



---

## VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DO FUNGO CAUSADOR DA SIGATOKA-AMARELA EM BANANEIRA NO ESTADO DA BAHIA COM O USO DE SSR

YSLAI SILVA PEIXOUTO<sup>1</sup>; WILMA BRANDÃO DE ANDRADE<sup>2</sup>; RAFAELLA DE LIMA ROQUE<sup>1</sup>; FERNANDO HADDAD<sup>3</sup>; CLÁUDIA FORTES FERREIRA<sup>3</sup>; EDSON PERITO AMORIM<sup>3</sup>

### INTRODUÇÃO

A bananeira assume importância econômica e social em todo o mundo, cultivada em mais de 130 países tropicais e subtropicais, principalmente por pequenos agricultores. O Brasil, em 2010 produziu 6,9 milhões de toneladas em uma área de 487 mil ha (FAO, 2012). Esta cultura apresenta importância na geração de empregos, sendo responsável pela renda de milhões de famílias. Embora este cenário seja bastante promissor, a maioria das variedades de bananeira disponível é suscetível à Sigatoka-amarela, causada pelo fungo *Mycosphaerella musicola* Leach, onde a aplicação sistemática de fungicidas ainda é a principal meio de controle.

A doença é responsável pela redução da área foliar verde da planta, refletindo em menor produtividade (CORDEIRO; MATOS, 2005). Diante disto, é importante conhecer a variabilidade genética do agente causal da Sigatoka-amarela para que o melhoramento visando a resistência seja mais eficiente no seu controle. Entende-se por variabilidade genética um conjunto de alelos e genótipos presentes em um grupo de indivíduos; representando a base fundamental para os programas de melhoramento.

Marcadores moleculares do tipo SSR-*Simple Sequence Repeats* (microsatélites), possibilitam o estudo da variabilidade genética por possuírem natureza co-dominante, serem altamente polimórficos e amplamente distribuídos no genoma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). O objetivo do trabalho foi estudar a distribuição da diversidade de isolados *M. musicola* por meio de marcadores microsatélites nas principais regiões produtoras de banana do Estado da Bahia.

### MATERIAL E MÉTODOS

Folhas de bananeira apresentando sintomas de Sigatoka-amarela foram coletadas nas regiões de Bom Jesus da Lapa e Presidente Tancredo Neves, na Bahia; sendo que cada isolado teve a sua

<sup>1</sup> Bióloga, estudante de pós-graduação, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-BA, e-mail: yslaipeixouto@hotmail.com; rafaella\_roque@hotmail.com

<sup>2</sup> Graduanda em Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-BA, e-mail: wilma\_bio@hotmail.com

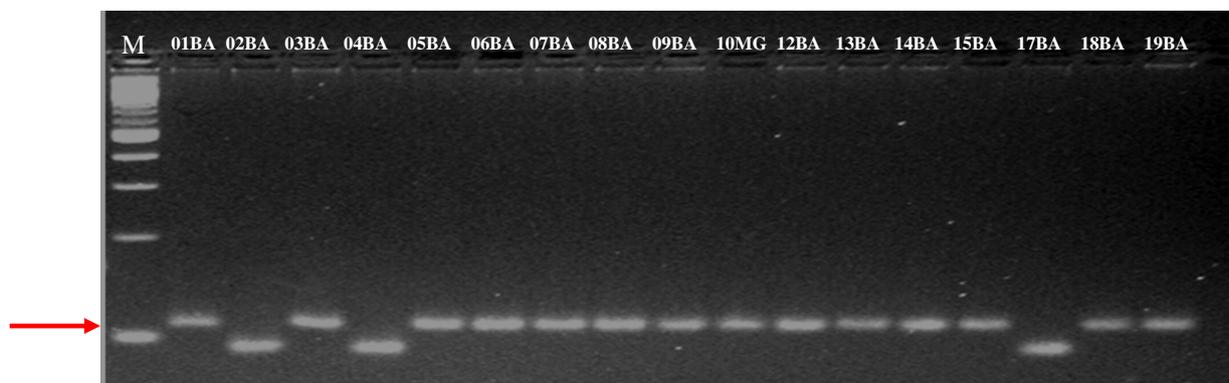
<sup>3</sup> Eng. Agr., pesquisador Embrapa Mandioca e Fruticultura-BA, e-mail: edson@cnpmf.embrapa.br , claudiaf@cnpmf.embrapa.br , fernando@cnpmf.embrapa.br

informação georeferenciada (GPS – *Global Positioning System*). As folhas coletadas foram colocadas em câmaras úmidas e após dois dias foi verificada a presença do fungo com a utilização de uma lupa. Os conidióforos encontrados foram capturados com uma seringa, transferidos para o meio ágar-água, e identificados com o auxílio do microscópio óptico, em seguida transferidos para o meio V8, obtendo assim, culturas monospóricas.

Após três semanas foi realizada a extração do DNA conforme o protocolo Doyle e Doyle (1990) modificado. As amplificações para os marcadores SSRs foram conduzidas de acordo com os protocolos sugeridos por Zapater et al. (2008) e Molina et al. (2001) com modificações. As distâncias genéticas entre os acessos foram avaliadas por meio de matriz de dissimilaridade, realizando o agrupamento dos genótipos pelo método UPGMA (*unweighted pair-group method using arithmetic averages*) com o índice *Shared Alleles*, ou alelos compartilhados, construindo assim, um dendrograma com o uso do programa POWERMARKER (LIU; MUSE, 2005). Para a definição do ponto de corte no dendrograma foi adotado o critério proposto por Mingoti (2005).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de onze *primers* SSRs foram utilizados nas reações de PCR e amplificados em gel de agarose ultrapura a 4% (Figura 1). Deste total, cinco apresentaram-se polimórficos em relação à população em estudo, os quais foram utilizados nas análises. A eficácia dos marcadores microssatélites específicos para *M. musicola* também foi observado por Molina et al. (2001) onde foi possível o estudo da estrutura populacional do patógeno em áreas com Sigatoka-amarela.

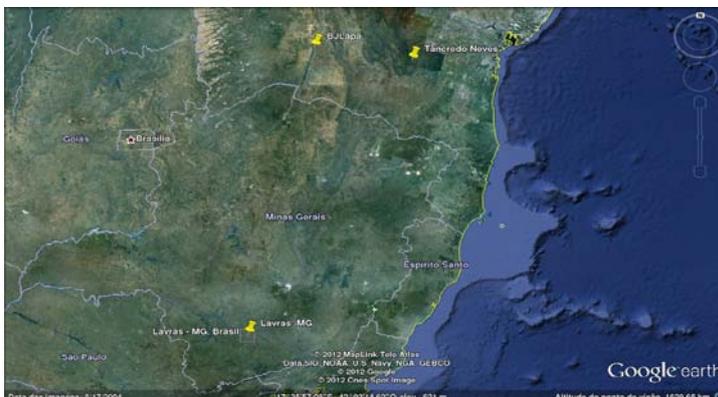


**Figura 1** - *Primer* MmSSR 103 amplificado com isolados de *M. musicola* dos municípios de Bom Jesus da Lapa-BA (01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 12, 19), Pres. Tancredo Neves-BA ( 13, 14, 15, 17 e 18) e Lavras-MG (10). M= Marcador ladder 100 pb (Biolabs). Seta vermelha = padrão de bandamento obtido pelo primer MmSSR 103.

Foram utilizados 17 isolados dos municípios de Bom Jesus da Lapa e Presidente Tancredo Neves, sendo um isolado de Lavras-MG utilizado para verificar se ele se comporta como *outlier*, ou seja, apresentando-se diferentemente dos outros isolados.

O isolado 10MG coletado em Lavras apresentou índice de dissimilaridade de 25% em relação ao isolado 15BA coletado em Presidente Tancredo Neves; o que não era esperado haja a vista a distância entre os dois municípios (Figura 2). Segundo Hayden et al. (2005) a diferenciação

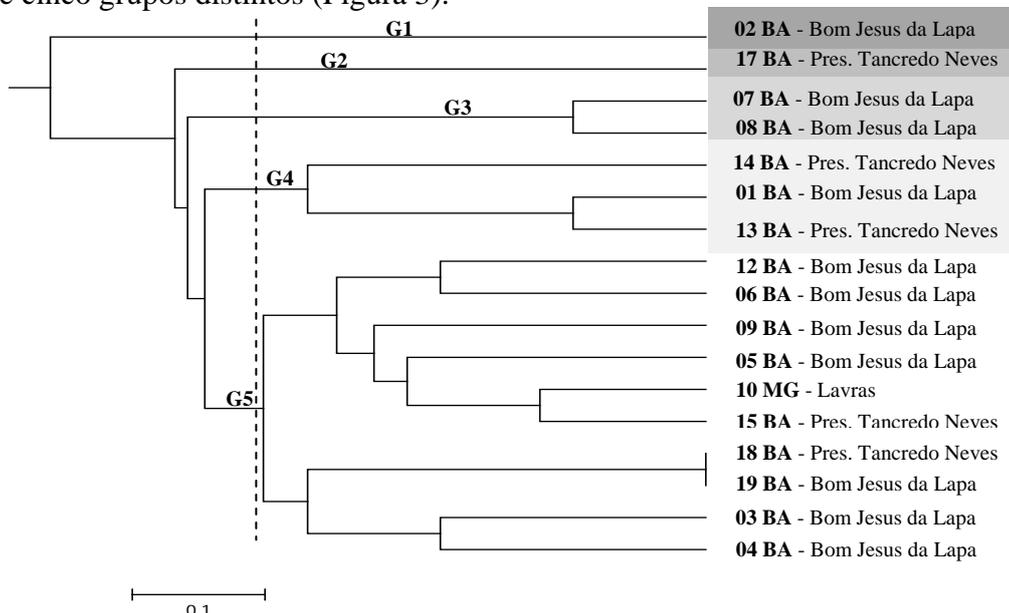
genética observada entre populações separadas dezenas ou centenas de quilômetros indica migração por ascósporos ou conídios. A fase teleomórfica é responsável pela sobrevivência do patógeno e disseminação à distância na presença de água livre, e a fase anamórfica é responsável pela rápida disseminação da doença nos períodos favoráveis (Figueiredo, 2001).



**Figura 2** - Localização dos municípios onde foram coletados isolados de *M. musicola*.

O isolado 02BA coletado em Bom Jesus da Lapa apresentou 100% de dissimilaridade com todos os outros isolados, exceto o isolado 04BA também de Bom Jesus da Lapa que apresentou 80% de dissimilaridade de acordo com a matriz de distância gerada pelo programa POWERMARKER.

O dendrograma baseado nas informações obtidas pelos marcadores SSRs possibilitou a formação de cinco grupos distintos (Figura 3).



**Figura 3** - Dendrograma construído a partir de bandas provenientes de cinco marcadores SSRs utilizando-se o método UPGMA de agrupamento pelo programa POWERMARKER.

Os genótipos foram agrupados com a seguinte distribuição: G1: 02BA, G2: 17BA, G3: 07BA e 08BA, G4: 01BA, 13BA e 14BA e G5: 03BA, 04BA, 05BA, 06BA, 09BA, 10MG, 12BA, 15BA, 18BA e 19BA, com ponto de corte de 0.75. De acordo com o dendrograma os isolados

02BA (G1) e 17BA (G2) formaram grupos isolados, apresentando divergência genética em relação aos demais isolados. Podemos observar que o G5 é composto por isolados dos três locais de coleta, inclusive o de Lavras o que não era esperado; e que os isolados 18BA de Presidente Tancredo Neves e o 19BA de Bom Jesus da Lapa apresentam 100% de similaridade. Com isso observa-se que os isolados não foram agrupados de acordo com seu local de coleta, indicando que apesar da distância física, os indivíduos não tiveram uma adaptação local-específica.

## CONCLUSÕES

Os marcadores microssatélites são capazes de separar os genótipos do fungo *M. musicola* de forma a contribuir em trabalhos futuros de associação entre estrutura populacional e diversidade genética, e assim direcionar estratégias a serem adotadas nos programas de melhoramento para controle da Sigatoka-amarela no Estado da Bahia.

## REFERÊNCIAS

- CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P. Expressão da Resistência de Variedades de Banana à Sigatoka-Amarela. **Fitopatologia Brasileira** v. 30, p. 532-534. 2005.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12, p. 13-15. 1990.
- FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação). Disponível em: < <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> >. Acesso em: 20/05/2012.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D., 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética, **Editora Embrapa-Cenargen**, Brasília, 220p.
- FIGUEIREDO, M.B. Doenças fúngicas emergentes em grandes culturas. **Biológico**, São Paulo, v.63, n.1/2, p.29-32, 2001
- HAYDEN, H.L.; CARLIER, J.; AITKEN, E.A.B. The genetic structure of Australian populations of *Mycosphaerella musicola* suggests restricted gene flow at the continental scale. **Phytopathology**. v. 95, n. 5, 2005.
- MINGOTI, S.A., **Análise de dados através de métodos de estatística multivarida: uma abordagem aplicada**, Belo Horizonte: Editora UFMG, 2005. 295p.
- LIU, K.; MUSE, S.V. **POWERMARKER: Integrated analysis environment for genetic marker data – Bioinformatics** 21 v. 9, p. 2128-2129. 2005.
- MOLINA, C.; KAEMMAR, D.; WEISING, A.K.; KAHL, G. Microsatellite markers for fungal banana pathogen *Mycosphaerella musicola*. **Primer Note**, v. 1, p. 137-139. 2001,

ZAPATER, M.F.; DICHEMIN, M.; DUSSART, J.F.M.; COSTE, D.; BROTTIER, P.; CARLIER, J. Microsatellite markers for the fungal banana pathogens *Mycosphaerella fijiensis*, *Mycosphaerella musicola* and *Mycosphaerella eumusae*. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 1121-1125. 2008.