas no local da infecção, em contrapartida, folhas necrosadas podem causar danos indiretos devido à redução da taxa fotossintética.



**Figura 2.** (A) Lesões elípticas de coloração marrom e centro acinzentado, que evoluem, aumentando em tamanho, tornando-se elípticas; (B) A infecção no primeiro nó, abaixo da panícula; (C) Sintoma denominado quebra de pescoço (Fotos: Cley Donizeti Martins Nunes).

Várias são as formas de controles da doença, porém, devido a capacidade saprofítica do patógeno, é mais viável optar pela prevenção. O patógeno *M. oryzae* uma vez introduzido em determinada área é capaz de permanecer vivo em restos de cultura podendo causar danos também aos próximos plantios. Em sementes armazenadas, por mais de 10 anos em bancos de germoplasma, foi detectada a presença do fungo *M. oryzae* ainda viável e, segundo o autor, a viabilidade do patógeno pode ultrapassar a da semente (Faiad et al., 1996).

Mesmo com a capacidade de sobrevivência em restos culturais e a disseminação pelo vento, a principal forma de transmissão e introdução do fungo em lavouras é por meio das sementes (Bruno & Urashima, 2001). As sementes são consideradas umas das principais formas de introdução de inóculo, pois possuem capacidade de armazenamento, transporte e inserção em regiões distantes. A transmissibilidade de inóculo pela semente gera controvérsias entre diversos autores, de que a quantidade de inóculo é insuficiente para gerar uma epidemia, em contrapartida,

mesmo em pequenas concentrações, com temperatura variando em torno 20 à 30°C, associadas a alta umidade relativa do ar podem dizimar lavouras.

Experimentos realizados com sementes de trigo, inoculadas com *M. oryzae*, apresentaram reduções no processo germinativo de acordo com o aumento do período de exposição ao patógeno. Ao analisar as sementes em microscopia de varredura foram verificadas deformações nos tecidos proporcionais ao tempo de exposição (Teixeira, 2014). Apesar disso, não foram identificados sintomas nas plântulas. Marcell et al. (2010) em estudos com arroz, sugeriu a ocorrência de crescimento endófito do patógeno em plantas geradas por sementes doentes, necessitando de rotas exclusivas para geração de conídios.

Faivre-Rampant et al. (2013) ao inocular sementes de arroz, com isolado de *M. oryzae* expressando uma proteína verde fluorescente, observou a produção de conídios a partir de sementes contaminadas, seguido da colonização da folha primária de plantas recém emergidas. O autor conclui também que, independentemente do estágio de inoculação, seja durante o período de maturação, formação de panículas ou mesmo na fase vegetativa, os plantios sempre haverão de gerar sementes contaminadas. As sementes geradas darão origem a plântulas infectadas, que morrem e servem como fonte de inóculo para plantas saudáveis nas proximidades, sendo disseminadas gradativamente, contribuindo com a contaminação do restante da lavoura.

### 2.3 MÉTODOS DE DETECÇÃO

Atualmente, o método de detecção utilizado para a identificação de fungos em sementes é baseado na incubação, por meio da técnica “blotter test”, seguida de análise morfológica, com auxílio de aparelhos de aumento (estereoscópio e microscópio). O uso do “blotter test” é recomendado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e está descrito no Manual de Análise Sanitária de Sementes como o método mais apropriado para este fim. Como vantagem, a técnica apresenta a possibilidade do acompanhamento do desenvolvimento dos fungos de forma natural, em contrapartida, o procedimento tem duração mínima de oito dias, dependendo do desenvolvimento do patógeno em estudo, e pode ser facilmente confundido no processo de análise morfológica, devido à semelhança entre algumas estruturas e a invasão de fungos saprófitas de crescimento rápido (Henning, 2005).

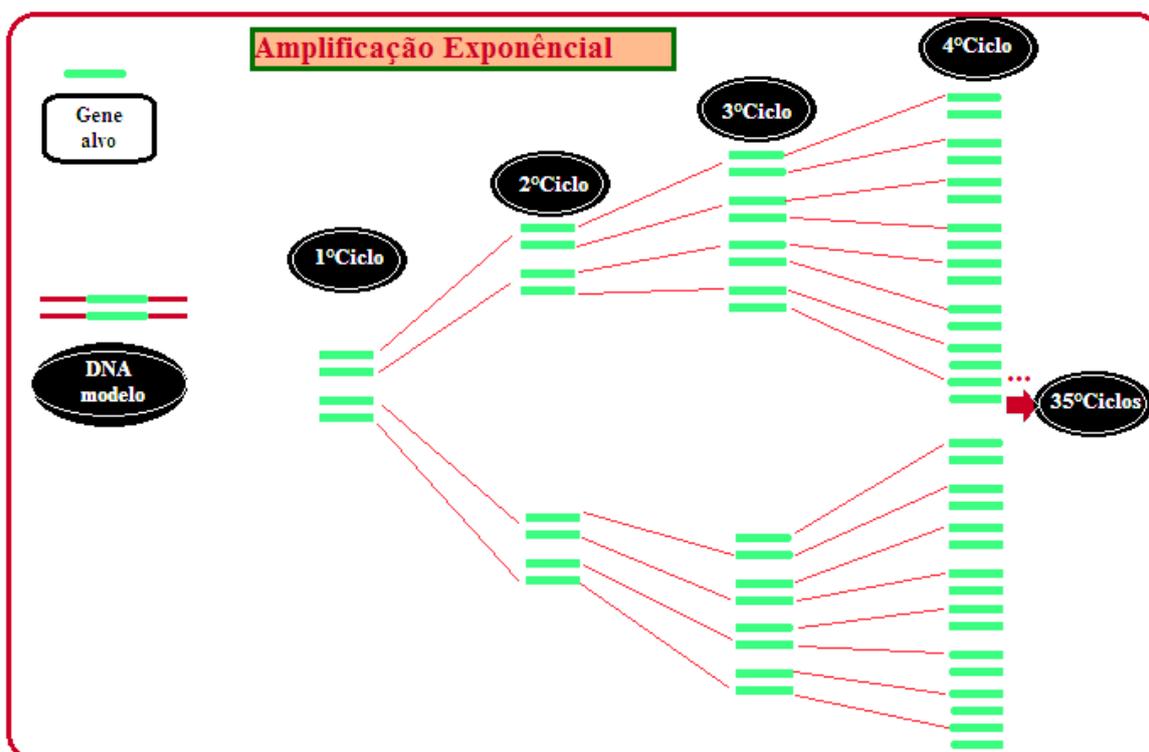
Doenças de grande importância econômica como brusone do arroz e do trigo são causadas por isolados da mesma espécie (Couch et al, 2002), indistinguíveis morfológicamente (Bedendo, 1997). Porém, geneticamente possuem características distintas (Hamer et al., 1989), e apesar de possuírem o mesmo nome científico ambas podem ser separadas por meio da análise molecular. Mesmo sendo geneticamente distintos, *M. oryzae* que infecta o arroz também pode infectar o trigo e outras gramíneas (Prabhu et al, 2006). Assim, torna-se imprescindível a detecção deste patógeno em sementes, prevenindo assim a introdução de inóculo inicial em áreas propícias (hospedeiros) para o desenvolvimento da doença. Outro exemplo de estruturas semelhantes é observado entre *Drechslera*, *B. oryzae*, *B. curvispora* e *B. cynodontis* todos associados a sementes de arroz (Farias et al., 2011). Portanto, problemas na identificação e separação das estruturas podem induzir a diagnoses incorretas, comprometendo novas áreas.

Técnicas de detecção molecular como a PCR têm revolucionado o processo de diagnose de doenças, devido à capacidade de amplificação de regiões específicas do alvo. Apesar do grande potencial do método, a PCR é pouco utilizada no processo de detecção em sementes devido a necessidade de recursos de alta tecnologia, bem como materiais e equipamentos sofisticados, tanto no processo de extração de DNA que antecede a reação quanto na sua amplificação por PCR, o que limita a aplicabilidade em campo ou em laboratórios com menores recursos financeiros, e conseqüentemente em países em desenvolvimento (Gill & Ghaemi, 2008).

### **2.3.1 Detecção molecular por meio da técnica PCR**

Desenvolvida pelo Químico Americano Kary Mullis em 1983 (Mullis, et al. 1986), a técnica de reação polimerase em cadeia (PCR) foi um marco no processo de detecção molecular. A metodologia consiste na multiplicação artificial do material genético em estudo, por meio de ciclos repetitivos gerados por meio de oscilações na temperatura mantidos por meio de um termociclador. A reação depende da ação de uma enzima catalisadora, a DNA polimerase, que induz ao processo de amplificação exponencial do DNA alvo por meio de iniciadores projetados artificialmente com base no DNA do indivíduo. A amplificação artificial de DNA baseia-se no mecanismo de replicação ocorrido naturalmente no processo de renovação celular.

A PCR é uma técnica de detecção molecular rápida, que oferece vantagens em relação as técnicas mais utilizadas para identificação de organismos, como testes de patogenicidade, testes sorológicos, isolamento monospórico ou análises microscópicas (Wang et al., 2009). Caracterizada por reconhecer e identificar baixas quantidades de DNA e amplificá-lo por milhões de vezes e em poucas horas (Figura 3), a PCR possibilita uma detecção eficiente e confiável acerca dos marcadores genéticos projetados com base na própria sequência em estudo.

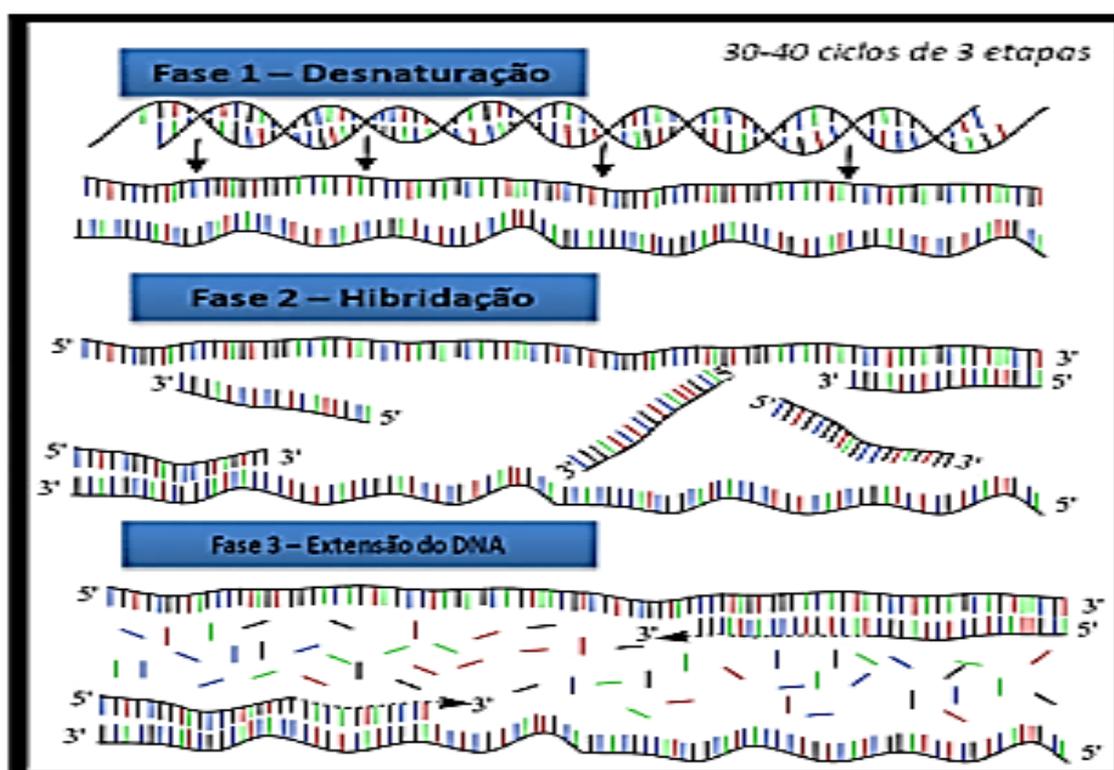


**Figura 3.** Ciclos exponenciais de amplificação via PCR.

O processo de amplificação é conferido por meio de diferentes temperaturas que induzem as fases de desnaturação, anelamento e extensão de trechos específicos (Figura 4). O procedimento inicia por meio da etapa de desnaturação, na qual ocorre a elevação da temperatura a aproximadamente 95°C para que haja a separação das fitas duplas de DNA. Em seguida, ocorre a fase de anelamento, em que os iniciadores específicos se agregam a região correspondente na fita em abertura por meio da redução da temperatura, variando de acordo com a  $T_m$  (Temperatura de fusão de um oligonucleotídeo) específica de cada iniciador. Em terceiro e último é iniciada a fase de extensão, a

temperatura é novamente elevada em aproximadamente 72°C (Pelt-Verkuil et al., 2008) para que a enzima *Taq DNA polymerase* possa inserir os nucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) a fita molde, originando uma nova fita.

A PCR consiste basicamente em uma mistura de reagentes baseados na replicação *in vivo*, estabilizadores da reação (Tampão), bases nucleotídicas, enzima, e o conjunto de iniciadores. Precisamente essa mistura é composta pelo DNA molde, enzimas essenciais DNA polimerase (TAQ polimerase), iniciadores da reação (*primers*), desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's) (Adenina, Timina, Citosina, Guanina), tampão, cátion bivalente  $Mg^{2+}$  e cátion monovalente  $K^+$  (KCl) (Pelt-Verkuil et al., 2008). Essa mistura é levada ao termociclador, e ao término de cada ciclo é obtido duas novas fitas para cada segmento de DNA alvo, levando ao aumento exponencial do material genético (Delidow et al., 1993).

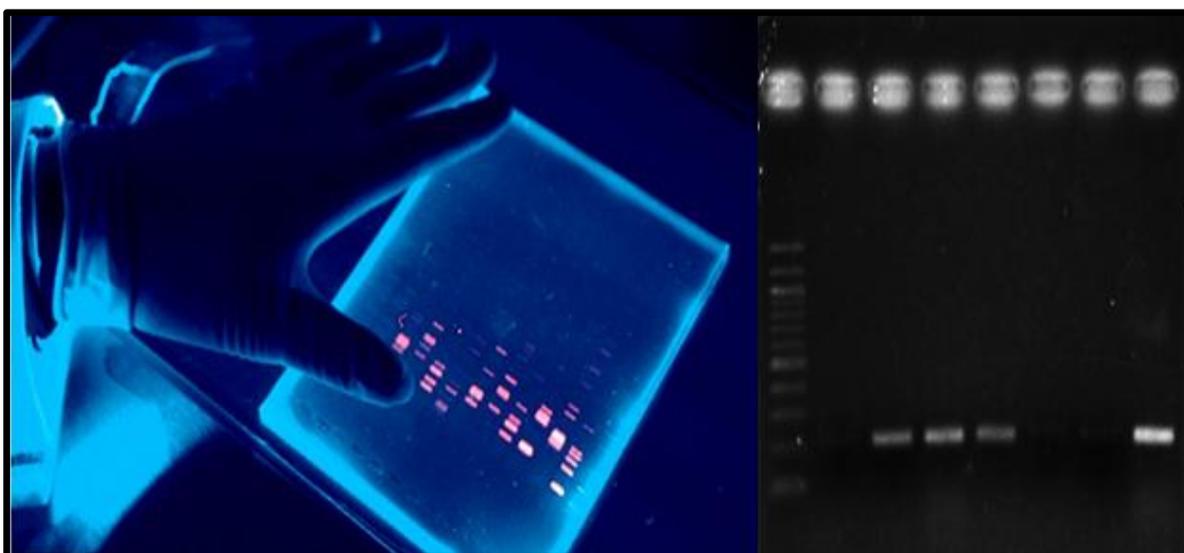


**Figura 4.** Esquematização de um ciclo da técnica da PCR (Pelt-Verkuil et al., 2008)

De um modo geral os produtos da PCR são visualizados por meio da eletroforese em gel de agarose. Após a inserção da amostra no gel é estabelecido um gradiente de separação de bandas, promovido por cargas elétricas, diferenciando de acordo

com o peso molecular, seja moléculas de DNA ou RNA, dependendo do material em estudo. A diferença de potencial faz com que o DNA migre na direção do polo positivo devido as cargas negativas que o compõem (Chen & Janes, 2002; Oie, 2008).

Após o processo de separação de bandas por meio de cargas, o gel é submergido a uma solução contendo corante fluorescente que se agrega ao DNA (intercalantes), e quando exposto a radiação acende, possibilitando a visualização do gradiente de bandas por meio do aparelho fotodocumentador. A observação das bandas no gel é fotodocumentada por meio de um computador acoplado a câmara com emissão luz ultravioleta, e as imagens captadas pelo computador permitem analisar os resultados e gerar diagnósticos (Figura 5).



**Figura 5.** Visualização do produto da PCR em gel de agarose exposto a luz ultravioleta, (Science Photo Library). À direita gel de eletroforese fotodocumentado.

A PCR cada vez mais tem sido utilizada em rotinas de laboratórios para detecção de doenças de plantas. A detecção de *M. oryzae* pode ser realizada por meio de marcadores específicos projetados a partir de genes exclusivos do patógeno. O genoma do patógeno encontra-se totalmente sequenciado, facilitando a projeção de iniciadores. No entanto a caracterização atribuída aos genes ainda é limitada, dificultando a escolha de regiões exclusivas. Chadha & Golapalakrishna (2006), selecionaram o gene *Mif23* para projeção de iniciadores para detecção do patógeno, porém pouco se sabe sobre este gene, apenas que esta envolvido no processo de formação do apressório (estrutura de

penetração). No entanto, *M. oryzae* de trigo e de outras gramíneas também apresentam esta estrutura de penetração, mas não são expressos os mesmos genes que *M. oryzae* de arroz.

Apesar da característica comum entre essas espécies os iniciadores projetados a partir da sequência *Mif23* são exclusivos para *M. oryzae* de arroz. Chadha & Golapalakrishna (2006), provaram a capacidade de reconhecimento do patógeno entre 27 isolados de diferentes regiões da Índia, a especificidade foi conferida ao comparar a 26 espécies fúngicas diversas. Em contrapartida, os autores concluem que a sensibilidade da PCR é insuficiente para reconhecimento de baixas infestações do patógeno na semente. De acordo com a literatura este foi o primeiro e único método molecular utilizado para detecção de *M. oryzae* em sementes.

### 2.3.2 Detecção molecular por meio da técnica LAMP

Notomi et al. (2000) desenvolveram uma metodologia que permite combinar sensibilidade, especificidade e eficiência no tempo de execução com baixo custo e facilidade no diagnóstico molecular, disponibilizando tecnologia de ponta a laboratórios com recursos limitados. A técnica LAMP - *Loop mediated isothermal amplification* - é caracterizada por amplificar rapidamente o DNA alvo sob temperaturas constantes, sendo necessário apenas um banho seco para reprodutibilidade da técnica (Njiru et al., 2008). A LAMP apresenta vantagem significativa sobre a PCR, devido a redução de custos e etapas para obtenção dos produtos.

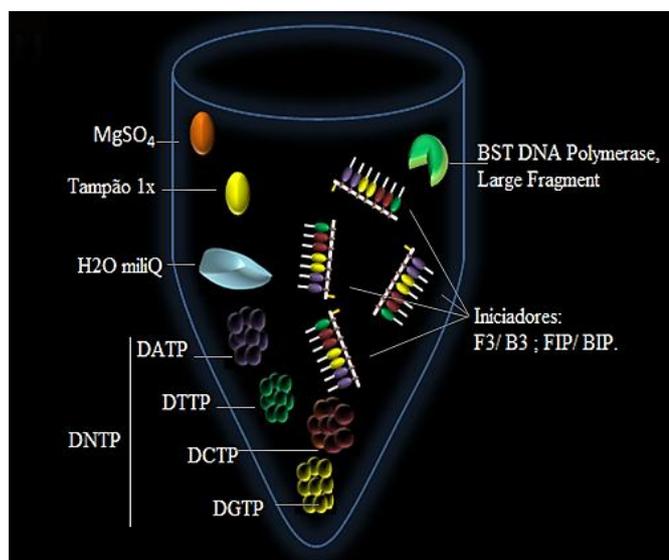
Por meio da LAMP é possível realizar e interpretar o diagnóstico molecular no local da infecção ou contaminação, neste caso em armazéns, cooperativas, ou laboratórios de baixa condição tecnológica, ou mesmo condições primitivas, sendo necessário apenas um “banho seco” para o processo de amplificação. Devido a capacidade de deslocamento de cadeia da enzima *Bst DNA Polymerase Large Fragment*, a metodologia dispensa a variação de temperaturas exigidas na PCR para abertura das fitas, anelamento dos iniciadores e extensão da fita.

A *Bst DNA Polymerase* possui a atividade de liberação de cadeias sob temperaturas ótimas de atividade em torno de 65°C, variando de acordo com os iniciadores constantes (Notomi et al., 2000). Para que ocorra a reação o LAMP necessita da ação conjunta de quatro iniciadores internos e externos (FIP/BIP e F3/B3) respectivamente, capazes de reconhecer seis regiões do DNA alvo, por esta característica confere alta

especificidade no diagnóstico. Os iniciadores internos são estruturados de maneira que duas regiões diferentes os compõem, as regiões são ligadas por uma sequência de quatro timinas (TTTT), exemplificando FIP (*Forward Inner Primer*) é constituído por (F1c - TTTT- F2) e BIP (*Backward Inner Primer*) por (B2 -TTTT- B1c), estes iniciadores são os responsáveis pela formação da estrutura primária da LAMP, uma vez que ao hibridizarem deixarem livres as extremidades F1c e B1c para se agregarem as regiões complementares F1 e B1 e formarem os *loops*.

O sucesso da técnica está diretamente ligado a projeção dos iniciadores, sendo primordial a escolha regiões específicas da espécie em estudo (Chiari, 2010). Além da escolha de regiões exclusivas é preciso verificar se os iniciadores gerados condizem ao que específica o Guia para desenho de *primers* LAMP (Primer explorer V4), que estabelece quatro principais pontos chaves, a Temperatura de melting ( $T_m$ ) cerca de  $65^\circ\text{C}$ , a estabilidade no final de cada iniciador ( $\Delta G < -4\text{kcal}$ ), conteúdo GC (50% à 60%), e a auto complementariedade.

Os componentes da LAMP são bem parecidos com a PCR, que se baseia no processo de replicação *in vivo*. A LAMP é composta basicamente pelo conjunto de iniciadores internos e externos (Figura 6), pela *Bst DNA Polymerase* e seu respectivo tampão (*ThermoPol Reaction Buffer*: 20 mM Tris-HCl, 10 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10 mM KCl, 2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0,1% Triton X-100, pH 8,8),  $\text{MgSO}_4$  doador de íons que pode também interagir no processo de detecção visual (Goto et al., 2009; Dasa et al., 2012) e dNTP (Adenina, Timina, Citosina, Guanina) em concentrações maiores que na PCR convencional (Li et al., 2011).

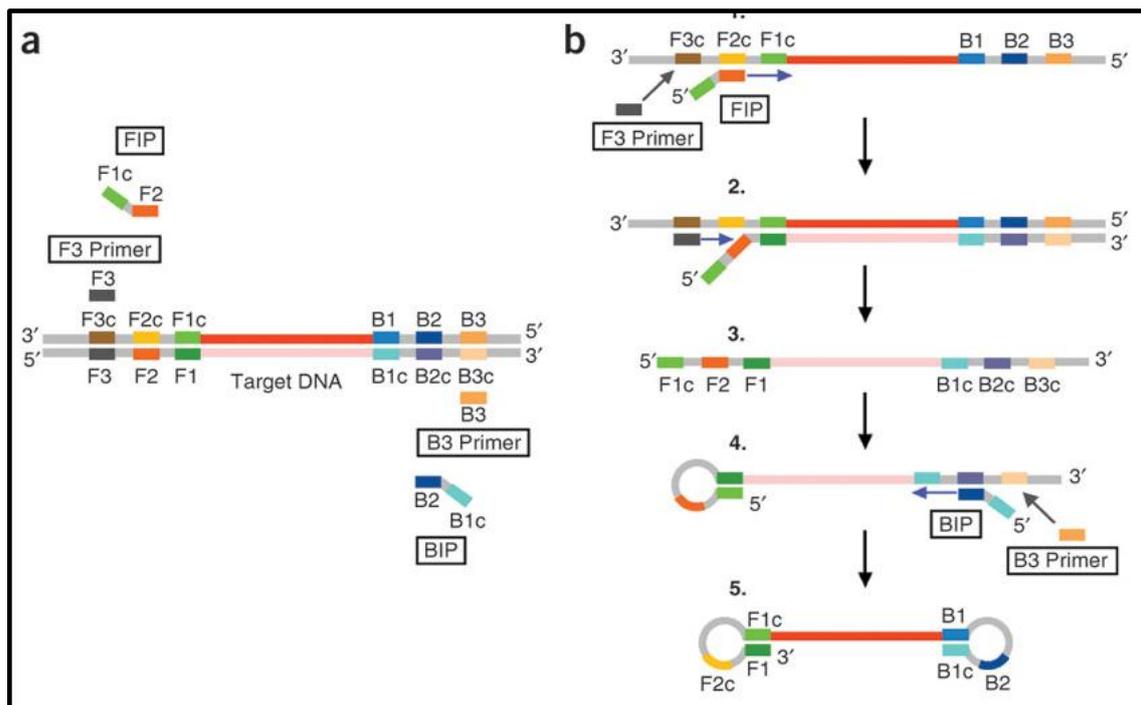


**Figura 6.** Reagentes que compõem a reação LAMP.

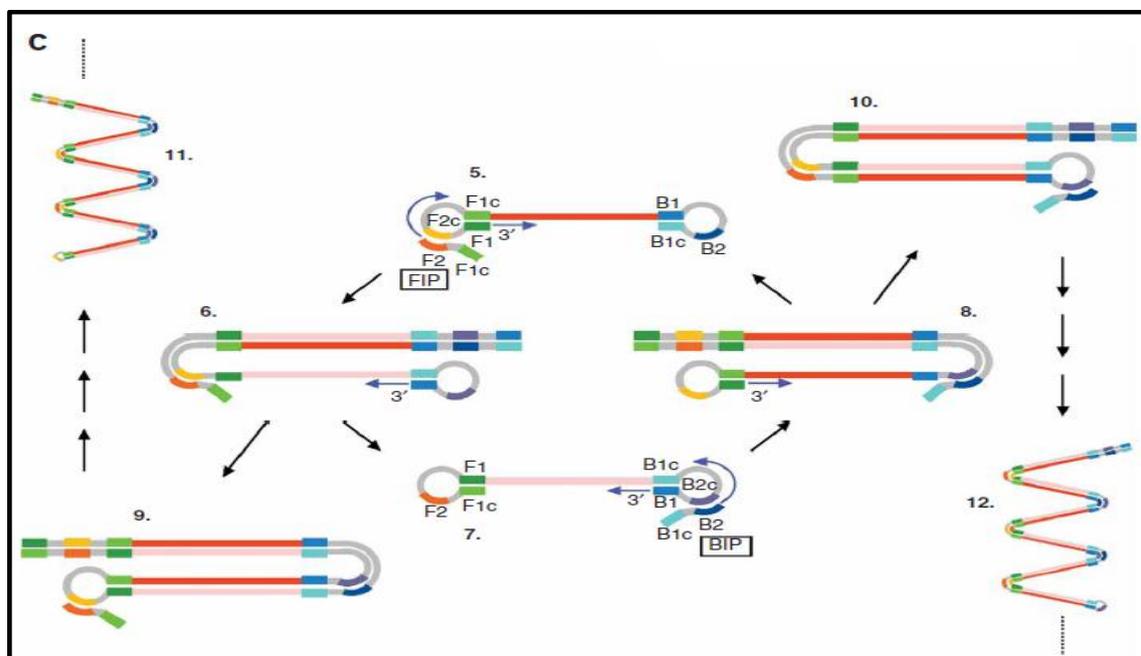
O processo de amplificação é composto pela etapa não cíclica (Figura 7), seguida da etapa cíclica a partir da estrutura formada na primeira etapa. A etapa não cíclica se inicia por meio do deslocamento da *Bst DNA Polymerase* sobre as fitas, durante o deslocamento a fita dupla se abre e ocorre o anelamento dos iniciadores começando pela extremidade 3', na qual o FIP (F1c - F2) se liga a região F2c, deixando livre a extremidade F1c, em seguida F3 se liga a região F3c iniciando uma nova síntese da fita formada anteriormente, liberando a fita com extremidade F1c que se unirá a região correspondente F1 formando uma das partes do *loop*. O mesmo procedimento ocorre na extremidade 5' em que BIP (B2 - B1c) se liga a B2c, seguida da inserção de B3 liberando a extremidade B1c que se hibridizará com B1 formando a estrutura completa com os dois *loops* assemelhando a um grampo.

A partir da estrutura formada é iniciada a fase cíclica na extremidade 3', a ligação se inicia com a adesão dos iniciadores internos FIP ou BIP, com o deslocamento da enzima *Bst DNA Polymerase* sobre os *loops* ocorre a hibridização das novas fitas. Esta etapa é denominada como fase de alongamento e reciclagem (*elongation and recycling step*), sendo amplificado somente a região alvo, vários *loops* são formados (Figura 8) em uma mesma fita, em escala de  $10^8$  a  $10^9$  em menos de uma hora (Parida et al., 2008; Notomi et al., 2000; Ushikubo, 2004).

Os produtos do LAMP podem ser vistos por meio da formação de bandas múltiplas em géis de eletroforese, ou mesmo por meio da observação direta em tubos transparentes em amostras com o DNA alvo (Notomi et al., 2000). A manipulação de corantes carcinogênicos como brometo de etídeo durante a coloração do DNA no gel de agarose não é recomendável (Khan et al., 2012), a possibilidade de leitura direta dos resultados da LAMP simplifica a diagnose molecular. A interpretação direta ocorre devido a liberação de íons de pirofosfato durante a amplificação do DNA, estes íons reagem com o  $Mg^{2+}$  presente na reação e formam o pirofosfato de magnésio (Mori et al, 2001), por este motivo somente em amostras positivas ocorre a turbidez, sendo desnecessário o uso da eletroforese e fotocimentação. A turbidez está diretamente relacionada com o percentual de amplificação.



**Figura 7.** (a) Explicação do processo de amplificação LAMP – Fase não cíclica. Seis regiões (F3c, F2c, F1c, B1c, B2c e B3c) são reconhecidas pelos iniciadores internos (FIP e BIP) externos (F3 e B3). (b) início do processo de amplificação isotérmica por meio da enzima *Bst* DNA Polymerase para formação do primeiro loop. (Fonte: Eiken Chemical Co. Ltd.).



**Figura 8.** Processo de amplificação LAMP – Fase cíclica. (8) início da fase cíclica a partir da estrutura em formato de halteres, (9) Síntese iniciada a partir de um dos loops no sentido 3' com adesão dos iniciadores internos. (10) Estrutura que inicia o ciclo de elongação é formada, os iniciadores a partir de então se ligarão de maneira alternada dando origem a estruturas de formatos e tamanhos variados com base na sequência alvo (11) Estrutura formada a partir de vários ciclos. Fonte: Eiken Chemical Co. Ltd.).

A adição de corantes pode facilitar a interpretação das amostras positivas a olho nu, agentes intercalantes como SYTO-82 (Watts et al, 2014), PicoGreen, Calceína (Wastling et al, 2010), Iodeto de Propídeo (Hill et al, 2008), Brometo de Etídio, SYBR Green I, são comumente utilizados, no entanto necessitam de iluminação com uma lâmpada UV (Iwamoto et al., 2003; Parida et al., 2008; Saleh et al. 2008). Corantes indicadores como Phenol red, Cresol red, Neutral red, M-Cresol purple (Tanner et al. 2015), Hydroxynaphthol blue (Goto et al, 2009) não necessitam de iluminação com lâmpada UV (Almasi et al., 2013), tornando ainda mais prática a utilização de kits baseado na metodologia LAMP. Os kits para detecção de doenças passam por adequações, e quando disponibilizados dispensam a eletroforese, uma vez que devidamente padronizados em laboratório, fornecerem informações seguras somente por meio da visualização direta.

O processo de detecção de agentes patogênicos por meio da tecnologia LAMP tem avançado, e possibilitado o diagnóstico direto de amostras de origens variadas, tais como, meios de cultura, fluidos oculares, sangue e tecidos, folhas, sementes (Wei Wei et al, 2012), resíduos entre outros, além de detectar patógenos bacterianos (Lin et al, 2011), viróticas e fúngicas com sucesso. A técnica possui a vantagem de ser menos suscetível à presença de inibidores do que o PCR convencional (Chiari, 2010), possibilitando o consórcio com métodos de extração de DNA rápido adaptado para condições de baixas tecnologias.

De acordo com Gonsalves (2014) a redução de custos da metodologia LAMP em relação a PCR chega a 53,92%, isso ocorre porque os kits baseado em LAMP dispensa o uso de termocicladores, cubas de eletroforese, fontes de tensão para carregamento, e aparelho fotodocumentador, e alguns tipos de reagentes, dentre eles o Brometo de etídeo considerado prejudicial a saúde. Portanto, esta é sem dúvida, uma ferramenta útil para laboratórios, cooperativas ou empresas, que visam diagnosticar a qualidade de lotes direcionados ao plantio ou de campos produção de sementes.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 DETECÇÃO DE FUNGOS EM SEMENTES

No Laboratório de Qualidade de Sementes da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás-Go, foi conduzido um experimento para identificação dos principais patógenos presentes em lote de sementes de arroz naturalmente infestado. O lote selecionado foi proveniente da parcela 306, safra 2013/2014, cultivar Maravilha. Foram separadas sementes aparentemente sadias, manchadas e lesionadas, e incubadas pelo método *blotter test*, de acordo com as recomendações do Manual de Análise Sanitária de Sementes do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento para diagnose de fungos. Quatro câmaras foram utilizadas, cada uma contendo 25 sementes separadas a 1 cm, depositadas sobre substrato de papel filtro umedecido. Os recipientes foram vedados e expostos a luz fluorescente branca, sob temperatura constante de 21°C e fotoperíodo de 12 horas.

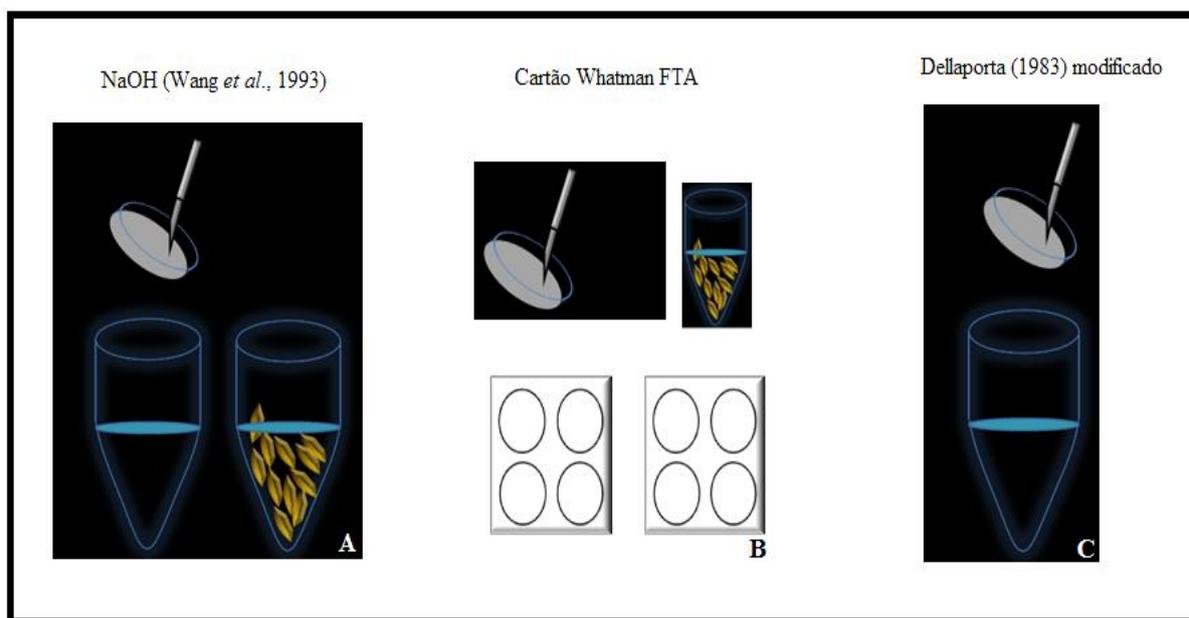
A identificação morfológica dos fungos encontrados nas sementes foi realizada após o período de 8 dias de incubação e monitoramento, com o auxílio de um aparelho estereoscópio que proporciona aumento de até 90x e de um microscópio óptico. A diferenciação entre os patógenos foi atribuída por meio de análises comparativas ao Catálogo de Identificação de Espécies Fúngicas da Embrapa Arroz e Feijão.

A grande variedade de espécies contidas nas sementes dificultou o processo de identificação, portanto, para certificar que as estruturas eram condizentes, foi necessário o isolamento monospórico em meio BDA (200 g de batata descascadas, 20 g de dextrose, 15 g de ágar, 1L de água destilada). Para inibir a formação de colônias de bactérias foram adicionados 0,3 g de Cloranfenicol para cada litro de BDA. As placas de petri contendo meio BDA e o organismo isolado foram devidamente vedadas e mantidas em câmara incubadora a 25°C. O crescimento dos patógenos foi acompanhado diariamente para controle de organismos invasivos. Após 15 dias, quando as estruturas cobriram todo o meio, uma parte foi coletada e depositada em lâminas para observação em microscópio

óptico, 0,5 gramas do restante das estruturas foram raspadas e utilizadas no processo de extração de DNA para diferenciação molecular.

### 3.2 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA

Após a caracterização morfológica foi iniciado o processo de identificação molecular. Foram testados diferentes métodos para averiguar qual melhor condiz com a metodologia LAMP. As metodologias de extração de DNA rápida por NaOH (Wang et al., 1993) e Cartão Whatman FTA (Classic Card), foram testadas e comparadas com a Extração pelo protocolo Dellaporta (Dellaporta et al., 1983) utilizado como controle (Figura 9).



**Figura 9.** Comparação entre metodologias de extração rápida de DNA. **(A)** Metodologia NaOH, extração direta do patógeno crescido em placa por meio da raspagem do micélio, e extração do DNA do patógeno presente na superfície da semente. **(B)** Cartão Whatman FTA, inserção direta do patógeno na superfície do cartão, e inserção do líquido com o patógeno extraído por meio da maceração da superfície da semente. **(C)** Dellaporta extraído direto da raspagem do micélio crescido em placa, método comparativo adaptado.

A extração por NaOH consistiu na caracterização do material em tubos, e adição de 10µl da solução NaOH na concentração de 0.5N, para cada miligrama do material. Em seguida o material em meio a solução foi macerado, até que os pedaços

grandes fossem desfeitos. A quantidade de 5µl da solução foi coletada e transferida para um novo tubo contendo 495µl do tampão Tris pH 8.0 concentração 100mM.

O Cartão Whatman FTA (Classic Card) é um kit composto por papel filtro de no qual o material em análise (de acordo com os tratamentos) foi aplicado, aguardado o processo de secagem, e em seguida parte do cartão com o material impregnado foi cortado em formato de disco, em tamanho aproximado de 2 mm de diâmetro, e transferido para um tubo contendo 100 µl do reagente componente do kit Whatman FTA para lavagem das impurezas e incubado por 5 minutos, descartado posteriormente e deixado apenas o disco. Em seguida 200µl do tampão TE foi adicionado, e este processo foi repetido por três vezes para eliminar substâncias de degradação do material genético. Finalmente o disco foi exposto para secagem a temperatura ambiente e o DNA extraído, retido no papel foi utilizado posteriormente para PCR.

O protocolo Dellaporta (1983) adaptado foi realizado por meio da adição de 500µl do tampão Dellaporta (1,57g Tris-HCL 100mM; 1,86g EDTA 50mM; 2,92g NaCl 500mM; 100ml de H<sub>2</sub>O Milli-Q com pH ajustado a 8,0) ao material para extração, seguido da agitação por 2 minutos em vortex. Em seguida foi adicionado 40µl de SDS 20% (2,8g dodecyl sulfato de sódio; 14 ml de H<sub>2</sub>O Mili-Q) agitando por 2 minutos em vortex e incubado a 65°C por 30 minutos em banho-maria, agitando periodicamente de 10 em 10 minutos.

Logo após o processo de incubação foi adicionado 300µl de acetato de potássio a 5M (48g acetato de potássio; 100 ml H<sub>2</sub>O Milli-Q) agitado em vortex por 2 minutos e centrifugado a 14000 rpm, a 25°C, por 10 minutos. Após a centrifugação foi retirado o sobrenadante e transferido para um novo microtubo, 330 µl de isopropanol gelado foram acrescentados e invertido suavemente, centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm, e descartado o sobrenadante, deixando apenas o material decantado (*pellet*).

O *pellet* foi purificado com álcool 70% por duas vezes consecutivas, centrifugado por 30 segundos entre as lavagens, em seguida 250µl de álcool absoluto foi adicionado, centrifugado por 5 minutos, o álcool foi descartado e por 40 minutos o material foi exposto para secagem e ressuspendido em 50µl de TE. O material extraído por este protocolo foi quantificado para fins comparativos aos demais métodos. A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria, utilizando o aparelho NanoDrop®.

Os métodos de extrações foram testados sob diferentes condições criadas propositalmente, simulando as condições de campo, representadas pelos tratamentos T1,

T2, T3, T4 e T5, conduzidos pelo método NaOH e T6, T7 pelo FTA, que em seguida foram comparados ao tratamento T8, correspondente ao DNA modelo extraído pelo método Dellaporta.

**Tabela 1.** Adequação do método de extração de DNA de acordo com as condições naturais representadas artificialmente pelos tratamentos.

Metodologia de Extração		Descrição
T1	NaOH	Uma semente de arroz com <i>M. oryzae</i> - não macerada
T2	NaOH	Uma semente de arroz com <i>M. oryzae</i> – macerada
T3	NaOH	Raspagem do micélio de <i>M. oryzae</i> crescido em placa
T4	NaOH	Uma semente de arroz com <i>M. oryzae</i> + quatro sementes de arroz sadias – maceradas
T5	NaOH	Uma semente de arroz com <i>M. oryzae</i> + quatro sementes contaminadas - <i>B. oryzae</i> , <i>Curvularia spp.</i> , <i>M. albescens</i> e <i>P. sorghina</i> – maceradas
T6	Cartão FTA	Raspagem do micélio de <i>M. oryzae</i> crescido em placa e deposição sobre o Cartão
T7	Cartão FTA	Solução contendo: Uma semente de arroz com <i>M. oryzae</i> + quatro sementes de arroz sadias – maceradas e depositadas sobre o Cartão
T8	Dellaporta	Raspagem do micélio de <i>M. oryzae</i> crescido em placa (controle)

As amostras de sementes identificadas com a presença do patógeno *M. oryzae* foram coletadas e distribuídas de acordo com os tratamentos. Nos tratamentos (T1) e (T2) foi colocada uma única semente contaminada em cada tubo, sendo que apenas o segundo passou pelo processo de maceração, para certificar se haveria também contaminação na parte interna do tegumento. O tratamento (T3) pelo método NaOH, foi utilizado como controle, o procedimento foi conduzido por meio da raspagem direta do fungo crescido em placa, e uma grande quantidade de 0,5 gramas do material foi submetida ao teste.

Os tratamentos (T4) e (T5), ambos macerados, simularam as condições de campo, em que os lotes apresentaram cerca de 20% de contaminação com *M. oryzae*. No primeiro caso, (T4) foi suposto que não haveria outros patógenos em campo, e foram adicionadas quatro sementes de arroz limpas e uma semente contendo o patógeno identificado ao mesmo recipiente, estabelecendo uma relação 1:5 que corresponde a 25%, como em condições naturais. No tratamento (T5) foi feita a mesma simulação, porém ao invés de adicionar sementes limpas, foram adicionadas quatro sementes cada uma contendo um patógeno diferente, sendo eles *B. oryzae*, *Curvularia spp.*, *M. albescens* e *P. sorghina*, a fim de verificar se haveria interferência de outros materiais genéticos sobre o DNA alvo.

Os Tratamentos T6 e T7 foram conduzidos pelo método do cartão Whatman FTA (Classic Card). Em T6 foi feito a raspagem direta do fungo crescido em placa e depositado sobre o cartão como controle da metodologia, em T7 foi realizada a maceração em água de 1:5 assim como no tratamento T4, ou seja, uma semente com *M. oryzae* e as demais sadias, e em seguida o líquido foi depositado sobre o cartão. O tratamento (T8) foi o DNA modelo, extraído pelo método Dellaporta, como base comparativa para outros métodos em termos de concentração e pureza.

### 3.3 PROJEÇÃO DOS INCIADORES LAMP

Os iniciadores foram projetados a partir do gene *Mif23*, a escolha foi embasada em iniciadores específicos projetados a partir dessa região para a técnica PCR descritos na literatura. A sequência foi fornecida pelo Genbank (acesso GI 4732021) (figura 10) e os iniciadores foram desenhados por meio de um programa disponibilizado na página da web (<http://primerexplorer.jp/e/>), designado Primer Explorer, recomendado pelo *Eiken GENOME SITE* para conceber exclusivamente iniciadores LAMP.

```

>gi|4732021|gb|AF118227.1|AF118227 Magnaporthe grisea infection structure specific
protein (mif23) gene, complete cds

GCCAAGTGTGTTCCCCCCTTTTTTCTTAGTAGAAAGG GGC AACATCTGTG TTC GTAATCCGGTGGCGC
GTCACCTCTCAATAGGCTGCCCTTACTACCATGGCCTCGATTACGAGTCGAAACTTGGTAGCGGCTG GC
ACTATCCAGGATTCG GCCTGCTCGGG TAAG AAAG GAACG AAATCG TTG TTGTAG TAGCCTCGCAAAA
TTGTGATTCAAAATCAGCTAGTAAACC GCTAG ATGGCATAGTTTTG CCACCATCGTGATTTG AATCCATT
GCCATTTAGATCCAG ATG GGG AAATGGC TTG CCTGTAGTCTCAGGAG ACCTCGCCCGG AAG ATATAA
GAGGCATTGTTCAACCCG TTCCG AAGCG AAG GGAAGG TTCCTCTCC GAAGGG GCCAAG GTC ACTCAAT
TCATTTGCCAGGGAAAAAAAACGAAC AATAGCATC ACTCGACCAAC ATACAATCG ACGAG ACAATGC
ATTCCAACACAG TCCTGTT CATG ATTGCC GCGGC GACGGGCG TCATG TCG GCCG AAC TCAACCTCTTCC
CGGGCCATGCCGTCGTCAG ACG TGAGGG TGCAGCTCGCG AGACTGCG AGCCCTCGCTACCAAGTATC
AATGACCCTTGTCTGGCG AGCCTG ATGTCTATTTCAAG ACTTTGCCG ACACCTGGT GCCG ATATTTGT
CTGCTCTTGCTCCAATACCG AGG TATGCC TCCGACAATATTTCCCATTTG AGGCCGTG GTG CGTTACATG
ACGTTGCTGACATCTC TAACCG TGCTACCA GACCAACGCATGCTCAATCACTGTTGCC GCCTCGGTAT
CGGATAAGTTCAACGC ATACAAGCACTATTTCGTAGCTGG TACTC GAGCAACAGCGCC GCTATTA ACT
CGGTGCTGTCGCAATG TCCC AAGCTCAG TTCTATGCCGG CGACTTGCCCG TCTGC ACTGGCAAAG ATA
GCTCAAACGGTGATCTTCCACTGCCACCAAGG GCTCTTCTG GCGCAGCTACTACCCTG GCGTGCGA
CCGATGCGGGATCAGG TAGTGCCACAGCCG CAACGG CCAGTGCCGGCGACAGCTCTAGCAACCCCACT
GGCTCGGCTGCCTCCGTCACC AAATCCGG GTCAGG ACCGCGGG AGACA AACTTTGTGGCGG GCGCAGT
TGCCGCCATTGGATT CCTTGG TGTTG TCGTGTCTTTG TAAG CCTGACAACAAGCCAACTTGCC TG TACC
AGTTAGGGCAGGACGAG GAGCTG TTGAACCGCAAGCCCG ATTTTGTTC TCAAGAGGTAGG AATGTTG
GCACCGTCAAAATTTATGTTGGTG TACTCTGATG TTGAGAATAGCATAGTAGCACAACATGATAAATCC
TGTCAGAGAAACCATGATGCTTTGAG TCCATGCAAGTCTTTGCCCTTGCATG TTTGATAAGAGCGACG
GCATCAAATTGCTGCATACCCTGTAATTGAGTATAGTG TGACGTAGTACGACAGTTAAGTTG TCAACG
TTACCAGTTGCGCTGCTTGATGCAAGTTACTTCGAC TTTTCA

```

**Figura 10.** Sequência *Mif23* disponibilizada pelo Genbank, utilizada para projeção dos iniciadores LAMP para detecção de *M. oryzae* em sementes de arroz.

O programa gerou nove conjuntos de iniciadores, que foram refinados de acordo as normas do Guia para desenho de *primers* LAMP (Primer explorer V4), e estabelecem quatro principais pontos chaves: a Temperatura de melting ( $T_m$ ) cerca de  $65^\circ\text{C}$ , a estabilidade no final de cada iniciador ( $\Delta G < -4\text{kcal}$ ), conteúdo GC (50% à 60%), e a auto complementariedade. De acordo com os principais pontos, três conjuntos de iniciadores foram desclassificados ao analisar a possibilidade de complementariedade indicada pela energia livre ( $\Delta G$ ), portanto, apenas seis conjuntos de iniciadores apresentaram viabilidade, foram selecionados e encaminhados para elaboração.

### 3.3.1 Compatibilidade dos iniciadores externos F3 e B3

Os seis conjuntos de iniciadores externos F3/B3 foram testados no processo de refinamento via PCR para verificar a capacidade de reconhecimento do alvo e a

especificidade. Os conjuntos foram representados por Py1, Py2, Py3, Py4, Py5, Py6. A especificidade foi equiparada aos materiais genéticos de *M. oryzae* de trigo (Pyt), *Sarocladium oryzae* (So), *Trichoderma spp.* (Tr) e *Fusarium sp.*(F) junto a *M. oryzae* (Mo) DNA alvo.

O volume estabelecido para cada reação PCR foi de 25µl, os componentes da amplificação foram fornecidos por meio do kit PCR Multiplex da Qiagen® (Tabela 2). Dividido em três partes o kit foi composto por Q-solution, Master mix e água ultrapura, a união dos componentes fornece bases nucleotídicas, enzima e tamponamento para a síntese e estabilidade da reação.

**Tabela 2.** Especificidade dos iniciadores projetados para detecção de *M. oryzae*.

Reagentes	Volume
Iniciador F3 [ ] 10 µM	2,5 µL
Iniciador B3 [ ] 10 µM	2,5 µL
Master Mix 2x (MM)	12.5 µL
Q-Solution 5x	2,5 µL
DNA [ ] 25 ng/µL	1,0 µL
Água	4,0 µL
Total	25 µL

Os seis conjuntos externos foram submetidos às mesmas temperaturas de amplificação, as condições foram fornecidas por meio do aparelho termociclador (Swift™ MaxPro, Esco), iniciando com o processo de ativação 95°C por 15 minutos, seguida a fase de desnaturação de 30 segundos à 94°C, o anelamento em 90 segundo à 57°C, e de extensão em 90 segundos à 72°C, as três fases repetidas por 35 ciclos, a extensão final foi de 10 minutos à 72°C. O produto da amplificação foi visualizado por meio da eletroforese gel em agarose, concentração 2%.

### 3.3.2 Amplificação isotérmica por meio da metodologia LAMP

Os seis conjuntos de iniciadores completos (F3/B3 e FIP/BIP) foram avaliados quanto a formação de bandas, com finalidade de selecionar o que melhor representa o padrão de bandas característico da LAMP. A reação foi conduzida com um volume total de 10µl, constituída de 1,4 mM da mistura de dNTP (25mM) (Sigma-Aldrich), 0,2 µM dos iniciadores externos (F3/B3), 1,6 µM de cada iniciador interno (FIP/BIP), 8 U de *Bst DNA Polymerase* (Fragmento ampliado) (New England BioLabs), 1X do tampão (*ThermoPol Reaction Buffer*: 20mM Tris-HCl, 10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10mM KCl, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1% Triton X-100, pH 8,8) (New England BioLabs), e 25ng de DNA. Todos os conjuntos de iniciadores foram submetidos a temperatura de 65°C. Nas etapas de adaptação da temperatura ideal os testes foram conduzidos em aparelho termociclador já que o laboratório dispunha do mesmo. A comparação entre as estruturas geradas foi analisada em gel de agarose 1,5% fotodocumentado.

### 3.3.3 Estabelecimento do tempo e temperatura adequada para o conjunto de iniciadores Py3

O conjunto de iniciadores que apresentou o melhor padrão de bandas foi testado para aperfeiçoar as condições de trabalho sendo submetido a diferentes temperaturas, com a finalidade de selecionar o que melhor amplifica as regiões alvo minimizando o surgimento de falsos-positivos. As temperaturas foram 55°C, 57°C, 59°C e 61°C selecionadas aleatoriamente. Para cada temperatura foi testado um controle denominado branco (sem DNA) (B), o material genético de *M. oryzae* de trigo (controle negativo) (Pyt) e por último o DNA alvo (Mo), totalizando doze amostras.

Após selecionar a temperatura mais adequada, o tempo mínimo para amplificação foi testado, seguindo 30, 45 e 60 minutos para cada amostra. Para cada um dos tempos foi testado um branco (B), um controle negativo (Pyt) e o DNA alvo (Mo), totalizando nove amostras. A análise da temperatura e do tempo considerado ótimo para amplificação do conjunto de iniciadores foi realizada por meio da formação de bandas em géis de agarose 1,5%.

### **3.3.4 Adição de corantes para análise direta dos produtos gerados por LAMP**

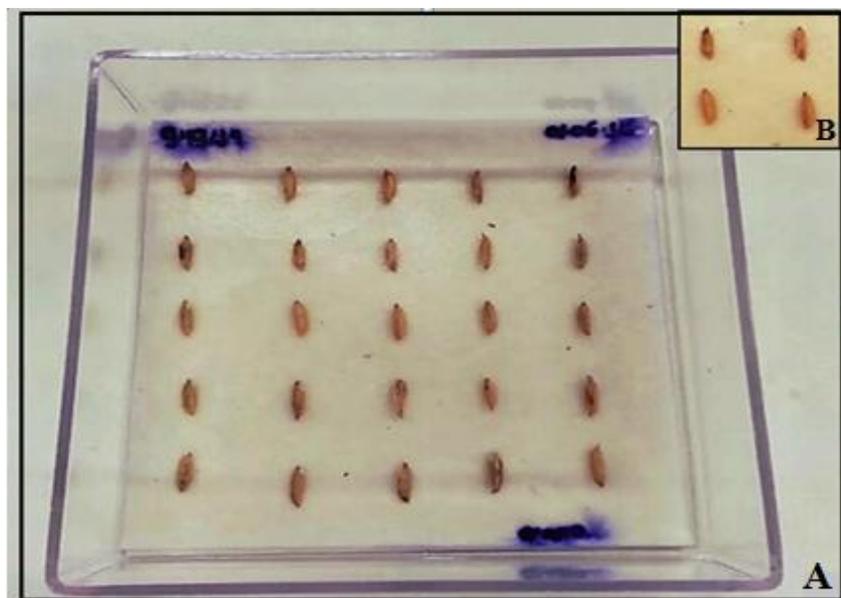
Para facilitar a interpretação direta a olho nu dos produtos amplificados da LAMP foram testados três corantes indicadores de pH, Phenol red, Hydroxynaphthol blue (HNB), Bromothymol blue (BTB). O preparo dos corantes Phenol red (Tanner et al, 2015) e HNB (Goto et al, 2009), foi de acordo com as recomendações citadas pelos autores que prescreveram a aplicação dos corantes para metodologia LAMP. O corante Bromothymol blue (BTB) primeira vez testado em conjunto com a metodologia LAMP, foi preparado nas seguintes condições, 99 mg do corante em pó BTB foi diluído em 200 ml do Tampão TRIS 1M pH 8,0, agitado constantemente e filtrado duas vezes consecutivas em filtro de membrana milipore.

A concentração dos corantes Phenol red e HNB na reação foi de 100 mM e 150 mM respectivamente, para o BTB a concentração utilizada foi 200 mM. Todos os corantes foram adicionados à mistura da reação, ou seja, antes do processo de amplificação para reduzir o índice de contaminantes.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 AMOSTRAGEM DOS PATÓGENOS IDENTIFICADOS EM SEMENTES DE ARROZ APÓS INCUBAÇÃO por “Blotter test”

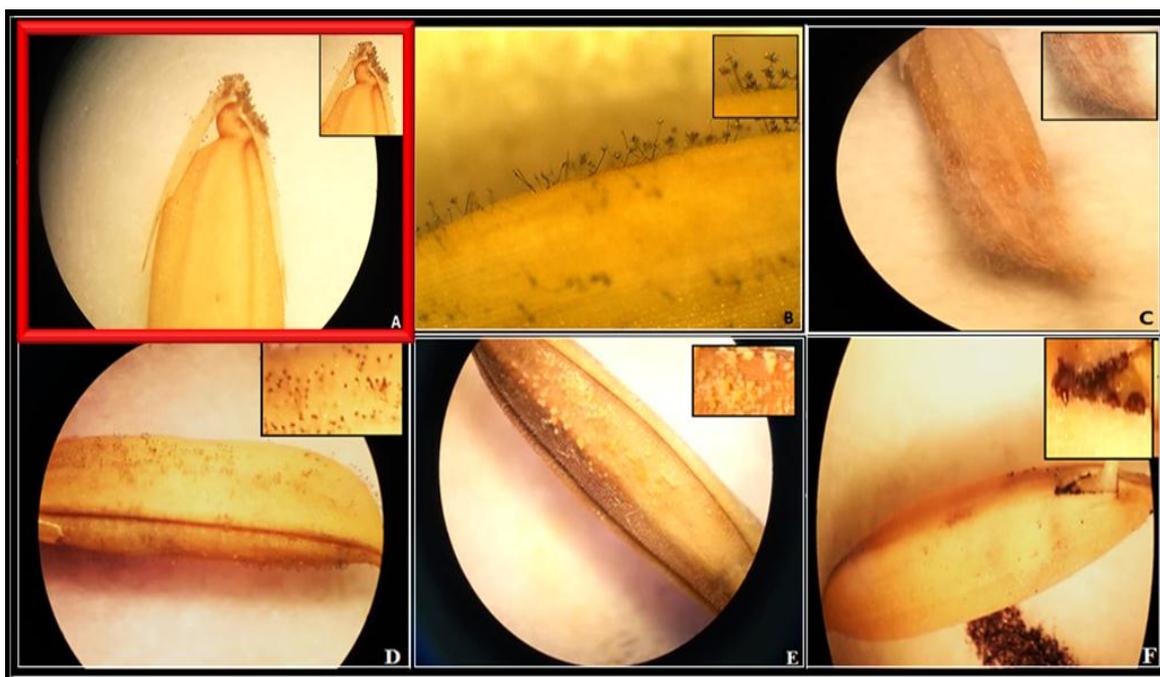
A inspeção direta muitas vezes pode ser insuficiente para a detecção de alguns microrganismos, para isso o Ministério da Agricultura recomenda o uso do método de incubação “blotter test” para análise e identificação de fungos (Figura 11). Segundo Henning (2005), a metodologia utilizada neste estudo apresenta como vantagem o acompanhamento do crescimento natural dos fungos em condições laboratoriais, no entanto, o autor afirma que alguns fungos de crescimento lento podem ser encobertos por outros que se desenvolvem rapidamente, o que dificulta a análise e dificulta o crescimento de alguns fungos de importância como *Peronospora manshurica* agente causal do míldio na soja.



**Figura 11.** Método de detecção “Blotter test”. (A) Caixa gerbox contendo amostra de sementes de arroz em papel filtro umedecido com água estéril; (B) qualidade das sementes, entre elas sementes deterioradas e sementes aparentemente livres de sinais de contaminação.

O lote selecionado possuía sementes consideradas isentas de sintomas, aparentemente manchadas, e sementes lesionadas. Após oito dias de condução do ensaio foi realizado o processo de identificação morfológica e caracterização comparativa das

estruturas, e diversos fungos foram identificados. Entre eles alguns de armazenamento, mas apenas os de maior relevância (Figura 12) contribuíram para continuidade deste trabalho. Entre os patógenos encontrados indentificou-se *M. oryzae*, *B. oryzae*, *R. oryzae*, *Curvularia spp.*, *M. albescens* e *P. sorghina*, como os mais predominantes, vistos por meio de uma amplificação em torno de 90x no aparelho estereoscópio e comparando-se suas estruturas morfológicas com as descritas em literatura.



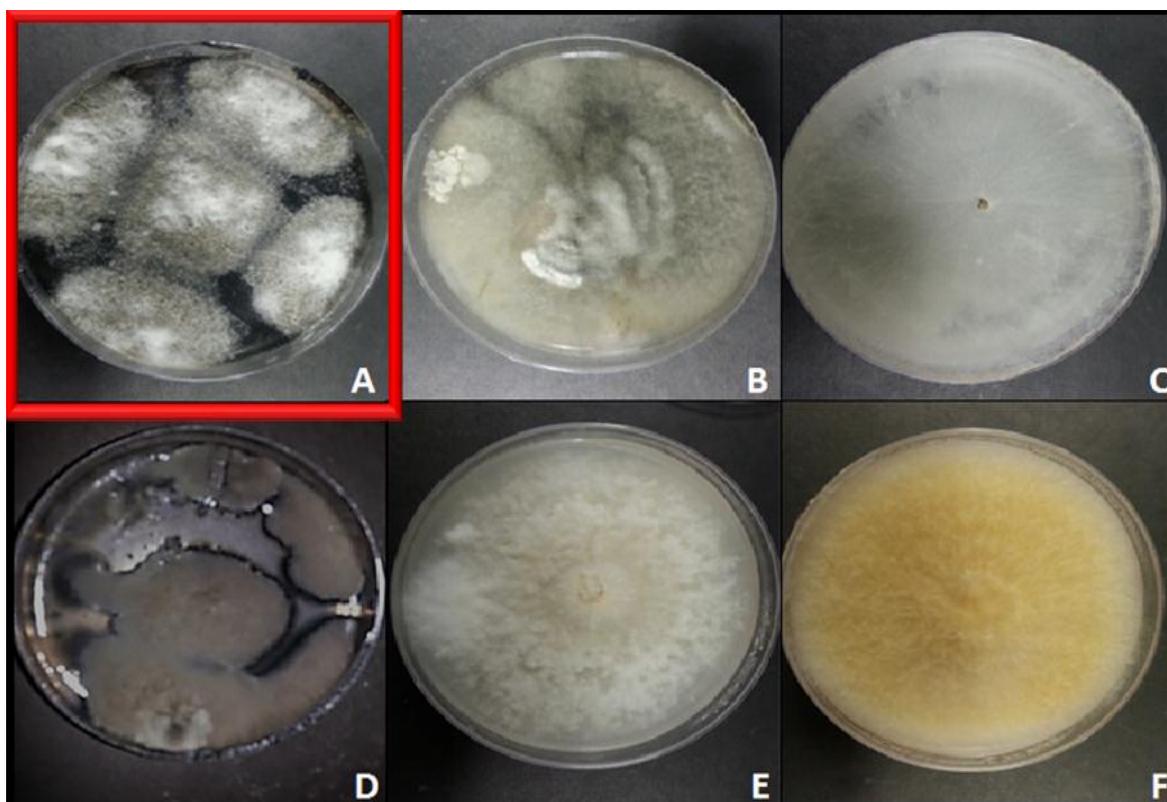
**Figura 12.** Estrutura dos principais patógenos fúngicos em sementes de arroz vistos sob aumento de 90x em aparelho estereoscópio. (A) *M. oryzae*; (B) *B. oryzae*; (C) *R. oryzae*; (D) *Curvularia spp.*; (E) *M. albescens* e (F) *P. sorghina*.

De acordo com o Manual de Análise Sanitária de Sementes do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento em casos de identificação detalhada de alguns microrganismos, quando a visualização em estereoscópio não é suficiente, é necessário o uso de alternativas, como o próprio isolamento do microrganismo. Teixeira (2014), em estudos com *M. oryzae* de trigo, relatou a dificuldade no processo de identificação em baixos níveis de infestação. Apesar da simplicidade de execução do método “*Blotter test*”, problemas após o período de incubação podem normalmente ocorrer durante a identificação das estruturas. Mesmo com auxílio de profissionais especializados dependendo da quantidade de patógenos presentes na amostra, e da semelhança entre as estruturas analisadas há tendências a diagnósticos incorretos que induzem a danos maiores,

como por exemplo, a falta de tratamento de sementes ou destinação inadequada das sementes (Atkins & Clark, 2004).

#### 4.2 ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DOS PATÓGENOS

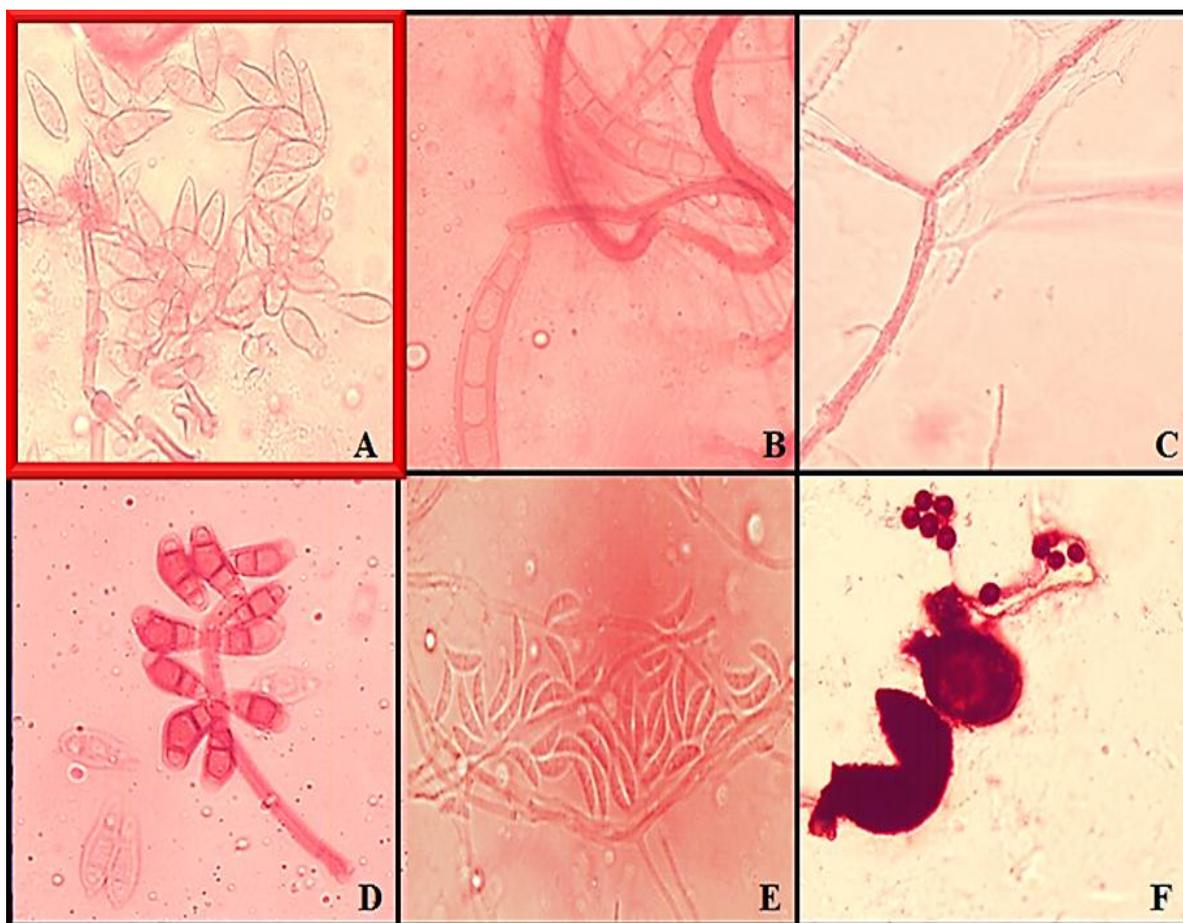
Após a análise comparativa por meio do estereoscópio, as estruturas foram coletadas e isoladas em meio BDA. Foram necessários, aproximadamente, 15 dias para que o crescimento dos patógenos se completasse, e durante esse período foram verificadas diariamente a pureza do isolamento, monitorando-se as características como cor e morfologia. Foram necessárias várias repetições devido a invasão de outros microrganismos, o que dificultou e prolongou ainda mais o processo. Entre os organismos invasores, os predominantes foram bactérias, ácaros e fungos, como *Penicillium sp.* e *Trichoderma spp.* Ao completar o crescimento sobre todo o meio, as estruturas (Figura 13) foram coletadas para análise microscópica, e o restante foi recolhido por meio da raspagem superficial do meio e utilizado no processo de extração de DNA.



**Figura 13.** Meio de cultura com os principais patógenos encontrados no lote de sementes (A) *M. oryzae*; (B) *B. oryzae*; (C) *R. oryzae*; (D) *Curvularia spp.*; (E) *M. albescens* e (F) *P. sorghina*.

### 4.3 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DAS ESPÉCIES

As estruturas foram montadas em lâmina, comparadas, e fotografadas por meio de um computador acoplado ao microscópio óptico. As lâminas foram cuidadosamente preparadas para que não ocasionasse perda de microrganismos, ou mesmo confusões com outros organismos presentes, gerando falso diagnóstico. A caracterização morfológica se deu por meio da comparação com estruturas já definidas, descritas no Manual de Análise Sanitária de Sementes e pelo Catálogo de Identificação de Espécies Fúngicas caracterizadas no Laboratório de Qualidade de Sementes da Embrapa Arroz e Feijão. O aumento utilizado nas fotografias variou até 400x, possibilitando melhor visualização das estruturas (Figura 14).



**Figura 14.** Identificação em microscópio das estruturas dos patógenos crescidos isoladamente. (A) *M. oryzae*; (B) *B. oryzae*; (C) *R. oryzae*; (D) *Curvularia spp.*; (E) *M. albescens* e (F) *P. sorghina*.

#### 4.4 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA EM SEMENTES

Apenas o DNA de *M. oryzae* extraído pelo método Dellaporta foi quantificado para fins comparativos com outros métodos de extração devido a alta qualidade do DNA extraído por esta metodologia, os demais materiais genéticos encontrados no lote de semente de arroz foram armazenados à temperatura de aproximadamente -20°C para trabalhos futuros de estudos moleculares. A quantificação do DNA de *M. oryzae* extraído pelo método Dellaporta foi realizada por espectrofotometria, utilizando o aparelho NanoDrop®. Os valores encontrados para as concentrações de DNA relacionados à proteína (A260/280) e para os metabólitos secundários junto aos componentes do tampão (A260/230) (Nanodrop, 2007), foram respectivamente 1,9 e 2,01, enquanto que a concentração de DNA por microlitro foi de 448,5 ng/μl, conforme os limites de pureza estabelecidos, atendendo satisfatoriamente a quantidades exigidas pelas técnicas de detecção molecular.

Os métodos NaOH e Cartão Whatman FTA (Classic Card) mostraram-se práticos e podem ser realizados em vários ambientes, sem a necessidade de aparelhos tecnológicos. O kit de extração pelo cartão FTA (Watman Biosci) é disponibilizado comercialmente, e baseia-se na adesão do DNA à superfície de uma base de celulose, facilitando a coleta de amostras em locais diversos sem que ocorra degradação. A técnica NaOH desenvolvida por Wang, et al. (1993) necessita apenas de simples etapas e dispensa o uso de temperaturas elevadas e aparelhos.

Os tratamentos (T1) e (T2) contiveram apenas uma semente com foco do fungo *M. oryzae*, apresentaram resultados positivos para amplificação por PCR, independente do processo de maceração no tratamento (T2) (Tabela 3). Os tratamentos (T1) e (T2) não apresentaram diferença visual, portanto, neste caso não houve alteração nas amostras maceradas (Figura 15). O processo de maceração foi para certificar se haveria também contaminação na parte interna ao tegumento. Lasca et al. (1987) em estudos com brusone provou que o patógeno pode permanecer tanto na parte interna como na parte externa da semente. Em concordância, outros autores afirmam que, o fungo pode contaminar o embrião em casos que a infestação é evidenciada antes do período de formação da semente (Amaral, 1987; Faivre-Rampant et al., 2013; Marcell et al. 2010). Portanto a maceração foi essencial neste estudo, já que não era conhecida a época de infecção do fungo.

Para certificar a eficiência do método de Extração NaOH, e para fins comparativos com os tratamentos de baixa infestação na superfície da semente, o tratamento (T3) consistiu na inserção direta do patógeno crescido em placa em grande concentração. A banda representando o tratamento (T3) não foi visivelmente mais nítida que a dos tratamentos com concentração limitada do patógeno (T1) e (T2), legitimando a eficiência do método independente da baixa infestação, portanto esta não foi uma barreira para a aplicação da metodologia.

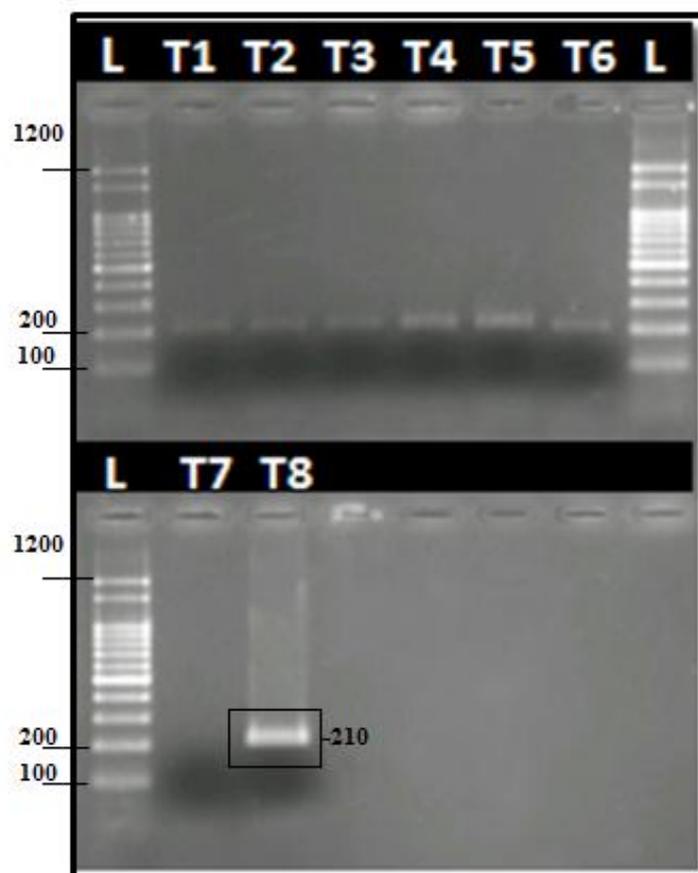
**Tabela 3.** Resultados da extração de DNA de *M. oryzae* em sementes realizada por diferentes tratamentos e metodologias.

	<b>Metodologia de Extração</b>	<b>Resultado</b>
T1	NaOH	DNA amplificado
T2	NaOH	DNA amplificado
T3	NaOH	DNA amplificado
T4	NaOH	DNA amplificado
T5	NaOH	DNA amplificado
T6	Cartão FTA	DNA amplificado
T7	Cartão FTA	DNA não amplificado
T8	Dellaporta	DNA amplificado (Controle)

Os tratamentos (T4) e (T5), ambos macerados, simularam as condições de campo, estabelecendo uma relação 1:5 (20%) para os dois tratamentos. Em (T4) independente da grande concentração do DNA de arroz, o resultado foi positivo e não houve inibição da reação, portanto, mesmo com a pequena quantidade de DNA de *M. oryzae* o material genético foi amplificado com sucesso. No tratamento (T5) simulando as condições mais próximas da realidade, diversos outros patógenos foram inseridos propositalmente. Apesar da quantidade do DNA de arroz e outros patógenos serem proporcionalmente maiores que a quantidade de DNA o de *M. oryzae*, estes não inibiram o processo de extração e amplificação do material genético do alvo via PCR.

Os Tratamentos (T6) e (T7) foram conduzidos pelo método de imobilização do DNA em cartão Whatman FTA (Classic Card). O tratamento (T6) foi o controle para o

método de extração FTA, com finalidade de validar o método assim como em (T3) foi feita a inserção direta do patógeno sobre o cartão. Em (T7) o tratamento foi o mesmo que em (T4), simulando as condições naturais de campo e desconsiderando a presença de outros patógenos. No tratamento controle (T6) o resultado foi positivo, já em (T7) não houve amplificação devido a pequena concentração de DNA do patógeno. O tratamento (T8) consistiu do DNA controle extraído pelo método Dellaporta e quantificado como referência para os demais em termos de concentração e pureza.



**Figura 15.** Fragmento de DNA de amplificado com iniciadores específicos de *M. oryzae* revelado por eletroforese em gel de agarose 2% comparando as metodologia NaOH, Cartão Watmam FTA e Dellaporta (controle). (L) Marcador molecular 1kb, **T1, T2, T3, T4 e T5** foram os tratamento conduzidos pelo método NaOH e **T6, T7** pelo cartão Watmam FTA, **T8** foi o DNA modelo extraído por Dellaporta.

Em experimento com FTA, Baratto & Megiolaro (2012), afirmaram não haver uniformidade nos resultados de seus experimentos, em alguns organismos foi possível extrair o material genético enquanto que em outros não, os autores concluem que essa heterogeneidade é proveniente da parede celular de alguns microrganismo. Neste estudo foi possível provar a eficiência do método FTA, excluindo a possibilidade de ser a parede

celular do fungo a responsável pelo problema de não amplificação, evidenciando o potencial do método durante o processo de extração diretamente do micélio. Neste caso a exclusão do método foi devido as condições de baixa infestação natural do patógeno. O método de extração pelo cartão FTA foi validado neste experimento, porém baixas concentrações de inóculo não são suficientes para eficiente amplificação por PCR, portanto, este método não é apropriado para a extração de patógenos diretamente da semente.

Visto que o objetivo foi encontrar um método rápido, prático, capaz de extrair DNA em baixas concentrações diretamente das sementes, excluindo-se a necessidade de variação de temperatura e uso de tecnologia com aparelhos sofisticados, o método mais indicado foi a extração por NaOH. Mesmo com a presença DNA de origens diversas, este método possibilitou extrair e identificar DNA de *M. oryzae* por meio de iniciadores específicos. A presença limitada do patógeno também não foi um obstáculo para o método, quando comparada a extração direta do patógeno crescido em meio de cultura.

A qualidade do DNA é outro fator importante a ser considerado ao observar as bandas no gel fotodocumentado. O não surgimento de bandas degradadas é devido ao acréscimo do tampão Tris pH 8.0 que paralisa a ação das enzimas citado por Wang, et al. (1993). O autor testou a metodologia com sete diferentes espécies de plantas e em todas obteve sucesso, assegurando que a técnica é bastante eficiente e não necessita de tratamentos orgânicos com solventes (proteínase), dispensando também o uso de temperaturas elevadas. Outra vantagem é a economia de tempo, considerando, a redução das possíveis contaminações cruzadas.

Para validar os resultados obtidos, as amostras foram comparadas de acordo com o padrão de peso molecular das bandas, e todas apresentaram a mesma altura correspondente ao DNA controle (T8). Portanto, apesar de outros materiais genéticos estarem presentes numa mesma amostra, como é o caso de (T4) e (T5), a amplificação manteve o padrão de bandas, o que significa que os materiais amplificados são do patógeno em estudo, devido a utilização de um conjunto de iniciadores específicos baseado na sequência do DNA de *M. oryzae* de arroz.

#### 4.5 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE DETECÇÃO POR LAMP

##### 4.5.1 Seleção da região do genoma e desenho dos iniciadores

Embora o genoma de *M. oryzae* tenha sido totalmente sequenciado nem todos os genes já estão caracterizados (Dean et al., 2005). O conhecimento da função do gene facilita a projeção de iniciadores específicos, como por exemplo, iniciadores posicionados a partir de regiões conservadas, que evitam amplificação de regiões similares em organismos com características genéticas próximas a de *M. oryzae* de trigo e outras gramíneas. Existem poucos relatos na literatura sobre desenvolvimento de marcadores específicos para *M. oryzae*, mesmo com o sequenciamento total do genoma. A região *Mif23* selecionada para a projeção dos iniciadores LAMP neste estudo é pouco conhecida, e não se sabe ao certo sua função.

A escolha da região foi embasada em experimentos conduzidos por meio de técnicas moleculares, que utilizaram a sequência para obtenção de iniciadores específicos para PCR com sucesso (Chadha & Golapalakrishna, 2006). A região *Mif 23* está relacionada a formação do apressório, denominada estrutura especializada de penetração do patógeno na planta. De acordo Lee & Dean (1993) em *M. oryzae* ocorrem alterações drásticas na expressão dos genes durante o processo germinação de esporos e formação do apressório. Oh, et al.(2008) durante processos indutivos para formação de apressório também verificou vários comportamentos, sendo expressos cerca 357 genes simultaneamente. Portanto, é possível que o gene *Mif23* não esteja envolvido exclusivamente na formação da estrutura infecção, e pode ser expresso em resposta a outros estímulos ambientais. O autor afirma também que o papel do gene durante a formação e infecção do apressório continua sendo indeterminado (Chadha & Golapalakrishna, 2006). Entretanto, a escolha dessa sequência foi devido à alta especificidade do teste de PCR anterior.

O programa utilizado para a projeção de iniciadores LAMP gerou nove conjuntos, no entanto, após a análise, três conjuntos de iniciadores foram desclassificados de acordo com o valor de energia livre ( $\Delta G$ ), que significa a diferença entre a energia livre do produto e a energia livre do reagente, que ao atingir valores maiores  $-4\text{kcal}$  torna-se pouco estável. Portanto, de acordo com o Guia para desenho de *primers* LAMP (Primer explorer V4), apenas seis dos nove conjuntos gerados apresentaram potencial para ser utilizados (Figura 16).

PrimerExplorer V4
Software

DesignId 140722224922

---

**Primer Information**

Py1 ID:1 dimer(minimum)dG=-2.38  
label 5'pos 3'pos len Tm 5'dG 3'dG GCrate Sequence

F3	744	762	19	59.86	-5.66	-5.74	0.53	GTGGTGCCTTACATGACGT
B3	946	963	18	60.45	-5.01	-6.02	0.61	CTTTGCCAGTGCAGACGG
FIP			41					GATACCGAGGGCGCAACAGTG-TGCTGACATCTCCTAACCGT
BIP			41					AGCTGGTACTCGAGCAACAGC-GGAACTGAGCTTGGGACATT

---

**Primer Information**

Py2 ID:18 dimer(minimum)dG=-2.33  
label 5'pos 3'pos len Tm 5'dG 3'dG GCrate Sequence

F3	1045	1063	19	59.46	-4.25	-5.90	0.58	GATCAGGTAGTGCCACAGC
B3	1235	1254	20	60.30	-6.10	-4.23	0.55	TCCTGCCCTAACTGGTACAG
FIP			38					CGGTCTGACCCGATTGG-GCGACAGCTCTAGCAACC
BIP			40					GACAAACTTTGTGGCGGGCG-TGGCTTGTGTGTCAGGCTTAC

---

**Primer Information**

Py3 ID:4 dimer(minimum)dG=-0.98  
label 5'pos 3'pos len Tm 5'dG 3'dG GCrate Sequence

F3	754	773	20	59.17	-4.46	-4.29	0.45	ACATGACGTTGCTGACATCT
B3	947	964	18	59.43	-4.02	-5.68	0.56	TCTTTGCCAGTGCAGACG
FIP			39					ATCCGATACCGAGGGCGCAA-CCTAACCGTGCTACCAGA
BIP			40					GGTACTCGAGCAACAGCGCC-GGAACTGAGCTTGGGACATT

PrimerExplorer V4
Software

DesignId 140722224922

---

**Primer Information**

Py4 ID:16 dimer(minimum)dG=-1.96  
label 5'pos 3'pos len Tm 5'dG 3'dG GCrate Sequence

F3	1009	1026	18	59.24	-7.42	-5.50	0.61	GCGCAGCTACTACCACTG
B3	1208	1227	20	60.05	-5.75	-4.58	0.50	TGGCTTGTGTGTCAGGCTTAC
FIP			38					GGTTGCTAGAGCTGTCCCG-CCGATGCGGGATCAGGTA
BIP			40					CCAAATCCGGGTGAGGACCG-AGCGACAACACCAAGGAATC

---

**Primer Information**

Py5 ID:21 dimer(minimum)dG=-2.24  
label 5'pos 3'pos len Tm 5'dG 3'dG GCrate Sequence

F3	1081	1098	18	59.55	-6.59	-6.01	0.61	GCGCAGCTCTAGCAACC
B3	1267	1284	18	60.24	-4.34	-5.79	0.56	AAATCGGGCTTGGCGTTC
FIP			39					GGATCCAATGGCGGCAACTG-CGTCACCAATCCGGGTC
BIP			40					TCGCTGCTTTGTAAGCCTGACA-AACAGCTCCTCGTCTGTC

---

**Primer Information**

Py6 ID:7 dimer(minimum)dG=-2.16  
label 5'pos 3'pos len Tm 5'dG 3'dG GCrate Sequence

F3	817	834	18	59.59	-7.36	-4.76	0.61	CCGCCTCGGTATCGGATA
B3	1001	1018	18	59.26	-4.81	-4.20	0.61	GTAGCTGCGCCAGAAGAG
FIP			42					CCGAGTTAATAGCGCGCTGTT-TCAACGCATACACAAGCACT
BIP			38					GCTCAGTTCTATGCGGCG-CCTTGGTGGCAGTGGAAAG

**Figura 16.** Iniciadores projetados a partir do gene *mif23* por meio do software Primer Explorer V4 para identificação de *M. oryzae* pela técnica LAMP. Os Conjuntos estão representados por Py1, Py2, Py3, Py4, Py5 e Py6, e são compostos por iniciadores externos (F3/B3 e FIP/BIP).

#### 4.5.2 Compatibilidade dos iniciadores externos para reconhecimento de *M. oryzae*

Diferentemente da técnica molecular PCR, em que são utilizados apenas dois iniciadores (forward e reverse), a LAMP é caracterizada pelo uso de um conjunto de quatro iniciadores (F3/B3 e FIP/BIP), que em grupo se ligam a seis regiões em condições de amplificação isotérmica. Os iniciadores externos projetados para LAMP podem também ser usados em PCR, formando uma única banda (Figura 17).

Os seis conjuntos projetados (Py1, Py2, Py3, Py4, Py5 e Py6) tiveram seus iniciadores externos submetidos a PCR para verificar sua compatibilidade com o material genético de *M. oryzae*, e todos foram comparados à amostras sem DNA (Controle negativo absoluto). A amplificação da região alvo do DNA de *M. oryzae* foi conferida pelos iniciadores, portanto, todos os seis conjuntos externos apresentam potencial para aplicação e reconhecimento por meio do LAMP.



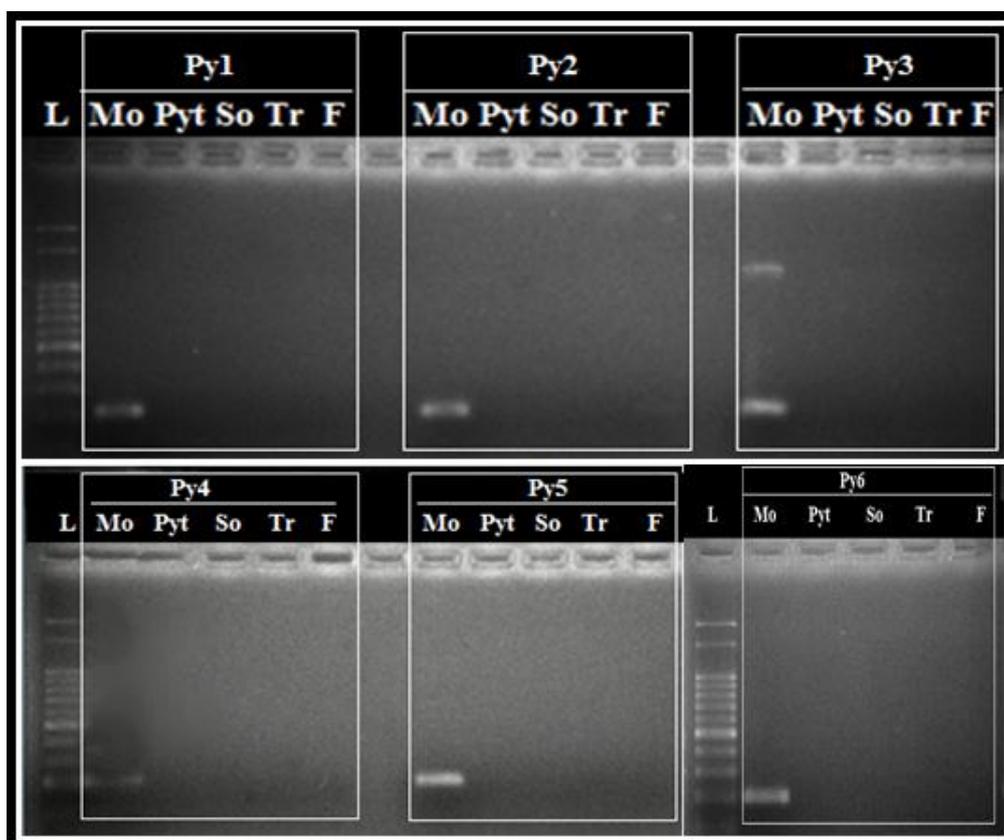
**Figura 17.** Amplificação de *M. oryzae* pelos iniciadores F3/B3, analisados por eletroforese em gel de agarose 2% para cada um dos conjuntos projetados. (L) Marcador molecular 1Kb, Py1, Py2, Py3, Py4, Py5 e Py6 conjuntos de iniciadores externos.

#### 4.5.3 Especificidade dos iniciadores externos

A seletividade dos iniciadores é uma característica indispensável, pois, assim como simulado na extração de DNA citada anteriormente, em condições de campo são encontrados diversas outras espécies de microrganismos. Para comprovar a especificidade dos iniciadores externos, os seis pares foram testados com patógenos de origens diversas.

Os iniciadores foram comparados ao material genético de *M. oryzae* de trigo, geneticamente relacionada com a *M. oryzae* de arroz, cujo estado perfeito também é denominado *M. oryzae*. Morfologicamente, alguns autores afirmam que a pequena variação existentes nos conídios são insuficientes para distinguir os agentes causadores da brusone (Choi et al., 2013).

Além de brusone de trigo que é classificada no mesmo subgrupo de brusone de arroz, outras espécies fungicas também foram selecionadas. Para o teste de especificidade e refinamento de LAMP, os seis conjuntos de iniciadores externos foram submetidos as mesmas condições de amplificação via PCR, e os materiais genéticos selecionados foram *M. oryzae* de trigo (Pyt), *S. oryzae* (So), *Trichoderma spp.* (Tr) e *Fusarium sp.* (F), em comparação com *M. oryzae* (Mo) do arroz. Por meio do gel de eletroforese fotodocumentado, foi verificado que todos os iniciadores amplificaram a sequência alvo e para os demais patógenos não ocorreu formação de bandas, portanto estes foram considerados específicos para a detecção de *M. oryzae* do arroz (Figura 18).



**Figura 18.** Teste de especificidade com todos os conjuntos projetados (Py1, Py2, Py3, Py4, Py5, Py6) usando apenas os iniciadores externos F3/B3 (L) Marcador molecular 1 Kb. Cada iniciador foi testado com (Mo) *M. oryzae* (DNA alvo); e comparado á DNAs de origem diversas (Pyt) *M. oryzae* de trigo; (So) *S. oryzae*; (Tr) *Trichoderma spp.* e (F) *Fusarium sp.*

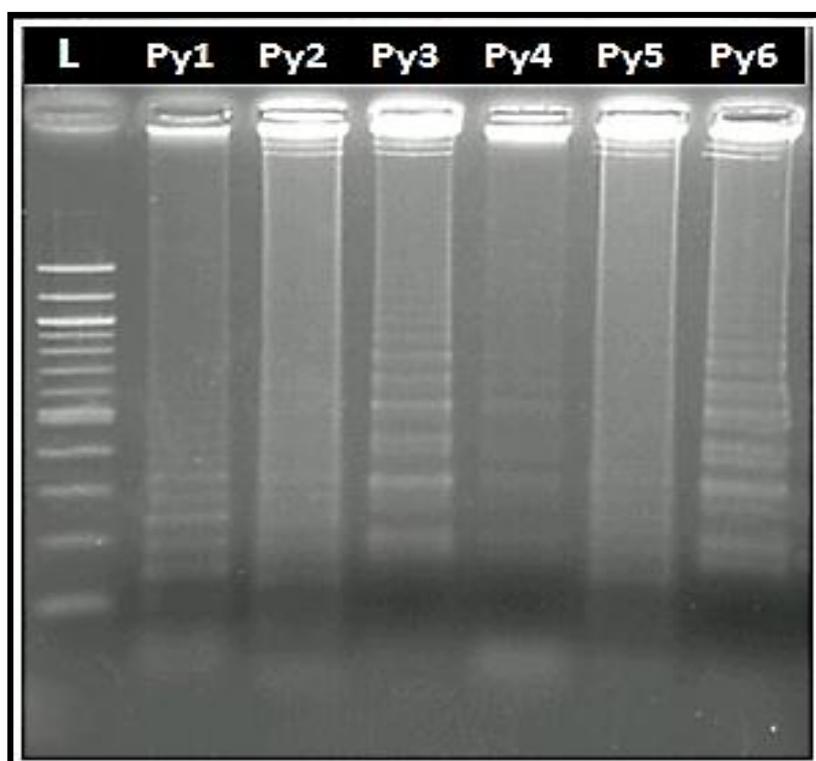
Propositalmente, os agentes causais de brusone de trigo e brusone de arroz foram comparados para apurar minuciosamente a especificidade dos iniciadores, pois, além da semelhança entre os isolados (Prabhu et al., 1992), o agente causal da brusone arroz também é capaz de infectar trigo, no entanto, isolados de trigo não são capazes de infectar arroz (Couch et al, 2005). Com isso torna-se ainda mais necessário a análise molecular, pois, uma vez encontrado um conídio de *M. oryzae* de trigo em sementes de arroz, somente com a informação visual ou mesmo análise microscópica não é possível diagnosticar e dar finalidade a determinado lote por meio de análise morfológica.

Mesmo com a proximidade morfológica entre os isolados de *M. oryzae* de arroz e trigo, por meio deste experimento foi comprovado que por análise molecular é possível distingui-los, e os marcadores moleculares altamente específicos para diagnose podem também ser utilizados para identificar o agente causal da brusone de arroz em regiões tritícolas atacadas com o patógeno. O sucesso na projeção do iniciador específico é devido a diferenciação entre os genomas, pois, isolados patogênicos ao arroz possuem de 40 a 50 sequências de nucleotídeos repetitivas, enquanto que os isolados das demais gramíneas é proveniente de isolados com poucas sequências repetitivas (Hamer et al.,1989). Segundo Couch & Kohn (2002) isolados provenientes de outras gramíneas pertencem a grupos filogenéticos distintos ao do arroz.

#### **4.5.4 Teste de seleção entre os conjuntos de iniciadores completos**

Os produtos de LAMP obtidos são amplificados em etapa única, em que vários ciclos de amplificação são realizados por um grupo de quatro iniciadores em ação complementar (FIP/BIP e F3/B3). Um fator crucial para o bom desempenho da técnica é o projeto dos iniciadores, que mesmo seguindo as especificações recomendadas pelo manual, podem não atender às características estabelecidas. Para isso, foi verificado se os seis conjuntos de iniciadores projetados possuem capacidade de amplificar o gene alvo e apresentam um padrão de peso molecular correspondente. As reações foram conduzidas individualmente em placas vedadas, de acordo com o protocolo de recomendações para LAMP, e a análise do produto gerado por LAMP foi realizada por meio da fotodocumentação da eletroforese em gel de agarose 2%.

As reações foram representadas pela sigla que nomeia o conjunto de iniciadores Py1, Py2, Py3, Py4, Py5 e Py6. Os seis conjuntos apresentaram potencial para uso em LAMP, e os produtos apareceram como uma escada de bandas múltiplas, o que era esperado de acordo com Notomi et al. (2000) (Figura 19). Embora fosse necessário padronização para todos os conjuntos, Py3 e Py6 foram os que melhores representaram o padrão de bandas que caracteriza a técnica, portanto, ambos foram escolhidos para dar continuidade aos testes e observar qual melhor se destaca em termos específicos, visto que o objetivo inicial era conseguir ao menos um que alcançasse resultado satisfatório.



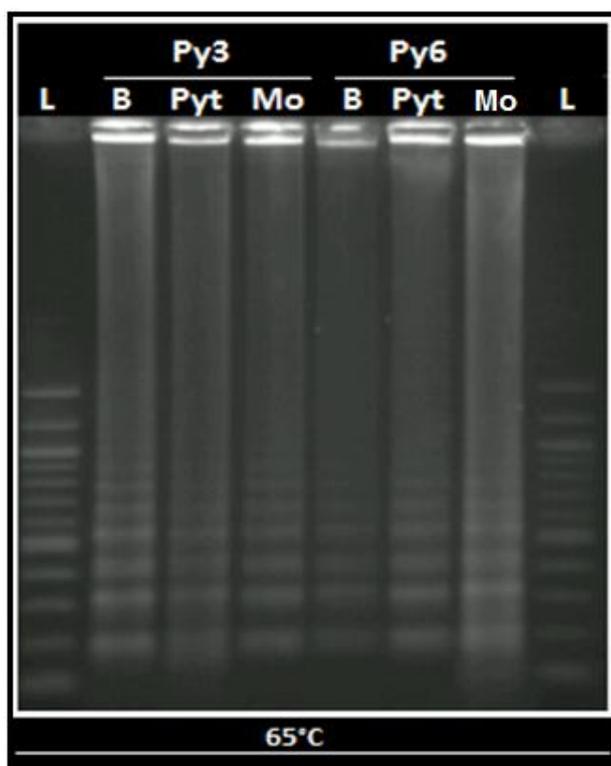
**Figura 19.** Teste comparativo entre o padrão de bandas formado (escada) com todos os conjuntos de iniciadores (FIP/BIP e F3/B3) projetados para a detecção de *M. oryzae* (Py1, Py2, Py3, Py4, Py5, Py6), (L) Marcador molecular 1Kb.

#### 4.5.5 Especificidade dos iniciadores pré-selecionados

Foi realizado um segundo teste com os iniciadores Py3 e Py6, com objetivo de verificar alguma particularidade entre eles, priorizando a capacidade de detecção específica. Os dois conjuntos de iniciadores foram submetidos as mesmas condições, em teste com uma amostra sem DNA (B), uma amostra contendo material genético de *M. oryzae* de trigo (Pyt), e por último uma amostra com o DNA alvo (Mo). Todas foram

conduzidas em placas vedadas com selo de silicone arredondado, sob temperatura constante de 65°C, controlada em aparelho termociclador.

Em todas as amostras houve amplificação, até mesmo nas quais não havia a presença de DNA (Figura 20). O surgimento de falso-positivo é uma ocorrência comum para LAMP, e pode ser provocado por diversos fatores. Entre os problemas mais frequentes está a não esterilização dos materiais utilizados durante o preparo da reação, o uso repetitivo de objetos laboratoriais já utilizados para este procedimento (Parida et al., 2008), a contaminação dos reagentes e dos iniciadores em outras ocasiões (Enomoto et al., 2005; Kong et al., 2012), o manuseio de amostras de DNA alvo no mesmo ambiente em que se conduziram as demais amostras, temperaturas inadequadas, evaporação e transmissão de material de uma amostra para outra em casos de má vedação durante o processo de amplificação (Tao et al., 2011), e a abertura dos tubos de reação após amplificação em ambiente de preparo do mix de reação.



**Figura 20.** Surgimento de falso-positivo em seleção do conjunto de iniciadores com base na detecção específica por LAMP.

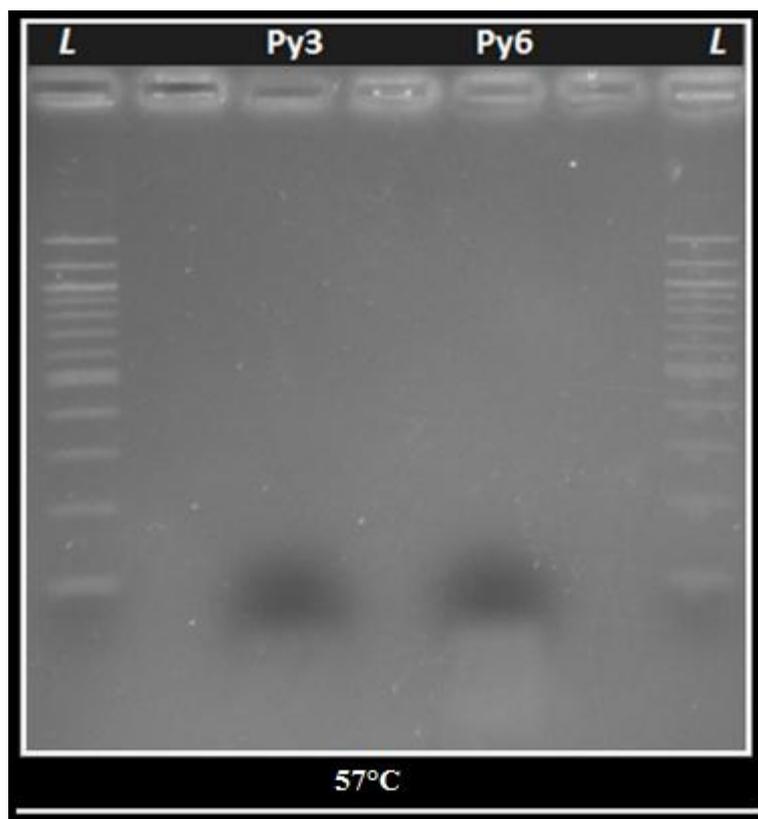
Wang et al. (2015) realizou o primeiro experimento sobre formação de falsos-positivos em LAMP. O autor afirma que apesar da técnica ter surgido há mais de uma

década, até então ainda não havia sido relatado em estudos as causas da amplificação não específica, e a maioria até o momento concentrou-se na condução do procedimento em tubo fechado.

Eliminar todas hipóteses de erro foi necessário para diagnosticar se a técnica realmente poderia ser aplicada com segurança no diagnóstico de *M. oryzae*. Segundo Konstantinova et al.(2002), para se considerar adequado, um diagnóstico deve ser sensível e específico, eliminando reações cruzadas com possíveis fungos presentes nas amostras. Portanto, testes foram realizados para verificar a contaminação dos iniciadores juntamente com os reagentes, e para isso um ambiente limpo foi escolhido para eliminar a possibilidade de interferência sobre os resultados antes e depois do processo de amplificação. As amostras foram preparadas sem a presença de material genético de qualquer espécie, e no lugar do DNA foi adicionada água Milli-Q estéril. Houve também uma redução na temperatura para 57°C, e foram usados tubos individuais para termocicladores com tampa plana e extra-forte.

Por meio da eletroforese em gel de agarose pode se observar que não houve formação de bandas (Figura 21), indicando que os iniciadores e reagentes estavam isentos de contaminação, em casos críticos de ocorrência de contaminação recomenda-se a concepção de novos iniciadores (Wang, et al., 2009). Porém outras mudanças foram necessárias para esse diagnóstico, como as condições de esterilização, a temperatura e os tubos individuais (antes conduzidos em placas), que também foram analisadas para verificar o que estava ocasionando o problema. Devido a sensibilidade da técnica, conduzir as amostras em ambiente limpo e com materiais estéreis é primordial para impedir a formação de falso-positivo.

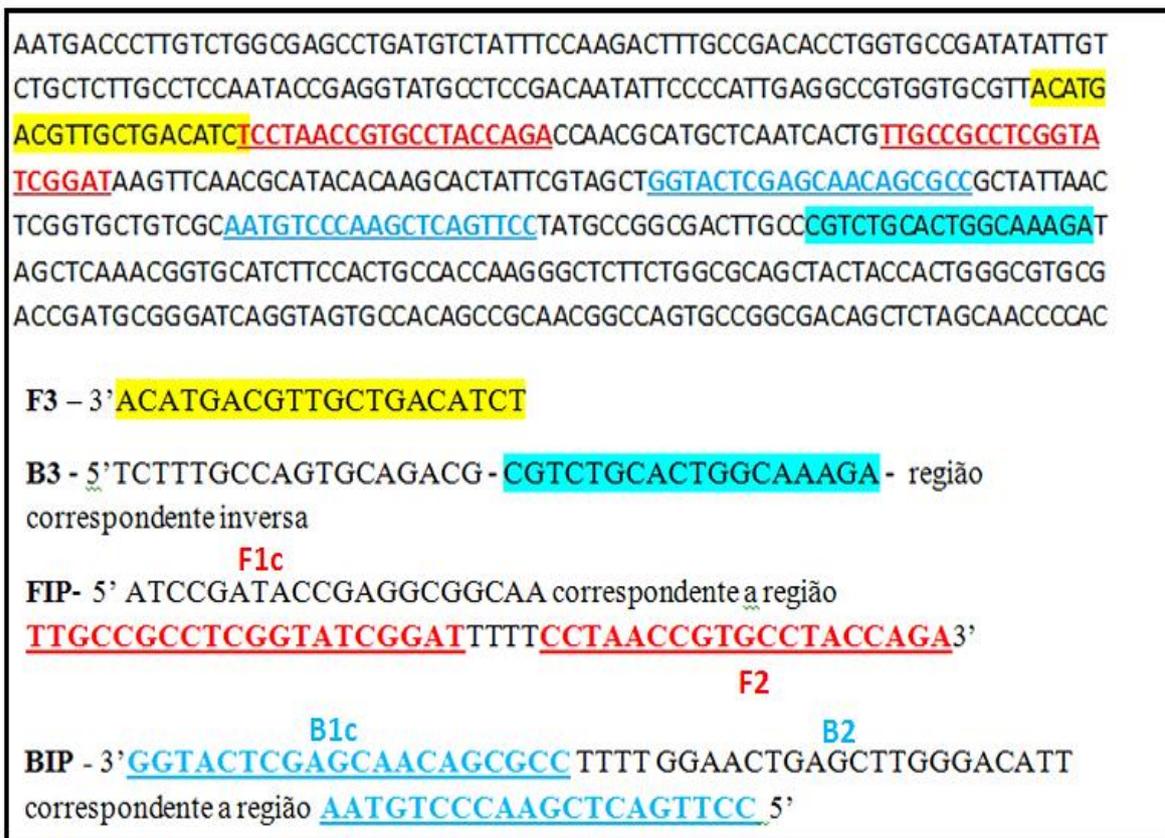
Outro fator que pode ter levado a contaminação foram as placas usadas no primeiro teste, pois o material pode ter sofrido dilatação durante a elevação da temperatura, permitindo a passagem do aerosol por meio da evaporação, contaminando o ambiente e as próximas reações. Tomita et al.(2008) afirmam que o processo de evaporação pode levar a contaminação cruzada, induzindo a formação de falso-positivos. Wang et al. (2009) recomendam tubos com tampas para a execução do procedimento e ao término o descarte em sacos plástico ou recipientes que não permitam a contaminação do local. Todavia a temperatura também foi modificada, fator que pode ter influenciado no processo de dilatação, ou mesmo na amplificação dos iniciadores.



**Figura 21.** Reação LAMP sem DNA para verificar a causa do surgimento de falso-positivo. Reagentes e conjunto de iniciadores Py3 e Py6 (mesmos usados no teste anterior), temperatura reduzida, vidrarias e condições de esterilização. (L) Marcador molecular 1Kb.

#### 4.5.6 Padronização da temperatura de amplificação para o iniciador Py3

A análise comparativa dos iniciadores Py3 e Py6 foi importante para averiguar se haveria particularidade entre um ou outro, o que não ocorreu nos testes anteriores, mas possibilitou comprovar que o surgimento de falso-positivo foi devido ao erro no processamento das amostras, evitando um possível descarte equivocado, pois, ao ver que a contaminação foi em ambos os testes, levantou-se a hipótese de que o problema poderia não ser nos iniciadores. Já que não houve nenhuma vantagem de um em relação ao outro durante os dois procedimentos realizados, a escolha do conjunto de iniciadores foi baseada na comparação entre o padrão de bandas formadas. A interpretação da figura (com todos os *primers*) possibilitou reconhecer Py3 (Figura 22) como conjunto de iniciadores que sobressaiu em relação aos demais, devido a geração de uma escada de bandas múltiplas comparativamente melhor, decorrente da boa formação dos *loops* (haste) durante a fase cíclica.



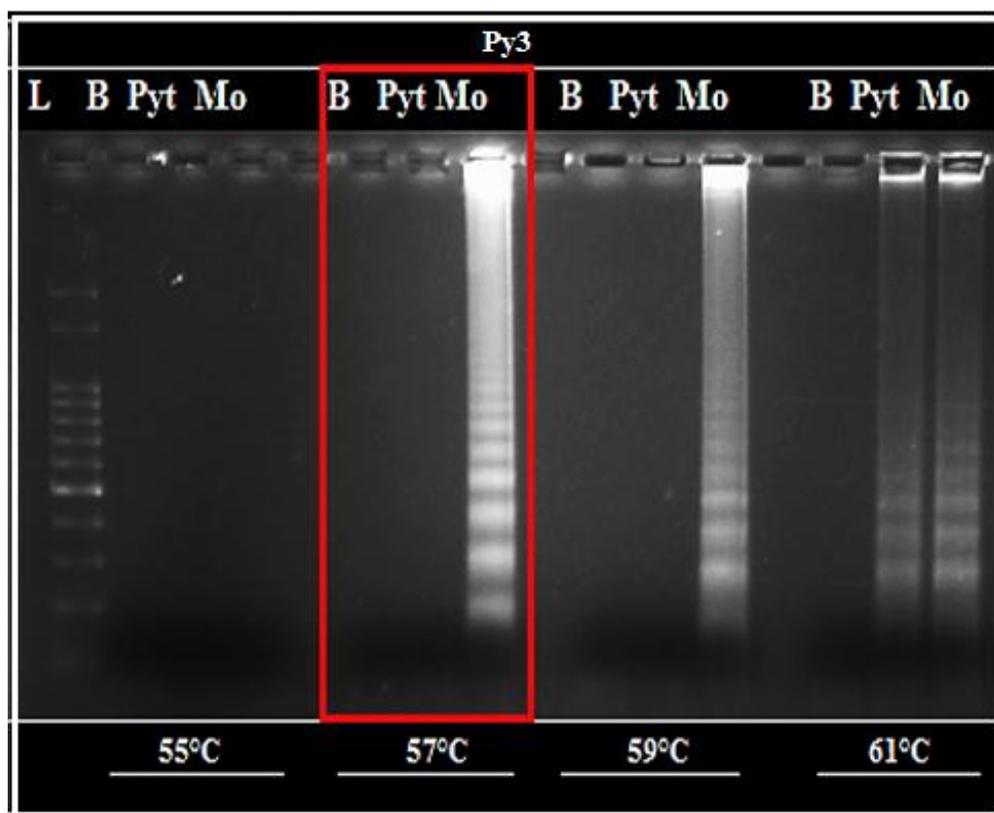
**Figura 22.** Localização do conjunto de iniciadores Py3 no gene *Mif23*. Iniciador F3 representado em amarelo, B3 o iniciador esta descrito em preto, más corresponde região representado pelo realce de texto azul em ordem inversa (inversão da ordem 5'), FIP sublinhado em vermelho unidos por quatro Timinas para formação dos LOOPS (localizados no gene em regiões separadas), BIP sublinhado em azul unido por quatro Timinas. As regiões F1c e B2 estão invertidas no gene (5') e representadas pela região correspondente, para facilitar o entendimento as regiões foram apresentadas em cores diferentes no quadro acima demonstrando a localização no gene.

O iniciador escolhido foi testado sob diferentes temperaturas, com finalidade de verificar qual melhor amplificava as regiões alvo de acordo com a técnica LAMP. O processo de preparo das reações foi realizado em tubos com tampa, e as condições de esterilização foram as mesmas citadas anteriormente. Em cada temperatura foi testado uma amostra sem DNA (B), um controle negativo *M. oryzae* de trigo (Pyt) e por ultimo o DNA alvo (Mo). As temperaturas foram selecionadas aleatoriamente, e a avaliação do conjunto de iniciadores Py3 foi a 55°C, 57°C, 59°C, 61°C. O produto da amplificação foi visto por meio da eletroforese em gel a 2%, e a análise comparativa entre as temperaturas possibilitou respostas importantes sobre a forma de condução da técnica.

A condição de 55°C não foi compatível ao conjunto de iniciadores Py3 por não apresentar produtos amplificados, as temperaturas 57°C e 59°C apresentaram resultados

positivos, com amplificação específica, vista por meio da formação de bandas padrão LAMP nas amostras com o DNA alvo. À 61°C a amostra alvo foi amplificada, no entanto, houve formação de falso positivo na amostra com DNA de *M. oryzae* de trigo. Apesar de 59°C também gerar bandas características ao LAMP, à 57°C o padrão gerado foi nitidamente mais forte indicando melhor formação dos *loops* na fase cíclica.

O iniciador foi caracterizado como extremamente seletivo quanto a condição isotérmica. A temperatura ideal de trabalho foi considerada ótima a 57°C, podendo haver uma pequena variação até 59°C, considerando a manutenção da qualidade do padrão de bandas formado, como mostra a Figura 23. É importante redobrar a atenção quanto a temperatura do banho seco, pois, de acordo com o gel fotocomentado, quanto maior a temperatura maior a probabilidade de surgimento de falso-positivo para este conjunto de iniciadores, gerando diagnósticos inadequados. Temperaturas inferiores a 57°C também são inapropriadas para este conjunto de iniciadores e podem mascarar os resultados, não amplificando o DNA alvo.



**Figura 23.** Aperfeiçoamento da temperatura ideal de amplificação para o conjunto Py3 (F3/B3 e Fip/BIP) nas temperaturas (55°C, 57°C, 59°C, 61°C). (B) Branco(amostra sem DNA); (Pyt) Dna de *M. oryzae* de trigo; (Mo) DNA alvo de *M. oryzae*, (L) Marcador molecular 1Kb.

Wang, et al.(2015), em estudos visando reduzir a formação de falsos-positivos também determinou 57°C como temperatura ideal para o patógeno. Segundo o autor o aumento da temperatura induz a formação de falso-positivos. Entretanto, é suposto que no primeiro caso (Figura 20), além da contaminação durante o procedimento, a temperatura 65°C pode ter influenciado na formação de falso-positivos, pois, de acordo com o gel e em concordância com o experimento de Wang, et al. (2015), é notável que o aumento da temperatura induz simultaneamente o surgimento de falso-positivos para estes conjuntos de iniciadores.

#### **4.5.7 Aprimoramento do tempo necessário para amplificação**

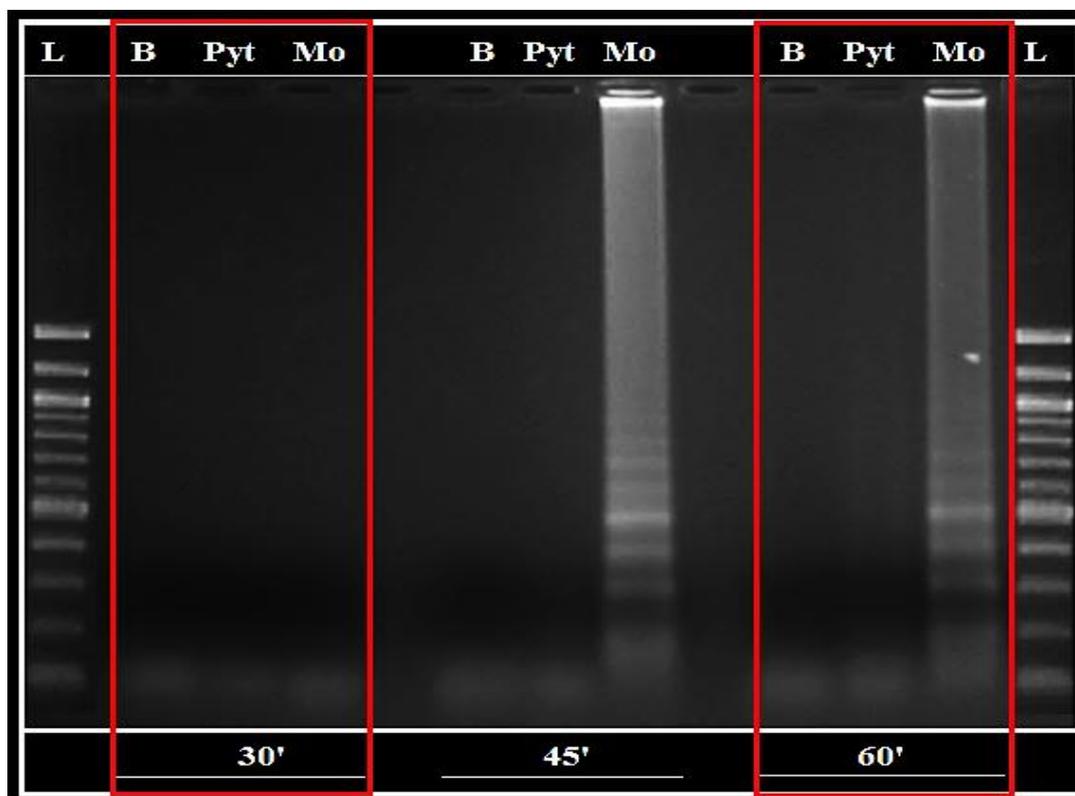
O método LAMP é caracterizado pela sensibilidade, especificidade, e eficiência em diagnóstico de doenças, e de eventos específicos com base em DNA. Além da praticidade no preparo, por meio da técnica é possível reduzir o tempo necessário para o processo de amplificação, variando de 30 a 90 minutos, de acordo com os iniciadores, em que este último raramente é necessário.

Para verificar qual o tempo mínimo necessário para amplificação de DNA de *M. oryzae*, os testes foram realizados no período de 30, 45 e 60 minutos. As amostras foram comparadas por meio da análise da LAMP em gel de agarose 2% (Figura 24), o período de 30 minutos foi insuficiente para que a amplificação ocorresse, já nos intervalos 45 minutos e 60 minutos o DNA alvo foi amplificado. No entanto, neste estudo foi frisada a agilidade no processo de detecção do patógeno e o período mínimo de 45 minutos foi considerado suficiente para amplificação de *M. oryzae*.

Wang, et al.(2015) afirmam que aumentar o tempo de amplificação para 1 hora, há tendências de amplificação não-específica nos controles negativos, e que reduções em torno de 40 minutos e 50 minutos diminuem a possibilidade de erros. Tang, et al. (2011) também consideraram como apropriado para a amplificação de *Listeria monocytogenes* o tempo de 40 minutos.

Estudos realizados com transgenia em cana-de-açúcar consideraram como ideal exatamente 60 minutos. Segundo o autor, a durabilidade do processo de amplificação varia de acordo com o tamanho do DNA alvo (Zhou, et al., 2014). Rocha (2012) em experimentos para diagnóstico pré-natal não invasivo para determinação do sexo, considerou como tempo mínimo, a amplificação a 60 minutos. Portanto, as informações

disponíveis consideradas ótimas em experimentos com redução do surgimento de falsos-positivos são particulares, e cada iniciador deve ser padronizado até que se determine o tempo considerado ideal para a amplificação sem a interferência de outros fatores.



**Figura 24.** Tempo mínimo necessário para a amplificação do Kit LAMP. Testados sob um período de 30', 45' e 60'. (B) Branco/ amostra sem DNA; (Pyt) DNA de *M. oryzae* de trigo; (Mo) *M. oryzae*/ DNA alvo (L) Marcador molecular 1Kb.

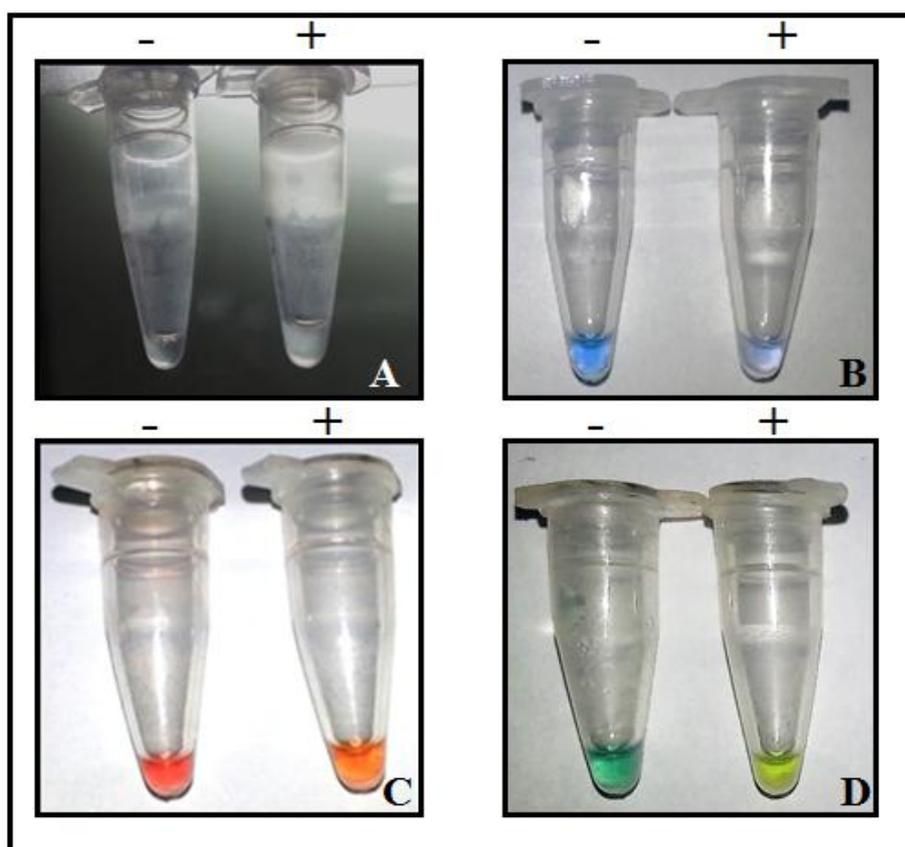
#### 4.5.8 Diagnose molecular observada por colorimetria

O ponto chave da tecnologia LAMP é a possibilidade de interpretação das análises moleculares por meio da visualização direta, facilitando o diagnóstico em laboratórios ou locais pouco equipados ou de baixa tecnologia. Após as etapas de adequações em laboratórios torna-se dispensável a visualização dos resultados por meio da eletroforese em géis de agarose, que além de dispendiosa, exige várias etapas, profissionais e instrumentação especializada, prolongando o tempo para obtenção de resultados.

Uma reação positiva é interpretada pela turbidez gerada, potencializada por meio da adição de corantes intercalantes ou indicadores de pH. Neste estudo foram utilizados três corantes para identificar qual apresentaria maior discrepância, facilitando o

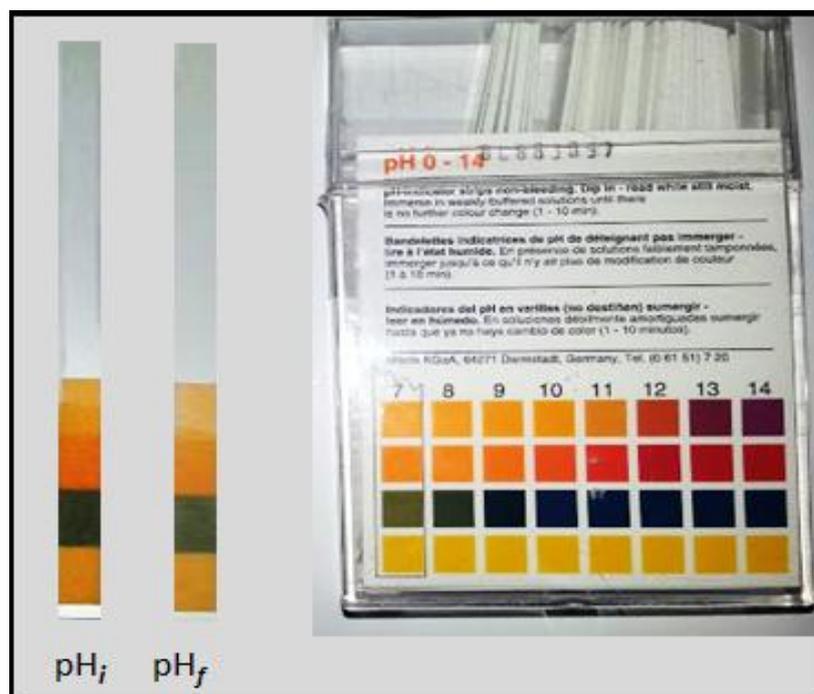
diagnóstico tanto por profissionais especializados quanto por leigos. Os corantes utilizados foram Phenol red, Hydroxynaphthol blue (HNB), Bromothymol blue (BTB) todos são indicadores de pH, foram selecionados por não necessitarem de luz ultravioleta como por exemplo Brometo de etídeo e SYBR green para leitura dos resultados.

A turbidez gerada em amostras positivas deve-se a formação de pirofosfato de magnésio, como mostrado no quadro comparativo (Figura 25), e é considerada subproduto da reação (Niemz et al. 2011). Portanto esta turbidez possui alta relação com o percentual de amplificação. A identificação direta por meio da turbidez, pode muitas vezes dificultar a distinção entre amostras, não sendo corretamente interpretada. O uso do aparelho turbidímetro facilita a interpretação, no entanto é inviável para a disponibilização do kit devido ao manuseio e custo gerado. A adição de corantes facilita a análise, no entanto, alguns corantes indicadores podem apresentar baixa discrepância devido a pouca variação no pH da amostra, como é o caso do Phenol red utilizado neste trabalho.



**Figura 25.** Interpretação direta dos produtos LAMP em amostras contaminadas com *M. oryzae*. (A) Turbidez gerada por meio da formação de pirofosfato de magnésio, sem adição de corantes ou cloreto de cálcio. (B) Hydroxynaphthol blue (HNB), (C) Phenol red, (D) Bromothymol blue (BTB). Sinal positivo representa amostras com *M. oryzae* de arroz, enquanto as amostras negativas contiveram *M. oryzae* de trigo.

O pH inicial da reação varia em torno de 8.8 devido ao tamponamento utilizado. Com a progressão da síntese de DNA, a concentração de  $Mg^{2+}$  reduz durante a formação de pirofosfato, e conseqüentemente o pH é reduzido em torno de 6.0 a 6.5 induzindo a transição do corante (Tanner et al., 2015). O corante Phenol red reage de amarelo para vermelho em um intervalo de transição de 6.8 a 8.2, o pH após a reação reduziu para 7.4 (Figura 26), portanto a pequena variação de cor para alaranjado é condizente com a moderada variação no pH.



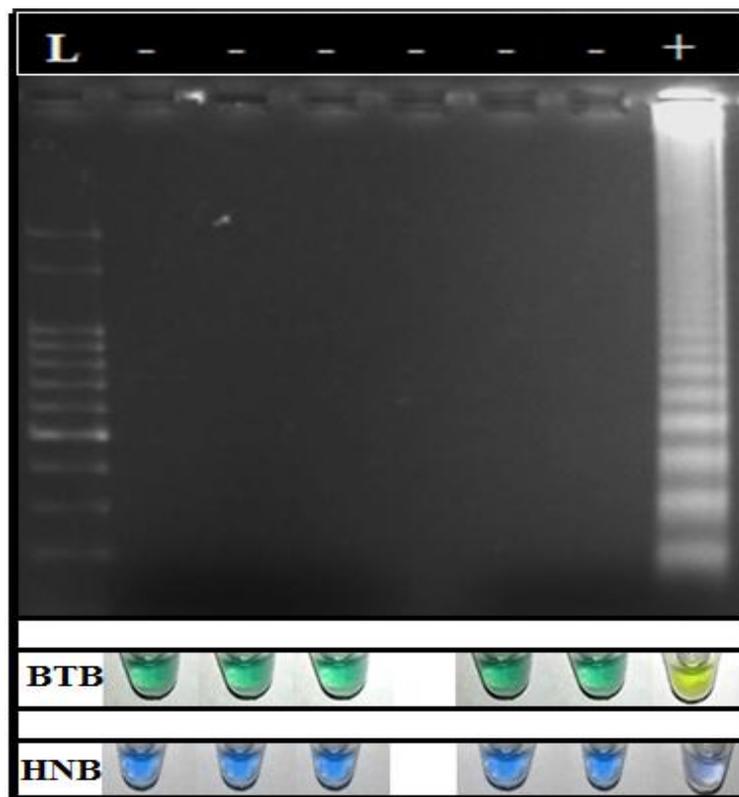
**Figura 26.** Indicador universal de pH.  $pH_i$  caracteriza o pH inicial da reação em torno de 8.8,  $pH_f$  após o processo de amplificação com redução variando em torno de 7.4. As reações foram analisadas em aparelho pHMETRO para exatidão dos valores citados. A observação por meio do indicador universal ilustra da variação gerada.

O uso do corante HNB é bastante comum entre os corantes indicadores, devido a possibilidade de adição antes do processo de reação, reduzindo o percentual de contaminação (Njiru et al., 2008). A mudança de coloração ocorre por meio da ação do corante HNB com íons de  $Mg^{2+}$ , em que amostras positivas mudam de azul violeta para uma tonalidade um pouco mais clara de azul (Goto et al., 2009). O uso de HNB facilitou a interpretação dos resultados em laboratório, podendo diferenciar amostras positivas, no entanto esta diferença foi baixa em relação ao esperado para a comercialização de kits.

A relação entre a progressão da síntese de DNA e da turbidez é diretamente proporcional, assim como também o aumento da tonalidade do corante HNB, pois, quanto maior a amplificação, menor a concentração de  $Mg^{2+}$  com a formação do pirofosfato. Portanto, ao aumentar o tempo de reação tende-se a gerar maior amplificação, e consequentemente obter tons mais discrepantes entre as amostras, mas esta não é uma opção interessante para este estudo, uma vez que se pretende reduzir o tempo do diagnóstico. Trabalhando com a hipótese de aumento no tempo de amplificação o corante HNB também não foi classificado como ótimo, pois, a mudança apenas entre tonalidades, e não entre cores, pode não deixar claro o diagnóstico para profissionais não habituados com a metodologia LAMP.

O corante Bromothymol blue (BTB) apresenta várias aplicações, no entanto para a metodologia LAMP ainda não houve relatos de uso descritos na literatura. Devido a transição deste corante entre 6.0 a 7.6 em pequenas faixas, a possibilidade de se obter maiores discrepância visuais foi dada como hipótese inicial neste trabalho, pois, a viragem do BTB ocorre do amarelo para o azul, e em soluções neutras a coloração torna-se esverdeada, aproximando da realidade encontrada no pH das reações deste estudo.

Os resultados com BTB foram satisfatórios quando comparados a transição obtidas com HNB já consagrado em consórcio com a metodologia LAMP. Para melhor comparar, foram colocados lado a lado os resultados obtidos pelas duas metodologias juntamente ao gel de eletroforese correspondente (Figura 27). O corante BTB foi sem dúvida o mais indicado para a disponibilização de kits LAMP visando a detecção de *M. oryzae*, devido a fácil distinção entre as amostras positivas. Esse é o primeiro relato da indicação do corante BTB para utilização em LAMP, comumente o BTB é utilizado em análises fotossintéticas, tornando-se amarelo na presença de  $CO_2$  (John Torday, et al, 1979). A aplicação do corante também é usada como corantes biológicos em lâminas para microscopia, e em isolamentos diazotróficos endofíticos em raízes (Döbereiner et al, 1995).



**Figura 27.** (L) Marcador molecular 1 Kb; (-) Controle negativo; (+) Amostras com o DNA alvo. Produtos do LAMP vistos por meio da eletroforese em gel de agarose. Visualização direta dos produtos da LAMP em tubos transparentes, corantes BTB (Azul de Bromotímol) e HNB (Azul de Hidroxinaphtol) utilizados para facilitar a interpretação dos resultados.

## 5 CONCLUSÕES

- Morfologicamente os agentes causais de brusone de arroz e trigo são indistinguíveis, por meio de análises moleculares é possível distinguir os isolados de *M.oryzae*.
- A detecção molecular de *M. oryzae* via PCR por iniciadores projetados a partir da sequencia *mif23* é altamente específica;
- O método de extração de DNA cartão FTA é eficiente, porém em condições limitantes, não é possível extrair DNA suficiente para amplificação do DNA alvo;
- A metodologia adaptada NaOH é precisa e eficiente para extração de DNA de *M. oryzae* em sementes;
- O método NaOH pode ser executado em laboratórios com baixo investimento tecnologico, assim como a técnica LAMP aqui descrita, e ambas metodologias podem seguramente ser agrupadas para obtenção de kits de detecção rápida do *M. oryzae*;
- Os iniciadores LAMP projetados a partir do gene *MIF23* são específicos para detecção de *M. oryzae* de arroz;
- A adoção inédita do corante Bromothymol blue (BTB) associado a metodologia LAMP simplifica a interpretação visual, além de proporcionar agilidade na obtenção do diagnóstico ocorrido em aproximadamente duas horas;
- Este é o primeiro kit desenvolvido a partir da metodologia LAMP para detecção de *M. oryzae* em sementes de arroz com possibilidade de interpretação visual direta pela adição do corante indicador de pH BTB;

## 6 REFERÊNCIAS

- ALMASI, M. A.; DEHABADI, S. M. H.; MORADI, A.; EFTEKHARI, Z.; OJAGHKANDI, M. A.; AGHAEI, S. Development and application of loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Journal Plant Pathology & Microbiology**, Canadá, v. 4, n. 5, p. 1-7, 2013.
- AMARAL, H.M. Testes de sanidade de semente de arroz. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V. de S. **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 358-70.
- ATKINS, S. D.; CLARK, I.M. Fungal molecular diagnostic: a mini review. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v. 45, n. 1, p. 3-15, 2004.
- BARATTO, C. M.; MEGIOLARO, F. Comparação de diferentes protocolos de extração de DNA de bactérias para utilização em RAPD-PCR. **Unoesc & Ciência - ACET**, Santa Catarina, v. 3, p. 121-130, 2012.
- BEDENDO, I.P. Doenças do arroz (*Oryza sativa*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 3ed, v.2, p. 85-104. 1997.
- BRUNO, A. C.; URASHIMA, A. S. Inter-relação sexual de *Magnaporthe grisea* do trigo e de outros hospedeiros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1,p. 21-26, 2001.
- CAMARGO, L.E.A. Mecanismos de variabilidade genética de agentes fitopatogênicos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres LTDA, 1995.
- CHADHA, S.; GOLAPALAKRISHNNA, T. Detection of *Magnaporthe grisea* in infested rice seeds using polymerase chain reaction. **Journal of applied Microbiology**, Mumbai, p. 1147-1153, 2006.
- CHAMBERLAIN, D.W.; GRAY, L.E. Germination, seed treatment an microorganisms in soybean seed produced in Illinois. **Plant Disease Reporter**, Washington, v.58, n.1, p.50-54, 1974.
- CHEN, B.Y; JANES, H.W. PCR cloning protocols. **Humana Press**, New York, v. 192, p. 439, 2002.

CHIARI, M. F. **Nova metodologia de diagnóstico para *Ehrlichia canis*: PCR X LAMP.** 2010. 72 f. Mestre (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

CHOI, J.; PARK, S. Y.; KIM, B. R.; ROH, J. H.; OH, I. S.; HAN, S. S.; LEE, Y. H. Comparative analysis of Pathogenicity and Phylogenetic Relationship in *Magnaporthe grisea* Species Complex. **Plos one**, v. 8, e57196, 2013.

CONAB. Perspectivas para Agropecuária 2014/2015. Brasília, DF, setembro, 2014.

CONAB. Acompanhamento da Safra de Brasileira: Grãos. Brasília, DF, Agosto, 2015.

COUCH, B. C.; KOHN, L. M. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *M. oryzae*, from *M. grisea*. **Mycologia**, Lawrence, v. 94, p. 683-693, 2002.

COUCH, B.C; FUDAL, I.; LEBRUN, M.; THARREAU, D.; VALENT, B.; VAN KIM, P.; NOTTE´GHEM, J.; KOHN, L. M. Origins of host-specific populations of the blast pathogen *M. oryzae* in crop domestication with subsequent expansion of pandemic clones on rice and weeds of rice. **Genetics**, v. 170, p. 613-630, 2005.

DAS, A.; BABIUK, S.; MCINTOSH, M. T. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Capripox viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, p. 1613-1620, 2012

DEAN, R.A.; TALBOT, N. J.; EBBOLE, D. J.; FARMAN, M. L.; MITCHELL, T. K.; ORBACH, M. J.; THON, M.; KULKARNI, R.; XU, J. R.; PAN, H.; READ, N. D.; LEE, Y. H.; CARBONE, I.; BROWN, D.; OH, Y. Y.; DONOFRIO, N.; JEONG, J. S.; SOANES, D. M.; DJONOVIC, S.; KOLOMIETS, E.; REHMEYER, C.; LI, W.; HARDING, M.; KIM, S.; LEBRUN, M. H.; BOHNERT, H.; COUGHLAN, S.; BUTLER, J.; CALVO, S.; MA, L. J.; NICOL, R.; PURCELL, S.; NUSBAUM, C.; GALAGAN, J. E.; BIRREN, B. W. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Nature**, North Carolina, p. 980-986, 2005.

DEAN, R.; VAN KAN, J. A. L.; PRETORIOUS, Z. A.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; PIETRO, ANTONIO, D.; SPANU, P. D.; RUDD, J. J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G. D. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Plant Pathology**, v. 13, n. 4, p. 414-430, 2012.

DELIDOW, B.C.; LYNCH, J.P.; PELUSO, J.J. White, B.A. PCR protocols: **current methods and applications**. Ed. A White. Humana Press, Totowa, Nova Jersey, 1993, p 1-29.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA minipreparation: versão II. **Molecular Biology Reporter**, v. 1, n. 4, p. 19-21, 1983.

DÖBEREINER, J., BALDANI V.L.D., BALDANI J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. In: SPEROTTO, R. A (Ed). **Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana**. 1. ed. Lajeado: Ed. Univates , p. 60, 2014.

EIKEN CHEMICAL COMERCIAL LTDA. **The principle of LAMP method**. Shanghai, 2000. Disponível em: <<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>>. Acesso em: 12 dez. 2015.

ENOMOTO, Y.; YOSHIKAWA, T.; IHIRA, M.; AKIMOTO, S.; MIYAKE, F.; USUI, C.; NISHIYAMA, Y. Rapid diagnosis of Herpes Simplex virus infection by a loop-mediated Isothermal Amplification Method. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p. 951–955, 2005.

FAIAD, M. G. R.; WETZEL, M. M. V. S, SALOMÃO, A. N.; CUNHA, R. Evaluation of fungi in seed germoplasm before long term storage. **Seed Science Technology**.Brazilian, v. 24, p.505-511, 1996.

FARIAS, C. R. J. D. AFONSO, A. P. S.; PIEROBOM, C. R.; DEL PONTE, E. M. Regional survey and identification of *B. spp.* associated with rice seeds in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, p. 369-372, 2011.

FAIVRE-RAMPANT, O.; GENIÉS, L.; PIFFANELLI, P.; THAREAU, D. Transmission of rice blast from seeds to adult plants in a non-systemic way. **Plant Pathology**, Bethesda, v. 62, n. 4, p. 879-887, 2013.

GILL, P.; GHAEMI, A. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. **Nucleotides and Nucleic Acids**.Tehran, v.27,p. 224-243. 2008.

GNANAMANICKAM, S. S. Biological Control of Rice Diseases. **Springer**, The Netherlands, v.8, p. 13 - 42, 2009.

GONSALVES, D. S. **Detecção da bactéria Wolbachia em insetos por meio da técnica LAMP (amplificação isotérmica mediada por loop)**. 2014. 78 f. Dissertação (Mestrado Biologia celular e Molecular) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Cent de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2014.

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

HAMER, J.E.; FARRALL, L.; ORBACH, M.J.; VALENT, B.; CHUMLEY, F.G. Host species specific conservation of a family of repeated DNA sequences in the genome of a fungal plant pathogen. **Proc. Natl. Acad. Sci**, USA, v.86, p. 9981-9985, 1989.

HENNING, A. A. **Patologia e tratamento de sementes: Noções gerais**.Paraná: Londrina: EMBRAPA Soja, 2005, 52 p.Documento 264.

HILL, J.; BERIWAL, S.; CHANDRA, I.; PAUL, V. K.; KAPIL, A.; SINGH, T.; WADOWSKY, R. M.; SINGH, V.; GOYAL, A.; JAHNUKAINEN, T.; JOHNSON, J. R.; TARR, P. I.; VATS, A. Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of Common Strains of *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, Finlândia v. 46, n. 8, p. 2800–2804, 2008

HOWARD R. J.; VALENT, B. Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. **Annual Rev. Microbiol**. Delaware, v. 50, p. 491-512, 1996.

IWAMOTO, T.; SONOBE, T.; HAYASHI, K. Loop-mediated isothermal amplification of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M.intracellulare* in sputum samples.**J. Clin. Microbiol**, Mailing, v. 41, p. 2616-2622, 2003.

JOHN TORDAY, P. H. D.; LINDA CARSON, B. S.; EDWARD E. LAWSON, M.D. Saturated Phosphatidylcholine in Amniotic Fluid and Prediction of the Respiratory-Distress Syndrome. **The New England Journal of Medicine**, Massachussets, v. 301, p. 1013-1018, 1979.

KHAN, M. G.; BHASKAR, K. R.; SALAM, M. A.; AKTHER, T.; PLUSCHKE, G.; MONDAL, D. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Leishmania* DNA in buffy coat from visceral leishmaniasis patients.**Parasit Vectors**, Bangladesh, v.5, p. 280, 2012.

KONG, Q. M.; LU, S. H.; TONG, Q. B.; LOU, D.; CHEN, R.; ZHENG, B.; KUMAGAI, T.; WEN, L.; OHTA, N.; ZHOU, X. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): early detection of *Toxoplasma gondii* infection in mice.**Parasit Vectors**, Bangladesh,v. 5, p. 1-7,2012.

KONSTANTINOVA, P. BONANTS, P. J. M.; GENT-PELZER M. P. E. V.; ZOUWEN, P. V. D.; BULK, R. V. D. Development of specific primers for detection and

identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assay. **Mycological Research**, Bulgaria, v. 106, n. 1, p. 23-33, 2002.

LANNA, A. C.; CARVALHO, M. A. F. **Nitrato redutase e sua importância no estabelecimento de plantas de arroz de terras altas**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2013, 36 p. Documento 280.

LASCA, C.C.; VALARIN, P.J.; VECHIATO, M.H. Localização dos fungos *Pyricularia oryzae* e *Helminthosporium oryzae* em sementes de arroz e controle por meio de tratamento com fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, p.154, 1987.

LEE, Y. H.; DEAN, R. A. Stage-Specific Gene Expression during Formation of *Magnapothe grisea*. **Experimental Mycology**, South Carolina, v. 17, p. 215-222, 1993.

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

LIN, G. Z.; ZHENG, F. Y.; ZHOU, J. Z.; GONG, X. W.; WANG, G. H.; CAO, X. A.; QIU, C. Q. Loop-mediated isothermal amplification assay targeting the omp 25 gene for rapid detection of *Brucella* spp. **Molecular and Cellular Probes**, China, v. 25, n. 2-3, p. 126-129, 2011.

LONG, D. H.; CORRELL, J. C.; LEE FN, TEBEEST DO. Rice blast epidemics initiated by infested rice grain on the soil surface. **Plant Disease**, Arkansas, v. 85, n. 6, p. 612, 2001.

LUCAS J. A.; RAMOS S. B.; MONTES, F.; OJEDA, J.; MEGIAS, M.; GUTIERREZ M. F.J. Use of two PGPR strains in the integrated management of blast disease in rice (*Oryza sativa*) in Southern Spain. **Field Crops Resource**.Spain, v.14, p.404-410, 2009.

MACLEAN, J. L.; DAWE, D. C.; HARDY, B.; HETTEL, G. **Rice almanac**: Importance of rice, source book for the most important economic activity on eartheditors. Wallingford, United Kingdom, CABI Publishing, 2002 , 3 ed., p 1-8.

MANANDHAR, H. K.; LYNDS JORGENSEN, H. J.; SMEDEGAARD-PETERSEN, V.; MATHUR, S, B. Seed borne infection of rice by *Pyricularia oryzae* and its transmission to seedlings. **Plant Disease**, v.82, n .10, p. 1093-1099, 1998.

MARCELL, S.; SAWERS, R.; OAKELEY, E.; ANGLIKER, H.; PASZKOWSKIA, U. Tissue-adapted invasion strategies of the rice blast fungus *M. oryzae*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, n. 9, p. 3177- 3187, 2010.

MORI, Y.; NAGAMINE, K.; TOMITA, N.; NOTOMI T. Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Japan, v. 289, p. 150-154, 2001.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A.; SCHARF, S.; SAIKI, R. K.; CHIFRE, G.; ERLICH, H. A. Amplificação enzimática específica do DNA in vitro: a reação em cadeia do polimerase. **Simpósios de Cold Spring Harbor em Biologia quantitativa**, 1986.

NANODROP TECHNOLOGIES. **User's Manual**. INC.ND-1000 Spectrophotometer V3. Wilmington, USA, 2007. 61p.

NEERGAARD, P. **Seed Pathology**. 2. ed. London: McMillan, p.1190, 1979.

NIEMZ, A.; FERGUSON, T. M.; BOYLE, D. S. Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases. **Trends Biotechnol.** Claremont, v. 29, p. 240-250, 2011.

NJIRU, Z. K.; MIKOSZA, A. S. J.; ARMSTRONG, T.; ENYARU, J. C.; NDUNG'U, J. M.; THOMPSON, A. R. C. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, Australia, v. 2, n. 1: e147, 2008.

NOTOMI, T.; OKAYAMA, H.; MASUBUCHI, H.; YONEKAWA, T.; WATANABE, K.; AMINO, N.; HASE, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 28, n. 12, p. 63e, 2000.

OH, Y.; DONOFRIO, N.; PAN, H.; COUGHLAN, S.; BROWN, D.E.; MENG, S.; MITCHELL T.; DEAN, R. A. Transcriptome analysis reveals new insight into appressorium formation and function in the rice blast fungus *M. oryzae*. **Genome Biology**, North Carolina , v. 9, 2008.

OIE. **Terrestrial Manual**. Validation and quality control of PCR methods for the diagnosis of infectious disease. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Commission OBS, p. 46-55, 2008.

PARIDA, M.; SANNARANGAIAH, S.; DASH, P. K.; RAO, P. V. L.; MORITA, K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene

amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. **Rev Med Virol**, India, v. 18, p. 407- 421, 2008

PEREIRA, L. A. A.; W. M. C., MACHADO, J. C.; MAGALHÃES, F. H. L.; PENA, R. C. M. Fungitoxidade in vitro de iprodione sobre o crescimento micelial de fungos que se associam a sementes de arroz. **Revista Brasileira de sementes**, Lavras, v. 24, p. 67-70, 2002.

PELT-VERKUIL, E., VAN BELKUM, A., HAYS, J.P. Principles and technical aspects of PCR amplification, **Springer**, p. 332, 2008.

PRABHU, A. S.; FILLIPI, M. C.; CASTRO, N. Pathogenic variation among isolates of *Pyricularia oryzae* affecting rice, trigo, and grasses in Brazil. **Tropical Pest Management**, London, v. 38, p. 367-371, 1992.

PRABHU, A. S.; FILLIPI, M. C.; CASTRO, N.; SILVA, G. B.; ARAÚJO, L. G. **Brusone em arroz; controle genético, progresso e perspectivas**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006.

RAMOS, L. N. **Estrutura populacional e parâmetros epidemiológicos de isolados de Magnaporthe grisea (Barr)**. 2009. 139 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)– Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

ROCHA, B. G. **Estabelecimento de Metodologias de Análise do DNA Livre Plasmático para o Diagnóstico Pré-Natal Não Invasivo: Sexagem Fetal**. 2012. 89f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

SALEH, M.; SOLIMAN, H.; EL-MATBOULI, M. Loop-mediated isothermal amplification as an emerging technology for detection of *Yersinia ruckeri* the cause agent of enteric red mouth disease in fish. **BMC Veterinary research**, Germany, v. 4, p. 31, 2008.

SANTOS, G. R.; RANGEL, P. H. N.; SANTIAGO, C. M.; LEÃO, F. F.; MARRA, B.; ALMEIDA JUNIOR, D. Reação a doenças e caracteres agronômicos de genótipos de arroz de várzeas no estado do Tocantins. **Revista Agropecuária Técnica**, 26: p. 51-57, 2005.

SANTOS, A. B. dos; STONE, L. F.; VIEIRA, N. R. de A. (Eds.). **A cultura do arroz no Brasil**. 2. ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006.

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

TANG, M. J. ZHOU, S.; ZHANG, X. Y.; PU, J. H.; GE, Q. L.; TANG, X. J.; GAO, Y, S. Rapid and Sensitive of Detection of *Listeria monocytogenes* by Loop-mediated Isothermal Amplification. **Current Microbiology**, Jiangsu, China, v. 63, n. 6, p. 511-516, 2011.

TAO, Z. Y.; ZHOU, H. Y.; XIA, H.; XU, S.; ZHU, H. W.; CULLETON, R. L.; HAN, E.; LU, F.; FANG, Q.; GU, Y. P.; LIU, Y. B.; ZHU G. D.; WANG, W. M.; LI, J. L.; CAO, J.; GAO, Q. Adaptation of a visualized loop-mediated isothermal amplification technique for field detection of *Plasmodium vivax* infection. **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 115, 2011.

TEIXEIRA, G.A. **Transmissibilidade de *M. oryzae* por sementes de trigo e deleção e caracterização do gene BIN1 do patógeno.** 2014.91f. Tese (Doutorado em Agronomia: Fitopatologia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

TOMITA, N.; MORI, Y.; KANDA, H.; NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. **Nature Protocols**, Japan, v. 3, p. 877-882, 2008.

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

WANG, H.; QI, M.; CULTER, A. J. A simple method of preparing plant samples for PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 21, n. 17, p. 4153-4154, 1993.

WANG, Y.; LAN, Q. K.; ZHAO, X.; ZHU, Z.; CHENG, Y. Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detection of genetically modified crops. **Journal Integration Agricultural**, China, v. 42, 1473-1477, 2009.

WANG, D. G.; BREWSTER, J. D.; PAUL, M.; TOMASULA, P. M. Two Methods for Increased Specificity and Sensitivity in Loop-Mediated Isothermal Amplification. **Molecules**, China, v. 20, p. 6048-6059, abril 2015.

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

WATMAN BIOSCIENCE. **Preparation of Sample DNA for Downstream Analysis.** Folheto explicativo. Estados Unidos/Canadá, 2008.

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

WEI WEI, Q.; YU, C.; ZHANG, S. Y.; MIRIAM, K.; ZHANG, W.; DOU, D.; TAO, X. One-step detection of *Bean pod mottle virus* in soybean seeds by the reverse-transcription loop-mediated isotherma amplification. **Virology**, Washington, v. 7, n. 9, 2012.

ZEIGLER, R. S.; LEONG, S. A TEENG, P. S. **Rice Blast Disease**. CAB International, Wallingford, 1994.

ZHOU, D. GUO, J.; XU, L.; GAO, S.; LIN, Q.; WU, Q.; WU, L.; QUE, Y. Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system for detection of cry1Ac transgenic sugarcane. **Nature Scientific Reports**, Austrália, 2014.