

Diversidade genética de isolados de *Cercospora sojina* de diferentes regiões do Brasil

BRIZOLA, D.C.¹, OLIVEIRA, K.B.¹, NASCIMENTO, G.M.¹, BINNECK, E.², SEIXAS, C.D.S.², SOARES, R.M.², ALMEIDA, A.M.R.² | ¹Universidade Norte do Paraná, ²Embrapa Soja, Londrina, Paraná, e-mail: alvaro.almeida@embrapa.br

Introdução

Dentre os diversos segmentos do agronegócio mundial, a produção de soja está entre as atividades econômicas que, nas últimas décadas, apresentou crescimento mais expressivo. Essa cultura da família Fabacea, gênero *Glycine* e espécie *Glycine max* ((L.) Merrill.) vem crescendo nas últimas três décadas correspondendo a 49% da área plantada no Brasil (CONAB, 2013). A principal razão da expansão da soja para todo território brasileiro foi à incorporação de um gene que induz o período juvenil, além de outros, que aumentaram a produtividade (VELLO, 1991). A soja, felizmente, encontrou diversos fatores favoráveis, como: desenvolvimento e estruturação do mercado internacional pelo comércio de produtos de complexo de soja (farelo, óleo e grãos); consolidação da oleaginosa como fonte de proteína para a alimentação animal; oferta de tecnologias que viabilizaram a exploração para novas

regiões, (LAZZAROTO & HIRAKURI, 2010). No contexto mundial, o Brasil possui uma grande participação na oferta e demanda de produtos do complexo soja, o qual vem contribuindo significativamente para a economia do setor primário, como também na balança comercial do país (CONAB, 2013).

Um dos importantes fatores que impedem a soja de atingir altas produtividades está a ocorrência de doenças. Entre as doenças fúngicas presente nas lavouras de soja, está a mancha olho-de-rã, provocada pelo fungo *Cercospora sojina* (sin. *Cercospora sojina*), que é considerada uma das principais doenças foliares, podendo atacar o caule, as vagens e as sementes. *C. sojina* foi descrito pela primeira vez, no Brasil, por Yorinori (1971), através de um lote de sementes da cultivar Bragg, originado dos EUA, que foi introduzido na Estação Experimental do IPEAME, em Ponta Grossa. O patógeno dissemina-se por sementes, razão pela qual se espalhou pelas principais regiões cultivadas com soja, no país.

Entre os métodos de controle, destacam-se o controle químico e uso de materiais genéticos com fontes de resistência distintas. O uso de cultivares resistente e o tratamento de sementes com fungicidas são fundamentais para evitar a introdução do fungo ou de novas raças do patógeno em áreas onde ela não esteja presente (TECNOLOGIAS, 2013).

Atualmente, há evidências da ocorrência de 25 raças desse patógeno no Brasil (YORINORI; KLINGELFUSS, 2000; TECNOLOGIAS, 2013). Entre os métodos que permitem visualizar diferenças entre raças estão os métodos moleculares. Um deles utiliza amplificações via PCR (*Polymase Chain Reaction*) de vários genes, ou parte de genes, tais como a região do ITS (*internal transcribed spacer*), partes do gene da β - tubulina e do fator de alongamento, entre outros

O objetivo deste trabalho foi identificar a diversidade genética de isolados, oriundos de diferentes regiões do Brasil pela análise da região do ITS e parte do gene de β - tubulina.

Material e métodos

Para os estudos moleculares foram utilizados 10 isolados de *Cercospora sojina* obtidos a partir de amostras de folhas infectadas, que foram coletadas em diferentes regiões produtoras de soja do Brasil. Os locais de coleta dos isolados foram : CS? Alto da Garça – MT, CS 2 Campinas – SP, CS 4 São Gabriel do Oeste – MT, CS 4 Ivatuba – PR, CS 7 Balsas – MA, CS 15 Tangará da Serra – GO, CS 17 São Gotardo – MG, CS 23 Niquelandia – GO, CS 24 Santa Filomena – PI, CS 25 Balsas – MA.

A partir desses isolados extraiu-se o DNA seguindo o protocolo descrito por Zolan e Pukkila (1986), com modificações. Após a extração do DNA, o mesmo foi quantificado em espectrofotômetro Nano Drop® e sua integridade foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,3%. As amostras foram diluídas para se obter uma concentração final de 10 ng/ μ l por amostra. A PCR foi realizada com primers específicos para amplificação da região ITS e β - tubulina do genoma da *C. sojina*.

Para se obter o perfil de corte para cada isolado foram feitas digestões com enzimas de restrição. Utilizaram - se cinco tipos de enzimas, com diferentes sítios de corte: Alu I, Hha I, Eco R1, Hind III, BamH I. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose a 1,3% em tampão SB 1x por eletroforese. Para comparar o tamanho dos fragmentos amplificados, utilizou-se marcador molecular de 100pb. Os resultados foram fotodocumentados utilizando L.Pix – transiluminator UVB.

Resultados e discussão

Cercospora sojina tem capacidade de desenvolver novas raças fazendo com que cultivares de soja resistentes se tornem suscetíveis à doença (YORINORI, 1989; ARIAS et al, 1996). Isto foi observado por ARIAS et al. (1996) com a cultivar Santa Rosa, anteriormente usada como resistente à mancha olho-de-rã no início da década de 1990, que tornou-se, ainda nessa década, suscetível à doença. ARIAS et al (1996) estudaram a herança

da resistência das raças 4 e 15 de *C. sojina* cruzadas com as cultivares Davis, Paraná, Santa Rosa, BR-27 e Bragg. Os autores concluíram que a resistência a estas raças é conferida por uma série de alelos múltiplos, onde provavelmente ocorrem genes distintos para a raça 4 sendo um gene proveniente da cv. Davis, outro da cv. Paraná e o terceiro da BR 27, cada um conferindo resistência independente de outra.

Desde então, com a evolução de técnicas moleculares, tem havido uma busca incessante por marcadores moleculares que permitam caracterizar as raças, sem a utilização de métodos biológicos, através de inoculações artificiais em plantas indicadoras.

O DNA de dez isolados de *C. sojina* foram amplificados por PCR com primers específicos e não se verificou diferença no gene ITS, já que os dez isolados apresentaram um único fragmento com 450 pb, após digestão com as cinco enzimas testadas.

Para o gene de β -tubulina digerido com as mesmas enzimas de restrição, constatou-se que as enzimas Alu I e Hha I provocaram cortes que diferenciaram os isolados CS 23 e CS 25 (Figura 1). Isso representa que o perfil desses isolados possuem características distintas dos demais, o que pode indicar que esses isolados pertencem a raças diferentes.

Essas diferenças podem ser úteis para um estudo mais abrangente de diferenciação de raças, com a inclusão de mais genes, como fator de alongamento, calmodulina, histona H3 e actina, seguindo-se a clonagem e sequenciamento para melhor caracterização das raças desse fungo.

Conclusão

A análise da região do ITS digerido com cinco enzimas de restrição não permitiu diferenciar os dez isolados de *C. sojina*.

A análise do gene de β - tubulina com as enzimas Alu I e Hha I permitiu diferenciar dois isolados (CS 23 e CS 25) dos demais.

Referências

ARIAS, E.R.A. **Teste de escala conjunta na estimação de parâmetros genéticos em soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 1996. 86p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sétimo levantamento**. Brasília: 2013.

LAZZAROTTO, J. J.; HIRAKURI, M. H. **Evolução e perspectiva de desempenho econômico associadas com a produção de soja nos contexto mundial e brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. 46 p. (Embrapa Soja. Documentos, 319).

TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO DE SOJA: Região Central do Brasil 2014. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 265p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 16).

VELLO, N.A. Métodos de melhoramento da soja. In: SIMPÓSIO SOBRE CULTURA E PRODUTIVIDADE DA SOJA, 1., Piracicaba, 1991. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1992, p.1.

YORINORI, J.T. Doenças: In: Ministério da Agricultura. IPEAME. **Soja no Paraná..** 1971. p.13-16. (Circular, 9).

YORINORI, J.T.; KLINGELFUSS, L.H. Novas raças de *Cercospora sojina* em soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.509-512, 2000.

ZOLAN, M.; PUKKILA, P. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. **Molecular and Cell Biology**, v. 6, p. 195-200, 1986.

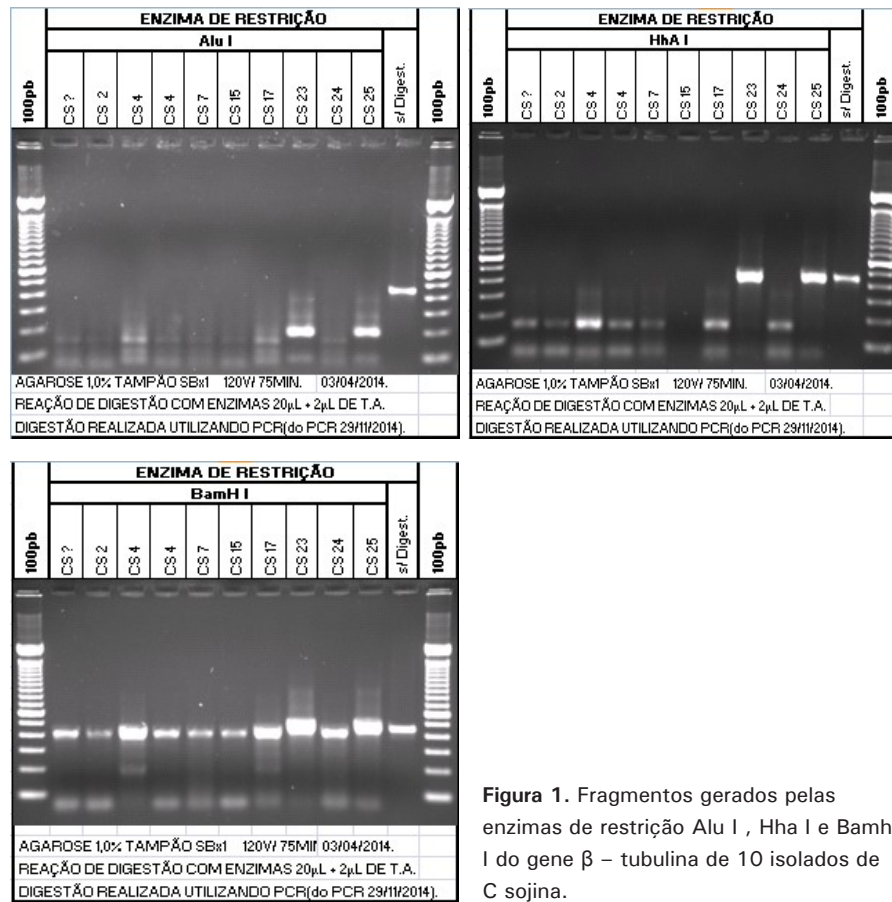


Figura 1. Fragmentos gerados pelas enzimas de restrição Alu I , Hha I e Bamh I do gene β - tubulina de 10 isolados de C sojina.