



VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS MONOSPÓRICOS DE *Colletotrichum lindemuthianum* AVALIADA POR MEIO DE MARCADORES AFLP

NOGUEIRA, LUCIANA RODRIGUES^{1*}; CERBARO, LILIAN²; BIANCHI, VALMOR JOÃO¹; ROSSETTO, EDEMAR ANTONIO²

¹LABORATÓRIO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS - DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA. INSTITUTO DE BIOLOGIA/UFPEL. ²LABORATÓRIO DE FITOPATOLOGIA – DEPARTAMENTO DE FITOSSANIDADE – FAEM/UFPEL. E-MAIL: [* LUCIANA.R.NOGUEIRA@GMAIL.COM](mailto:LUCIANA.R.NOGUEIRA@GMAIL.COM)

1. INTRODUÇÃO

O fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose, é um dos fitopatógenos de maior ocorrência e responsável por prejuízos expressivos à cultura do feijão. A antracnose pode ser altamente devastadora, proporcionando perdas de até 100% na produção quando os fatores cultivar suscetível, ambiente favorável ao patógeno e sementes infectadas estiverem simultaneamente presentes durante o período de cultivo. Entre as medidas de controle desse patógeno destacam-se: o uso de sementes certificadas, a rotação de culturas, o controle químico e a resistência genética, sendo esta última a mais eficaz, por minimizar os custos de produção e reduzir os danos causados ao ambiente (SARTORATO 2002; SILVA et al., 2004).

TENDO EM VISTA O APARECIMENTO CONSTANTE DE NOVAS RAÇAS COM CAPACIDADE DE “QUEBRAR” A RESISTÊNCIA DE CULTIVARES DE FEIJÃO, UMA ALTERNATIVA SERIA O MONITORAMENTO DAS RAÇAS, POR MEIO DE ANÁLISES DE VARIABILIDADE GENÉTICA DO FUNGO. ESTUDOS UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES PARA À ANÁLISE *C. LINDEMUTHIANUM* TÊM DEMONSTRADO A EXISTÊNCIA DE GRANDE VARIABILIDADE DESTE FUNGO EM CAMPOS DE PRODUÇÃO DE FEIJÃO EM REGIÕES DISTINTAS (SILVA, 2004).

Desta forma, desenvolvimento do presente trabalho teve por objetivo analisar a variabilidade genética de *Colletotrichum lindemuthianum*, provenientes de diferentes regiões do Brasil, através da marcadores moleculares do tipo AFLP (Amplified fragment length polymorphism).

2. MATERIAL E MÉTODOS

FORAM ANALISADOS 19 ISOLADOS MONÓSPORICOS, PROVENIENTES DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL, (TABELA 1). A EXTRAÇÃO DO DNA DO PATÓGENO FOI BASEADA NO PROTOCOLO DE DOYLE; DOYLE (1987) E LODHI ET AL. (1994) (COM MODIFICAÇÕES). A EXTRAÇÃO INICIAL FOI COM TAMPÃO CTAB 2%, COM ADIÇÃO DE 1% DE B-MERCAPTOETANOL. PARA A

DESPROTEINAÇÃO UTILIZOU-SE CLOROFÓRMIO:ÁLCOOL ISOAMÍLICO (24:1), EM SEGUIDA, AS AMOSTRAS FORAM LEVEMENTE AGITADAS E CENTRIFUGADAS A 12000 RPM POR 10 MIN. O SOBRENADANTE FOI COLETADO PARA NOVO TUBO E O DNA PRECIPITADO COM ETANOL ABSOLUTO.

AS AMOSTRAS DE DNA FORAM QUANTIFICADAS E DILUÍDAS PARA 50 NG μL^{-1} . PARA A ANÁLISE COM MARCADORES AFLP (VOS ET AL., 1995) FOI UTILIZADA O KIT DE REAGENTES AFLP ANALYSIS SYSTEM FOR MICROORGANISMS, SEGUINDO O PROTOCOLO DESCRITO PELO FABRICANTE. OS PRODUTOS FINAIS DE AMPLIFICAÇÃO FORAM SUBMETIDOS À ELETROFORESE POR 2 H A 70 V, EM UM GEL DE POLIACRILAMIDA 6%, CORADOS COM NITRATO DE PRATA (BASSAM ET. AL 1991). AS BANDAS OBTIDAS NO GEL FORAM CONVERTIDAS EM UMA MATRIZ BINÁRIA PARA PRESENÇA (1) E AUSÊNCIA DAS BANDAS (0). PARA A ESTIMATIVA DA SIMILARIDADE GENÉTICA UTILIZOU-SE O COEFICIENTE SIMPLE MATCHING (SOKAL; MICHENER, 1958) E A ANÁLISE DE AGRUPAMENTO FOI REALIZADO PELO MÉTODO UPGMA UTILIZANDO O SOFTWARE NTSYS-PC 2.1 (ROLF, 1989).

Tabela 1. Origem geográfica de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* usados na análise AFLP.

Descrição	Procedência	Ano-isolamento	Cultivar isolada
1	Fazenda Embrapa –Goiania/GO	2000	LinhagemCNF1819
2	Vitória /ES	2006	Uirapuru
3	Castrolândia Fund ABC/PR	2003	Rubi
4	Vitória /ES	2006	Uirapuru
5	Taquarituba/SP	2004	Vereda
6	Lavras/MG	2005	H126
7	Pinhão/PR	2004	Valente
8	Lavras/MG	2006	-
9	Campinas/SP	2006	-
10	São José do Cerrito/SC(Lav 1)	2008	De produtor-crioula
11	São José do Cerrito/SC(Lav 2)	2008	De produtor-crioula
12	São José do Cerrito/SC(Lav 3)	2008	De produtor-crioula
13	Araçá/SC	2008	De produtor-crioula
14	Ponte Alta/SC	2008	De produtor-crioula
15	Canguçu/RS	2007	Expedito
16	Goiania/GO	2004	Líder
17	Canguçu/RS	2009	LinhagemTB 02-21
18	Est. Experim. Cascata - Pelotas/RS	2009	Expedito
19	Sobradinho/RS	2009	Expedito

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as oito combinações de *primers* iniciadores testadas, apenas duas (MC/EAAC e MA/EA) foram utilizadas na avaliação dos 19 isolados de *Colletotrichum lindemuthianum*. Para as demais combinações de oligonucleotídeos iniciadores, o protocolo ainda está sendo padronizado. A partir da análise dos géis, foram registradas 64 bandas, destas 50 foram polimórficas sendo utilizadas para estimar a similaridade genética. O coeficiente de correlação cofenética (r) foi de 0,88, indicando bom ajuste entre os dados de similaridade e de agrupamento.

Os resultados obtidos no presente trabalho são contraditórios aos obtidos por González et al., (1998) e Silva, (2004) que observaram uma tendência de agrupamentos por região de origem. Já Mahuku e Riascos (2004) obtiveram resultados em que não houve uma separação dos grupos de acordo com o pool gênico do hospedeiro ou região geográfica, o que está de acordo com os resultados obtidos por Balardin et al. (1997b; 1999) e Fabre et al. (1995). Desta forma, os resultados de similaridade revelados no

presente trabalho podem estar relacionados ao pequeno número de marcadores polimórficos obtidos, insuficientes para proporcionar uma abordagem mais ampla no genoma e, assim, permitir um agrupamento mais condizente com os dados citados na literatura.

A INTERPRETAÇÃO DO DENDROGRAMA (**FIGURA 1**) NÃO PERMITE A CORRELAÇÃO DIRETA ENTRE OS ACESSOS E SUA REGIÃO DE COLETA, EVIDENCIANDO A AMPLA VARIABILIDADE TANTO EM ISOLADOS DA MESMA REGIÃO QUANTO EM ISOLADOS DE REGIÕES DISTINTAS, A EXEMPLO DOS ISOLADOS 06 E 08, QUE MESMO SEREM PROVENIENTES DA MESMA REGIÃO DE COLETA (LAVRAS-MG), ESTÃO LOCALIZADOS EM GRUPOS DE LIGAÇÃO DIFERENTES. PODE-SE SUGERIR QUE ESTA ALTA VARIABILIDADE SEJA ATRIBUÍDA À TROCA DE MATERIAIS VEGETAL INFESTADO PELO FUNGO, NA FORMA DE SEMENTES, ENTRE AS REGIÕES PRODUTORAS.

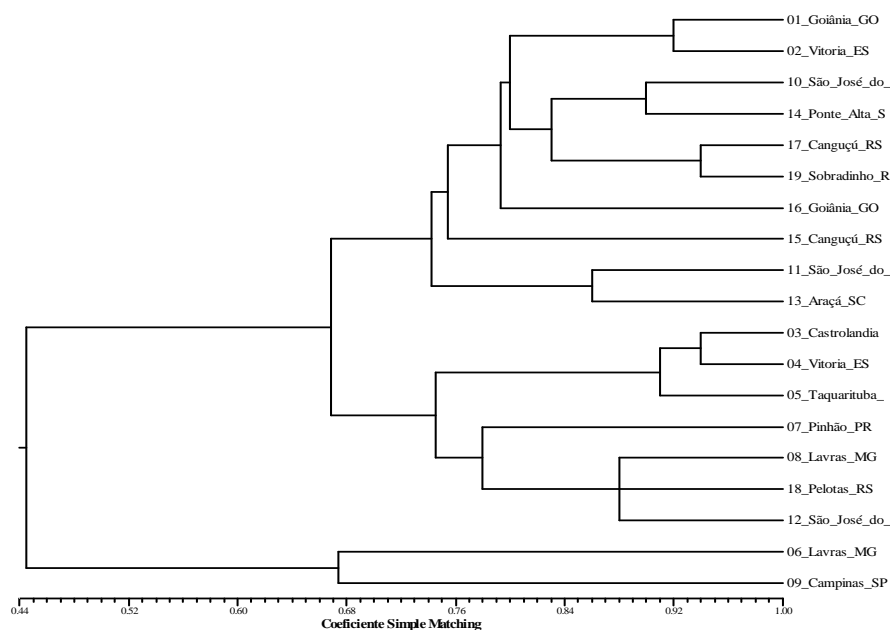


Figura 1. Dendrograma de similaridade genética gerado a partir da análise de *Simple matching* com o programa NTSYS-pc usando os dados obtidos a partir de AFLP dos 19 isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* analisados.

Outra possibilidade pode estar relacionada aos mecanismos ou fatores indutores de variabilidade genética que o patógeno em questão possui, explicando essa baixa similaridade entre isolados coletados numa mesma região, a exemplo dos isolados 12 e 10.

Diante destes resultados, análises adicionais, envolvendo outros genótipos e combinações de *primers* são necessárias e estão sendo realizadas.

4. CONCLUSÕES

Os estudos preliminares confirmaram a eficiência dos marcadores AFLP na detecção de polimorfismo de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Existe a necessidade de se testar uma maior combinação de oligonucleotídeos iniciadores para obter uma abordagem mais ampla do genoma desse patógeno e para uma melhor estimativa da similaridade genética.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALARDIN, R.S.; JAROSZ, A.M.; KELLY, J.D. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central, and North America.

Phytopathology, St. Paul, v. 87, n. 12, p. 1184-1191, Dec. 1997b.

BALARDIN, R.S.; SMITH, J.J.; KELLY, J. RIBOSOMAL DNA POLYMORPHISM IN *COLLETOTRICHUM LINDEMUTHIANUM*. **MYCOLOGICAL RESEARCH**, NEW YORK, v.103, n.7, p.841-848, JULY 1999.

BASSAN, B.J.; ANOLLÉS, G. C. E.; GRESSHOF, P. M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 196, p.80-83, 1991.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem Bull**, v.19, p.11-15, 1987.

FABRE, J. V.; JULIEN, J.; PARISOT, D.; DRON, M. ANALYSIS OF DIVERSE ISOLATES OF *COLLETOTRICHUM LINDEMUTHIANUM* INFECTING COMMON BEAN USING MOLECULAR MARKERS. **MYCOLOGICAL RESEARCH**, NEW YORK, v. 99, n. 4, p. 429-435, APR. 1995

GONZÁLEZ, M. RODRIGUEZ R, ZAVALA, M.E, JACOB, J.J., HERNANDEZ F, JORGE A, MARTINEZ O, SIMPSON J, Characterization of Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. **Phytopathology**, St. Paul, v.88, n.4, p.292-299, Apr. 1998.

LODHI, M. A.; YE, G. N.; WEEDEN, N. F.; REISCH, B. I. A SIMPLE AND EFFICIENT METHOD FOR DNA EXTRACTION FROM GRAPEVINE CULTIVARS AND -*VITIS* SPECIES. **PLANT MOLECULAR BIOLOGY REPORTER**, v.12, p.6-13, 1994

MAHUKU, G.S.; RIASCOS, J.J. Virulence and molecular diversity within *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Anden and Mesoamerican bean varieties and regions. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.110, n. 3, p. 253-263, Mar. 2004.

ROLF, F.J. **NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System**. Exeter publisher, New York, 1989.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W.;Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

SARTORATO, A. Determinação da variabilidade patogênica do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc.) Scrib. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 7., 2002, Viçosa. **Resumos...** Viçosa, UFV: 2002. p. 114-116.

SILVA, K.J.D. **DISTRIBUIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE COLLETOTRICHUM LINDEMUTHIANUM NO BRASIL**: UFLA, 2004. 86P. (DISSERTAÇÃO –MESTRADO EM AGRONOMIA/GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS).

SOKAL, R.R.; MICHENER, C.D. A statistical method for evaluating systematic relationships. **University of Kansas Science Bulletin**, v.38, p.1409–1438, 1958.

VOS P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KULPER, M.; ZABEU, M. AFLP: A NEW TECHNIQUE FOR DNA FINGERPRINTING. **NUCLEIC ACIDS RESEACRH**, v.23, p.4407-4414, 1995.

