

## DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE ISOLADOS DE *Rhizoctonia solani* ORIUNDOS DA CULTURA DO CAUPI

ALOISIO SARTORATO<sup>1</sup>, KÁTIA DE LIMA NECHET<sup>2</sup>

**INTRODUÇÃO:** O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] é uma das principais fontes de proteína para a população de baixa renda, principalmente nas Regiões Norte e Nordeste do Brasil. Esta leguminosa, embora bem adaptada nestas regiões, é suscetível a várias doenças que podem comprometer o seu rendimento. Entre estas doenças, a mela, cujo agente causal é o fungo *Rhizoctonia solani* (*Thanatephorus cucumeris*), na região amazônica, é um dos principais entraves à produção desta leguminosa podendo ocasionar perdas de até 50% da produção. *Rhizoctonia solani* representa um grupo economicamente importante e geneticamente diverso de patógeno de solo que ocorre em várias espécies de plantas em todo o mundo. Embora *Rhizoctonia solani* seja um fungo importante, no Brasil não existe informação alguma sobre a diversidade genética dos seus isolados associados à cultura do feijão-caupi. O presente trabalho apresentou como objetivo estudar a divergência genética de 20 isolados do fungo *R. solani* coletados de cultivares de caupi no Estado de Roraima em condições de mata e cerrado e, três isolados coletados de cultivares de feijoeiro comum utilizando os métodos RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e ITS (Internal Transcribed Spacer).

**MATERIAL E MÉTODOS:** O micélio de cada um dos isolados do fungo *R. solani* (Tabela 1) foi obtido multiplicando-os em 50 mL por Erlenmeyer do meio líquido de Batata + Dextrose (Carvalho & Sartorato, 2003). Os Erlenmeyers foram colocados em uma mesa giratória com 120 RPM por 4-5 dias. A extração do DNA de cada isolado foi realizada conforme descrito por Raeder & Broda (1987). Em cada um dos estudos (RAPD e ITS) foram utilizados 20 isolados de *Rhizoctonia solani* coletados de cultivares de caupi no Estado de Roraima cultivadas em dois ecossistemas diferentes (mata e cerrado) e três isolados coletados em cultivares de feijoeiro comum e oriundos da micoteca da Embrapa Arroz e Feijão (Figuras 1 e 2). Na avaliação pela técnica Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) foram utilizados os seguintes primers: OP G04, G08, G13, G14, G15, G17, K10, L14, L17, L18, R03 e R13. Cada ciclo de amplificação consistiram dos seguintes passos: 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 35°C e 60 segundos a 72°C. Após 40 ciclos, cada reação foi submetida a 72°C por 7 minutos para um passo de extensão final. Os produtos da reação foram separados em gel de agarose 1,2% contendo 0,2 µg de brometo de etídio/mL de gel. (Sartorato et al., 2000). Pela técnica Internal Transcribed Spacer (ITS) as reações foram realizadas utilizando o par de primers

<sup>1</sup>Embrapa Arroz e Feijão, C.P. 179, CEP 75375-000, Santo Antônio de Goiás, GO

<sup>2</sup>Embrapa Roraima, C.P.133, CEP 69301-970, Boa Vista, RR

ITS 1 e ITS 4. Os ciclos de amplificação consistiram dos seguintes passos: 1 minuto a 94°C, 1 min a 50°C e 1 min e 45 segundos a 72°C . Após 40 ciclos, cada reação foi submetida a 72°C por 5 minutos para um passo de extensão final. Os produtos da reação foram separados em gel de agarose 1,5% contendo 0,2 µg de brometo de etídio/mL de gel. Em ambos os métodos, as bandas de DNA amplificadas foram observadas sob luz UV e fotografadas com o sistema Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Os produtos da amplificação da reação de ITS foram digeridos com as enzimas de restrição *Eco RI*, *HaeIII*, *Hind III*, *Hha I* e *Taq I*. A digestão dos DNA's de cada isolado foi realizada segundo a indicação do fabricante das enzimas (Invitrogen). Após a digestão, nova eletroforese em gel de agarose a 2% contendo 0,2 µg de brometo de etídio/mL foi realizada. De forma análoga ao realizado para o experimento de RAPD, as bandas amplificadas foram anotadas segundo sua presença (1) ou sua ausência (0) para cada isolado do patógeno. A matriz gerada foi submetida à análise de agrupamento realizada pelo método da médias aritméticas não ponderadas e o quadrado da Distância Euclidiana. Em todos os cálculos foi utilizado o programa Statistic for Windows, versão 5.0.

Tabela 1. Relação dos isolados de *Rhizoctonia solani* coletados de caupi em dois ecossistema no Estado de Roraima e de feijoeiro comum.

Número do Isolado	Ecossistema	Número do Isolado	Ecossistema
141 H	Mata	200 C	Cerrado
201 A	Mata	200 H	Cerrado
201 B	Mata	200 M	Cerrado
201 C	Mata	200 O	Cerrado
208 D	Mata	200 P	Cerrado
220 B	Mata	200 S	Cerrado
220 C	Mata	210 E	Cerrado
220 L	Mata	FE P01	Feijoeiro comum
220 J	Mata	FE 43	Feijoeiro comum
154	Cerrado	FE 44	Feijoeiro comum
200	Cerrado	FE VAL	Feijoeiro comum
200b	Cerrado		

**RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 1 (RAPD) e na Figura 2 (ITS). Pelo método de RAPD foram obtidas um total de 137 bandas. Quando foi utilizado o método de ITS foi observado apenas uma banda com aproximadamente 700 pb, inclusive para os quatro isolados oriundos do feijoeiro comum. Na presença da enzima *Hind III* não foi observada a clivagem dos DNA's do fungo *R. solani*. Entretanto, após a clivagem dos DNA's de cada isolado com as diferentes enzimas, foi possível observar dois sites de restrição/enzima. Independentemente do método de estudo utilizado, com exceção do isolado 141H, todos os isolados coletados no ecossistema 'mata' foram reunidos

em um único grupo. Isto indica que os isolados coletados neste ecossistema são semelhantes entre si. Com relação aos isolados coletados no ecossistema 'cerrado' observou-se que quatro deles (200P, 200B, 210E e 200M) foram reunidos no grupo 1 e cinco (200, 200H, 200S, 200C e 200O) foram reunidos no grupo 2. Estes dados indicam que os isolados coletados no ecossistema 'cerrado' são mais divergentes entre si que os isolados coletados no ecossistema 'mata'. O isolado 154, oriundo do ecossistema 'cerrado', quando avaliado pelo método de RAPD foi reunido entre os isolados deste grupo (grupo 2). Entretanto, quando foi utilizado o método de ITS com digestão enzimática, o isolado 154 reuniu-se entre os isolados do grupo 1, composto pela grande maioria dos isolados do ecossistema 'mata'. Os isolados (FE VAL, FE 43, FE 44 E FE P01) obtidos de feijoeiro comum quando avaliados pelo método RAPD reuniram-se no grupo 2, mostrando-se serem semelhantes a alguns isolados coletados no ecossistema 'cerrado'. No entanto, quando avaliados pelo método ITS com digestão enzimática, dois deles (FE VAL e FE 43) mostraram-se mais semelhantes aos isolados do ecossistema 'mata' que do ecossistema 'cerrado'. Os outros dois isolados do feijoeiro comum (FE 44 e FE P01), quando avaliado por este método continuou sendo mais semelhante aos isolados coletados no 'cerrado' (= RAPD).

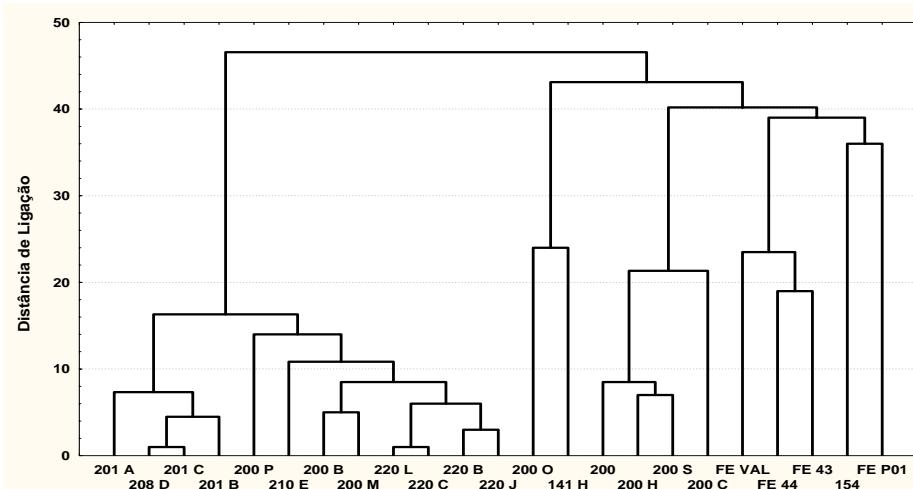


Figura 1. Dendrograma de 23 isolados de *Rhizoctonia solani* pelo método Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), utilizando 12 primers .

**CONCLUSÕES:** Os dois métodos (RAPD e ITS) utilizados no presente estudo mostraram-se eficientes, apresentando resultados semelhantes, em classificar os isolados de *R. solani* oriundos de caupi cultivado no Estado de Roraima. Os isolados de *R. solani* coletados no ecossistema 'mata', mostraram-se mais similares geneticamente que aqueles coletados no ecossistema 'cerrado'. Com relação aos

isolados de feijoeiro comum, o método do RAPD os classificou como mais semelhantes aos isolados coletados no ecossistema ‘cerrado’, enquanto pelo método ITS, dois deles foram classificados como mais semelhantes aos isolados coletados no ecossistema ‘mata’.

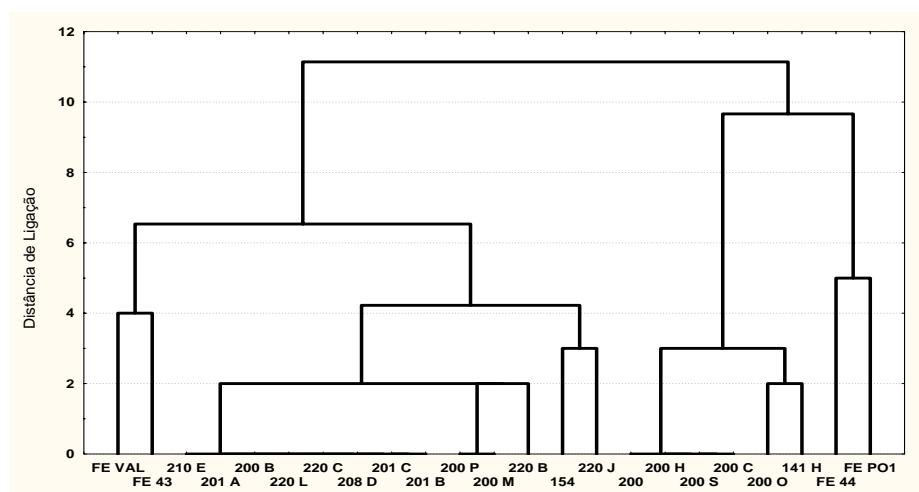


Figura 2. Dendrograma de 23 isolados de *Rhizoctonia solani* pelo método Internal Transcribed Spacer (ITS), apesar da digestão com quatro enzimas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SARTORATO, A.; NIETSCH, S.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. RAPD and SCAR markers linked to resistance gene to angular leaf spot in common beans. *Fitopatologia Brasileira*, v. 25, p. 637-642. 2000.
- CARVALHO, F.A.; SARTORATO, A. Meio líquido para produção de micélio de *Phaeoisariopsis griseola* e *Colletotrichum lindemuthianum*. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 7., 2002, Viçosa. Anais. Viçosa: UFV, 2003. v. 1 p. 120-124.
- RAEDER, U. & BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, v. 1, p. 17-20. 1985.