

ANÁLISE FILOGENÉTICA E ESPECTRAL: OBTENÇÃO DE DADOS PARA PERFIL DE *FUSARIUM* UTILIZANDO UV-VIS

Palavras-chave: Cevada, *Fusarium*, ultravioleta-visível

Giovanna Capobianco Garofalo, FEA – UNICAMP

Elem Tamirys Dos Santos Caramês, ICB - USP

Profa. Dra. Liliana Oliveira Rocha, orientadora, FEA – UNICAMP

OBJETIVOS DA PESQUISA

A pesquisa teve como objetivo utilizar o método de UV-Vis para adquirir informações químicas que possibilitem caracterizar espécies de *Fusarium graminearum* isoladas de cevada nativa e cultivada. Além disso, visou-se a construção de um perfil que viabilize o desenvolvimento de estratégias para redução da frequência de aparecimento desse patógeno na cevada brasileira.

METODOLOGIA DA PESQUISA

O projeto iniciou-se com a seleção de espécies previamente isoladas de cevada nativa e cultivada nos estados de São Paulo e do Rio Grande do Sul no ano de 2017, que foram caracterizadas por Iwase et al. (2022) e de Piacentini et al. (2019).

As espécies que abrangem a cevada nativa e a cevada cultivada estão indicadas na Tabela 1.

Cevada Nativa		Cevada Cultivada
F. armeniacum	F. austromericanum	F. poae
F. cortaderiae	F. tricinctum	F. graminearum
F. asiaticum	F. heterosporum	F. cortaderie
F. graminearum		F. meridionale

Tabela 1: Espécies de cevada nativa e cultivada utilizadas no projeto

• EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE DNA

Para estas análises, os isolados foram cultivados em meio PDA á 25°C durante 5 dias, conforme descrito por Iwase et al., (2020). A extração foi realizada utilizando o *kit Dneasy Plant Mini*, conforme as instruções do fabricante. Os *primers RPB1* e *RPB2* e as reações de PCR foram realizadas de acordo com O'Donnell et al., (2013) e O'Donnell et al., (2018). Os amplicons foram purificados com o *QIAquick PCR purification Kit* e após isso foram enviados para sequenciamento no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), pertencente a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). As sequencias obtidas foram analisadas no software Geneious v. 6.0.6.

Para o alinhamento múltiplo utilizaram-se sequências de nucleotídeos disponíveis no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e as do experimento, com o auxílio do plug-in *ClustalW* do *software* utilizado. O alinhamento foi composto por **203 taxa**, com **1387 nucleotídeos** e **184 caracteres parcimônica-informativos (PICs)**, resultando em uma árvore com **índice de consistência de (CI) de 0,5597** e **índice de retenção (RI) de 0,5406**.

A análise de máxima parcimônia foi realizada com a opção de pesquisa heurística com 1000 sequências de adição aleatória e algoritmo de reconexão de bissecção no *software* PAUP 4.0b10. A árvore filogenética foi observada usando o programa FigTree v.1.4., contemplando as espécies de cevada nativa e de cevada cultivada.

• **DADOS ESPECTRAIS POR UV-Vis**

Para esta análise, os isolados foram cultivados em meio ágar V8, à 25°C durante 7 dias. Após o período de crescimento, o micélio foi coletado utilizando-se um bisturi, o conteúdo foi adicionado de 1mL de água ultrapura estéril em eppendorfs e vortexado. Após isso, o conteúdo foi centrifugado (8000 rpm por 3 minutos) e o sobrenadante resultante foi coletado e diluído 30 vezes em água ultrapura para a obtenção dos espectros.

Para a análise espectral, foram pipetados 200µL das amostras de isolado

em uma microplaca de quartzo e a leitura foi realizada em uma microleitora de placas, dentro da faixa de 200nm a 1000nm com 1nm de resolução. Dois terços das amostras de cada espécie foram utilizadas para a calibração e um terço foi usado para os testes, essa divisão foi realizada através do algoritmo Kennard-Stone.

Para a análise de dados, foi utilizado o método de análise discriminante por quadrados parciais mínimos (PLS-DA), que é um dos métodos supervisionados de classificação mais populares. Esse método baseia-se no algoritmo de regressão por quadrados mínimos parciais, sendo um método otimizado para discriminar diferentes grupos de objetos através da correlação entre duas matrizes (GORROCHATEGUI *et al.*, 2016; POLLO *et al.*, 2021). A performance do modelo final obtido foi avaliada de acordo com a sensibilidade e especificidade, calculados de acordo com as equações 1 e 2 a seguir:

$$TPR = \frac{TP}{(TP + FN)} \quad (\text{Equação 1})$$

$$TNR = \frac{TN}{(TN + FP)} \quad (\text{Equação 2})$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

• ÁRVORE FILOGENÉTICA

A árvore filogenética obtida está representada na Figura 1, ao lado. A espécie *F. graminearum* s.s. foi a predominante dentre as utilizadas, com 21 cepas na cevada nativa e 20 na cevada cultivada. Na cevada nativa ela foi seguida de 5 cepas de *F. cortaderiae* e *F. heterosporum*, 4 de *F. asiaticum* e *F. tricinctum*, 3 de *F. armeniacum* e somente uma de *F. austromericanum*. Já na cevada cultivada, foi seguida de 18 cepas de *F. poae* e 4 de *F. cortaderiae* e *F. meridionale*.

• DADOS ESPECTRAIS POR UV-Vis

Para uma melhor análise dos espectros, estes foram separados entre as espécies nativas e cultivadas, graças ao grande número de espécies utilizadas. Os espectros obtidos por UV-Vis foram pré-tratados, sendo centrados na média. Os espectros obtidos e pré-tratados das espécies cultivadas e nativas podem ser observados, respectivamente, nas Figura 2 e Figura 3.



Figura 1: Filogenia inferida pelos loci *RPB1* + *RPB2*, incluindo isolados de ecossistema natural (cevada nativa) e cepas provenientes de cevada cultivada.

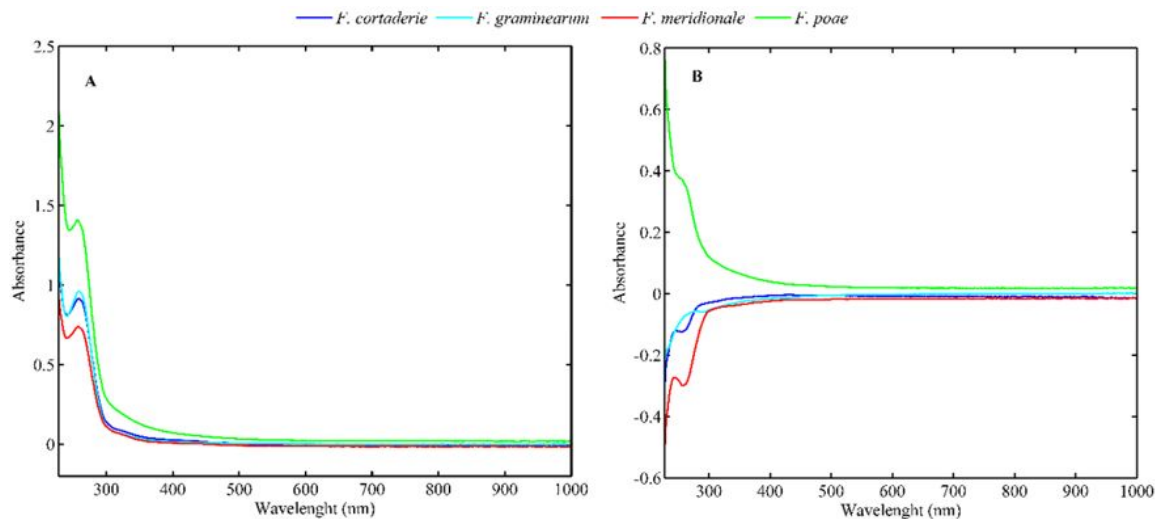


Figura 2 – Espectros médios (esquerda) e pré-tratados na média (direita) das espécies de cevada cultivada

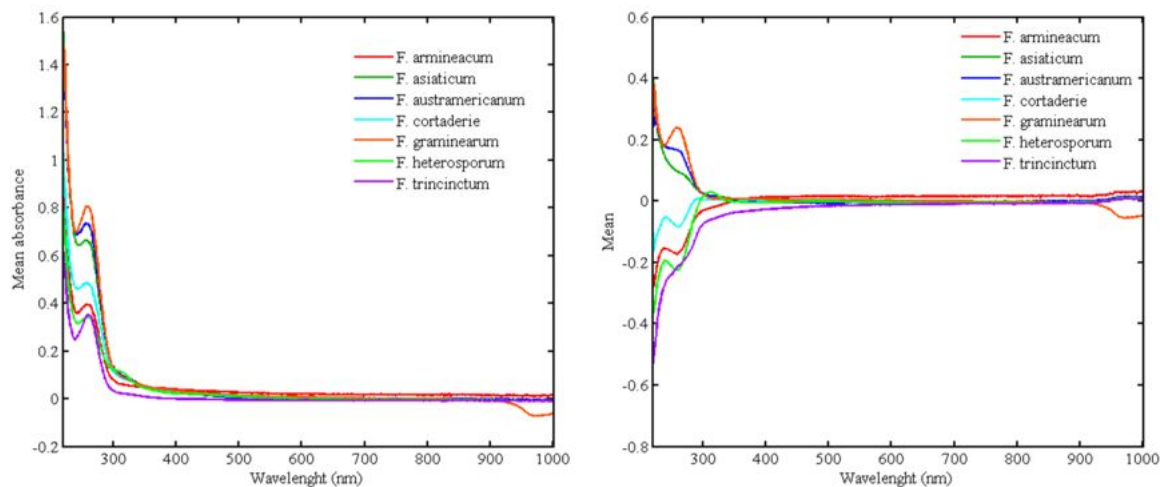


Figura 3 – Espectros médios (esquerda) e pré-tratados na média (direita) das espécies de cevada nativa

O método PLS-DA foi utilizado para analisar o resultado da classificação das espécies utilizadas a partir dos dados espectrais.

Os resultados deste método podem ser observados na Tabela 2 e 3:

Espécie	Calibração		Validação	
	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
<i>F. cortaderie</i>	76,90	88,60	95,00	90,20
<i>F. graminearum</i>	92,80	73,50	100,00	31,90
<i>F. poae</i>	94,70	74,90	57,10	75,60
<i>F. meridionale</i>	81,40	97,30	50,00	89,00

Tabela 2: Resultados do método PLS-DA aplicado aos espectros da cevada cultivada

Espécie	Calibração		Validação	
	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
<i>F. armineacum</i>	80,59	95,00	26,67	96,25
<i>F. asiaticum</i>	55,17	92,70	20,69	86,33
<i>F. austramericanum</i>	90,9	97,38	59,09	94,64
<i>F. cortaderiae</i>	88,46	93,13	84,61	84,76
<i>F. graminearum</i>	73,25	97,34	60,46	85,71
<i>F. heterosporum</i>	60,00	100,00	31,58	99,41
<i>F. trincinctum</i>	90,00	96,54	95,24	97,04

Tabela 3: Resultados do método PLS-DA aplicado aos espectros da cevada nativa

A partir destas tabelas observa-se que as espécies apresentaram bons resultados na calibração. Algumas espécies como a *F. tricinctum* (95,24; 97,04) e *F. cortaderie* (95,00; 90,20) também foram classificadas com considerável sucesso no teste, assim como no trabalho de Conceição *et al.* (2021) em que foi obtido êxito na classificação de duas espécies de *Fusarium* (*F. verticillioides* e *F. graminearum*) através da análise de espectros por PLS-DA. O erro de classificação pode ter ocorrido devido ao alto número de espécies utilizadas em um algoritmo relativamente simples, outra fonte de erro pode ser a falta de informação na faixa espectral analisada. Citar os

O erro de classificação observado neste trabalho pode ser consequência de diversos fatores incluindo o grande número de espécies utilizadas em um algoritmo relativamente simples e a falta de informações na faixa espectral analisada.

CONCLUSÕES

Pode-se concluir, com base nos dados obtidos neste projeto, que a técnica espectroscópica utilizada apresenta relevante informação química para a classificação correta das espécies. Porém, precisam ser realizadas melhoras nos parâmetros de teste para que todas as classes apresentem dados de performance melhores. Para isso, seria interessante o uso de algoritmos mais complexos como os não lineares para a análise destes dados, que possibilitem a construção de um modelo mais assertivo, e/ou a utilização de técnicas não destrutivas que ajudem a complementar as informações químicas da faixa do UV-Vis, como espectroscopia Raman, NIR e MIR.

BIBLIOGRAFIA

- CONCEIÇÃO, R. R. P. da *et al.* Application of near-infrared hyperspectral (NIR) images combined with multivariate image analysis in the differentiation of two mycotoxigenic *Fusarium* species associated with maize. **Food Chemistry**, Belo Horizonte, v. 344, p. 128615, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128615>.
- GORROCHATEGUI, E. *et al.* Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 425–442, set. 2016.
- IWASE, C. H.T. *et al.* Characterization of the *Fusarium sambucinum* species complex and detection of multiple mycotoxins in Brazilian barley samples. **Food Research International**. [S.L.]. Elsevier BV, 2022
- PIACENTINI, K. *et al.* Assessment of Toxigenic *Fusarium* Species and Their Mycotoxins in Brewing Barley Grains. **Toxins**. [S.L.], MDPI AG, 2019
- O'DONNELL *et al.* Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. **Fungal Gen. Biol.** 52: 20-31, 2013.
- O'DONNELL *et al.* Marasas *et al.* 194 “Toxigenic *Fusarium* species: identity and mycotoxicology” revisited. **Mycologia**. DOI: 10.1080/00275514.2018.1519773, 2018
- POLLO, B. J. *et al.* Chemometrics, Comprehensive Two-Dimensional gas chromatography and “omics” sciences: basic tools and recent applications. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 134, p. 116111, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2020.116111>.