

Diversidade genética de isolados de *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei, por RAPD e PCR-RFLP

KAJIWARA, T.H.¹; SOLDERA, M.C.A.²; URQUIZA, G.P.C.³; VIEIRA, N.D.⁴; ALMEIDA, A.M.R.⁴

¹Universidade Estadual do Norte do Paraná – UENP;

²Universidade Estadual de Maringá – UEM; ³Bolsista

CNPq; ⁴Embrapa Soja, amra@cnpso.embrapa.br

O fungo *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei é considerado um patógeno amplamente distribuído, associado com mais de 70 espécies de plantas hospedeiras em países tropicais e subtropicais (Pereira et al., 2003). No Brasil, ele foi identificado pela primeira vez em soja, no município de Tarumã, por Almeida et al. (1976). Os principais sintomas causados por esse fungo são manchas foliares chamadas de manchas-alvo, caracterizadas por lesões pardas e anéis concêntricos de coloração mais escura (Almeida et al., 2005). Em *Glycine max*, além da mancha-alvo, cultivares suscetíveis podem sofrer severa desfolha, manchas na haste e nas vagens, e podridão radicular (Almeida et al., 2005).

Alguns autores têm considerado *C. cassiicola* como patógeno cosmopolita e inespecífico por infectar diversas espécies vegetais (Pereira et al., 2003). No entanto, *C. cassiicola* foi encontrado em *Lantana camara*, sendo considerado como uma forma específica para essa planta e nomeado como *C. cassiicola* f. sp. *lantanae* (Pereira et al., 2002).

De fato, avaliações cuidadosas sobre a especificidade de populações de *C. cassiicola* têm sido pouco descritas. Portanto, este trabalho pretendeu caracterizar a diversidade genética entre os isolados de *C. cassiicola* por meio de técnicas moleculares como o uso de RAPD

(*Random Amplification Polimorphic DNA*) e digestão por enzimas de restrição (PCR-RFLP).

Quarenta e dois isolados de *C. cassiicola* foram obtidos de culturas monospóricas oriundos de diversas plantas hospedeiras e coletadas em diferentes regiões do Brasil e do Japão. Esses isolados foram cultivados em meio BDA (batata-dextrose-agar), contendo estreptomicina e transferidos para meio líquido BD (batata-dextrose). Após incubados a 37 °C, por aproximadamente 15 dias, efetuou-se a extração do DNA. O DNA genômico foi avaliado por meio de marcadores RAPD com 13 *primers* (A10, AE15, AB17, AE3, N16, N12, AE18, M13, L8, B17, L7, AE6 e M5). Com os perfis de polimorfismo obtidos foi montada uma matriz utilizada para a construção do dendrograma. Na análise dos isolados por meio de PCR-RFLP, foi amplificada a região ribossômica envolvendo o ITS1-5.8S-ITS2 (*Internal Transcribe Spacer*) utilizando os iniciadores ITS 1F e ITS 4R (White et al., 1990). Posteriormente, foi amplificada a região do gene β -tubulina, utilizando os iniciadores β -tub 2a e β -tub 2b (Glass & Donaldson, 1995). Utilizaram-se enzimas *EcoRI* e *AluI* para discriminar a região do DNA ribossomal e enzimas *EcoRI* e *HhaI* para diferenciar a região amplificada da β -tubulina. Após a digestão, foi feita uma análise para obtenção do perfil eletroforético.

O dendrograma obtido com marcadores RAPD mostrou grande diversidade genética entre os isolados (Fig. 1), independente da espécie vegetal coletada. Essa diversidade está associada à resposta genética do hospedeiro, principalmente soja, variável em testes de inoculação artificial.

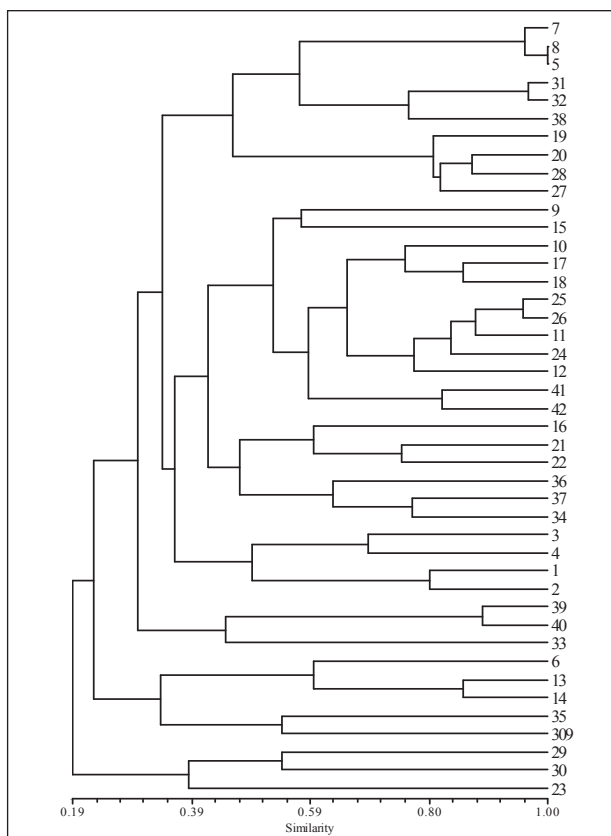


Fig. 1. Dendrograma obtido por análise de agrupamento UPGMA. Isolados utilizados na reação de RAPD

A região do DNA ribossomal, com aproximadamente 600 pb, foi amplificada em todos os isolados. Na análise da digestão, a enzima *EcoRI* apresentou um padrão de clivagem com dois fragmentos de 250 pb e 350 pb em todas as amostras, e a enzima *AluI* apresentou três padrões de clivagem (20 pb/190 pb/ 390 pb; 210 pb/390 pb; 600 pb). A região da β -tubulina, com aproximadamente 500 pb, foi amplificada em trinta e um isolados. Na digestão com a enzima *EcoRI*, a região amplificada não foi clivada, entretanto, a enzima *HhaI* apresentou dois sítios de restrição clivando a região em três fragmentos de aproximadamente 50 pb, 200 pb e 250 pb.

Os testes de RAPD mostraram a grande diversidade genética entre os isolados e as enzimas de restrição identificaram diferentes sítios em relação aos fragmentos de ITS e de β -tubulina. No entanto, estudos futuros, incluindo o sequenciamento desses isolados, serão feitos para comprovar as diferenças nas sequências.

Referências

ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F.V.; HENNING, A.A.; GODOY, C.V.; CONSTAMILAN, L.M.; MEYER, M.C. Doenças da Soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 577.

GLASS, N.L.; DONALDSON, G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323–1330, 1995.

PEREIRA, J.M.; BARRETO, R.W.; ELLISON, C.A.; MAFFIA, L.A. *Corynespora cassiicola* f. sp. *Lantanae*: a potential biocontrol agent from Brazil for *Lantana camara*. **Biological Control**, v.26, p.21-31, 2003.

WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S.; TAYLOR, J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKEY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego.1990. pp.315-322.