

Diversidade Genética de *Colletotrichum Graminicola* Isolados da Cultura do Sorgo no Ecosistema Agrícola Tropical Revelada por SDS-PAGE, RAPD e Análise da Sequência do rDNA 18s e Região Intergência 18s-28s.

XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 01 a 05 de setembro de 2002 - Florianópolis - SC

Paoli, H.C.¹; Quintão, P.L.¹; Coelho, V.T.S.¹; Fonseca, P.C.²; Melo M.A.V.¹; Lage, G.A.¹; Ferreira, A.S.³; Casela, C.R.³; Guimarães, C.T.³; Gomes, E.A.³; Figueiredo, J.E.F.³
¹Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix, Belo Horizonte, MG, Brasil, ²Escola Superior de Agricultura e Ciências de Machado, Machado, MG, Brasil, ³Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, Brasil

Em anos recentes, o sorgo vem se tornando uma cultura importante no Brasil como alternativa para consumo humano e animal. Elevada incidência de doenças fúngicas constitui sério obstáculo a expansão da cultura do sorgo, destacando-se a antracnose causada por *Colletotrichum graminicola*. O patógeno apresenta alta variabilidade e rapidamente se adapta à resistência genética do hospedeiro pela produção de novas formas de virulência. Uma estratégia para a obtenção de resistência estável a *C. graminicola* tem sido a identificação de combinações de genótipos de sorgo para os quais não existam associações de virulência na população do patógeno, mas para isso é necessário obter informações rápidas e precisas sobre a estrutura genética das populações isoladas. Atualmente, essas informações são obtidas pela análise da estrutura de virulência do patógeno empregando variedades diferenciadoras. Várias raças brasileiras de *C. graminicola* foram identificadas utilizando esse procedimento que apresenta restrições, pois as relações patógeno/hospedeiro são fortemente influenciadas pelas condições fisiológicas dos agentes envolvidos e por fatores ambientais. Por isso, torna-se necessário desenvolver protocolos mais seguros para identificação de raças do patógeno. Com esse objetivo, foram iniciados estudos utilizando métodos moleculares baseados em análise de proteína (SDS-PAGE) e DNA (RAPD, ARDRA, sequenciamento de genes ribossomais). Foram utilizadas cinco raças de *C. graminicola* identificadas por meio de série diferencial (F1= 29A, F2= 31B, F3= 15C, F4= 30C, F5=15E). Para extração de proteínas totais foi utilizado 0,5 grama de massa micelial macerada em nitrogênio líquido e ressuspensa em tampão Tris/HCl. Amostras dos cinco isolados foram aquecidas por 10 minutos a 100 °C, e após adição de tampão da amostra, resolvidas em gel SDS-PAGE a 12,5% a 100V por 2h, corado com Commassie blue e fotografado (Figura 1). Para a extração do DNA, 0,8g de massa micelial seca foi macerada em nitrogênio líquido e transferidos para tubos de polipropileno contendo 5 ml de tampão de extração (0.2 M NaCl, 0.1 M Tris/HCl pH 8.0, 0,02 M EDTA, 1,0% SDS, 0.1% β-mercaptoetanol). As amostras foram vigorosamente agitadas para obtenção de mistura uniforme e incubadas por 15 min à temperatura ambiente. Em seguida, igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) foi adicionado às amostras, procedendo-se a incubação por 10 min a temperatura ambiente. Os restos celulares foram removidos por centrifugação a 8000 rpm por 10 min a 4 °C. Aproximadamente 5 ml do sobrenadante foram transferidos para tubos contendo igual volume de etanol gelado, seguido de centrifugação por 10 min a 8000 rpm. Após descarte do sobrenadante, o sedimento foi lavado rapidamente em álcool 70% e ressuspensa em 0,5 ml TE (1M Tris-HCl/0,5M EDTA) contendo 40 µg/ml de RNase. A qualidade do DNA foi

avaliada em géis de agarose 0,8% (dados não mostrados) e quantificado em espectrofotometro. As reações de amplificação por RAPD e rDNA foram feitas empregando 40 ng de DNA por reação em volume final de 25,0 µl contendo 2,5 mM MgCl₂, 25 uM dNTP, 2,5 mM Tris, 4,0 mM primer aleatório (10-mer primers OPERON ou primers universais específicos), 1,5 U *Taq* DNA polimerase e água deionizada. A reação foi processada no termociclador PTC-100™ (MJ Research. Inc.) estabelecendo o programa de 30

Palavras-Chave: rDNA, RAPD-PCR, ARDRA, seqüenciamento, SDS-PAGE ciclos de 15 segundos à 94°C para desnaturação do DNA, 30 segundos à 35°C para anelamento do primer e 30 segundos à 72°C para extensão da fita de DNA. As reações foram finalizadas após incubação por 10 minutos à 72°C. A resolução dos fragmentos amplificados foi feita em géis de agarose 1,2% corado com 12 µL de brometo de etídio 100µg/ml (Figura 2).

Genes ribossomais (rDNA) foram amplificados a partir de DNA genômico total utilizando primers universais para o gene 18S (NS1 e NS8) e para a região intergênica (ITS, primers ITS1 e ITS4). Os produtos amplificados foram digeridos com diferentes enzimas de restrição (ARDRA) e resolvidos em géis de agarose 1,0% (Figura 3). Para a reação de seqüenciamento de rDNA foram utilizados 180ng de DNA genômico total, 8,0 µL mix, 4,0 mM primer (ITS1, ITS4, NS1 e NS8) em volume total de 25 µL que foi ajustado com dH₂O. A reação foi incubada no termociclador PTC-100™ (MJ Research. Inc.) estabelecendo o programa de 25 ciclos de 30 segundos à 96°C para desnaturação do DNA, 15 segundos à 50°C para anelamento do primer e 4 minutos à 60°C para extensão da fita de DNA. Ao final, a reação foi precipitada com NaOAc 3M, 95% etanol, vortexado e deixado no gelo por 10 minutos antes de centrifugar por 30 minutos a 13500 rpm. O sedimento foi lavado com etanol 70%, seco ao ar e ressuspensão em tampão de sequenciamento e aplicado no seqüenciador automático ABI 377 prisma. As seqüências geradas foram comparadas pelo programa Bastn com seqüências depositadas no GenBank. Todos os resultados apresentaram maior escore para seqüências de rDNA de *C. graminicola*. A análise entre as seqüências de DNA geradas no presente estudo possibilitaram discriminar os cinco isolados de *C. graminicola* (Figuras 4 e 5, Tabela I) .

O padrão eletroforético de proteínas (SDS-PAGE) e DNA (RAPD, ARDRA e seqüenciamento de rDNA) foram efetivos para evidenciar diferenças entre as cinco raças empregadas neste estudo. A análise de dissimilaridade pelo método de Jaccard possibilitou o agrupamento das cinco raças de *C. graminicola* em taxonomias diferentes (Figuras 1 e 3, Tabela I). Contudo, os dendogramas gerados por RAPD-PCR (Figura 2) e rDNA (Figura 5) agrupam os cinco isolados de forma diferente. Portanto, apesar de úteis para revelar diferenças e semelhanças entre indivíduos e raças, as metodologias baseadas em análise de proteínas e DNA geram muitas vezes resultados diferentes, e precisam ser considerados com cautela ao interpretar as relações filéticas entre diferentes isolados. Ao mesmo tempo, os resultados possibilitaram o estabelecimento de novos protocolos, mais seguros e rápidos, para a caracterização de *C. graminicola*. Essas metodologias têm se mostrado úteis para análise de microrganismos (bactérias e fungos endofíticos, actinomicetos, fitopatógenos e entomopatógenos) isolados de ecossistema agrícola (Figueiredo e colaboradores, artigos em preparação).

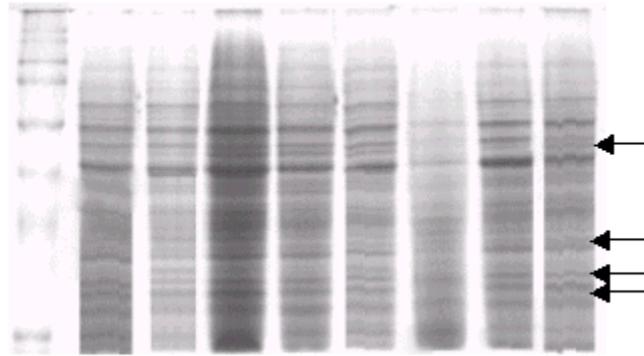
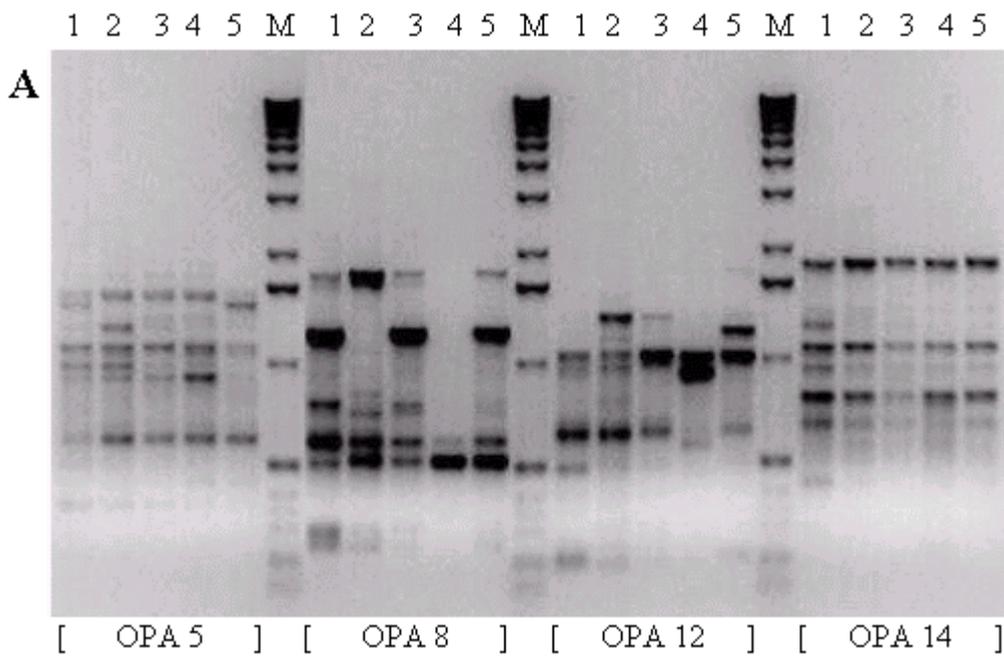


Figura 1. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de proteínas totais de cinco isolados de *C.graminicola*. Algumas diferenças encontradas foram indicadas pelas setas, destacando as diferenças no perfil eletroforético entre as raças.



e pares indicam produtos amplificados dos isolados fúngicos (F1 a F5) sem digerir e digeridos, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas no tamanho do DNA amplificado. Diferenças no padrão de digestão foram observadas apenas em D. M = marcador de peso molecular lambda digerido com a enzima de restrição *Hind* III (GIBCO/BRL).

```

F2 -TTTTCTCCGCTTATTGAAAAATGGTAAAGTT-CAGCGGGTTATTCCTACCTG-AT-CCGAGGTCAACCAGTTAAAAAGTTAGGGGGTTTTACGGCAAGAGTCCC 101
F1 C.....G.....T.--...T...T.....G.....-.-.....-..... 100
F3 --.....T.--..C.TG...-.....-.....-..... 97
F5 -----,G.T.T.-A...T.G.....G..A......A..... 79
F4 -----,CGG..G..C.T.A.-.....A..C.A.....-.-..... 85

F2 T-CCGGATCCCGATGCCGAGACGTTAGTTACTACGCAAAGGAGGCTCCG-GGAGGGTCCGCCACTACTTTTGAGGGCCTACGTCAACCGTAGTCCCC-AACACCA 203
F1 -.....-.....-.....-.....-.....-..... 203
F3 -.....-.....-.....-.....-.....-..... 203
F5 -.....A.....T.....T..... 203
F4 .T.....A.....-.....A.....-..... 203

F2 AGCGAAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCACTGAATTCGCAAT 308
F1 ..... 308
F3 ..... 308
F5 ..... 308
F4 ..... 308

F2 TCACATTACTTATCGCATTTTCGTCGCTT-CTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAAAGTTTAAATTATTGCTTGTGCCACTCAGAAGAAACGT 412
F1 ..... 412
F3 ..... 412
F5 .....A..A.....-..... 412
F4 .....A..... 412

F2 CGTTAAATCAGAGTTT-GGTTATCCTCCGGCGGGCGCCGCGACCCCTCCCGAAGAAGAAGGCGCGGCCGGGAGGGCGTCCCGGGGGGACCCCATACCCCGCG 516
F1 .....A.....C..... 516
F3 .....-.....C..... 516
F5 .....-.....G.....C..... 516
F4 .....T.....T.....G.....C.....A..C.....C..... 516

F2 AAGCAACAGTTAGGTATGTTACAAAAGGGTTATAAGAGCGGTAAC--TCCAG---TAATGATCCCCCGCAGGTTCACT-ACGAAAGGG- 599
F1 .....-.....-.....-.....T.....-.....G.....G 597
F3 .....-.....-.....A.....-.....T.....C.....G 595
F5 .....-.....A.....-.....-.....T.....CC...G..... 578
F4 ..C.....-.....-.....TCA.AA..CCT.....T..C..----- 572

```

Figura 4. Alinhamento das seqüências de rDNA da região intragênica ITS das cinco raças de *Colletotrichum graminicola*. As linhas pontilhadas representam igualdade com a primeira seqüência, e os tracejados são «gaps» que foram introduzidos nas seqüências com a finalidade de possibilitar o melhor alinhamento entre cada uma delas. As diferenças, quando presentes, estão indicadas com os respectivos nucleotídeos (ClustalW Multiple Sequence Alignment Results).

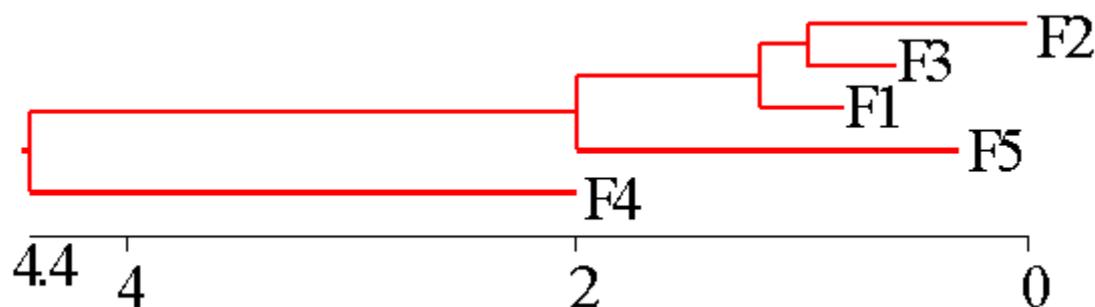


Figura 5. Dendrograma editado pela análise de seqüências de rDNA da região intragênica (ITS), para as cinco raças de *Colletotrichum graminicola*. Os números indicam a percentagem de dissimilaridades entre as diferentes raças.

TABELA I. Porcentagem de divergência (■) e de similaridade (■) entre diferentes isolados de *C. graminicola*.

	F1	F2	F3	F4	F5
F1	***	93.7	95.3	86.6	91.2
F2	1.5	***	95.5	87.6	90.0
F3	1.0	1.4	***	87.6	90.5
F4	6.1	7.0	6.1	***	83.4
F5	2.9	3.6	3.2	6.6	***

REFERÊNCIAS

- BRUNS, T. D.; VILGALYS, R.; BARNS, S. M.; GONZALES, D.; HIBBETT, D. S.; LANE, D. J.; SIMON, L.; STICKEL, S.; SZARO, T. M.; WEISBURG, W. G.; SOGIN, M. L. Evolutionary relationships within the fungi: analysis of nuclear small subunit rRNA sequences. **Molecular, Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v.1, p.231-241, 1992.
- CARBONE, I.; KOHN, L. M. Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacer I of the *Sclerotiniaceae*. **Mycologia**, New York, v.85, p.415-427, 1993
- CHEN, W. Restriction fragment length polymorphism in enzymatically amplified ribosomal DNAs of three heterothallic *Pythium* species. **Phytopathology**, St. Paul, v.82, p.1467-1472, 1992.
- GARGAS, A.; DEPRIEST, P. T. A nomenclature for fungal PCR primers with examples from intron-containing SSU rDNA. **Mycologia**, New York, v.88, p.745-748, 1996.
- GERBI, S. A. Evolution in ribosomal DNA. In: McIntyre, R. (Ed.) **Molecular evolution**. London, Academic Press, 1986. Cap.7, p 419-517.
- GUTHRIE, P.A.I.; MAGILL, C.W.; FREDERIKSEN, R.A.; ODVODY, G.N. Random Amplified Polymorphic DNA markers — a system for identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, St. Paul, v.82, p.832-835, 1992.
- HIBBETT, D. Ribosomal RNA and fungal systematics. **Transactions of the Mycological Society of Japan**, Tokyo, v.33, p.533-556, 1992.
- HONEYCUTT, R.J.; SOBRAL, B W.; MCCLELLAND, M. tRNA intergeneric spacers reveal polymorphySmS diagnostic for *Xanthomonas albilineans*. **Microbiology**, New York, v.141, p. 3229-3239, 1995.
- LAEMMILI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-685, 1970.
- VILGALYS, R.; HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.172, p.4238-4246, 1990.
- VILGALYS, R.; HOPPLE, J. S.; HIBBETT, D. S. Phylogenetic implications of generic concepts in fungal taxonomy: The impact of molecular systematic studies. **Mycologia Helvetica**, Bern, v.6, p.73-91, 1994.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.) **PCR Protocols**, a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990. 256-264.

