



**VERIFICAÇÃO 'IN HOUSE' DO MÉTODO DE DETECÇÃO ATRAVÉS DE PCR EM TEMPO REAL DO FUNGO *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS*, AGENTE CAUSAL DA SIGATOKA NEGRA EM BANANA**

Luciana Oliveira Barateli; Regina Melo Sartori Coelho; Abmael Monteiro de Lima Junior; Rodrigo da Silva Santos.

LABORATÓRIO NACIONAL AGROPECUÁRIO – LANAGRO-GO

lucianabaratelli@hotmail.com

**RESUMO:** A Sigatoka negra, patologia causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* em banana, foi detectada no Brasil pela primeira vez em 1997, mais especificamente no estado do Amazonas, e até o presente momento o estado de Goiás encontra-se como área livre desta doença. A identificação de doenças e a detecção de patógenos, assim como as suas regiões de ocorrência, é de fundamental importância para o monitoramento e manejo de doenças. Neste contexto Laboratório de Diagnóstico e Biotecnologia (LDB) do LANAGRO-GO, tem desempenhado um importante trabalho juntamente como o DSV na identificação de pragas quarentenárias bem como sua região de ocorrência. O objetivo deste trabalho foi avaliar os critérios de desempenho qualitativos para a validação 'in house' de método de diagnóstico molecular do fungo *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal da Sigatoka negra, utilizando a técnica de PCR em tempo real, partindo de tecidos com sintomas típicos. A validação proposta avaliou os requisitos especificidade, limites de detecção, robustez e inibição (parâmetros qualitativos) da técnica de PCR em tempo real para o diagnóstico de *Mycosphaerella fijiensis*. Em todos os parâmetros avaliados o método testado de PCR em tempo real dentro das condições do laboratório LDB no LANAGRO-GO mostrou-se eficiente para a detecção de *Mycosphaerella fijiensis*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Sigatoka Negra. *Mycosphaerella fijiensis*. PCR. Fitopatologia. Diagnóstico molecular.

## 1. INTRODUÇÃO

A Sigatoka negra, patologia causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* em banana, foi detectada no Brasil pela primeira vez em 1997, mais especificamente no estado do Amazonas, e até o presente momento o estado de Goiás encontra-se como área livre desta doença. As áreas livres de sigatoka negra foram reconhecidas oficialmente pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, através da Instrução Normativa Federal nº 29, em 7 de junho de 2006 (Teixeira, 2009).

A identificação de doenças e a detecção de patógenos (fungos, bactérias e nematóides), assim como as suas regiões de ocorrência, é de fundamental importância para o monitoramento e manejo de doenças. O Departamento de Sanidade Vegetal (DSV) é responsável pela elaboração da regulamentação fitossanitária nacional, assim como pela fiscalização do seu cumprimento (MAPA, 2015). Neste contexto o Laboratório Nacional Agropecuário de Goiás (LANAGRO-GO), mais especificamente o Laboratório de Diagnóstico e Biotecnologia (LDB), tem desempenhado um importante trabalho juntamente com o DSV na identificação de pragas quarentenárias bem como sua região de ocorrência.

Para diminuir o tempo empregado nas análises, bem como aumentar a especificidade dos métodos de diagnóstico fitossanitário o Laboratório de Diagnóstico e Biotecnologia (LDB) tem implementado em sua rotina o diagnóstico molecular do fitopatógeno. Neste trabalho avaliou-se os critérios de desempenho qualitativos para a validação 'in house' de método de diagnóstico molecular do fungo *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal da Sigatoka negra, utilizando a técnica de PCR em tempo real.

## 2. METODOLOGIA

A validação proposta avaliou os requisitos especificidade, limites de detecção, robustez e inibição (parâmetros qualitativos) da técnica de PCR em tempo real para o

diagnóstico de *Mycosphaerella fijiensis* a partir de isolados obtidos diretamente de leões típicos, nas condições do LDB do LANAGRO/GO.

Utilizou-se diferentes metodologias, como tipos meios de cultura, diferentes regimes de luminosidade e temperatura para realizar o isolamento do fungo. Através dos isolados retirou-se amostras para a identificação morfológica e molecular do patógeno utilizando técnicas de PCR em tempo real.

A análise qualitativa foi realizada através da detecção da sequência do DNA alvo na amostra. O resultado claramente demonstra a presença ou ausência do elemento genético sob estudo.

Para avaliação da especificidade analítica por PCR em tempo real utilizou-se os primers/sonda MFBf (5' - CGA CAC AGC AAG AGC AGC TTC - 3'), MFBr (5' - TTC GAA AGC CTT GGC ACT TCA A - 3') / MFBp (5' - 6FAM CTG AGC ACG ACT GAC CAC AAC GCA bhq-1 -3'). As amostras foram submetidas a amplificação de DNA por PCR em tempo real para a identificação da região alvo para a determinação da especificidade dos primers e sonda utilizados.

Os testes de limite de detecção foram realizados com DNA de *Mycosphaerella fijiensis* em sete diluições, com 10 repetições cada, sendo: uma solução inicial com 100 ng (solução não diluída), seguidas de diluições: 1:10; 1:10<sup>2</sup>; 1:10<sup>3</sup>; 1:10<sup>4</sup>; 1:10<sup>5</sup>; 1:10<sup>6</sup>; 1:10<sup>7</sup>.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Durante o isolamento do fungo a metodologia que se mostrou mais eficaz foi a utilização do meio de cultura V8 no regime de luminosidade de 10 dias subsequentes sob ausência total de luz e 5 dias subsequentes sob luz contínua.

No teste de especificidade analítica os primers utilizados para amplificação de DNA mostraram-se específicos conforme o resultado esperado, onde as amostras que continham a região alvo específica amplificaram em reação de PCR em tempo real e as demais amostras que não continham a região alvo não amplificaram.

Após avaliação dos parâmetros do teste de limite de detecção pode-se constatar que não houve diferença significativa com relação ao LOD, sendo as amostras de DNA obtidas das folhas com lesões com limite de detecção na terceira diluição D<sub>3</sub> (1:10<sup>3</sup>) e as amostras obtidas do isolado com limite de detecção na quarta diluição D<sub>4</sub> (1:10<sup>4</sup>).

### **4. CONCLUSÕES**

Os parâmetros avaliados através das reações de PCR mostraram que o método qualitativo de PCR em tempo real para detecção do fungo *Mycosphaerella fijiensis* utilizando os primers/sonda (MFBf, MFBBr)/MFBp é específico, como limite de detecção com repetitividade na concentração de 0,0001 para amostras obtidas de folhas com lesões e 0,00001 de amostras obtidas do fungo isolado.

Sendo assim, conclui-se que o Laboratório de Diagnóstico e Biotecnologia (LDB) do LANAGRO/GO está apto a realizar a detecção de *Mycosphaerella fijiensis* em banana por PCR em tempo real.

## REFERÊNCIAS

TEIXEIRA, E. A. **Avanços da Agrodefesa na Área de Sanidade Vegetal**. 2009. Disponível em: <<http://www.agrodefesa.go.gov.br/publicacoes/sanidade-vegetal/195-avancos-na-area-de-sanidade-vegetal/file>>. Acesso em: 28. mai. 2015.

ENGL. European Network of GMO Laboratories. **Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing**. 2008. 8 p. Disponível em : [http://gmocrl.jrc.ec.europa.eu/doc/Min\\_Perf\\_Requirements\\_Analytical\\_methods.pdf](http://gmocrl.jrc.ec.europa.eu/doc/Min_Perf_Requirements_Analytical_methods.pdf)>. Acesso em: 25 jul. 2014.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **DOQ-CGCRE-008**. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Ro de Janeiro: INMETRO, 2003.

INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANDARDIZATION. **ISO 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories**. Geneva, Switzerland: ISO, 2005.

MCCARTNEY, H. A.; FOSTER, S. J.; FRAAIJE, B. A.; WARD, E. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. **Pest Manag Sci.**, v 59, n. 2, p.129-142, feb. 2003.

WATERWORTH, H. E.; WHITE, G. A. Plant introduction and quarantine: the need for both. **Plant Dis**, v. 66, p. 87-90, jan. 1982.

EMBRAPA. **Sistema de Produção da Bananeira Irrigada**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananeiraIrrigada/doencas.htm> > Acesso em: 19. mar. 2015.

GASPAROTTO, L; PEREIRA, J. C.R; HANADA, R.E; MONTARROYOS, A. V. V. **Sigatoka-negra da bananeira**. Embrapa Ocidental. Manaus, AM, 2006.