

## Desenvolvimento de iniciadores para detecção e diferenciação de *Magnaporthe oryzae* em sementes de arroz

Nara Cristina Teixeira<sup>1</sup>, Livia Teixeira Duarte<sup>2</sup>, Márcio Vinícius de Carvalho Barros Côrtes<sup>3</sup>, Marta Cristina Corsi de Filippi<sup>4</sup>, Adriane Wendland<sup>5</sup>

O arroz (*Oryza sativa*) é plantado e consumido em diversos países do mundo devido seu alto teor nutricional. Segundo o Ministério da agricultura Pecuária e abastecimento, em 2013 o cereal contribuiu com aproximadamente 6.593,0 milhões para o PIB. No entanto, a produtividade da cultura ainda é considerada limitada por diversos fatores, como alterações climáticas, pragas e doenças. A principal doença de arroz é a brusone, causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae*, responsável por causar prejuízos em cerca de 85 países. A doença provoca sintomas nas folhas, com o aparecimento de pequenas lesões necróticas de coloração marrom, que evoluem, tornando-se com o centro cinza ou esbranquiçado, e em seguida pode provocar a queda das folhas ou mesmo a morte da planta inteira. Na fase de maturação também podem manifestar os sintomas em nós e entrenós do caule, e causar a “quebra do pescoço”, bloqueando a passagem da seiva. Se a planta for infectada antes da fase leitosa do grão pode ocorrer morte da panícula. Todavia, a doença infecta todos os estádios vegetativos. Com isso um método rápido e sensível de detecção do agente causal de Brusone rápido e sensível se faz necessário para rastrear e testar a sanidade de lotes de sementes de arroz, auxiliando na tomada de decisão quanto ao destino (plantio, consumo ou descarte) e devidos controle e tratamentos a serem realizados para garantir a sanidade da lavoura, evitando a introdução da doença em novas áreas de cultivo, a redução do uso de defensivos químicos e por consequência, a redução também nos custos de implantação e condução da cultura de arroz. Adicionalmente, permite que cultivares alcancem seu potencial produtivo, promovendo sua durabilidade da resistência genética. Portanto, esse trabalho teve como objetivo desenvolver um método de detecção do agente causal de brusone em arroz a nível molecular, por meio de amplificação de regiões específicas do DNA da espécie *M. oryzae*. No laboratório de análise molecular da Embrapa Arroz e Feijão, foi conduzido um experimento com patógenos de arroz, iniciado por um processo de extração de DNA via protocolo Doyle e Doyle, adaptado para fungos. O material foi quantificado e diluído a concentração de 50ng/mL. Regiões específicas do fungo foram obtidas e comparadas no Genbank, e a sequência utilizada para manipulação dos primers foi a do gene Mif23, responsável pela formação do apressório e penetração do fungo. Foram manipulados 6 pares de primers (forward e reverse) para PCR (Reação Polímerase em Cadeia). Os primers foram testados com o kit Master mix (QIAGEN), de acordo com as quantidades e temperaturas de reação estabelecidas pelo fabricante. Em seguida, foi feita uma eletroforese em gel de agarose verificando a ligação dos primers. Foi realizada também a extração do DNA de *Pyricularia grisea*, *Sarocladium Oryzae*, *Trichoderma asperellum* e *Fusarium oxysporum*, conforme metodologia citada anteriormente. O DNA das outras espécies foi testado com os mesmos primers fabricados para detecção de *M. oryzae*, e também submetidos a eletroforese em gel. No primeiro teste realizado com os seis pares de primers, manipulados para *M. oryzae* foi possível visualizar a amplificação do material desejado por meio da eletroforese em gel de agarose 1,5%. No teste de especificidade, no qual o DNA dos demais patógenos foram submetidos às mesmas condições de PCR, somente as bandas de DNA de *M. oryzae* amplificaram, comprovando a especificidade do material. Por meio da técnica de amplificação exponencial PCR, que se baseia no processo de replicação, é possível aumentar a quantidade do DNA desejado, e com isso, facilitar o diagnóstico mais preciso dos agentes patogênicos. As espécies utilizadas foram de culturas e espécies distintas e permitiram assegurar a confiabilidade dos primers desenvolvidos a partir do gene específico Mif23, quando submetidos às mesmas condições de amplificação e comparados entre si. Os iniciadores concebidos neste experimento estão sendo aplicados na obtenção e disponibilização de um kit de detecção preciso e rápido para *Magnaporthe oryzae* com base em LAMP (“Loop Mediated Isothermal Amplification) e conjuntamente com outras espécies fitopatogênicas ao arroz por meio de PCR multiplex.

<sup>1</sup> Estudante de Mestrado na Pós Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Goiás, estagiário da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, naracristina015@hotmail.com

<sup>2</sup> Farmacêutica, Mestre em Ciências Farmacêuticas, analista da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, livia.duarte@embrapa.br

<sup>3</sup> Farmacêutico, Mestre em Bioquímica, analista da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, marcio.cortes@embrapa.br

<sup>4</sup> Engenheira agrônoma, PhD em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, cristina.filippi@embrapa.br

<sup>5</sup> Engenheira agrônoma, Ph.D. em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, adriane.wendland@embrapa.br