

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DA ESPÉCIE *Bipolaris sorokiniana* ASSOCIADA ÀS MANCHAS EM COLMOS DE CEVADA NO PARANÁ

Paula Cristina dos Santos Rodrigues¹, Priscila Angelotti Zampar², Celso Martins França³,
Heraldo Rosa Feksa⁴, Juliano Luiz de Almeida⁵, Dauri José Tessmann⁶

¹Mestranda em proteção de plantas do curso de Agronomia, Campus Sede Maringá/PR, Universidade Estadual de Maringá – UEM.
paulaesrodrigues@gmail.com

²Mestre em proteção de plantas, doutoranda em proteção de plantas do curso de Agronomia, Campus Sede Maringá/PR, Universidade Estadual de Maringá - UEM. priangelotti@gmail.com

³Acadêmico do curso de Agronomia, Campus Sede Maringá, Universidade Estadual de Maringá - UEM. cmartinsfranca@gmail.com

⁴⁶Pesquisador Doutor da Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária / Cooperativa Agrária Agroindustrial. heraldo@agraria.com.br e juliano@agraria.com.br

⁶Professor do curso de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá - UEM. djtessmann@uem.br

RESUMO

O fungo *Bipolaris sorokiniana* causa escurecimento e necrose em raízes, colmos e folhas de trigo (*Triticum aestivum*) e cevada (*Hordeum vulgare*). O patógeno causa a doença denominada mancha marrom nas folhas e podridão comum nas raízes. O diagnóstico nos colmos é normalmente mais difícil de ser realizado do que nas folhas devido às variações que ocorrem na expressão dos sintomas pelas diferentes cultivares. O objetivo do estudo foi diagnosticar a mancha marrom em colmos de novas cultivares de cevada e confirmar a identificação do patógeno pelo método molecular que emprega a reação da polimerase em cadeia (PCR). Para isso foram analisados colmos de cevada das cultivares Imperatriz e Danielle com sintomas da doença, os quais foram coletados na área experimental da Fundação Agrária de Pesquisa agropecuária, em Guarapuava, PR, das cultivares Imperatriz e Danielle. Para o isolamento do fungo em culturas puras, segmentos de colmos com sintomas da doença foram desinfestados superficialmente em álcool 70% e solução de hipoclorito de sódio 2% e posteriormente enxaguados com água estéril, secos em papel filtro e transferidos para placas de petri contendo o meio de cultura de batata-dextrose-ágar (BDA) modificado. O BDA modificado continha 25% da concentração normal de batata e dextrose e o antibiótico cloranfenicol na concentração de 300 ppm. O DNA genômico dos isolados foi extraído do micélio de culturas puras obtidas por pontas de hifas crescendo na temperatura de 23±2 °C com fotoperíodo de 12 horas por sete dias. A PCR foi utilizada para amplificação de um segmento de DNA de 650 pares de bases da região ITS-rDNA que foi sequenciado. A identificação da espécie foi realizada mediante a comparação das sequências obtidas com sequências de fungos disponíveis no NCBI, complementada por análise filogenética. Os quinze isolados analisados apresentaram identidade com *B. sorokiniana* superior da 98%, e a análise filogenética de um grupo representativo dos isolados revelou o agrupamento num clado contendo uma linhagem de referência, confirmando assim a identificação da espécie. Verificou-se a associação do fungo *B. sorokiniana* com as manchas necróticas encontradas em nós e entre-nós dos colmos de cevada. Os resultados obtidos contribuem para aprofundar os conhecimentos sobre a sintomatologia da mancha marrom em colmos de novas cultivares de cevada.

PALAVRAS CHAVE: Diagnóstico molecular; Doenças fúngicas; Doenças de plantas; Fungos fitopatogênicos.

1 INTRODUÇÃO

A cevada (*Hordeum vulgare*) é um dos principais cereais de inverno cultivados no sul do Brasil. A área cultivada na safra de 2019 foi 119 mil hectares e o volume da produção foi de 429 milhões de toneladas de grãos, assim distribuída: 57,1% no Paraná, 41,2% no Rio Grande do Sul e 1,7 em Santa Catarina 1,7% (CONAB, 2020). O principal destino dos grãos é a produção de malte para a indústria cervejeira, no entanto, os grãos de cevada também são utilizados para farinha e o subproduto da fabricação de malte, assim como grãos de baixa qualidade, são utilizados na fabricação de ração animal.

O fungo *Bipolaris sorokiniana* é conhecido por causar causa manchas necróticas na parte aérea e podridão de raízes na cevada e no trigo (*Triticum aestivum*). Nas folhas, o patógeno causa a doença denominada mancha marrom e nas raízes a doença podridão comum. Porém, o diagnóstico nos colmos é normalmente mais difícil de ser realizado do

que nas folhas devido às variações que ocorrem na expressão dos sintomas pelas diferentes cultivares. Essas doenças afetam a cevada e o trigo em várias regiões produtoras, principalmente nas regiões subtropicais úmidas, como o sul do Brasil (FORCELINI & REIS, 2005; STAIN, 2010).

A reação da polimerase em cadeia (PCR) é uma das principais ferramentas moleculares utilizadas na caracterização filogenética e identificação de fungos (VU *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2021). Visando contribuir para aprofundar os conhecimentos sobre a sintomatologia da mancha marrom em colmos de novas cultivares de cevada, o objetivo do estudo foi diagnosticar a mancha marrom em colmos de cevada nas cultivares Imperatriz e Danielle e confirmar a identificação do patógeno pelo método molecular que emprega a reação da polimerase em cadeia (PCR).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e analisou 15 isolados que foram obtidos de amostras de colmos de cevada sintomáticos coletados na estação experimental da Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária na fase de maturação.

Para o isolamento do patógeno em meio de cultura, segmentos de colmos com tamanho de 5 mm foram removidos com um bisturi da área de transição entre o tecido doente e sadio (Figura 1A). Os segmentos receberam desinfestação superficial em álcool 70% por 10 segundos e em solução de hipoclorito de sódio 2% por 30 segundos e em seguida foram secos com papel filtro esterilizado e transferidos para placas de Petri contendo o meio de batata-dextrose-ágar (BDA) modificado, contendo apenas 25% da concentração normal de batata e dextrose e o antibiótico cloranfenicol na concentração de 300 ppm. As placas contendo os segmentos de colmo foram mantidas em câmara de crescimento de microrganismos na temperatura de 23 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas por 7 dias. Em seguida, pontas de hifas das colônias (Figura 1B) foram transferidas para novas placas contendo meio BDA modificado, as quais foram mantidas por 5 a 7 dias nas condições descritas anteriormente. Das culturas puras foi removido o micélio o qual foi macerado em nitrogênio líquido até formar um pó, utilizado na extração de DNA com o PureLink™ Genomic Plant DNA Purification Kit (Invitrogen).

Para a amplificação das regiões ITS1 e ITS2 do rDNA foram empregados os pares de primers ITS4 e ITS5 e protocolo descrito por White *et al.* (1990), de sequências 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' e 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3', respectivamente. O volume total das reações foi de 25 µL, contendo 25-50 ng de DNA genômico, 4 pmol de cada primer, água ultrapura e os seguintes reagentes do Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen) kit: 2,5 µ do tampão de reação, 1,25 µL de MgCl₂ 50 µM, 1 µL de dNTPs 10 mM e 1 U de Taq DNA polimerase. As reações de PCR foram conduzidas no termociclador Biocicler (Biometra). As condições de PCR foram de 2 minutos a 95°C (desnaturação inicial) e o DNA alvo foi amplificado por 30 ciclos, cada ciclo consistido da desnaturação a 95°C por 1 minuto. O anelamento foi realizado a 50°C por 1 minuto, a extensão a 72°C por 45 segundos com um incremento de 4 segundos por ciclo.

Os fragmentos amplificados foram purificados com o kit ExoSap-IT (Applied Biosystems), segundo o protocolo estabelecido pelo fabricante e encaminhados para sequenciamento na empresa GoGenetic (www.gogenetic.com.br) de Curitiba, PR.

Para a identificação da espécie, as sequências de DNA obtidas foram comparadas com sequências disponíveis no banco de dados da NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Para a caracterização filogenética, alinhamentos múltiplos foram obtidos contendo os isolados deste estudo e sequências da região ITS-5.8S rDNA obtidas no GenBank de espécies de fungos relacionadas com manchas foliares na cevada e trigo. Os alinhamentos e a

inferência de árvores filogenéticas foram realizados com o programa MEGA (www.megasoftware.net), utilizando-se o método de máxima verossimilhança. Os ramos das árvores foram testados estatisticamente por análise de *bootstrap*, com 1000 repetições.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A reação da PCR com os primers ITS4/ITS5 permitiu a amplificação de um fragmento do rDNA de 650 pares de bases, que inclui as regiões ITS1, ITS2 e gene 5.8S (Figura 1C). A comparação das sequências de DNA obtidas para o 15 isolados analisados no estudo com sequências de DNA disponíveis no banco de dados NCBI permitiu a identificação desses isolados como *B. sorokiniana* com percentual de identidade acima de 98% com o acesso de referência MH864698.1.

A análise filogenética revelou que os seis isolados representativos do estudo agruparam no clado da espécie *B. sorokiniana*, com suporte estatístico de bootstrap de 100% (Figura 2). O estudo mostrou que a análise região ITS-rDNA permitiu a identificação da espécie dos isolados, evidenciando assim que consiste em um *DNA barcode* válido para o patógeno (VU *et al.*, 2019).

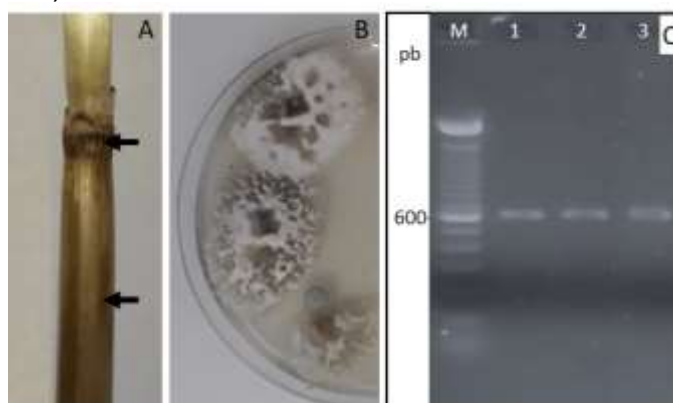


Figura 1: A: sintomas de manchas escuras no nó e entre-nó do colmo de cevada; B: colônia de *Bipolaris sorokiniana* crescendo em meio de cultura de batata-dextrose-ágar modificado, contendo 25% da concentração normal de batata e dextrose; e C: gel de agarose 2% dos produtos da PCR, mostrando bandas de tamanho aproximado de 650 pares de bases (pb), onde M = marcador e as colunas 1 a 3 indicam isolados representativos de *B. sorokiniana*. A flexa indica o local de coleta do tecido doente.

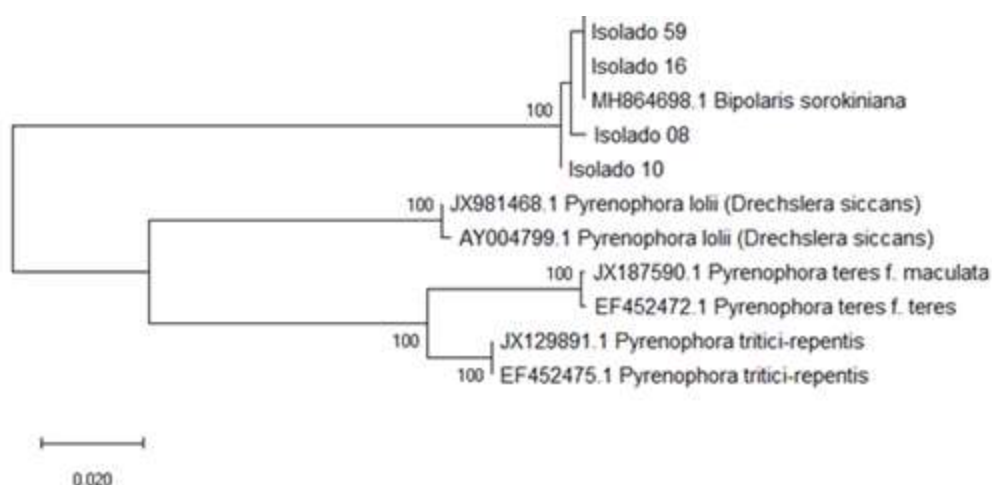


Figura 2: Árvore filogenética inferida pelo método de máxima verossimilhança com base em sequências de DNA da região ITS-rDNA de isolados obtidos neste estudo (8, 10, 16, 59, 60 e 66) e linhagens de espécies de referência do NCBI. O número sob os ramos significa o valor do teste estatístico de *bootstrap*, com 1000 repetições.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Verificou-se a associação do fungo *Bipolaris sorokiniana* com as machas necróticas encontradas em nós e entre-nós dos colmos de cevada.

REFERÊNCIAS

CONAB - Companhia Nacional do Abastecimento. Séries históricas. **Cevada**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras?start=10>. Acesso em: 07 jul. 2021.

FORCELINI, C.A., REIS, E.M. Doenças da cevada. *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: Ceres, 2005. p.231-234. v. 2.

PEREIRA, C.B., WARD, T.J., DEL PONTE, E.M., MOREIRA, G.M., BUSMAN, M., MCCORMICK, S., FEKSA, E.R., DE ALMEIDA, J.L. TESSMANN, D. J. Five-year survey uncovers extensive diversity and temporal fluctuations among *Fusarium* head blight pathogens of wheat and barley in Brazil. **Plant Pathology**, v. 70, p. 426-435, 2021.

STEIN, J.F. Common root and foot rot and associated leaf and seedling diseases. *In*: BOCKUS, B.; BOWDEN, R. L.; HUNGER, R. M.; MORRILL, W.L.; MURRAY, T. D.; SMILEY, R. W. (eds), **Compendium of wheat diseases**. Fourth edition. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, p.26-28, 2010.

VU, D.; GROENEWALD, M.; DE VRIES, M., GEHRMANN, T.; STIELOW, B.; EBERHARDT, U., VERKLEY, G. J. M. (2019). Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. **Studies in Mycology**, v. 92, p. 135-154, 2019.