

CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Pyrenophora teres*, AGENTE CAUSAL DA MANCHA EM REDE DA CEVADA NO PARANÁ

Gabriela Pereira de Paula (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Paula Cristina dos Santos Rodrigues (Mestranda/PGA/UEM), Priscila Angelotti Zampar (Coorientadora), Dauri José Tessmann (Orientador) e-mail: djtessmann@uem.br;

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Agrárias/Maringá, PR.

Ciências Agrárias/ Agronomia/ Fitopatologia.

Palavras-chave: cevada, identificação molecular, análise filogenética.

Resumo:

A doença foliar mancha em rede é a principal doença foliar da cevada (*Hordeum vulgare*) no Brasil, seu agente causal é o fungo necrotrófico *Pyrenophora teres*. O patógeno reduz a área fotossintética das plantas, prejudicando tanto a produtividade, o rendimento e a qualidade dos grãos colhidos nas lavouras de cevada. O objetivo do estudo foi a identificação e caracterização molecular de um grupo de 12 isolados obtidos de folhas de cevada com sintomas de mancha em rede, coletadas na região centro sul do Paraná. Para isso realizou-se a extração do DNA genômico por meio do Kit PureLink™ Genomic Plant DNA Purification (Invitrogen). Prosseguiu-se com a reação da polimerase em cadeia (PCR) com os iniciadores ITS4 e ITS5, onde ocorreu a amplificação de um segmento de aproximadamente 650 pares de bases da região ITS-gene 5.8S do DNA ribossomal (rDNA). O produto da PCR foi sequenciado pela GoGenetic e o código de barras do DNA obtido foi comparado com o banco de dados do *GenBank* (NCBI), possibilitando a identificação inicial dos isolados. A caracterização filogenética foi realizada por meio da inferência de árvore filogenética pelos métodos de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. Todos os isolados do estudo foram agrupados no clado contendo sequências de referência de *P. teres*, comprovando a identificação e caracterização molecular dos isolados do estudo.

Introdução

A cevada (*Hordeum vulgare*) é uma das gramíneas cerealíferas, mais consumidas e produzidas no sul do Brasil desde a década de 1930. Em 2022 estima-se que a área cultivada no país será de 115,5 mil hectares e a produção de 427,5 mil toneladas, de acordo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2022). No Brasil, diferentemente de outros países malteação tem sido a principal aplicação econômica da cevada, destinada principalmente para indústria cervejeira e em menor escala também para a fabricação de farinhas e ração animal.

O principal fitopatôgeno da cultura da cevada é o fungo *Pyrenophora teres* agente causal da doença mancha em rede ou mancha reticulada, sendo altamente destrutivo em regiões brasileiras produtoras de cevada (LUZ & MINELLA, 1982). Visando contribuir para aprofundar os conhecimentos sobre identificação molecular de fungos fitopatogênicos, o objetivo deste projeto foi a caracterização e a identificação molecular de isolados de *Pyrenophora teres* coletados na região sul do Paraná, por PCR no Laboratório de Fitopatologia da UEM.

Materiais e Métodos

O estudo foi realizado no Laboratório de Fitopatologia pertencente à Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os 12 isolados de *Pyrenophora* utilizados no estudo foram obtidos de folhas de cevada com sintomas de mancha em rede, coletadas na região centro-sul do Paraná, e morfológicamente identificadas como pertencentes ao gênero *Pyrenophora*. Para extração do DNA genômico dos isolados, as culturas foram desenvolvidas em placas de Petri em meio de cultura de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) por sete dias à 23 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas (ZAUZA et al., 2007). No final desse período macerou-se com nitrogênio líquido o micélio até obter a consistência de pó, o processo foi realizado para cada um dos isolados. Prosseguiu-se com a extração do DNA genômico com o Kit PureLink™ Genomic Plant DNA Purification (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante.

A identificação molecular fez-se com base na amplificação da região ITS 5.8 rDNA, com os iniciadores ITS4 e ITS5 descritos por White et al. (1990). A receita utilizada para a PCR teve um volume de reação de 25 µL, os quais eram compostos de 10X PCR buffer, 50 mM MgCl₂, 10mM dNTP's, 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 10 mM do iniciador ITS4, 10 mM do indicador ITS5, DNA genômico e água ultrapura. Utilizou-se o termociclador Biocicler Biomera para condução das reações de PCR, nas condições de 2 minutos a 95°C (desnaturação inicial), e ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto para anelamento dos iniciadores e extensão a 72°C por 45 segundos; por 30 ciclos.

O produto de PCR dos isolados foram enviados para sequenciamento na empresa GoGenetic. Com resultado do sequenciamento obteve-se os consensos dos sequenciamentos *forward* e *reverse*, por meio do programa BioEdit. Fez-se a comparação (BLAST search) dos consensos com sequências de espécies de *Pyrenophora* disponíveis no banco de dados da NCBI (National Center for Biotechnology Information).

A caracterização filogenética foi obtida por meio do alinhamento da sequência de DNA dos isolados do estudo e de acessos de linhagens de referência das espécies *Pyrenophora teres*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Pyrenophora avenicola*, *Pyrenophora chaetomioides* e *Bipolaris sorokiniana*. O programa utilizado para o alinhamento foi o MEGA. A inferência das árvores filogenéticas foi por meio dos programas MEGA mediante o método de máxima verossimilhança; e o portal CIPRESS Science Gateway v.3.3 foi utilizado pelo método de inferência Bayesiana. O programa Figtree v1.4.4 (MILLER et al., 2010) foi utilizado para edição das árvores e junção dos métodos ML e inferência Bayesiana.

Resultados e Discussão

O produto de PCR com os iniciadores ITS4/ITS5 permitiu a amplificação em gel de agarose de bandas com o tamanho aproximado de 650 pares de base. As comparações do código de barras do DNA e sequências disponíveis (*BLAST search*) no banco de dados da NCBI possibilitou a identificação preliminar dos isolados, todos os isolados obtiveram um percentual de identidade superior a 98% com sequências de referência de *Pyrenophora teres*.

A caracterização filogenética do gene ITS 5.8S do rDNA (Figura 1) agrupou os 12 isolados do estudo (101, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 132.1, 136, 143, 174 e 476-10) no clado contendo sequências de referência de *P. teres* com valor de *bootstrap* de 99% por Máxima Verossimilhança e 1 por inferência Bayesiana. Confirmando desta maneira a identificação e caracterização molecular dos isolados do estudo como *Pyrenophora teres*.

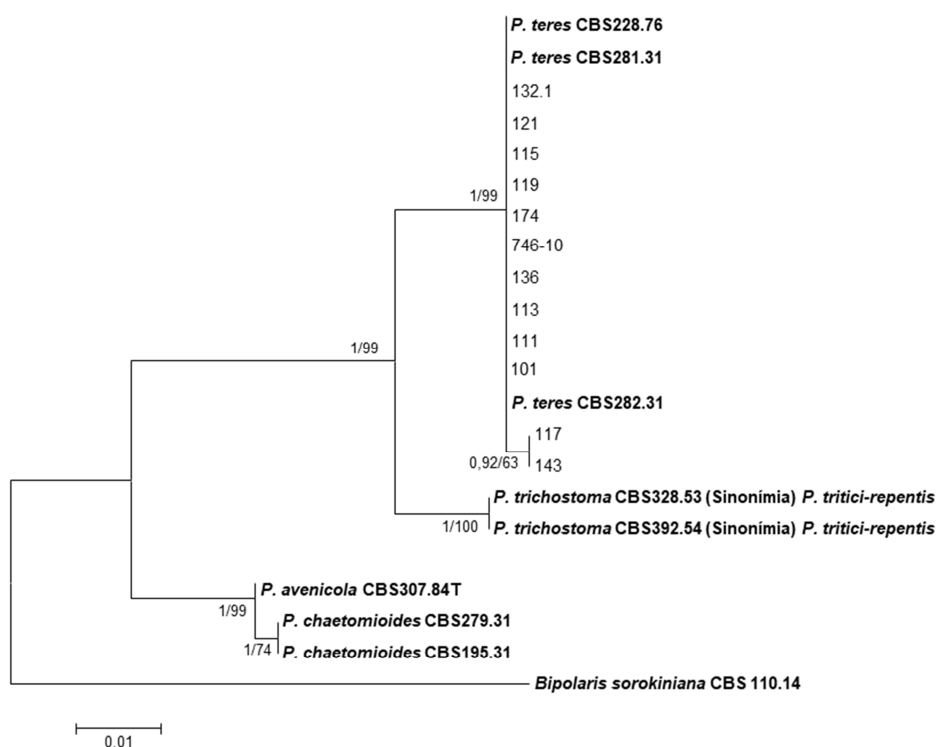


Figura 3. Árvore filogenética inferida pelo método de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana com os isolados obtidos neste estudo e acessos do GenBank (em negrito) de sequências de DNA da região ITS-gene 5.8S do rDNA das espécies *Pyrenophora tritici-repentis*, *P. teres*, *P. chaetomioides*, *P. avenicola* e *Bipolaris sorokiniana* (outgroup). O número sob os ramos significa o valor dos testes estatísticos de bootstrap, com 1000 repetições, o primeiro número é referente a Análise Bayesiana e o segundo a Máxima Verossimilhança.

A identificação molecular através do gene ITS permitiu constatar que o fungo *Pyrenophora teres* está associado a folhas com sintomas de mancha em rede. A mancha reticulada (*net-type*) é comumente encontrada em lavouras de cevada

(MATHRE, 1982), principalmente em regiões com temperaturas ideais para o desenvolvimento do patógeno, como no sul brasileira (MINELLA et al., 1981).

Conclusões

Com base na identificação e caracterização molecular os 12 isolados do estudo correspondem a espécie *Pyrenophora teres*, verificando também a associação do fungo *P. teres* às machas em rede em folhas de cevada.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação Araucária (FA) e à Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Referências

CONAB - **Companhia Nacional do Abastecimento. Séries históricas. Cevada.** Acesso em: 20 de março de 2022 Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>.

LUZ, W.C. da; MINELLA, E. Microorganismos das sementes de cevada em diferentes locais do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.7, n.3, p.387-391, out. 1982.

MATHRE, D.E. **Compendium of barley diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 78p, 1982.

MILLER, M. A; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway. **Gateway Computing Environments Workshop**, 11705685: 1–8. 2010.

MINELLA, E., WENDT, W., LUZ, W.C. et al., **Recomendações técnicas para o cultivo da cevada cervejeira**. Passo Fundo: EMBRAPA-CNTP, 1981. 24p. (EMBRAPA-CNTP, Circular Técnica, 1).

WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S. & TAYLER, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for polygenetics. In: INNIS, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J., WHITE, T.J. (Eds.). **PCR protocols: A guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

ZAUZA, E. A. V., ALFENAS, A. C., MAFIA, R. G. Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: ALFENAS, A.C., MAFIA, R.G. (eds.). **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: Editora UFV. 2007. p. 23-51a UFV. 2007. p. 23-51.