

CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DO FUNGO *Phaeoisariopsis griseola* ATRAVÉS DA TÉCNICA RAPD

Aloisio Sartorato¹

Palavras-chave: Fungo, diversidade molecular, *Isariopsis griseola*, análise de agrupamento.

INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) é hospedeiro de várias doenças de origem fúngicas, bacterianas, viróticas e as incitadas por nematóides. Entre as doenças fúngicas, a mancha angular vem se constituindo em um dos principais problemas fitopatológicos desta cultura. Os métodos de controle desta doença inclui as práticas culturais, o controle químico e a resistência genética.

O desenvolvimento de cultivares de feijoeiro comum resistentes à mancha angular requer o conhecimento prévio da variabilidade patogênica de seu agente causal, o fungo *Phaeoisariopsis griseola*. Tem sido demonstrado que este patógeno apresenta grande variabilidade patogênica. O método universalmente aceito para se determinar esta variabilidade é a inoculação, dos diferentes isolados do patógeno, nas cultivares diferenciadoras. Esta forma separa os isolados do patógeno com base na complementariedade dos alelos de virulência/resistência existente no patógeno/hospedeiro, não levando em consideração outras características do fungo. O surgimento das técnicas do DNA recombinante, veio fornecer novas metodologias para as investigações da variação genética de fungos fitopatogênicos de forma mais completa e segura. Estudos de diversidade e da caracterização de diversas espécies de plantas e fungos têm sido realizados envolvendo a técnica denominada Random Amplified Polimorphic DNA-RAPD. As maiores vantagens desta técnica consistem na sua simplicidade, na universalidade dos primers utilizados, na inexistência da influência do ambiente nos resultados obtidos e na tolerância a uma grande variação na concentração de DNA.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a multiplicação do micélio do fungo *P. griseola*, 5 a 6 discos de agar de 0,70 cm de diâmetro foram transferidos para Erlenmeyers de 250 mL contendo o meio líquido composto de 200 g de Batata e 10 g de glucose por litro de água. Os Erlenmeyers foram então colocados em uma mesa agitadora, à temperatura ambiente e 110-120 rpm, por 12 a 15 dias. O micélio produzido foi colhido por filtragem em papel de filtro colocado em um kitasato

¹Pesquisador, Dr., Embrapa Arroz e Feijão, Caixa Postal 179, CEP 75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO, Brasil. E-mail: sartorat@cnpaf.embrapa.br

acoplado a uma bomba de vácuo. Imediatamente após a filtração o micélio foi identificado e colocado no gelo e, então, transferido para refrigerador -80°C onde permaneceu até o momento da extração do DNA. O DNA foi extraído segundo o método do SDS usando TE (10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA) para a diluição final das amostras. As reações de amplificações foram realizadas em termociclador modelo PTC-100™ (M J Research, INC). Cada reação com 25 µL continha 25 ng de DNA, 0.1 mM de cada dNTP, 2.0 mM de MgCl₂, 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM de KCl, 0,4 uM de cada um dos seguintes primers OP K 07, K 09, L12, L14, L17, R 03, R 04 e R 17 (Operon Technologies, USA) e uma unidade da enzima *Taq* polimerase.

Cada ciclo de amplificação consistiu de um passo inicial de desnaturação do DNA por 3 minutos a 94°C seguido de 45 ciclos de 94°C por 1 minuto, 35°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos e um passo de extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em géis de agarose a 1,5%, visualizados sob luz UV e fotografados com o fotossistema Eagle Eye II (Stratagene Inc, La Jolla, CA).

RESULTADOS

A banda obtida de cada indivíduo recebeu o valor 1 ou 0 de acordo com a sua presença ou ausência, respectivamente. Somente as bandas mais intensas foram consideradas. A análise de agrupamento foi realizada pelo método UPGM (Unweighted pair-group average) utilizando a distância Euclidiana. Todos os cálculos foram realizados com o programa estatístico "Statistic for Windows", versão 5.0.

A análise dos 98 isolados de *P. griseola* coletados nos municípios de Damolândia e Inhumas, Estado de Goiás, revelaram grande diversidade genética (Figura 1). A distância genética variou de 0,00 a 5,39, indicando uma grande diversidade entre os isolados do fungo *P. griseola* o que está em acordo com os resultados obtidos pela determinação dos patótipos através da inoculação das diferenciadoras. Foram gerados um total de 59 fragmentos dos quais 14 (23,7%) foram polimórficos.

De acordo com a metodologia utilizada, a uma distância de 62.5%, os isolados foram divididos em quatro diferentes grupos. Os grupos 1 e 4 foram formados por isolados coletados apenas dos municípios de Inhumas e Damolândia, respectivamente, enquanto os grupos 2 e 3 foram formados por isolados de ambos os municípios. Nestes dois últimos grupos, que foram divididos em vários subgrupos, embora não tenha sido observado agrupamento algum dos isolados conforme seus locais de origem, notou-se uma tendência dos isolados de se aglomerarem segundo seus locais de coleta (Figura 1). Os grupos 2 e 3 apresentaram 65,5% e 75% dos isolados com origem nos municípios de Inhumas e Damolândia, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos quando foram comparados os patótipos oriundos de cada isolado. Este resultado sugere a não ligação

entre os marcadores RAPD e os patótipos identificados com inoculação artificial das cultivares diferenciadoras. Para a falta deste tipo de ligamento sugere-se (i) o fato das cultivares diferenciadoras terem sido escolhidas ao acaso, não se levando em consideração o processo evolucionário entre o patógeno e o hospedeiro; (ii) o conjunto de diferenciadoras, com apenas 12 cultivares, não contém todos os genes que o hospedeiro supostamente deve apresentar para classificar o fungo *P. griseola* de uma forma evolucionária; (iii) o feijoeiro cultivado nos dois municípios é na sua quase totalidade de origem mesoamericana. Consequentemente, a pressão de seleção imposta ao patógeno favorece a seleção de patótipos de origem mesoamericana, tornando-os geneticamente similares e dificultando suas separações em grupos distintos e (iv) o dendograma da Figura 1 foi desenvolvido levando-se em consideração não apenas os alelos de virulência do patógeno mas também os alelos amplificados e ligados a outras características genéticas do fungo. Resultados semelhantes foram observados quando a análise envolveu os isolados que pertenciam a apenas um patótipo.

Nenhuma banda específica ligada a um determinado patótipo foi observada.

Embora a técnica de RAPD permita um estudo mais completo do genoma do fungo *P. griseola* do que aquele realizado através da inoculação artificial das cultivares diferenciadoras, infelizmente, ela não permite a identificação de qual alelo está ligado à virulência no fungo. Assim, esta técnica não pode ser considerada apropriada para a determinação da variabilidade patogênica de *P. griseola*.

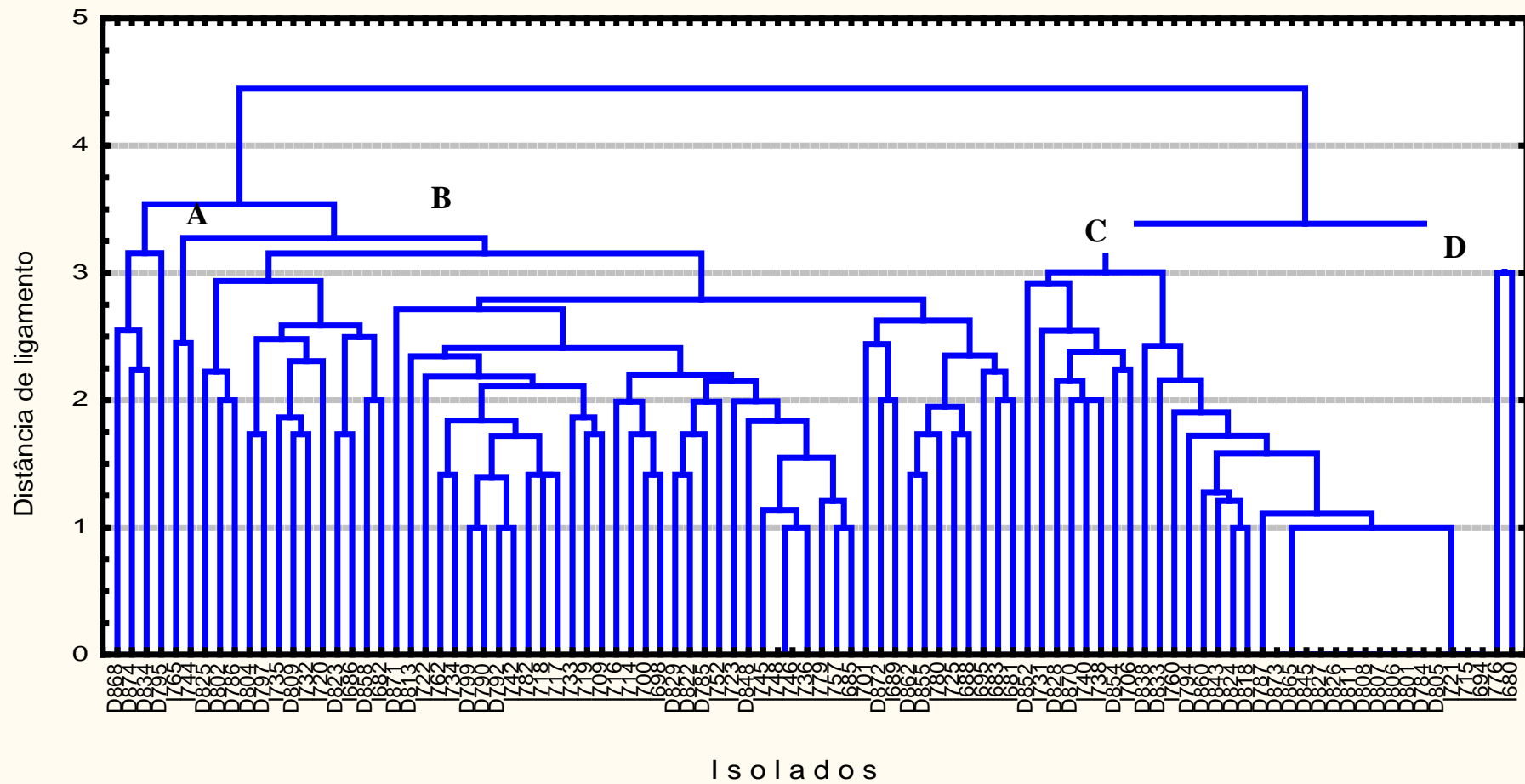


Figura 1. Dendrograma dos 96 isolados monospóricos de *Phaeoisariopsis griseola* com base nos padrões gerados pela técnica de RAPD com 8 primers (OP K 07, K 09, L12, L14, L17, R 03, R 04 e R 17). Embrapa Arroz e Feijão, 2002.