

Diversidade Genética do Complexo *Diaporthe/Phomopsis* em Soja, no Brasil

SOLDERA¹, M.C.A., VIEIRA², N.D., LAURINDO³, D.G., MORALES⁴, A.M., MARIN², S.R.R., BINNEK², E., CONSTAMILAN⁵, L.M. ALMEIDA², A.M.R. ¹Universidade Estadual do Norte do Paraná. Faculdade Luiz Meneghel, UENP-Campus Bandeirantes, PR. CEP 86360-000. E-mail: mcas@cnpso.embrapa.br, ² Embrapa Soja, ³ Centro Universitário Filadélfia - UNIFIL, Londrina, PR, ⁴ Universidade Federal de Viçosa, MG. ⁵Embrapa trigo.

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é um dos produtos agrícolas de maior importância para a economia nacional. Atualmente, as principais doenças relacionadas a grandes perdas na produção são causadas por fungos, entre eles destaca-se o complexo *Diaporthe/Phomopsis*, um importante grupo de patógenos da soja com uma ampla diversidade genética (PIOLI et al. 2003). O complexo *Diaporthe/Phomopsis* é responsável por doenças conhecidas como a queima da haste e da vagem, cancro da haste e podridão de sementes da soja (HENNING & FRANÇA NETO, 1984) Normalmente, o cancro da haste é uma doença de desenvolvimento lento, matando a planta dentro de 50 a 80 dias (YORINORI, 1990). Em cultivares mais suscetíveis, o desenvolvimento é mais rápido, podendo causar perda total dos campos de soja.

A avaliação da variabilidade genética dos patógenos atualmente é feita por meio de técnicas moleculares dentre as quais se destaca a Reação de Polimerase em Cadeia (*Polimerase Chain Reaction* - PCR), associada à digestão por enzimas de restrição do DNA ribossomal. Este trabalho pretende aumentar o conhecimento da estrutura genética das populações do patógeno permitindo inferências quanto à história evolutiva e correlações filogenéticas entre esses isolados, podendo fornecer importantes informações à área de melhoramento genético.

Noventa e seis isolados de *Phomopsis* sp. foram obtidos de hastes e sementes de soja de diferentes regiões do Brasil. Esses isolados foram cultivados em meio líquido BDA (batata-dextrose-agar). Para avaliar a diversidade desses isolados, utilizou-se DNA genômico por meio de marcadores RAPD (*Random Amplification Polimorphic DNA*) com 11 *primers* da *Operon Technologies*, OPAA01, OPAA06, OPAA10, OPAA15, OPAB17, OPAB19, OPAB05, OPAH01, OPAI03, OPN09 e OPAL12. Com os perfis de polimorfismo obtido foi montada uma matriz binária utilizada para a construção do dendograma (Fig. 1), obtendo agrupamento de pares não ponderados baseados na média aritmética (UPGMA - *Unweighted Pair Group Method*), ilustrando a distância genética entre os isolados oriundos de diferentes regiões.

Na análise de RAPD constatou-se a produção de 2752 fragmentos, com tamanho variando de 310 a 3000 pares de bases (pb). O dendograma obtido com marcadores RAPD mostrou grande diversidade genética entre os isolados, com coeficientes de similaridade variando de 0,9 a 0,12.

Os agrupamentos foram feitos considerando-se arbitrariamente 70 % de similaridade. Para amplificar a região foram selecionados, dentro dos vários agrupamentos, vinte isolados aos quais foram acrescentados dezoito isolados provenientes do Rio Grande do Sul (Tabela 1) para a amplificação da região do DNA ribossomal, utilizando os *primers* ITS (*Internal Transcribe Spacer*)-1F (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) e ITS-4R (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC). A região amplificada, (ITS1-5.8S-ITS2) com aproximadamente 600 pb, foi utilizada para análise de perfil eletroforético, após digestão com a enzima *Alu I*. Exceto um valor de 700 pb, observado com o isolado de Nova Ponte, todos os demais apresentaram valores similares àqueles descritos por Zhang et al. (1998). A análise da digestão com a enzima *Alu I* mostrou clivagem com vários padrões de fragmentos. As diferenças encontradas nos padrões de clivagem permitiram separar três grupos, A, B e C (Fig. 2). Os resultados de RAPD comprovaram a grande diversidade genética entre os isolados do complexo *Diaporthe/Phomopsis* obtidos em diferentes regiões geográficas do Brasil. Essas três espécies foram mencionadas anteriormente por

Vechiato et al. (2003) com isolados brasileiros e por Pioli et al. (2003), trabalhando com isolados argentinos. Por meio desses resultados constatou-se que os isolados obtidos nas diferentes regiões do Brasil e classificados neste trabalho como pertencentes aos grupos A, B e C, pertencem às espécies *D.p. var. caulivora* (26,3 %), *Phomopsis longicolla* (55,2 %) e *D.p. var. meridionalis* (13,1 %), respectivamente. Como a maioria dos isolados incluídos neste estudo são do Rio Grande do Sul (52,63 %), único local onde se constatou a espécie *D.p. var. caulivora*, a porcentagem encontrada foi proporcionalmente alta para essa espécie, considerando-se o total de isolados utilizados.

Tabela 1. Relação dos isolados utilizados na clivagem com enzima de restrição Alu I.

Isolado	Origem	Isolado	Origem
1	Passo Fundo-RS	20	Boa Vista-RR
2	Passo Fundo-RS	21	Boa Vista-RR
3	Passo Fundo-RS	22	Boa Vista-RR
4	Passo Fundo-RS	23	Roraima
5	Passo Fundo-RS	24	Roraima
6	Passo Fundo-RS	25	Roraima
7	Passo Fundo-RS	26	Dourados-MT
8	Passo Fundo-RS	27	Roraima-RR
9	Passo Fundo-RS	28	Passo Fundo-RS
10	Passo Fundo-RS	29	Passo Fundo-MS
11	Passo Fundo-RS	30	Catalão-GO
12	Passo Fundo-RS	31	Faxinal do Guedes-SC
13	Passo Fundo-RS	32	Faxinal do Guedes-SC
14	Passo Fundo-RS	33	Guarapuava-PR
15	Passo Fundo-RS	34	Abelardo Luz-PR
16	Passo Fundo-RS	35	CH8 <i>Dp. var meridionalis</i>
17	Passo Fundo-RS	36	Ponta Grossa-PR
18	Passo Fundo-RS	37	Ponta Grossa-PR
19	Primavera do Leste-MT	38	Nova Ponte-MG

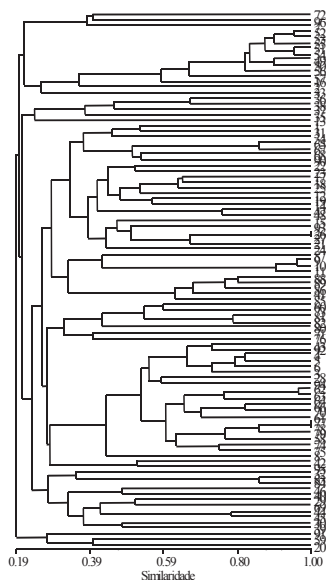


Fig. 1. Dendrograma obtido por análise de agrupamento UPGMA. Isolados utilizados na reação de RAPD.

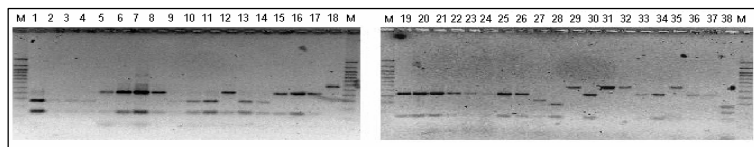


Fig. 2 – Resultado da eletroforese da digestão com a enzima de restrição *Alu I*. Grupo A) 1, 2, 3, 4, 9, 10, 11, 13, 14, 28, Grupo B) 5, 6, 7, 8, 12, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 30, 33, 34, 36, 37 e Grupo C) 18, 31, 32, 35. O isolado 35 foi usado como padrão *D.p. var meridionalis* e o 28 como padrão de *D.p. var caulivor* e o 19 como padrão *P. longicolla*.. M- marcador 100pb.

Referências

- HENNING, A.A.; FRANÇA NETO, J.B. Effect of *Phomopsis* spp. on soybean seed quality in Brazil. In: CONFERENCE ON THE DIAPORTHE/ PHOMOPSIS DISEASE COMPLEX OF SOYBEAN, 1984, Fort Walton Beach. **Proceedings...**Springfiled, 1984. p. 66-7.
- PIOLI, R. N.; MORANDI, E.N.; MARTÍNEZ, M.C.; LUCCA, F.; TOZZIN, A.; BISARO; HOPP, E. Morphologic, molecular, and pathogenic characterization of *Diaporthe phaseolorum* variability in the core soybean-producing area of Argentina. **Phytopathology**, v.93, 2003. p.136-146.
- TECNOLOGIAS de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2005. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrado: Embrapa Agropecuária Oeste: Fundação Meridional, 2004. 239p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 6).
- VECHIATO, M.H.; MARINGONI, A.C.; MARTINS, E.M.F.; KOHARA, E.Y. **Caracterização de isolados de *Diaporthe ssp* e *Diaporthe Phaseolorum var. meridionalis***. 2003. Tese (Doutorado) Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2003.
- YORINORI, J.T. **Cancro da haste da soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1990. 8p. (EMBRAPA CNPSo, Comunicado técnico, 44).
- ZHANG, W.; HARTMAN, G.L.; RICCIONI, L.; CHEN, W.D.; PEDERSEN, W.L. Using PCR to distinguish *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from other soybean fungal pathogens and to detect them in soybean tissues. **Plant Disease**, v.81, 1997. p. 1143-1149.
- ZHANG, W.; RICCIONI, L.; PEDERSEN, W.L.; KOLLIPARA, K.P.; HARTMAN, G.L. Molecular identification and Phylogenetic Grouping of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* isolates from soybean. **Phytopathology**, v.88, 1998. p. 1306-1314.