

Patogenicidade e caracterização molecular de *Myrothecium roridum* Tode Ex Fr., isolado de plantas de soja, algodão e melão

Camila N. Lazarin^{1,2}; José Perez da Graça^{2,3}; Silvana R. R. Marin²; Nilson Darlan Vieira²; Eliseu Binneck²; Maurício Conrado Meyer²; Claudine Dinali Santos Seixas²; Álvaro Manoel Rodrigues Almeida². ¹Centro Universitário Filadélfia, Londrina-PR; ²Embrapa Soja; ³Fundação Faculdades Luiz Meneghel, Bandeirantes-PR.

Introdução

A mancha foliar de mirotécio em soja, causada por *Myrothecium roridum*, foi descrita no Brasil, em 1980 (Almeida et al., 1980) e, recentemente, em algodão (Chitarra & Meyer, 2004).

Isolados mantidos em meio de cultura, como BDA, apresentam diferentes coloração e morfologia micelial.

Segundo Lima et al. (1997), foram detectadas variabilidade morfológica e variações na atividade de isoesterase entre isolados de *M. roridum*, obtidos de leucena e melão. Aparentemente, essas características mostravam a ocorrência de variabilidade genética do patógeno, como observado por Graça, J. P. (Comunicação pessoal, 2005).

Embora a utilização de avaliações morfológicas e isoenzimáticas sejam úteis, métodos moleculares têm proporcionado melhores resultados no estudo da diversidade genética entre isolados.

Este trabalho objetivou avaliar a diversidade genética de isolados de *M. roridum*, obtidos de soja, algodão e melão, utilizando marcador molecular tipo RAPD (Random Amplified polymorphic DNA) e comparações quanto ao tamanho de fragmentos amplificados da região ITS (Internal Transcribed Spacer).

Material e Métodos

Vinte e três isolados obtidos de plantas de soja, algodão e melão (Tabela 1) foram utilizados para análises morfológica e molecular. Isolados desenvolvidos em meio de BDA (batata-dextrose-agar) foram incubados a 26°C e, posteriormente, repicados a partir de um único conídio, originando culturas monospóricas, utilizadas neste trabalho. Os conídios foram raspados da superfície da colônia desenvolvida e utilizados para avaliação do tamanho longitudinal. Trinta conídios foram avaliados, descartando-se a maior e a menor leitura.

Tabela 1. Origem dos isolados de *Myrothecium roridum*.

	Isolado	Local de coleta	Material de isolamento
1	MA-20	Balsas-MA	Folha soja
2	MA-67	Tasso Fragoso-MA	Folha algodão
3	MA-72	Riachão-MA	Bráctea algodão
4	MA-73	Riachão-MA	Folha soja
5	MA-74	Riachão-MA	Folha algodão
6	MA-75	Tasso Fragoso-MA	Folha algodão
7	MA-76	Tasso Fragoso-MA	Maçã algodão
8	MA-77	Tasso Fragoso-MA	Folha soja
9	MA-81	Riachão-MA	Folha soja
10	MA-82	Tasso Fragoso-MA	Folha algodão
11	MA-83	Tasso Fragoso-MA	Semente soja
12	MA-84	Tasso Fragoso-MA	Semente soja
13	781	Monte Carmelo-MG	Folha soja
14	782	UFRPE-Recife-PE	Raiz melão
15	783	UFRPE-Recife-PE	Raiz melão
16	784	UFRPE-Recife-PE	Fruto melão
17	785	UFRPE-Recife-PE	Fruto melão
18	787	PA	Soja
19	789	MT	Soja
20	790	MT	Soja
21	791	TO	Soja
22	792	BA	Soja
23	793	MG	Soja
24	794	GO	Soja

Cada isolado foi cultivado em meio líquido e o micélio formado, após lavado, foi utilizado para extração de DNA, (Almeida et al., 2003). O DNA de cada amostra foi mantido a -20°C até ser utilizado em RAPD (Williams et al., 1990), com o uso de primers decâmeros ou para amplificação da região ITS, utilizando primers descritos por White et al. (1997).

Resultados e Discussão

Este trabalho constitui a primeira demonstração científica da diversidade genética de isolados de *Myrothecium roridum*, no Brasil, por meio de métodos moleculares. Vinte e três isolados obtidos de algodão, soja e melão foram agrupados em nove grupos, de acordo com os coeficientes da matriz de similaridade, estabelecendo um corte de 80% de similaridade genética.

Os grupos A, B, C, F e G foram constituídos com apenas um isolado, enquanto os grupos D e E possuem 15 e 3 isolados, respectivamente (Fig. 1). Os coeficientes de similaridade do grupo D variou de 80 % a 100%, enquanto a variação no grupo E foi de 81% a 100%.

As diferenças observadas mostram que a maioria dos isolados de soja, algodão e melão possuem alta similaridade. No entanto, há três isolados de soja (MA-20, MA-73, MA-83) e um de melão (781) que apresentam baixa similaridade com os demais. Os isolados do Maranhão (grupos D e E) apresentam alta similaridade.

A amplificação da região ITS mostrou que o tamanho do fragmento de DNA amplificado pelos primers ITS1 e ITS4, que corresponde à região entre os genes 16S e 23S e inclui o gene 5,8 S foi de 620 pb. Estudos adicionais com digestão por enzimas de restrição estão em andamento.

As médias das avaliações de comprimento dos conídios estão entre as médias citadas para este gênero. No entanto, os isolados 783 e MA-77 apresentaram o maior (8,64 μm) e o menor (5,94 μm) comprimento, respectivamente.

Os dados obtidos sugerem que, há significativa diversidade genética entre os isolados de *M. roridum*, o que deve ser considerado num programa de melhoramento genético.

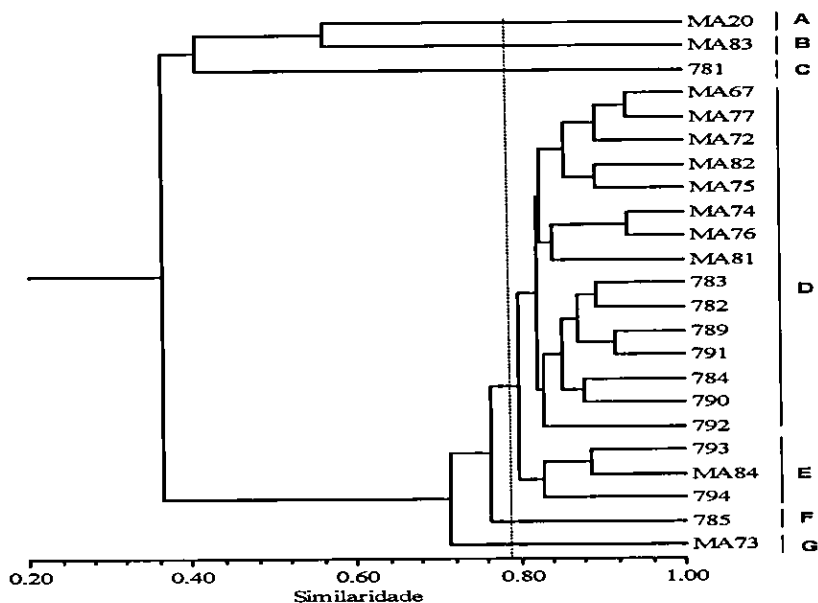


Figura 1. Dendrograma obtido através dos perfis de bandas gerados com RAPD para 24 isolados de *Myrothecium roridum*. O cálculo de similaridade foi realizado utilizando o coeficiente de DICE (UPGMA).

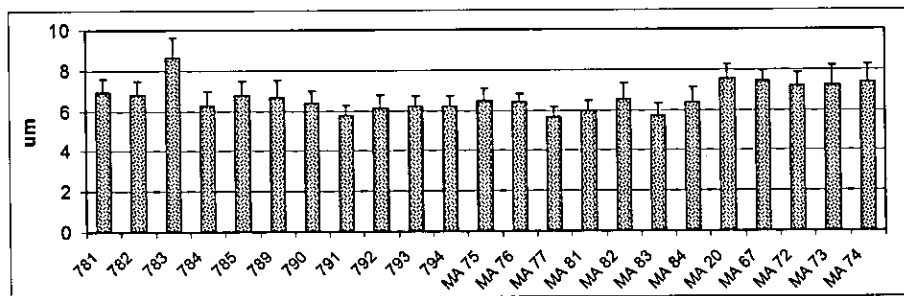


Figura 2. Tamanho médio de conídios de diferentes isolados de *Myrothecium roridum*, desenvolvidos em meio de batata-dextrose-agar.

Referências

- ALMEIDA, A. M. R.; KASTER, M.; ALBUQUERQUE, F. C. Ocorrência de *Myrothecium roridum* Tode ex Fr. Soja (*Glycine max*) (L.) Merrill no Estado do Piauí. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 5, n. 1, p. 129-133, fev. 1980.
- ALMEIDA, M. R. A.; ABDELNOOR, R. V.; ARIAS, C. R. A.; CARVALHO, W. P.; JACOUD, D. S.; MARIN, S. R. R.; BENATO, L. C.; PINTO, M. C.; CARVALHO, C. G. P. Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. **Fitopatologia brasileira** v. 28, p. 270-285, 2003.
- CHITARRA, L. G.; MEYER, M. C. Primeiro relato da mancha de *Myrothecium* em algodão, no Estado de Mato Grosso. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 543, 2004.
- GRAÇA, J. P. da. **Relatório de Estágio**. Londrina, 2005. 25p.
- LIMA, G. S.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. Cultural and morphological characteristics, and isoesterase activity of *Myrothecium roridum* isolates. **Summa Phytopathologica**, v. 23, p. 131-134, 1997.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. A.; TINGGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.) **PCR Protocol, a guide to methods and applications**, San Diego: Academic Press, p. 315-322, 1997.