

COMPARAÇÃO MOLECULAR ENTRE ISOLADOS DE *Colletotrichum* sp, AGENTE CAUSAL DE UMA NOVA DOENÇA NO FEIJOEIRO E ISOLADOS DE *Colletotrichum graminicola* E *Colletotrichum lindemuthianum*

Keith Caetano Chaves¹; Aloísio Sartorato²; Carlos Agustín Rava e Jefferson Luis da Silva Costa

Recentemente foram encontradas nos municípios de Maurilândia (Fazenda Jamaica) e de Santa Helena de Goiás (Sementes Fartura) plantas de feijão com sintomas diferentes daqueles das doenças mais conhecidas, consistindo em manchas pretas com bordas avermelhadas localizadas nos internódios comprometendo o enchimento das vagens. Os dois locais têm em comum a proximidade de seus municípios, a utilização da cultivar Pérola e a utilização de plantio direto contínuo do feijoeiro com rotações de milho e sorgo. Em análise realizada no laboratório de fitopatologia da Embrapa Arroz e Feijão, constatou-se a presença de conídios semelhantes aos do fungo *Colletotrichum graminicola*. Os conídios entretanto, mostraram-se hialinos, falciformes, não septados e de dimensões menores (13,5-27,0 x 2,7-5,4 μ) do que os de *C. graminicola*, de acordo com VON ARX (1957). Os apressórios obtidos em meio de cultura apresentam-se esféricos, piriformes e de forma irregular, medindo 16,2-54,0 x 13,5-40,8 μ . As dimensões médias dos apressórios foram superiores às de *Colletotrichum graminicola*, de acordo com SUTTON (1968). Para esta nova doença propõe-se o nome de “sarna do feijoeiro comum”. Com o objetivo de verificar as semelhanças genéticas existentes entre eles, os isolados do agente causal desta nova doença (isolados 1, 2, 3 e 4) foram comparados pela técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) com os isolados de *Colletotrichum graminicola* obtidos do milho (isolados 5 e 6) e do sorgo (isolados 7 e 8). Como padrão comparativo (“out group”) foram utilizados dois isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* (isolados 9 e 10) obtidos do feijoeiro. Os isolados de *C. graminicola* utilizados neste estudo foram obtidos na Embrapa Milho e Sorgo. Para extração do DNA, o micélio dos fungos foram produzidos em meio líquido - extrato de levedura. Após filtração em papel de filtro estéril, o micélio de cada isolado foi liofilizado e armazenado em refrigerador, a -80 °C, até o momento da extração, quando os isolados foram macerados em N₂ líquido, sendo, então, adicionado 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/ μ l. Cada reação de amplificação de 25 μ l foi composta de 25 ng de DNA genômico; 10 mM de Tris-HCl, pH 8,2; 50 mM de KCl; 2,0 mM de MgCl₂; 0,1 mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); uma unidade de Taq polimerase e, 0,4 μ M de cada *primer* utilizado - OPA 04, OPA 13, OPG 03, OPO 07 e OPS 17 do kit de “primers” da “Operon

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

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

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 sete minutos. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose a 1,6% contendo 10 mg/mL de brometo de etídeo, imerso em tampão TBE (Tris Borato 90 mM, EDTA 1 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 cinco *primers* utilizados, foram calculadas as distâncias genéticas absolutas, pelo método de Lance & Williams e o dendrograma pelo método Centróide. De acordo com a Tabela 1, os pares de isolados mais próximos foram 3 e 4 e 7 e 8 e os mais distantes 5 e 7 e 5 e 8. No dendrograma da Figura 1 pode-se observar que a uma distância de 40%, todos os isolados de *Colletotrichum* sp do feijoeiro comum (isolados 1, 2, 3 e 4) estão localizados em um mesmo grupo, indicando a semelhança entre eles. Os mesmos resultados foram observados para os isolados de *C. graminicola* do milho (isolados 5 e 6), de *C. graminicola* do sorgo (isolados 7 e 8) e de *C. lindemuthianum* do feijoeiro comum (isolados 9 e 10). Estes resultados indicam que esta nova espécie de *Colletotrichum* obtida do feijoeiro é geneticamente diferente de *Colletotrichum graminicola*, isolado do milho e do sorgo e de *C. lindemuthianum*, agente causal da antracnose do feijoeiro comum, e que os isolados de *C. graminicola* do sorgo e do milho e de *C. lindemuthianum*, também são geneticamente diferentes entre si.

Tabela 1. Distâncias genéticas absolutas entre os diferentes pares de isolados.

Isolados	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1									
2	0,12	-							
3	0,14	0,02	-						
4	0,14	0,02	0,00	-					
5	0,74	0,71	0,75	0,75	-				
6	0,74	0,71	0,75	0,75	0,06	-			
7	0,63	0,65	0,64	0,64	0,80	0,76	-		
8	0,63	0,65	0,64	0,64	0,80	0,76	0,00	-	
9	0,61	0,64	0,63	0,63	0,71	0,65	0,64	0,64	-
10	0,69	0,71	0,71	0,71	0,68	0,62	0,71	0,71	0,14

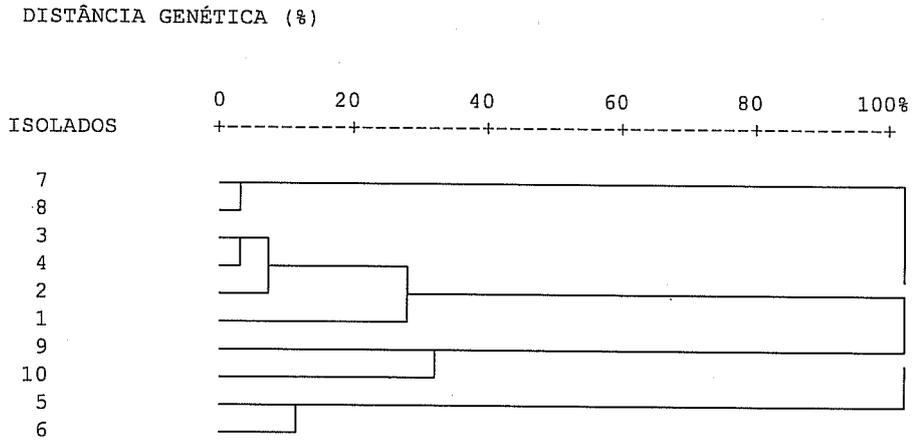


Fig. 1. Dendrograma dos isolados de *Colletotrichum* sp. desenvolvido com base na percentagem da distância genética.