



XLI Congresso Paulista de Fitopatologia

20 a 22 de fevereiro de 2018
Marília - SP

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA REGIÃO ESPAÇADORA TRANSCRITA INTERNA (ITS) DO rDNA DE ISOLADOS FÚNGICOS OBTIDOS A PARTIR DE LESÕES FOLIARES DE *Panicum maximum*

Thays Benites Camargo Pereira¹; Celso Dornelas Fernandes²; Jaqueline Rosemeire Verzignassi²; Margareth Vieira Batista³.

¹Pesquisadora DCR/CNPq-FUNDECT, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS. tbcpereira@usp.br. ²Pesquisadores da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS. ³Técnica do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS.

RESUMO - A mancha foliar, principal doença de *Panicum maximum*, tem, até o momento, descrito como agente causal o fungo *Bipolaris maydis*. Tal organismo apresenta grande diversidade genética e alta variabilidade morfológica, o que dificulta a sua identificação somente por estudos morfológicos. Assim, este trabalho objetivou caracterizar molecularmente a diversidade genética de *Bipolaris* spp., oriundos de lesões foliares de *P. maximum*, usando-se o marcador molecular ITS, que amplifica a região espaçadora transcrita interna do rDNA do patógeno. Para o estudo, selecionaram-se 37 isolados de *Bipolaris* spp., disponíveis na coleção micológica do laboratório de fitopatologia da Embrapa Gado de Corte. O DNA foi extraído pelo método Doyle e Doyle modificado e a reação de PCR foi conduzida com a utilização do marcador molecular para a região ITS. O método de extração utilizado proporcionou a obtenção de DNA com altas concentrações e pureza. A correta amplificação do fragmento genômico dos isolados de *Bipolaris* spp. permitiu a realização do sequenciamento direto da PCR. A comparação das sequências obtidas com aquelas disponibilizadas no banco de dados do NCBI (GenBank) revelou a ocorrência de quatro diferentes agrupamentos de isolados, quais sejam: um isolado com 99% de identidade com *Curvularia* spp., três com 99% de identidade com *Bipolaris sorokiniana*, um com 100% de identidade *B. zea* e 32 com 99 a 100% de identidade com *B. yamadae*.

Palavras-chave: *Bipolaris maydis*, forrageiras, mancha foliar

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador de carne bovina do mundo, concentrando nas forrageiras a base da alimentação de seu rebanho (FONSECA et al., 2010). A área de pastagens do Brasil compreende em torno de 161 milhões de hectares, dos quais, estima-se que 102 milhões encontram-se estabelecidos com pastagens cultivadas, o que corresponde a 12% do território brasileiro (SIDRA-IBGE, 2017). Conforme Valle et al. (2009), grande parte destas áreas encontra-se estabelecida com cultivares exóticas e de reprodução clonal. Neste contexto, destacam-se duas cultivares de *Panicum maximum* Jacq., Tanzânia e Mombaça (JANK et al., 2008).



XLI Congresso Paulista de Fitopatologia

20 a 22 de fevereiro de 2018
Marília - SP

O impacto de doenças ainda é pouco estudado em *P. maximum*, contudo, Lenné (1994) relata a ocorrência de aproximadamente 80 patógenos nesta espécie e ressalta que as manchas foliares causadas por fungos fitopatogênicos são as principais doenças encontradas em gramíneas forrageiras. Martinez et al. (2010) apontam a mancha foliar causada por *B. maydis*, como a principal doença de *P. maximum*, sendo a cultivar Tanzânia considerada a mais suscetível. Este fungo foi descrito pela primeira vez em 2003, causando mancha foliar em capim Tanzânia no Brasil (CHARCHAR et al., 2003).

A identificação de espécies de *Bipolaris* descritas unicamente por caracterização morfológica é limitada e, muitas vezes duvidosa, já que muitas espécies possuem caracteres sobrepostos, além da ampla diversidade morfológica dentro da espécie. Estudos moleculares têm sido empregados nos sistemas de classificação com o objetivo de eliminar dúvidas e acomodar as espécies corretamente (MANAMGODA et al., 2014). Baseado na análise da sequência de DNA combinada de quatro marcadores, ITS (Internal transcribed spacer), GPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), TEF-1 α (Translation elongation factor EF-1 alpha) e LSU (Large Subunit of rRNA) e nas características morfológicas, Manamgoda et al., (2014) revisaram o gênero *Bipolaris*, reclassificando e classificando diversas espécies.

Este trabalho teve como objetivo caracterizar e analisar a região do ITS do rDNA das espécies fúngicas isoladas a partir de manchas foliares típicas de *Panicum maximum*, provenientes de cinco estados brasileiros.

MATERIAL E MÉTODOS

Da micoteca do laboratório de fitopatologia da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, foram recuperados 37 isolados fúngicos provenientes de manchas foliares típicas de *Panicum maximum*, coletadas nos estados de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo e do Distrito Federal.

A extração de DNA foi realizada conforme o método Doyle e Doyle modificado a partir de micélio produzido em meio Aveia-Agar. O tampão de extração CTAB 2 % (1,4 M de NaCl, 50 mM de EDTA, 2 % de CTAB, 1mM de Tris-HCl, 1% de PVP-40 e 0,2% de 2-Mercaptoetanol) foi adicionado no volume de 1000 μ L diretamente na placa de Petri contendo o isolado fúngico. A suspensão foi transferida para um almofariz e macerada com 0,3 g de areia de



XLI Congresso Paulista de Fitopatologia

20 a 22 de fevereiro de 2018
Marília - SP

aqúario autoclavada, transferida para um tubo e mantida por 30 minutos em banho-maria a 65 °C. Após, foram adicionados às amostras 500 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), centrifugadas por 5 minutos a 20.000 x g e o sobrenadante transferido para um novo tubo, repetindo-se esta etapa duas vezes. O sobrenadante foi então recuperado para um novo tubo, adicionado igual volume de isopropanol gelado, homogeneizado e mantido a -20 °C por 30 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 20.000 x g. Descartou-se o líquido sobrenadante, adicionando-se ao DNA precipitado 500 µL de etanol 70% gelado e centrifugou-se a 20.000 x g por 3 minutos. Esta etapa foi repetida duas vezes. O DNA precipitado foi ressuscitado em 50 µL de TE 1X (10 mM de Tris-Cl e 0.5 mM EDTA; pH 9.0). A quantificação do DNA foi determinada em NanoDrop 2000, Thermo Scientific™ e, posteriormente, as amostras foram armazenadas a -20 °C.

Os DNAs genômicos dos isolados fúngicos foram submetidos à reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se os oligonucleotídeos para amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA, ITS1 (5'TTCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White et al., 1990). A reação de PCR foi realizada em volume total de 25 µL, utilizando-se os seguintes produtos: 50 ng de DNA; 20 pmol.µL⁻¹ de cada oligonucleotídeo; 2,5 mM de cada dNTPs; 350nM Tris-HCl, 250 mM KCl, 35nM MgCl₂ do 10X PCR Buffer; e 1U Uni-Taq DNA Polymerase (5 U.µL⁻¹). A amplificação foi conduzida em termociclador programado para uma desnaturação inicial de 95 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação 94 °C por 40s; anelamento a 52 °C por 50s; extensão a 72 °C por 1 min e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos das reações de PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% utilizando-se GelRed™, visualizado sob luz UV e fotodocumentado.

Os produtos de amplificação foram sequenciados em plataforma ABI 3730 - Applied Biosystems. Os eletroferogramas foram editados no software Sequencher 5.4.6 e as sequências obtidas foram utilizadas para a busca de sequências similares, utilizando-se a ferramenta BLASTn do NCBI.



XLI Congresso Paulista de Fitopatologia

20 a 22 de fevereiro de 2018
Marília - SP

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método utilizado para extração do DNA fúngico foi eficiente e permitiu a obtenção de concentrações maiores que $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ e a razão das absorvâncias 260/280 variando de 1,98 a 2,65, indicando ausência de contaminação por proteínas. A reação de PCR conduzida com os oligonucleotídeos ITS1/ITS4 geraram amplificação de fragmentos com aproximadamente 600 pb, conforme o esperado. Apenas dois isolados apresentaram fragmento com tamanho diferente do esperado, com aproximadamente 750pb.

O sequenciamento foi realizado com o produto direto da PCR e ambas as regiões do ITS foram sequenciadas. Comparando-se as sequências dos isolados fúngicos com aquelas disponibilizadas no banco de dados do NCBI (GenBank), revelou-se a ocorrência de quatro diferentes agrupamentos de isolados, quais sejam: um com 99% de identidade com *Curvularia* spp., três com 99% de identidade com *B. sorokiniana*, um com 100% de identidade *B. zea* e 32 com 99 a 100% de identidade com *B. yamadae*.

A utilização do marcador molecular para a região ITS dos isolados confirmou a identificação morfológica de gênero para a maioria dos isolados analisados, com a exceção de apenas um, possibilitando a separação entre *Curvularia* spp. e *Bipolaris* spp. De acordo com Manamgoda et al. (2014), os referidos gêneros são considerados irmãos e conflitos na classificação morfológica podem ocorrer. Estes autores relatam que a utilização de um único marcador como o ITS ou o GPDH pode esclarecer dúvidas presentes na classificação para a maioria das espécies. Entretanto, o GPDH foi melhor marcador para determinação entre as espécies *Bipolaris*.

A confirmação das espécies, identificadas com a utilização do marcador ITS, deverá ser confirmada com a utilização de outros marcadores como, por exemplo, o GPDH, dando suporte aos resultados obtidos neste trabalho

CONCLUSÕES

Obteve-se neste trabalho um protocolo eficiente para extração do DNA de *Bipolaris* spp. com alta pureza e concentração. As condições para amplificação das regiões ITS do rDNA do patógeno foram adequadas, gerando fragmentos genômicos, conforme o esperado. O



XLI Congresso Paulista de Fitopatologia

20 a 22 de fevereiro de 2018
Marília - SP

sequenciamento direto do produto do PCR-ITS mostrou-se excelente e eficiente método para diferenciação entre os gêneros de *Curvularia* e *Bipolaris*, assim como permitiu a identificação das diferentes espécies presentes na coleção micológica da Embrapa Gado de Corte, isolados a partir de manchas foliares de *P. maximum*. A confirmação das espécies, identificadas com a utilização do marcador ITS, deverá ser confirmada com a utilização de outros marcadores como, por exemplo, o GPDH, dando suporte aos resultados obtidos neste trabalho.

AGRADECIMENTOS

CNPq, FUNDECT, FUNDAPAM, UNIPASTO e EMBRAPA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHARCHAR, M.J.A.; ANJO, J.R.N.; FERNANDES, F.D.; FERNANDES, C.D.. *Panicum maximum* cv. Tanzânia nova hospedeira de *Bipolaris maydis*. Fitopatologia Brasileira, v.28, p.385, 2003. Suplemento.

FONSECA, D. M.; SANTOS, M. E. R.; MARTUSCELLO, J. A. Importância das Forrageiras no Sistema de Produção. In: Plantas Forrageiras. Viçosa, MG: UFV, 2010. p. 13 – 29.

JANK, L.; RESENDE, R. M. S.; VALLE, C. B. do et al. Melhoramento genético de *Panicum maximum*. In: RESENDE, R. M. S.; VALLE, C. B. do; JANK, L. (Ed.) Melhoramento de forrageiras tropicais. 1.ed. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2008. p.55-87.

LENNÉ, J.M. Diseases of other pasture grasses. In: LENNÉ, J.M.; TRUTMANN, P. Diseases of Tropical Pasture Plants. CBA International, 1994, 404p.

MANAMGODA, D.S.; ROSSMAN, A.Y.; CASTLEBURY, L.A.; CROUS, P.W.; MADRID, H.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K.D. The genus *Bipolaris*. Studies in Mycology, v. 79, p. 221–288, 2014.

MARTINEZ, A.S.; FRANZENER, G.; STANGARLIN, J.R. Danos causados por *Bipolaris maydis* em *Panicum maximum* cv. Tanzânia. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 31, n. 4, p. 863-870, 2010.

SISTEMA IBGE DE RECUPERAÇÃO AUTOMÁTICA. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/264#resultado>>. Acesso em: 28 Set. 2017.



XLI Congresso Paulista de Fitopatologia

20 a 22 de fevereiro de 2018
Marília - SP

VALLE, C.B.; JANK, L.; RESENDE, R.M.S. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. *Revista Ceres*. v.56, n.4, p.460-472, 2009.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, USA: 315–322, 1990.