

VARIABILIDADE PATOGENICA E MOLECULAR ENTRE ISOLADOS DE *Colletotrichum lindemuthianum* ORIUNDOS DE DIFERENTES REGIÕES PRODUTORAS DE FEIJÃO NO BRASIL

KAESSEL JACKSON DAMASCENO E SILVA¹, ELAINE APARECIDA DE SOUZA², ALOÍSIO SARTORATO³, FRANCINE HIROMI ISHIKAWA⁴

INTRODUÇÃO: Entre os fatores que afetam a produção do feijoeiro, a ocorrência de patógenos é a que mais se destaca. O fungo, *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose, é um dos fitopatógenos de maior ocorrência e responsável por prejuízos expressivos à cultura. A antracnose pode ser altamente devastadora, proporcionando perdas de até 100% na produção. Entre as medidas de controle desse patógeno, a resistência genética destaca-se como a mais eficaz, por minimizar os custos de produção e reduzir os danos causados ao ambiente. O emprego da resistência genética para a produção de germoplasma comercial tem sido dificultado devido ao surgimento constante de novas raças fisiológicas do fungo, *C. lindemuthianum*. (Sartorato, 2002; Talamini et al., 2004). Uma das alternativas para a realização do monitoramento da coevolução patógeno-hospedeiro é a inoculação de uma suspensão de esporos, do isolado coletado, em doze cultivares diferenciadoras. Uma ferramenta promissora para o estudo da dinâmica populacional é o uso de marcadores moleculares, os quais permitem fazer inferência sobre a variabilidade genética entre e dentro de raças. Essas informações são importantes para o acompanhamento da evolução do patógeno. Desta maneira, este trabalho teve por objetivo estudar a distribuição populacional de isolados do fungo *C. lindemuthianum* provenientes de diferentes regiões do Brasil, além de identificar se a variação genética existente é intra ou inter-racial, utilizando cultivares diferenciadoras e marcadores RAPD.

MATERIAL E MÉTODOS: O trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Resistência de Plantas a Doenças, Genética Molecular e em casa de vegetação, localizados na área experimental do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram selecionados 88 isolados de *C. lindemuthianum* provenientes das micotecas do Departamento de Biologia da UFLA e do CNPAF/EMBRAPA. Estes isolados foram obtidos de diferentes origens

¹ Doutorando em Agronomia / Genética e Melhoramento de Plantas, Depto de Biologia, Universidade Federal de Lavras - UFLA, Cx. Postal 37, 37200-000, Lavras, MG, e-mail: kaeselgen@yahoo.com.br

² Professora, Depto de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Cx. Postal 37, 37200-000, Lavras, MG, e-mail: esasouza@ufla.br

³ Pesquisador, Embrapa Arroz e Feijão, Cx. Postal 179, CEP 75375-000, Santo Antônio de Goiás, GO, e-mail: sartorat@cpaf.embrapa.br

⁴ Mestranda em Agronomia / Genética e Melhoramento de Plantas, Depto de Biologia, Universidade Federal de Lavras - UFLA, Cx. Postal 37, 37200-000, Lavras, MG, e-mail: francinehi@hotmail.com

geográficas: região Sudeste, representada pelos estados de MG e SP; região Sul, representada por PR, SC e RS; região Centro-Oeste, representada por DF, GO e MS e região Nordeste, representada pela BA. Foi também usado um isolado (raça 2047) da Costa Rica, além de três isolados da fase sexuada (*Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*). Os procedimentos de isolamento do fungo, obtenção das monospóricas e suspensões, além dos procedimentos de inoculação e caracterização das raças foram realizados de acordo com metodologia utilizada por Rava et al. (1994). Obteve-se a massa micelial e, logo após foi realizada a extração do DNA (Raeder e Broda, 1985). As amostras de DNA foram amplificadas por 16 primers de RAPD. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% imerso em tampão TBE. Posteriormente, foram corados com brometo de etídio e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta Fotodyne e fotografados com a câmara fotográfica EDA - 290 da KODAK. Foram obtidas as estimativas de similaridade genética de Dice e a análise de agrupamento das similaridades (UPGMA), gerando um dendrograma. Foram feitas duas análises de variância molecular, uma considerando estrutura hierárquica em nível de estados e a outra em nível de raças.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: Foram determinadas 19 raças (0, 8, 55, 64, 65, 67, 69, 73, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 97, 337, 593 e 2047) distintas entre os 88 isolados estudados. O elevado número de raças é um indicativo da ampla variabilidade do patógeno em termos de patogenicidade. A “quebra” da resistência das cultivares diferenciadoras TO (*Co-4* ou *Mex.2*) e TU (*Co-5* ou *Mex.3*) pelas raças 337 e 593, respectivamente, revela que novas estratégias devem ser priorizadas para a introdução de novas fontes de resistência na região de origem dessas raças. Foi possível verificar que as raças 65 (27,27%), 81 (20,45%) e 73 (15,91%) são as mais freqüentes e, juntas, representam 63,63% do total dos isolados estudados. As cultivares diferenciadoras PI 207262 (*Co-4*³ e *Co-9*), AB136 (*Co-6* e *co-8*) e G2333 (*Co-4*², *Co-5* e *Co-7*) não foram infectadas por nenhuma raça (exceção à raça 2047, não coletada no Brasil), evidenciando que são importantes fontes de resistência para um programa de melhoramento visando o controle da antracnose. A análise com marcadores RAPD gerou um total de 64 bandas. A similaridade genética entre os isolados variou de 0,65 a 0,99, com média de 0,85. A análise de agrupamento revelou a formação de sete grupos (Figura 1). É válido frisar, que houve uma tendência à formação de grupos por estado de origem, notando a ocorrência de trocas de material genético dentro do estado. Nas Tabelas 1 e 2, encontram-se os resumos da análise de variância molecular (AMOVA) dos resultados obtidos a partir de uma hierarquização feita em nível de Estados e outra em nível de raças, respectivamente. Pela AMOVA (Tabela 1), verificou-se que a diferenciação genética existente entre os estados amostrados é altamente significativa ($\Phi_{ST} = 0,075$, $p < 0,000$), sendo que 7,55% da variação genética está contida entre estados e 92,45% da variação existente encontra-se dentro das populações (estados). Posteriormente, foi feita a AMOVA em nível de raças

(Tabela 1) e à semelhança da análise anterior, a maior parte da variação foi encontrada dentro de raças (80,85%). Verificou-se também que a diferenciação genética existente entre raças foi altamente significativa ($\Phi_{ST} = 0,192$, $p < 0,000$).

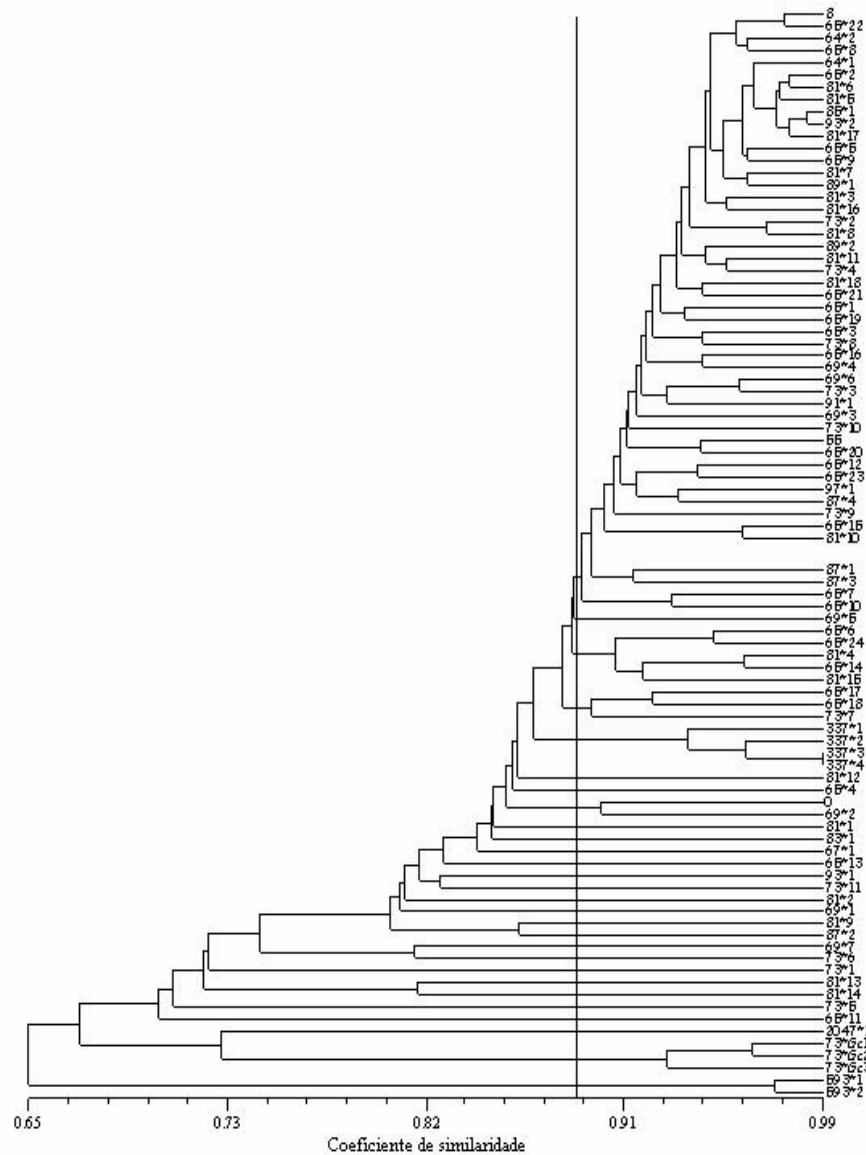


Figura 1. Dendrograma das similaridades genéticas entre os isolados de *C. lindemuthianum* oriundos de diferentes regiões do Brasil.

Tabela 1 Resumos das análises de variância molecular para seis estados de origem dos isolados e para onze raças do fungo (*C. lindemuthinum*) analisados por marcadores RAPD.

F.V.	GL	SQ	Comp. de variância	% Total	Φ_{ST}	P
Hierarquização em Nível de Estados						
Entre estados	5	74,124	0,6582	7,55	0,075	0,000
Dentro de estados	78	628,959	8,0636	92,45		
Total	83	703,083	8,7218	100,00		
Hierarquização em Nível de Raças						
Entre raças	10	182,311	1,7047	19,15	0,192	0,000
Dentro de raças	68	489,309	7,1957	80,85		
Total	78	671,620	8,9004	100,00		

CONCLUSÕES: As raças 65, 81 e 73 apresentam maior estabilidade em relação às demais. O aparecimento das raças 337 e 593 justifica a necessidade de monitoramento da variabilidade do patógeno. Os marcadores moleculares mostraram-se eficientes no estudo da dinâmica populacional de *C. lindemuthianum* e detectarem alta variabilidade. A maior variação está contida dentro de raças, evidenciando a elevada capacidade de variação deste patógeno.

AGRADECIMENTOS: À FAPEMIG, ao CNPq, ao Programa de Melhoramento do Feijoeiro da UFLA e à Embrapa Arroz e Feijão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters Applied Microbiology**, Oxford, v. 1, n. 1, p. 17-20, 1985.
- RAVA, C. A.; PURCHIO, A. F.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 2, p. 167-172, jun. 1994.
- 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.
- TALAMINI, V.; SOUZA, E. A.; POZZA, E. A.; CARRIJO, F. R. F.; ISHIKAWA, F. H.; SILVA, K. J. D.; OLIVEIRA, F. A. Identificação de raças patogênicas de *Colletotrichum lindemuthianum* a partir de isolados provenientes de regiões produtoras de feijoeiro comum. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 371-375, abr./jun. 2004.