

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *FUSARIUM SOLANI* PATOGENICOS NO FEIJÃO E/OU SOJA

Virginia Carla de Oliveira¹; Aloísio Sartorato²; Jefferson Luis da Silva Costa²

Fusarium solani é um fungo do solo com ampla gama de hospedeiros que apresenta variação em sua morfologia, fisiologia e patogenicidade. Isto resulta em uma taxionomia complexa dividida em seção, forma e raça. Dentro de um alto nível de especialização, forma *specialis* é associado à patogenicidade apenas a uma espécie hospedeira (especialização interespecífica) - *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, no feijão e *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, na soja. Quatorze isolados de *Fusarium solani* coletados em solos de cerrado, onde foram cultivados feijão e soja, foram testados quanto a sua patogenicidade em ambas as culturas. De acordo com os resultados (Tabela 1), dez foram patogênicos em ambas as culturas, indicando a não especificidade para o hospedeiro (forma *specialis*). Com o objetivo de caracterizar molecularmente estes isolados, utilizou-se a técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Para a extração do DNA, o fungo foi cultivado em meio líquido (extrato de levedura), por cinco dias. Após filtragem em papel de filtro estéril, o micélio foi liofilizado e armazenado em refrigerador a 80 °C até o momento da extração, quando os isolados foram macerados em N₂ líquido, sendo, então, adicionada a solução tampão (SDS 10%; EDTA 0,5 M; Tris-HCl 1,0 M, β Mercaptoetanol 10%). Efetuada a extração, quantificou-se o DNA em fluorômetro, procedendo-se as diluições para a concentração final de 10 ng/μl. Cada reação de amplificação de 25 μl foi composta de 25 ng de DNA genômico; 10 mM de Tris-HCl, pH 8,2; 50 mM de KCl; 2 mM de MgCl₂; 0,1 mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); uma unidade de Taq polimerase e, 0,4 μM de cada *primer* utilizado - OPA 03, OPA 04, OPD 08 e OPE 16 do kit de "primers" da "Operon Technologies". As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PTC 100 MJ Research. Os ciclos de amplificação constituíram-se de uma etapa de desnaturação a 94 °C por 15 segundos, uma etapa de anelamento a 35 °C por 30 segundos e uma etapa de extensão a 72 °C por um minuto. Depois de 40 ciclos, foi efetuada uma última etapa de extensão a 72 °C por 7 minutos. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose a 1,4% contendo 10 mg/mL de brometo de etídeo, imerso em tampão TBE (Tris Borato 90,0 mM, EDTA 1,0 mM, pH 8,0) a 80 V. As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas com o sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene). A partir dos padrões de bandas, obtidos pela amplificação dos quatro *primers* utilizados, foram calculadas as distâncias genética relativas (%) pelo método de Lance & Williams e o dendrograma pelo método Centróide. De acordo com a Tabela 2, os pares de isolados mais próximos foram F24 e F26, F36 e F26, F01 e F39 e, F42 e F36, com

¹Bolsista, Embrapa Arroz e Feijão, Caixa Postal 179, 75375-000, Santo Antônio de Goiás, GO.

²Pesquisador, Ph.D., Embrapa Arroz e Feijão.

7%, 16%, 16% e 16% de dissimilaridade, respectivamente. Os pares de isolados mais distantes entre si com 100%, 99%, 94% e 92% de dissimilaridade, foram F34 e F45, F40 e F46, F45 e F46 e, F34 e F46, respectivamente. Na Tabela 1 observa-se que os isolados do Feijão (F42) e da soja (F46) foram patogênicos a ambas as culturas, embora apresentem um alto grau de dissimilaridade (85%). Os isolados F03, F24, F34, F40, F42, F44, F45 e F46, que apresentaram dissimilaridade média a alta, foram patogênicos a ambas as culturas. O isolado F01, patogênico apenas na soja, demonstrou semelhança com o grupo de isolados que foram patogênicos ao feijão. Com relação ao dendrograma (Figura 1), no nível de 70% de distância, pode-se observar quatro grupos distintos compostos dos seguintes isolados: Grupo I (F01, F14, F24, F26, F34, F36, F39 F40 e F42), Grupo II (F43, F44 e F46), Grupo III (F45) e Grupo IV (F03). Os isolados F14, F26 e F36, que pertencem ao grupo no qual encontra-se o isolado do feijão, foram os únicos não patogênicos à soja.

Tabela 1. Patogenicidade dos isolados formae specialis de *Fusarium solani* no feijão e na soja.

Isolado	Procedência	Feijão	Soja
F01	Goiânia-GO	.*	.*
F03	Acreúna-GO	+	+
F14	Goiânia-GO	+	-
F24	Goiânia-GO	+	+
F26	Goiânia-GO	+	-
F34	Goiânia-GO	+	+
F36	Goiânia-GO	+	-
F39	Goiânia-GO	+	+
F40	Goiânia-GO	+	+
F42	Goiânia-GO	+	+
F43	Paranapanema-SP	+	+
F44	Taquarituba-SP	+	+
F45	Silvânia-GO	+	+
F46	Brasília-DF	+	+

*+ = patogênico.

*- = não patogênico.

Tabela 2. Distâncias genéticas relativas (%) entre os diferentes pares de solados.

ISOL.*		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
F40	1	-												
F43	2	81	-											
F14	3	41	90	-										
F01	4	53	83	39	-									
F03	5	90	92	80	84	-								
F39	6	55	89	46	16	78	-							
F42	7	50	87	29	26	82	35	-						
F44	8	83	21	86	84	81	84	82	-					
F36	9	48	89	24	27	85	35	16	84	-				
F24	10	57	87	29	39	90	49	21	88	22	-			
F26	11	53	88	22	31	92	39	20	89	16	6	-		
F45	12	70	62	80	89	73	84	81	70	84	82	84	-	
F46	13	99	50	82	86	82	87	85	35	81	85	86	94	-
F34	14	40	93	39	51	81	53	54	88	53	55	51	100	92

*ISOL. = Isolados.

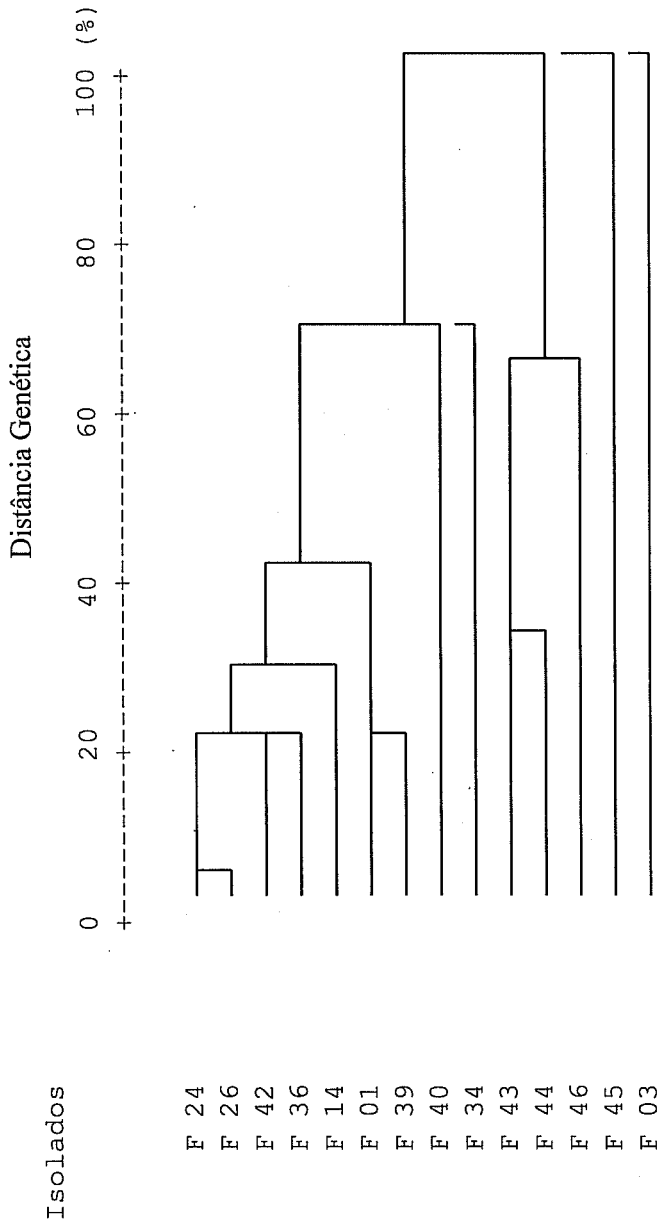


Fig. 1. Dendrograma de isolados de *Fusarium solani* desenvolvido com base na porcentagem da distância genética.