

Padronização de um método para detecção da mutação I86F no gene ISDH de *Phakopsora pachyrhizi* e sua ocorrência em amostras de soja das safras 2017/18 e 2018/19

SOARES, D.A.¹; DINIZ, N.F.¹; SANTOS, A.B.²; GODOY, C.V.²; MEYER, M.C.²; MARCELINO-GUIMARÃES, F.C.².

¹Unifil, Graduanda em Agronomia, Londrina, PR; ²Pesquisador, Embrapa Soja

Introdução

A ferrugem-asiática da soja está entre as maiores causas de perda no rendimento produtivo da cultura. Quando constatada pela primeira vez no Brasil em 2001, gerou perdas estimadas de até 569,2 milhões de toneladas (Yorinori et al., 2004), sendo responsável por danos que variam 10% a 90% nas diversas regiões do país onde já foi relatada (Yorinori et al., 2005). A doença é causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, parasita obrigatório pertencente ao filo Basidiomycota, que possui capacidade de adentrar a célula e retirar nutrientes através de estruturas denominadas haustórios. O patógeno produz estruturas típicas de reprodução denominadas urédias, que emergem no local afetado da epiderme do hospedeiro, causando lesões de coloração castanha a marrom-escura, que comprometem a área foliar da planta.

Dentre as estratégias de manejo para controle da doença, destaca-se o uso de cultivares resistentes, emprego do vazio sanitário e calendarização da semeadura da soja, bem como o controle químico, via aplicação de fungicidas foliares, que é o método mais utilizado. Os fungicidas de maior eficiência no controle da ferrugem-asiática pertencem aos grupos dos Inibidores de Demetilação (IDM, trazóis); os Inibidores de Quinona externa (IQe, estrobilurinas); e os Inibidores de Succinato Desidrogenase (ISDH, carboxamidas) (Godoy et al., 2016). Contudo, com a generalizada distribuição geográfica da doença, a rápida disseminação e a alta agressividade no campo, o uso intensivo de fungicidas tem provocado a seleção de populações de *P. pachyrhizi* com menor sensibilidade, aumentando a frequência de populações resistentes (Godoy; Meyer, 2014).

No Brasil, até a safra de 2015/2016, não havia sido descoberta a resistência aos fungicidas ISDH, que inibem a atuação da enzima succinato desidrogenase em duas fases da respiração celular, o transporte de elétrons e o ciclo do ácido cítrico (Sierotzki; Scaliott, 2003). A resistência foi relacionada à ocorrência de uma mutação não sinônima no gene *sdhC*, levando a troca do aminoácido C-186F no códon 86 (Simões et al., 2018).

O objetivo deste trabalho foi validar um método para detecção da mutação 186F via PCR quantitativo e determinar a frequência da mutação em populações de fungos de diferentes regiões de cultivo de soja nas safras 2017/18 e 2018/2019.

Material e Métodos

As amostras de diferentes regiões do Brasil, das safras 2017/2018 e 2018/2019, foram coletadas ou recebidas, via correio na Embrapa Soja, somando um total de 92 amostras, provenientes de áreas experimentais ou de lavouras comerciais. Após o recebimento das folhas no laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, os esporos foram aspirados a partir das lesões presentes na superfície da face abaxial da folha, desidratados por um período de 24 horas para posterior armazenamento em temperatura de -80°C . A extração do DNA do esporo da ferrugem foi realizada com base no protocolo de extração de Dellaporta et al. (1983) modificado e armazenado a uma temperatura de 4°C até o seu uso.

Para a detecção da mutação, o DNA das amostras foi submetido à amplificação via PCR quantitativo, utilizando de primers e sondas desenvolvidos pelo Laboratório de Biotecnologia Vegetal com base na metodologia TaqMan, flanqueando o sítio da mutação. As corridas foram analisadas no equipamento ABI 7900 em reações multiplex, em um volume final de $20\ \mu\text{L}$, contendo 2ng de DNA, $0,80\ \mu\text{M}$ dos primers e $0,20\ \mu\text{M}$ das sondas, e processados no software 7500 FastSystem.

A análise dos resultados foi conduzida com base nos gráfico de componentes, de amplificação e via discriminação alélica. Inicialmente, os DNAs de amostras de referência, obtido de amostras de DNA de isolados puros homozigotos selvagens ou heterozigotos (monospóricos), previamente tendo a

região da mutação sequenciada via Sanger, foram utilizados para validar o perfil de amplificação em cada curva. Para estimar o percentual da presença da mutação em cada amostra populacional, amostras de DNA de isolados puros homocigotos selvagem e heterocigotos (monospóricos) foram misturadas a fim de se obter padrões de referência variando de 0% a 50% de frequência da mutação.

Resultados e Discussão

Inicialmente, a análise do perfil de amplificação foi avaliada via gráfico de componentes, que consiste no desempenho das fluorescências FAM e VIC, representando a presença dos alelos resistente e suscetível, respectivamente. Numa amostra referência mutada (heterocigota), confirmada previamente via sequenciamento Sanger, o comportamento das curvas mostra aumento da fluorescência FAM antes e com maior intensidade que o da fluorescência VIC (Figura 1A). Numa amostra referência não-mutada, a curva da fluorescência VIC mostra aumento mais expressivo, a ponto de cruzar a curva da fluorescência FAM (Figura 1B).

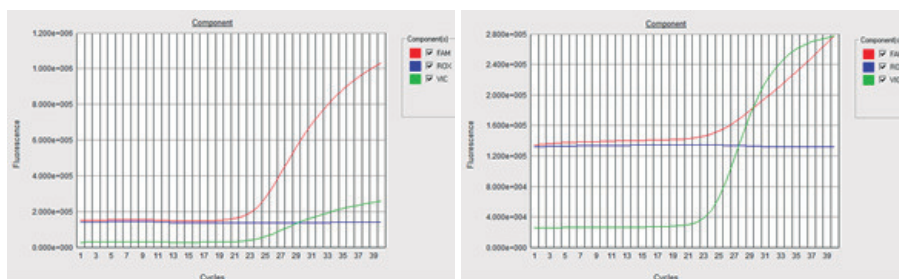


Figura 1. Perfil de amplificação das amostras de *P. pachyrhizi* no gráfico de componentes após amplificação via PCR quantitativo utilizando a metodologia TaqMan. Amostra referência (isolado monospórico) apresentando a mutação (A) e sem a mutação (B).

Adicionalmente, a análise dos resultados foi conduzida com base no gráfico de amplificação. De modo similar, na amostra referência mutada, a curva de amplificação referente ao alelo resistente apresenta maior intensidade (Figura 2A) comparado com a amostra referência não-mutada, onde a curva referente ao alelo suscetível apresenta maior intensidade e cruza a curva referente ao alelo resistente (Figura 2B).

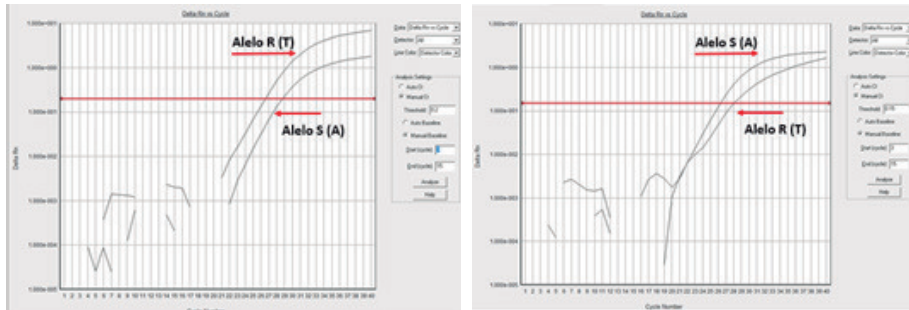


Figura 2. Perfil de amplificação das amostras de *P. pachyrhizi* no gráfico de amplificação após PCR quantitativo utilizando a metodologia TaqMan. Amostra referência (isolado monospórico) apresentando a mutação (A) e sem a mutação (B).

Finalmente, as amostras foram plotadas no gráfico de discriminação alélica, visando determinar a dispersão das amostras em função da frequência da mutação, variando de 0% a 50%. Como não foi possível estabelecer uma curva padrão, as amostras foram classificadas em intervalos variando de 0-3%, 3-6%, 6-12%, 12-25%, 25-50% de frequência da mutação (Figura 3).

A análise das 92 amostras populacionais revelou que 85% das amostras (78) de populações coletadas nas duas safras apresentam a mutação que determina a resistência ao ISDH (Figura 3A) em diferentes percentuais (Figura 3B), sendo apenas 14 amostras classificadas como não mutadas. O número de amostras mutadas foi igual para ambas as safras (39), variando, no entanto, as frequências estimadas da presença da mutação. A frequência estimada da presença da mutação nos intervalos de 3-6%, 6-12%, 12-25% e 25-50% foi maior na safra de 2018/2019, enquanto que o intervalo 0-3% foi maior na safra de 2017/2018. A safra de 2017/2018 não apresentou amostras com frequência estimada de 25-50%; em contrapartida, 4 amostras apresentaram frequência de 50%. Na safra de 2018/2019, apenas uma amostra apresentou frequência estimada de 25-50% e nenhuma amostra com frequência de 50%.

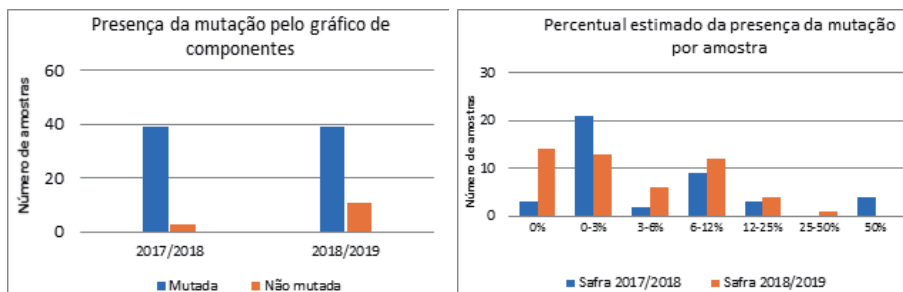


Figura 3. Caracterização das amostras de soja das safras 2017/18 e 2018/19 quanto a presença da mutação 186F: distribuição da mutação por safra (A) e percentual estimado da frequência da mutação por safra (B).

Todas as amostras consideradas não mutadas (14) apresentaram, integralmente, as características que indicam a ausência da mutação para a resistência ao SDHI, onde no gráfico de componentes a curva que representa a fluorescência VIC cruzou a curva que representa a fluorescência FAM; na amplificação absoluta a curva que representa a presença do alelo suscetível cruza a curva que representa o alelo de resistência; e na discriminação alélica, a amostra se posiciona na área representada pelo percentual estimado de 0% de mutação. Dentre as amostras consideradas mutadas pelo gráfico de componentes, 10 não condisseram integralmente com os padrões estabelecidos para indicar a presença da mutação, sendo que três delas se aproximaram mais dos padrões que determinam a ausência da mutação.

Conclusão

Pelo método desenvolvido para a detecção da mutação que determina a resistência ao ISDH, a ocorrência de mutação foi igual nas safras de 2017/2018 e 2018/2019, variando no percentual estimado das frequências da presença da mutação nas populações do fungo.

Referências

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

GODOY, C. V.; MEYER, M. C. Resistência a fungicidas na cultura da soja. **Informativo Meridional**, Londrina, v. 14, n. 51, p. 5, 2014.

GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; SOARES, R. M.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; MEYER, M. C.; COSTAMILAN, L. M. Asian soybean rust in Brazil: past, present, and future. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 51, n. 5, p. 407-421, 2016.

SIEROTZKI, H.; SCALLIET, G. A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. **Phytopathology**, v. 103, n. 9, p. 880-887, 2013.

SIMÕES, K.; HAWLIK, A.; REHFUS, A.; GAVA, F.; STAMMLER, G. First detection of a SDH variant with reduced SDHI sensitivity in *Phakopsora pachyrhizi*. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 125, p. 21-26, 2018.

YORINORI, J. T.; NUNES JUNIOR, J.; LAZZAROTTO, J. J. **Ferrugem “asiática” da soja no Brasil**: evolução, importância econômica e controle. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 36 p. (Embrapa Soja. Documentos, 247).

YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M.; FREDERICK, R. D.; COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P. F.; GODOY, C. V.; NUNES JUNIOR, J. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, v. 89, p. 675-677, 2005.