

Caracterização Molecular de Isolados de *Colletotrichum sublineolum* por RAPD

Eliane A. Gomes^{1*}, Newton P. Carneiro¹, Maria T. S. de Oliveira², Carolline P. Petrillo², Carlos F. S. Tinoco² e Carlos R. Casela¹

¹ Pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG – Caixa Postal 151

² Bolsistas da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG – Caixa Postal 151

* eliane@cnpms.embrapa.br

Palavras-chave: *Colletotrichum sublineolum*, diversidade molecular, polimorfismo, RAPD, antracnose.

O aumento na produção da cultura de sorgo no Brasil foi determinado pela intensificação e modificação no sistema de cultivo desse cereal e pelos avanços obtidos no melhoramento genético, com a geração de cultivares de alta produtividade. Ao lado dessa expansão, houve também um aumento na incidência e severidade de doenças nesta cultura, o que tem limitado a obtenção de novos ganhos de produtividade. Dentre as doenças que afetam a cultura do sorgo no Brasil, a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum sublineolum*, é de ocorrência generalizada, presente em todas as áreas de plantio de sorgo no país, sendo considerada a doença de maior importância para a cultura no momento. O seu controle é prioritário pela indústria de produção de sementes, já que pode causar perdas de até 88% na produtividade de grãos, além de causar esterilidade parcial de panículas e afetar drasticamente a qualidade da semente produzida (Panizzi e Fernandes, 1997).

Dentre as estratégias de manejo da antracnose, a utilização de genótipos resistentes destaca-se como a forma mais viável, segura e de menor impacto ambiental, tanto para a fase de podridão do colmo quanto para a fase de queima foliar (Ferreira e Casela, 2001; Rezende, 2004). A variabilidade genética existente no germoplasma de sorgo tem permitido a obtenção de fontes de resistência, que vêm sendo intensamente utilizadas em programas de melhoramento para a obtenção de híbridos resistentes. Entretanto, a utilização da resistência genética pode ser dificultada pela variabilidade genética apresentada por *C. sublineolum*, resultando na rápida adaptação do patógeno aos materiais resistentes disponível no mercado (Bergstrom e Nicholson, 1999, Ferreira e Casela, 2001). Desse modo, um conhecimento mais aprofundado da variabilidade e da estrutura populacional do patógeno é fundamental para a elaboração e estabelecimento de estratégias de manejo que possibilitem a obtenção de níveis mais estáveis de resistência nesse patossistema (Casela *et al.*, 1998, 1992; Casela *et al.*, 2001). Além disso, apesar da existência de elevada variabilidade patogênica entre os isolados de *C. sublineolum*, existem controvérsias quanto à existência de raças fisiológicas desse patógeno.

Atualmente, a caracterização das raças de *C. sublineolum* é baseada principalmente na patogenicidade e em características morfológicas. O desenvolvimento de ferramentas eficientes, que auxiliem na caracterização das raças e na identificação de novos genótipos do patógeno, é necessário para o acompanhamento das variações nas populações, fornecendo um quadro dinâmico das interações entre o genótipo do hospedeiro e do patógeno. Dentre as novas ferramentas, destacam-se os protocolos baseados em técnicas moleculares que têm sido utilizados com o objetivo de se obter uma rápida e eficiente identificação de isolados de *C. sublineolum*.

O objetivo deste trabalho é determinar a existência de variabilidade genética em isolados de *C. sublineolum* utilizando marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

Trinta e nove isolados monospóricos de *C. sublineolum* (Tabela 1) coletados de diferentes localidades no Brasil foram crescidos em placas de Petri, contendo meio OMA (Aveia-agar-tetraciclina) e incubados a 25 °C, por 7 dias. Para a extração de DNA, fragmentos do micélio resultante foram transferidos para meio batata dextrose (PDB, Difco Laboratories) em frascos Erlenmeyer e incubados com agitação a 25 °C, por 7 dias. O micélio foi coletado por filtração,

lavado 3 vezes em água destilada, seco com gaze e macerado com nitrogênio líquido até formar um pó bem fino. O isolamento do DNA genômico dos isolados foi realizado segundo o método descrito por Saghai-Marroof et al. (1984), com modificações. O DNA estoque foi diluído em água ultra pura para a concentração de 10 ng/ μ L e armazenado a -20 °C.

Para a análise por RAPD, doze "primers", OPA01, OPA02, OPA03, OPA04, OPA05, OPA08, OPA09, OPA10, OPY06, OPY07, OPY17 e OPZ03 (Operon Technology) foram utilizados. As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 25 μ L contendo 0,4 μ M de cada "primer", 20 mM de Tris-HCl pH 8,4, 50 mM de KCl, 2,5 mM de MgCl₂, 0,1 mM de cada desoxinucleotídeo, 25 ng de DNA genômico e 0,5 U de Taq DNA polimerase. Para as amplificações, foi utilizada uma desnaturação inicial de 94°C por 15 s, seguido de 40 ciclos (15 s a 94°C, 30 s a 36°C, 1 min a 72°C) e uma extensão final de 7 min a 72°C. As reações RAPD foram repetidas duas vezes para cada "primer" e controles negativos, sem DNA, foram incluídos em cada reação. Todas as amplificações foram feitas em um termociclador Eppendorf. Os produtos de RAPD foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% com tampão TAE 1 X (Tris-base, 40 mM pH 7,8; acetate de sódio 20 mM e Na-EDTA, 1,0 mM), corados com brometo de etídeo (1 μ g mL⁻¹), visualizados sob luz ultra-violeta e as imagens capturadas em um sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene). Os dados de RAPD foram analisados em uma matriz binária de 0 e 1, correspondendo à presença e ausência de bandas reprodutíveis, respectivamente. A análise de agrupamento foi feita pelo método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method Algorithm) usando o programa Statistica versão 4.2 (StatSoft Inc.).

Para avaliação da virulência dos isolados, quatro linhagens elites do programa de melhoramento genético de sorgo da EMBRAPA-CNPMS (Tabela 1) foram inoculadas com os 39 isolados de *C. sublineolum*.

Os doze "primers" utilizados geraram 87 bandas, sendo 15 monomórficas (17%) entre todos os isolados de *C. sublineolum* (Tabela 2). Não houve amplificação no controle negativo. O número de bandas amplificadas com cada "primer" variou entre 6 (OPA05, OPA08, OPA09, OPY17 e OPZ03) e 9 (OPA02 e OPA4) com uma média de 7,25 bandas por "primer" (Figura 1). O tamanho das bandas variou de 400 (OPA05) a 10.000 pares de bases (OPA02). Um total de 72 bandas polimórficas foi capaz de discriminar os 39 isolados e detectar uma alta variação genética. Nas comparações par a par entre os isolados, a menor distância genética foi de 0,01 entre os isolados COL 39 e COL 41, enquanto que a maior distância foi 0,89 observada entre os isolados COL 49 e COL 120.

No dendrograma gerado pela análise dos fragmentos amplificados por RAPD, pode-se observar que a maioria dos isolados ficaram agrupados de acordo com a linhagem de sorgo de origem, com algumas exceções (Figura 2 e Tabela 2). Foram gerados três grupos principais, a 50% de distância genética: Grupos A, B e C (Figura 2). O Grupo A pode ser subdividido em Grupo A.1 (isolados COL 01, 36, 16, 26, 08 e 20), A.2 (isolados COL 38, 76, 147 e 109), A.3 (isolados 39, 41, 105, 121, 135, 149 e 134) e A.4 (isolados 51, 117, 120, 132, 1602, 1609, 1614, 1619, 1621, 1627, 1631, 1639, 1644 e 1647). Todos os isolados do Grupo A.1 foram obtidos da linhagem CMS210 de sorgo, apesar de três isolados desta linhagem se distribuírem em outros grupos: 39 e 41 no Grupo A.3 e 49 no Grupo C. O Grupo A.4 reuniu todos os isolados obtidos da linhagem BR005 (Tabela 2) além de dois isolados (120 e 132) que, apesar de terem sido obtidos de BR005, também apresentam virulência contra BR005. Os isolados obtidos de BR009 se distribuíram nos Grupos A.2, A.3 e A.4. Finalmente, todos os isolados dos Grupos B e C vieram da linhagem BR008, exceto 49, que apesar de ter isolado de CMS210, também apresenta virulência à BR008.

A técnica de RAPD utilizada neste trabalho foi eficiente na caracterização da diversidade genética de isolados de *C. sublineolum* obtidos de diferentes linhagens de sorgo. Trabalhos futuros, utilizando outros "primers" de RAPD, aliado a outras técnicas moleculares, como microssatélites ou seqüenciamento de regiões específicas de DNA, podem auxiliar a caracterização das raças e a identificação de novos genótipos do patógeno.

Referências bibliográficas

- CASELA, C.R.; FERREIRA, A.S.; SANTOS, F.G. Associação de virulência de *Colletotrichum graminicola* à resistência genética em sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, n.2, p.143-146, 1998.
- CASELA, C.R.; FERREIRA, A.S.; SANTOS, F.G. Differences in competitive ability among races of *Colletotrichum graminicola* in mixtures. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.2, p.217-219, 2001.
- FERREIRA, A.S.; CASELA, C.R. Antracnose do milho (*Colletotrichum graminicola*). Sete Lagoas: EMBRAPA – CNPMS, 2001. 6p. (EMBRAPA – CNPMS. Circular Técnica, n. 13).
- PANIZZI, R.C. & FERNANDES, N.G. Doenças do sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Camargo, E.A., Rezende, J.A.M. (Eds.) Manual de Fitopatologia - Doenças das Plantas Cultivadas. Editora Agronômica Ceres, São Paulo, 1997. v.2, pp.676-689.
- REZENDE, V.F. Análise da resistência genética da antracnose foliar em milho. Tese (Doutorado em genética e melhoramento de plantas). Piracicaba, 103 p., 2004. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN, R.A.; ALLARD, R.W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosome location and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, Washington, v.89, n.2, p.1477-1481, 1984.

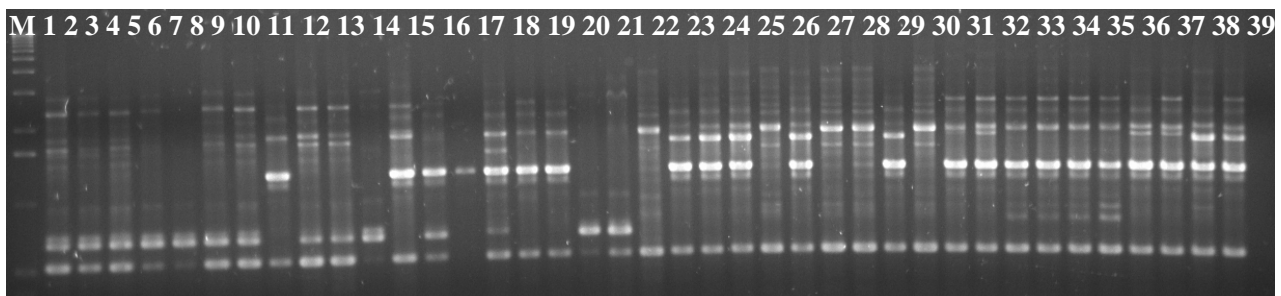


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos amplificados por RAPD, utilizando o "primer" OPA01, de 39 isolados de *Colletotrichum sublineolum*. M – Marcador 1 Kb ladder.

Tabela 1. Isolados e linhagens de sorgo hospedeiras de *Colletotrichum sublineolum*

Isolados/Origem - CMS210											
Cultivar	1	8	16	20	22	26	36	38	39	41	49
BR009	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
BR008	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
BR005	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CMS210	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CMS169	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Isolados/Origem - BR008											
Cultivar	51	56	62	69	71	78	89	98			
BR009	S	S	S	S	S	R	S	S			
BR008	S	S	S	S	S	S	S	S			
BR005	R	R	R	S	R	R	R	R			
CMS210	R	R	R	R	R	S	R	R			
CMS169	R	R	R	R	R	R	R	R			
Isolados/Origem - BR005											
Cultivar	1602	1609	1614	1621	1627	1631	1639	1644	1647		
BR009	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
BR008	R	R	S	S	R	R	R	R	R		
BR005	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
CMS210	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
CMS169	S	R	R	R	R	R	R	R	R		
Isolados/Origem - BR009											
Cultivar	105	109	117	120	121	132	134	135	147	149	
BR009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
BR008	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
BR005	R	R	R	S	R	S	R	S	R	S	
CMS210	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
CMS169	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	

Tabela 2. "Primers" usados nas reações de RAPD, seqüências, número de fragmentos analisados, número de bandas polimórficas e porcentagem de polimorfismo gerado

Primer	Seqüência (5' – 3')	Fragmentos analisados	Fragmentos polimórficos	Polimorfismo (%)
OPA01	CAGGCCCTTC	8	7	87,5
OPA02	TGCCGAGCTG	9	7	77,8
OPA03	AGTCAGCCAC	8	4	50,0
OPA04	AATCGGGCTG	9	8	88,9
OPA05	AGGGGTCTTG	6	5	83,4
OPA08	GTGACGTAGG	6	6	100
OPA09	GGGTAACGCC	6	5	83,4
OPA10	GTGATCGCAG	8	7	87,5
OPY06	AAGGCTCACC	7	5	71,4
OPY07	AGAGCCGTCA	8	7	87,5
OPY17	GACGTGGTGA	6	6	100
OPZ03	CAGCACCGCA	6	5	83,4
Total		87	72	82,7

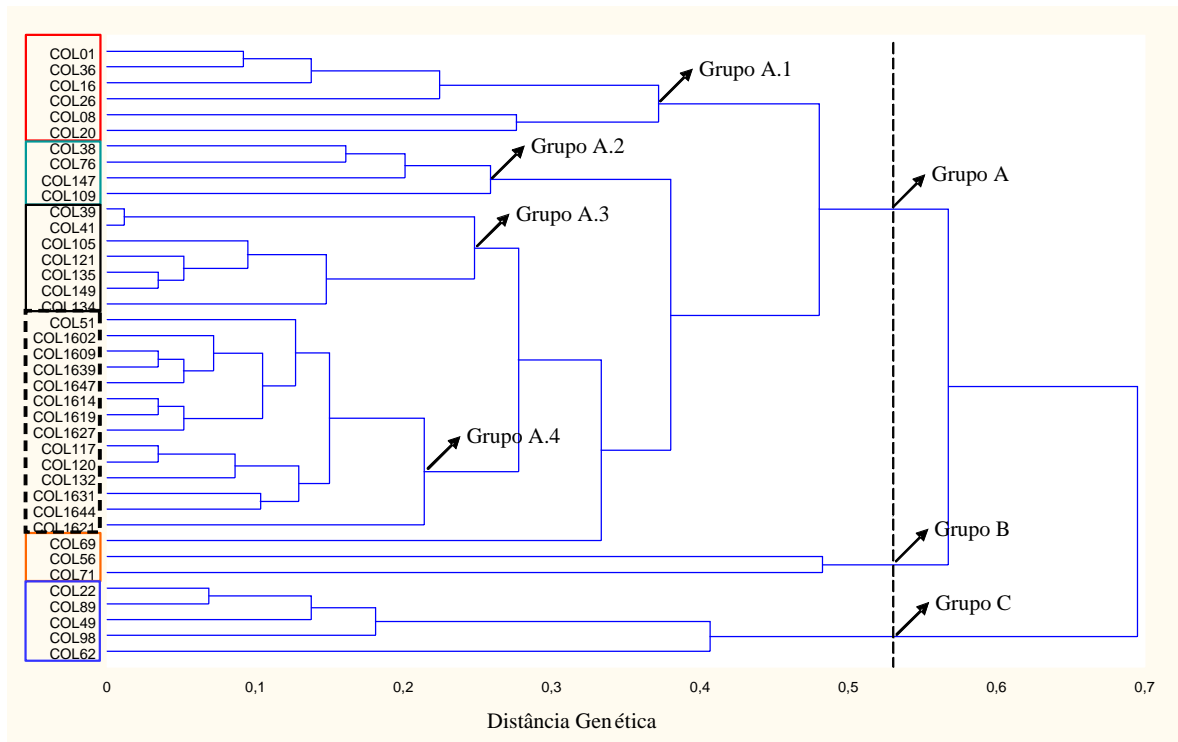


Figura 2. Análise de agrupamento dos 39 isolados de *Colletotrichum sublineolum* usando marcadores RAPD. O dendrograma foi gerado pelo método de UPGMA usando 72 marcadores polimórficos. A identificação dos isolados está de acordo com a Tabela 1.