

## Metodologia molecular para rápida identificação de *Mycosphaerella fijiensis*

Gustavo Henrique Ferrero Klabunde\*<sup>1</sup>, André Boldrin Beltrame<sup>1</sup>

### RESUMO

As principais doenças foliares da bananeira são causadas pelas espécies fúngicas do complexo *Mycosphaerella*, sendo as principais a *Mycosphaerella fijiensis*, causadora da Sigatoka negra e *Mycosphaerella musicola*, agente causal da Sigatoka amarela. O objetivo deste trabalho foi o de selecionar um marcador molecular para a diferenciação rápida e precisa via PCR/gel de eletroforese de isolados monospóricos de *M. fijiensis*, visto que a semelhança morfológica destes isolados para isolados de outras espécies do complexo é extremamente elevada. Foram testados os marcadores ITS, ACT, HIS e mtSSU, sendo que somente o marcador mitocondrial mtSSU apresentou diferenças visíveis em gel de agarose em função de um *indel* exclusivo de amostras de *M. fijiensis* do tamanho de 84 pb. Esta inserção de bases culmina em uma separação de bandas dos produtos de amplificação, permitindo a rápida diferenciação dos isolados de *M. fijiensis* em laboratório de biologia molecular.

**Palavras-chave:** Banana; complexo *Mycosphaerella*; mtSSU; PCR.

### INTRODUÇÃO

O Estado de Santa Catarina é o quarto maior produtor de bananas do Brasil, com mais de 28 mil hectares em produção, produzindo uma média de 25 toneladas por hectare (GOULART JR, 2019). *M. musicola* e *M. fijiensis* são as espécies que mais causam perdas econômicas em bananeiras. As doenças são distribuídas por todo o mundo e possuem morfologia de lesão muito semelhante. *M. musicola* ocorre em todas as regiões produtoras do Brasil, porém é menos agressiva que *M. fijiensis*, que possui sintomas que acometem folhas mais jovens e atingem a nervura principal, causando maiores perdas (ARZANLOU *et al.*, 2008). Geralmente, as folhas infectadas por *M. fijiensis* são destruídas antes que o cacho atinja o ponto de colheita (LIVRAMENTO e NEGREIROS, 2017).

O mal de Sigatoka reduz a capacidade fotossintética da planta causando a morte prematura das folhas, reduzindo a qualidade e rendimento das frutas, o número de pencas viáveis, causando assim prejuízos na produção (ARZANLOU *et al.*, 2008). O controle da doença se dá pelo monitoramento da doença com base no sistema de previsão bioclimático, que define quando deve ocorrer o controle químico, baseado na interação entre o estágio de desenvolvimento da folha vela e a severidade da doença nas folhas mais novas (MORAES *et al.*, 2011). Essa é uma alternativa para racionalização do uso de fungicidas, que tem como consequência o aumento do custo da produção e o impacto negativo no ambiente, além de haver uma pressão seletiva nas populações de patógenos, levando ao desenvolvimento de linhagens resistentes. Fatores como a natureza de dispersão do patógeno e a seleção imposta pelo hospedeiro podem influenciar a variabilidade encontrada na população (NAKYANZI, 2002).

Objetivando compreender a dinâmica populacional e diversidade genética dos isolados de *Mycosphaerella*, foram coletadas amostras foliares com sintomas típicos do mal de Sigatoka nas principais regiões produtoras de Santa Catarina. Em laboratório, os isolados monospóricos foram obtidos com a liberação de ascósporos em substrato ágar-ágar e posterior isolamento monospórico em meio BDA (CORDEIRO *et al.* 2011). No entanto, as características morfológicas dos isolados

<sup>1</sup> EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Estação Experimental de Itajaí.

\*gustavoklabunde@epagri.sc.gov.br

das espécies do complexo são extremamente semelhantes, necessitando a aplicação de técnicas para a confirmação das espécies recém isoladas. Dessa forma, técnicas moleculares têm sido adotadas como complemento ao estudo da morfologia do patógeno (ARZANLOU *et al.*, 2008).

O objetivo deste trabalho foi o de selecionar um marcador molecular para a diferenciação rápida e precisa via PCR/gel de eletroforese de isolados monospóricos de *M. fijiensis*, visto que a semelhança morfológica destes isolados para isolados de outras espécies do complexo é extremamente elevada.

## MATERIAL E MÉTODOS

O DNA total de 24 isolados monospóricos, sendo: 5 isolados de *M. musicola*, 13 isolados de *M. fijiensis*, 4 isolados de *M. thailandica* e 2 isolados de *M. musae*, foi extraído de acordo com protocolo definido por Doyle e Doyle (1990). A quantidade e qualidade do DNA total foram avaliadas por espectrofotometria UV a 260nm e 280nm no equipamento *Eppendorf BioPhotometer Plus*, e a integridade foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1,2%, utilizando-se o marcador de peso molecular 100pb DNA *Ladder* (*Bioneer*). As reações de PCR seguiram o protocolo descrito por Arzanlou *et al.* (2008). O volume total das reações foi de 20µL e os iniciadores utilizados para amplificar a região de interesse foram os seguintes: Região ITS (ITS1 e ITS4); Gene Actina (ACT-512F e ACT-783R); Região mtSSU (MNS1 e MNS2); Gene Histona H3 (CYLH3F e CYLH3R). As condições de temperatura foram: 5 min por 95°C para a desnaturação inicial, seguido por 36 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 30 s, 72°C por 60 s, e uma extensão final a 72°C por 7 min.

Para a visualização da amplificação dos fragmentos de DNA, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1,2%, utilizando-se o marcador de peso molecular 100 pb DNA *Ladder* (*Bioneer*). As amostras, totalizando 24, foram corridas em tampão TE 1X a 100V durante 2 horas, coradas com brometo de etídeo por 30 minutos e posteriormente o gel foi visualizado no transluminador Gel Doc XR+ (*Bio Rad Laboratories*). Os fragmentos amplificados foram posteriormente sequenciados em analisador genético ABI3500 com uso do kit Big Dye Terminator v3.1 (*Applied Biosystems*). Os cromatogramas foram alinhados com a utilização do programa MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das quatro regiões avaliadas, somente a região mtSSU apresentou polimorfismo de tamanho (*Indel*) que permitiu a diferenciação de *M. fijiensis* das demais espécies via gel de eletroforese em agarose (Figura 1).

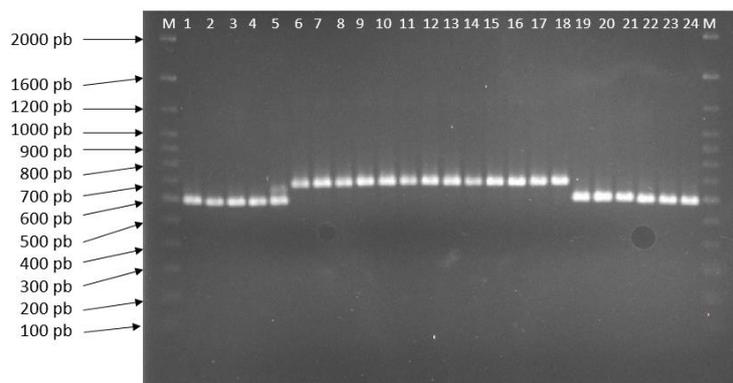


Figura 1. Gel de eletroforese do produto de amplificação do marcador mtSSU em amostras de isolados do complexo *Mycosphaerella*. M: marcador de peso molecular 100pb DNA *Ladder* (*Bioneer*). Amostras 1 a 5: *M. musicola* (aprox. 600pb); Amostras 6 a 18: *M. fijiensis* (aprox. 700 pb); Amostras 19 a 22: *M. thailandica* (aprox. 600pb); Amostras 23 a 24: *M. musae* (aprox. 600pb).

De acordo com a Figura 1, após duas horas de corrida eletroforética dos produtos de amplificação do gene mtSSU, as amostras de *M. fijiensis* revelam uma banda de aproximadamente 700pb contra uma banda de aproximadamente 600pb das demais espécies avaliadas.

Para as demais regiões amplificadas, todas as espécies apresentaram o mesmo padrão eletroforético, caracterizado pela amplificação de banda única e idêntica entre todas as espécies, embora exista a possibilidade da existência de *SNPs* (*Single Nucleotide Polymorphisms*) diferenciando taxonomicamente as espécies. Além disso, estas regiões avaliadas são rotineiramente utilizadas em estudos filogenéticos envolvendo diversas espécies fúngicas (ARZANLOU *et al.*, 2008).

A diferença eletroforética do produto de amplificação do marcador mtSSU em *M. fijiensis* para das demais espécies avaliadas se dá em função de uma única inserção de 84 pb (Figura 2).



Figura 2. Alinhamento de sequência parcial do gene mtSSU em isolados fúngicos do complexo *Mycosphaerella* da micoteca da EPAGRI Itajaí e de sequências referência de *M. musicola*, *M. fijiensis* e *P. fijiensis* e *P. musae* (EU514430; EU514417; KC80776; DQ028490; KC800777). Destaca-se ao centro da figura o *indel* de 84 pb exclusivo das amostras de *M. fijiensis*/*P. fijiensis*.

O ganho ou perda (*indel*) de bases nitrogenadas em uma sequência de DNA é um evento menos provável de acontecer em relação a uma simples substituição de bases (*SNP*). *Indels* com menos de 50pb são classificados como microindels e acontecem em maior frequência (GONZALEZ *et al.*, 2007).

Esta sequência de 84 pb não revelou em análise de anotação funcional, nenhuma fase de leitura para a síntese de aminoácidos, sendo uma região estrutural da sub-unidade pequena do DNA ribossomal mitocondrial. Todos os marcadores utilizados possuem um longo histórico de uso em trabalhos de taxonomia molecular em diversos grupos de fungos, sendo que o sequenciamento de DNA via eletroforese capilar revela os polimorfismos do tipo *SNPs* para a saturação de filogenias e determinação taxonômica (ARZANLOU *et al.*, 2008).

## CONCLUSÃO

O marcador molecular mitocondrial identificado permite com clareza a identificação molecular de *Mycosphaerella fijiensis* em isolados fúngicos do complexo *Mycosphaerella*.

## AGRADECIMENTOS:

FAPESC – Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ARZANLOU, M.; GROENEWALD, J.Z.; FULLERTON, R.A.; ABELN, E.C.A.; CARLIER, J.; ZAPATER, M.-F.; BUDDENHAGEN, I.; VILJOEN, A.; CROUS, P.W. Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and related anamorphs on banana. *Persoonia*, v.20, p.19-37, 2008.
- CORDEIRO, Z.J.M.; ROCHA, H. S.; ARAÚJO, A.G. Documentos 198: Metodologias para manuseio de *Mycosphaerella musicola* em Laboratório. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura. Ed. 1, p. 18 – 26, 2011.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolations of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v. 12, p. 1315,1990.
- GONZALEZ, K.D., HILL, K.A., LI, K. Somatic microindels: analysis in mouse soma and comparison with the human germline. *Human Mutation*. 28 (1), p. 69–80, 2007.
- GOULART JR, R. Fruticultura: Banana. In: GIEHL, A.L.; PADRÃO, G.A.; ELIAS, H.T.; ALVES, J.R.; GUGEL, J.T.; ARAÚJO, L.A.; GOULART JR, R.; MARCONDES, T. Boletim Agropecuário, Ed: nº 70. Florianópolis. Centro de Socio-economia e Planejamento Agrícola (Epagri/Cepa), p. 7-10, 2019.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MegaX: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, v.35, p. 1547-1549, 2018.
- LIVRAMENTO, G.; NEGREIROS, R.J.Z. Banana: Recomendações técnicas para o cultivo no litoral Joinville de Santa Catarina. Florianópolis: Epagri, 2017. 101p.
- MORAES, W. S.; SILVA, S. H. M. G.; FUKUDA, E.; SILVA, C. M. Técnica de monitoramento da Sigatoka-negra na cultura da banana. *Pesquisa & Tecnologia*, v. 8, n. 2, 2011.