

Avaliação isoenzimática de ...

1997

SP-S8175



CPAA-3699-1

AVALIAÇÃO ISOENZIMÁTICA DE *Colletotrichum guanicola*.ISOENZYMIC EVALIATION OF *Colletotrichum guanicola*Solange de Melo Veras¹, Luadir Gasparotto¹ & Maria Menezes²¹ Embrapa-CPAA, C.P. 319, 69011-970 - Manaus - Amazonas² UFRPE - DEPA - Área de Fitossanidade, 52171-900 - Recife - Pernambuco

Recebido para publicação em 31 de outubro de 1996.

ABSTRACT

This paper relates the electrophoretic patterns of the total protein, esterase and acid phosphatase of nine *Colletotrichum guanicola* isolates. The isolates were cultivated in liquid medium BD during seven days under continuous light regime at 25°C. The electrophoretic analysis in polyacrylamide gel showed different patterns, indicating the occurrence of phenotypic variation among isolates. However, the isolates ISO-1 and ISO-2, ISO-8 and ISO-9 were similar to each other.

KEYWORDS. Isoenzymatic characterization; *Colletotrichum guanicola*; phenotype.

INTRODUÇÃO

O fungo *Colletotrichum guanicola* Albuquerque, destaca-se como agente etiológico da principal e mais importante doença do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke), a antracnose.

A identificação da espécie tem sido feita com base morfológica, verificando-se a existência de variabilidade cultural e também com relação ao tamanho de conídios, entre os isolados obtidos de plantas de guaranazeiro com sintomas típicos de antracnose.

Análise de isoenzimas é uma técnica atualmente usada por micologistas e fitopatologistas para obtenção de dados confiáveis na identificação de isolados desconhecidos, bem como para determinar a extensão da variação genética dentro e entre populações de fungos relacionados (1).

Vários trabalhos foram realizados por diferentes pesquisadores, envolvendo estudos isoenzimáticos em diferentes espécies de fungos, dentre eles, pesquisas desenvolvidas por BOSLAND & WILLIAMS (2) sobre o polimorfismo enzimático de *Fusarium oxysporum*; por HELLMAN & CHRIST (3) estudando raças de *Ustilago hordei*; por JUNQUEIRA et al. (4) analisando padrões isoenzimáticos de sete isolados de *Microcyclus ulei*; por MICALES et al. (1) sobre atividade isoenzimática dentro do gênero *Peronosclerospora*, além de outros.

Com relação a *C. guanicola*, inexistem estudos desta natureza, porém os há com outras espécies de *Colletotrichum*, como os desenvolvidos por LENNE & BURDON (5) com isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de *Stylosanthes guianensis*, BONDE et al. (6) em análise de comparação isoenzimática de *C. acutatum*, *C. fragariae* e *C. gloeosporioides*.

O presente trabalho, objetivou a caracterização isoenzimática de nove isolados de *C. guanicola*, através de padrões eletroforéticos em gel de poliacrilamida.

MATERIAL E MÉTODOS

S8175

Os nove isolados de *C. guanicola* foram obtidos de folhas e ramos de guaranazeiro com sintomas de antracnose, oriundos de áreas de produção de alguns municípios do Estado do Amazonas.

Preparo das amostras e obtenção do extrato protéico. Fragmentos de micélio de cada um dos nove isolados de *C. guaranicola*, foram transferidos de tubos de ensaio para frascos de erlenmeyer contendo 150ml de meio líquido BD e incubados pelo período de sete dias em regime de claro contínuo, a 25°C. Após o período de incubação, a massa micelial foi filtrada em papel de filtro, lavada com três porções de água estéril, seco em papel absorvente em condições ambientais e pesada.

Para obtenção do extrato protéico, 1 (um) grama de massa micelial de cada isolado, foi individualmente macerado em almofariz mantido em banho de gelo, adicionando-se 1,5 ml de tampão tris-glicina 0,125M, pH 8,2, 300mg de sacarose e 300 mg de polivinilpirrolidona (PVP). Em seguida, as amostras foram mantidas em refrigerador durante 4 horas, a 4°C e, posteriormente filtradas em dupla camada de gase.

Análise eletroforética de isoenzimas. Utilizou-se o sistema contínuo de eletroforese em géis de poliacrilamida, de acordo com método empregado por ALFENAS et al. (7).

A perfuração dos poços nos géis, realizada através de um pente metálico, nos quais foram colocados retângulos de 0,4 x 0,3cm de papel de filtro Whatman nº 3 embebidos nos extratos dos respectivos isolados, segundo metodologia utilizada por FALCÃO (8).

Coloração e fixação da cor. Após a migração eletroforética, o gel foi retirado da placa, e para a detecção de proteínas, utilizou-se como solução corante azul de Coomassie e a fixação da cor, feita com solução fixadora PAGE por 20 minutos, a 37°C. Para detecção de esterase, o gel foi imerso na solução corante Fast blue BB e a fixação da cor, feita com fixador AYALA et al. (9), durante 20 minutos, a 37°C.

Para detecção da fosfatase ácida, utilizou-se a solução corante Fast Garnet e a fixação da cor realizada com fixador AYALA et al. (9), durante 20 minutos, a 37°C. A secagem dos géis, realizada conforme ALFENAS et al. (7).

Interpretação dos zimogramas. Os padrões de proteínas totais, esterase e fosfatase ácida, foram determinados através do número, posição e intensidade das bandas e o cálculo da mobilidade relativa das bandas (R_m), efetuado em relação à distância em cm da região mais anódica ou mais catódica do isolado ISO-2 usado como controle, conforme método adotado por Falcão (8).

RESULTADOS

No sistema proteínas totais, foram detectadas um total de 11 regiões protéicas anódicas, PT-1, PT-2, PT-3, PT-4, PT-5, PT-6, PT-7, PT-8, PT-9, PT-10 e PT-11, que apresentaram mobilidade relativa de 1,24, 1,00; 0,93; 0,78; 0,71; 0,65; 0,54; 0,43; 0,39; 0,32 e 0,15, respectivamente (Figura 1).

Como pode ser constatado, os isolados apresentaram de três a sete bandas protéicas, sendo a maioria de fraca intensidade. Os isolados ISO-4 e ISO-6 foram os que mostraram o maior número de bandas, respectivamente sete e seis, com R_m diferentes, exceção das bandas PT-4, PT-8 e PT-11 que alcançaram a mesma posição no gel. Os isolados ISO-1 e ISO-2 apresentaram o mesmo comportamento com cinco bandas protéicas de mesma R_m , sendo quatro de intensidade fraca e uma de média intensidade. O mesmo foi observado com os isolados ISO-8 e ISO-9 que mostraram respectivamente quatro bandas, sendo três de fraca intensidade e uma intermediária, igualmente com mesma mobilidade relativa.

Para o sistema esterase, foram observadas o máximo de oito regiões anódicas, EST-1, EST-2, EST-3, EST-4, EST-5, EST-6, EST-7, e EST-8, com mobilidade relativa de 1,00; 0,93; 0,82; 0,71; 0,62; 0,48; 0,44 e 0,22, respectivamente (Figura 2).

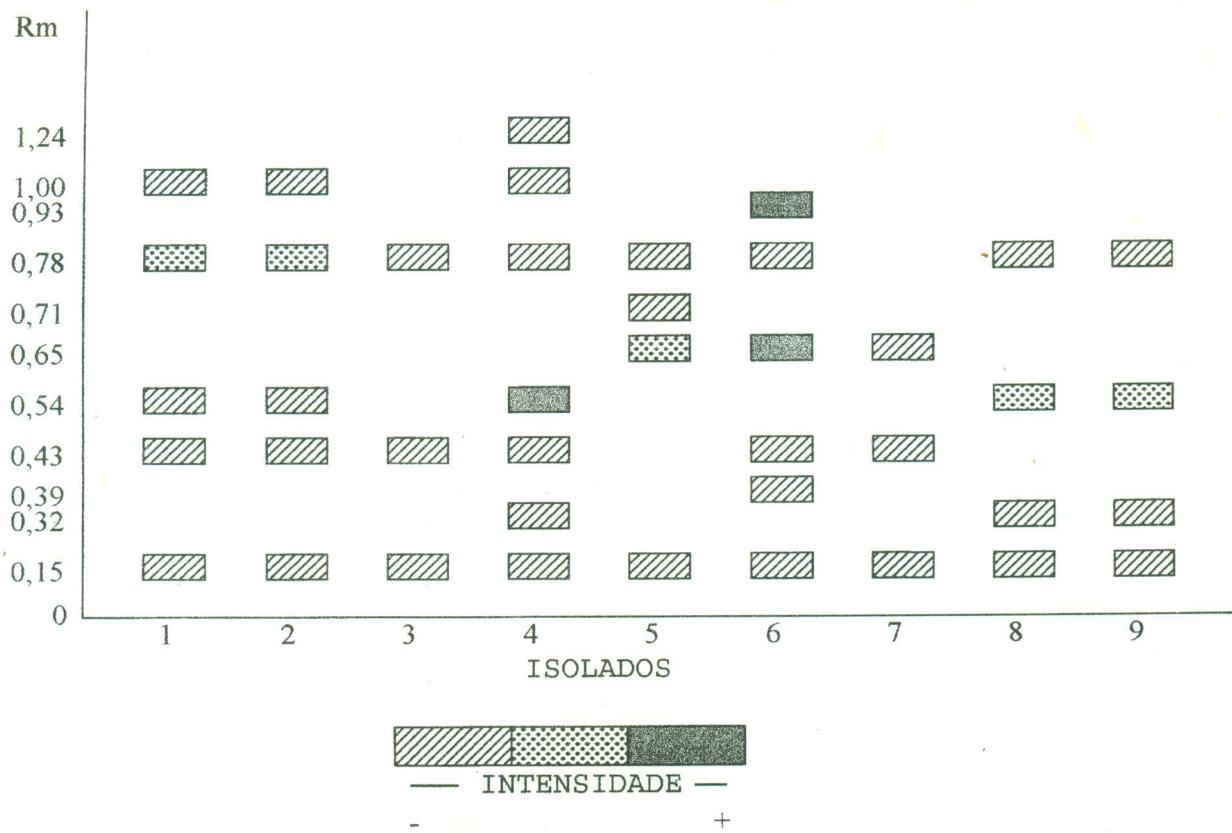


Figura 1. Zimograma de proteínas totais, em gel de poliacrilamida, dos isolados de *Colletotrichum guaranicola*.

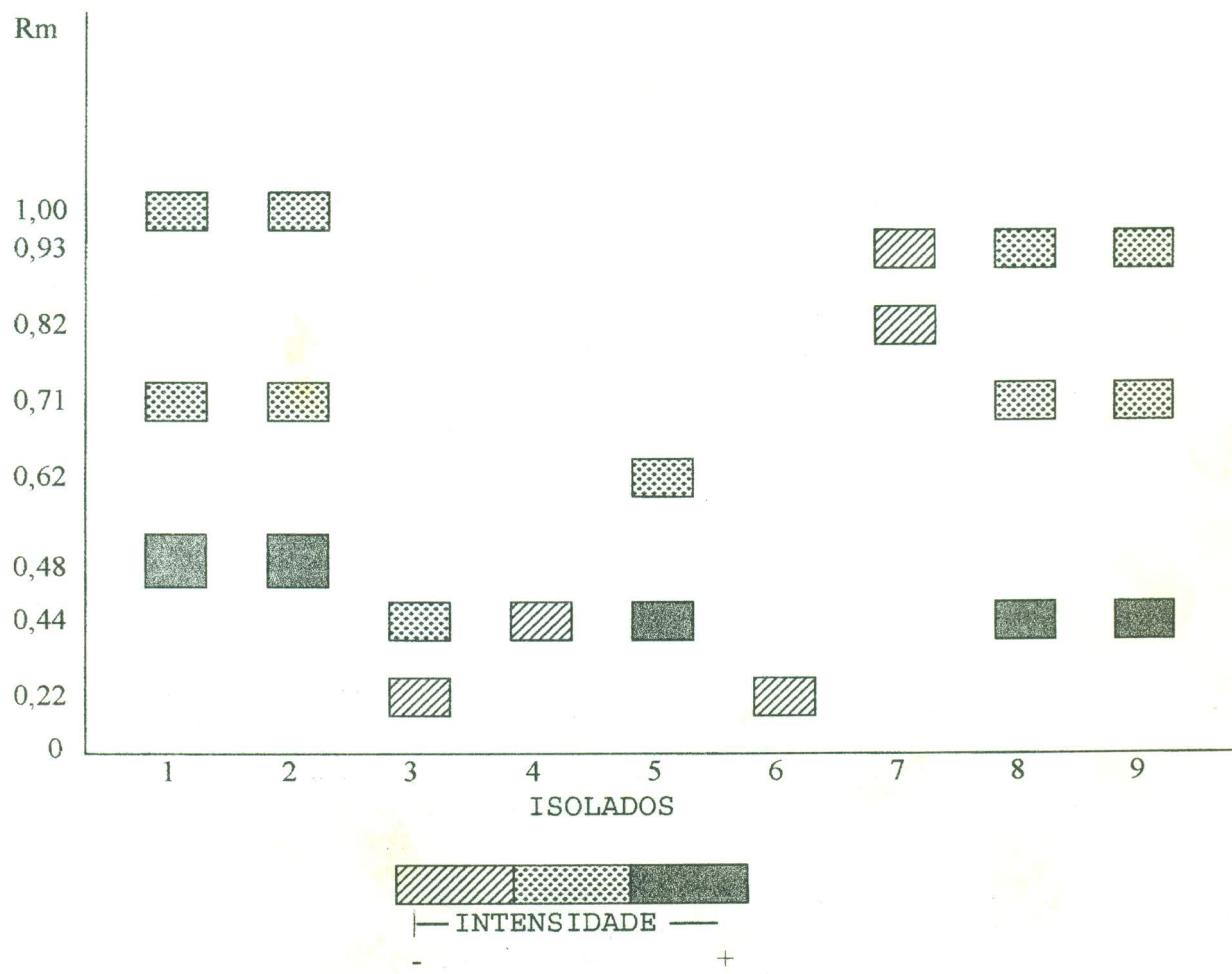


Figura 2. Zimograma de esterase, em gel de poliacrilamida, dos isolados de *Colletotrichum guaranicola*.

Na atividade esterásica, os isolados ISO-1 e ISO-2 apresentaram comportamento isoenzimático semelhante, com três bandas de esterase, sendo respectivamente, uma forte e duas de média intensidade, com mesma Rm no gel. Do mesmo modo, os isolados ISO-8 e ISO-9 também mostraram ser geneticamente semelhantes, com três bandas de esterase, uma forte e duas de média intensidade na mesma posição no gel. Nos quatro isolados ISO-1 e ISO-2, ISO-8 e ISO-9, aparentemente iguais pela atividade isoesterásica, constatou-se através da Figura 2, uma diferença na posição da EST-1 ($R_m=1,00$) e EST-2 ($R_m=0,93$), porém considerada uma distância relativamente próxima.

Nos demais isolados ocorreu a presença de bandas comuns, como EST-7 com $R_m=0,44$ (ISO-3, ISO-4, ISO-5, ISO-8 e ISO-9), EST-8 com $R_m=0,22$ (ISO-3 e ISO-6), EST-4 com $R_m=0,71$ (ISO-1, ISO-2, ISO-8 e ISO-9) e EST-2 com $R_m=0,93$ comum a ISO-7, ISO-8 e ISO-9.

Em geral, os isolados de *C. guaranicola* apresentaram uma variabilidade genética, indicada pelo número, intensidade e posição das bandas de esterase, porém guardando certa afinidade entre eles.

No sistema fosfatase ácida, foram detectadas um total de cinco regiões anódicas, designadas ACP-1, ACP-2, ACP-3, ACP-4 e ACP-5, com mobilidade relativa de 1,20; 1,00; 0,65; 0,40 e 0,15, respectivamente, e duas regiões catódicas, ACP-6 e ACP-7 de mobilidade relativa de 1,00 e 2,00 (Figura 3).

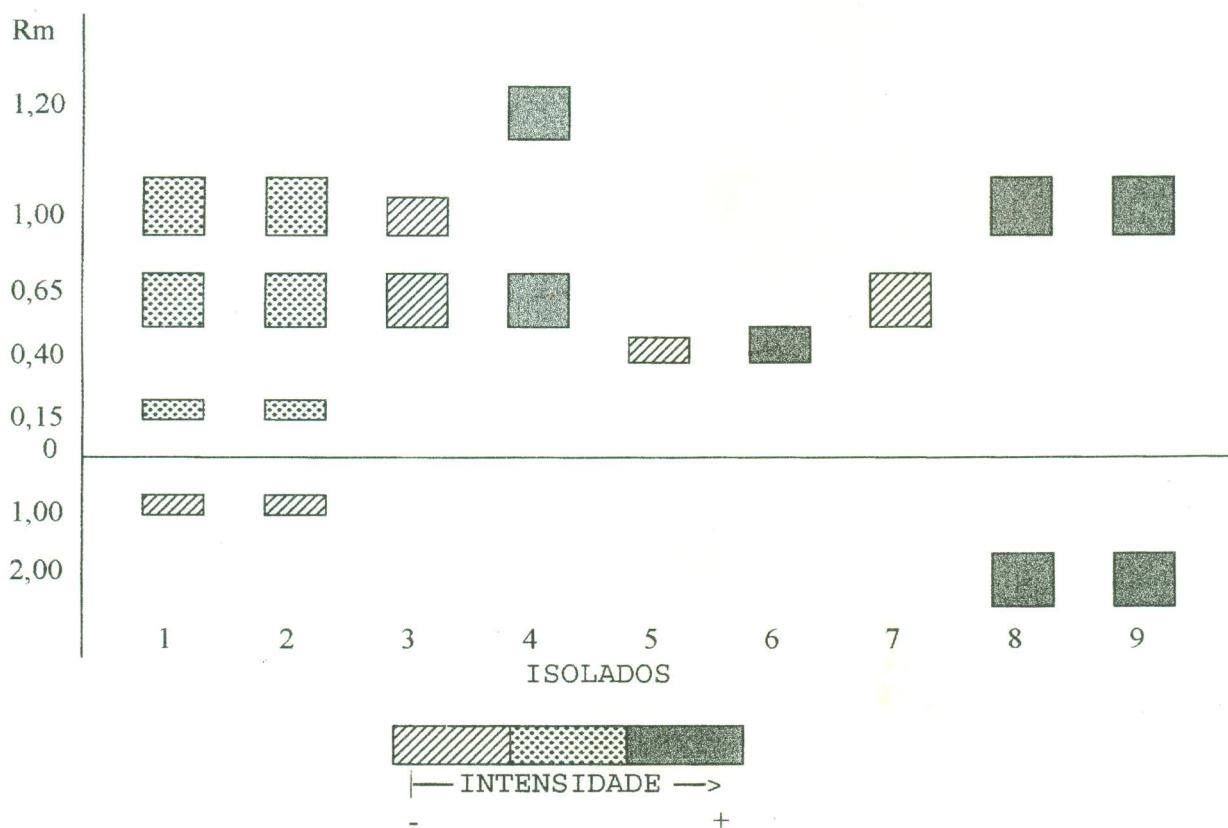


Figura 3. Zimograma de fosfatase ácida, em gel de poliacrilamida, dos isolados de *Colletotrichum quaranicola*.

Os isolados ISO-1 e ISO-2 mostraram comportamento semelhante, com quatro bandas de atividade da fosfatase ácida, sendo três anódicas (ACP-2, ACP-3 e ACP-5) de intensidade média e uma catódica (ACP-6) de intensidade fraca, as quais apresentaram a mesma Rm no gel. Do mesmo modo, os isolados ISO-8 e ISO-9 mostraram-se iguais, com duas bandas de intensidade forte de fosfatase ácida, sendo uma anódica (ACP-2) na mesma distância ($Rm=1,00$) e a outra catódica (ACP-7) com $Rm=2,00$.

Os demais isolados variaram quanto a Rm e intensidade enzimática, porém ISO-5 e ISO-6, aparentemente semelhantes, quanto ao número e mobilidade relativa, mostraram no entanto diferença na atividade da enzima, indicada pela coloração (ISO-5, fraca e ISO-6, forte).

DISCUSSÃO

Em geral, a análise eletroforética permitiu observar variabilidade isoenzimática dos isolados de *C. guaranicola* nos três sistemas analisados. Entretanto, os isolados ISO-1 e ISO-2, bem como ISO-8 e ISO-9 mostraram estreita semelhança entre si com relação às características fenotípicas tanto para proteínas totais, como nas atividades das enzimas esterase e fosfatase ácida. Os demais isolados comportaram-se diferentemente, mas sempre guardando certa relação entre eles, indicada pela presença de bandas isoenzimáticas comuns. É provável tratar-se de variantes dentro da população de *C. guaranicola*.

LENNÉ & BURDON (5), pesquisando quatro sistemas enzimáticos em isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de *Stylosanthes guianensis*, verificaram limitada diversidade de isoenzimas, sugerindo um alto nível de reprodução clonal. Por outro lado, BONDE et al. (6), estudando três patógenos de morangueiro, *C. acuntatum*, *C. fragariae* e *C. gloeosporioides*, constataram que estas espécies podiam ser separadas por meio de comparação isoenzimática, sendo que *C. acuntatum* e *C. gloeosporioides* eram mais estreitamente relacionadas do que *C. fragariae* e *C. gloeosporioides*. Já FIGUEIREDO et al. (10) ao investigarem a variabilidade isoenzimática de quinze isolados de *C. lindemuthianum* através de eletroforese em géis de amido, detectaram atividade para 20 das 25 enzimas testadas, sendo a maioria delas polimórficas. Entretanto, a análise realizada em géis de poliacrilamida, não mostrou eficiência na detecção de variabilidade entre os isolados.

A estabilidade no comportamento dos quatro isolados (ISO-1 e ISO-2, ISO-8 e ISO-9), revelado através dos dados isoenzimáticos obtidos, ressalta a importância da utilização desses marcadores na análise de fungos fitopatogênicos, demonstrando a eficiência de técnicas moleculares na caracterização da população genética de fungos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MICALES, J.A.; BONDE, M.R. & PETERSEN, G.L. (1988) Isoenzyme analysis and aminopeptidase activities within the genus *Peronosclerospora*. *Phytopathology*, St. Paul, (78), p.1396-1402.
2. BOSLAND, P. A. & WILLIAMS, P.H. (1987). An evaluation of *Fusarium oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isozyme polymorphism, vegetative compactibility and geographic origin. *Canadian Journal Botany*, (65), p.2067-2073.
3. HELLMAN, R. & CHRIST, A. (1991). Isozyme variation of physiology races of *Ustilago hordei*. *Phytopathology*, St. Paul, (81), p.1536-1540.
4. JUNQUEIRA, N.T.; ALFENAS, A.C.; CHAVES, G.M.; ZAMBOLIM, L. & GASPAROTTO, L. (1987). Variabilidade isoenzimática de isolados de *Microcyclus ulei* com diferentes níveis de virulência . *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, (12), p.208-214.
5. LENNÉ, J.M. & BURDON, J.J. (1990). Preliminary study of virulence and isozyme variation in natural populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes guianensis*. *Phytopathology*, St. Paul, (80), p.728-731.
6. BONDE, M.R.; PETERSEN, G.L. & MAAS, J.L. (1991). Isozyme comparisons for identification of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Phytopathology*, St. Paul, (81), p.1523-1528.
7. ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W. & PASSADOR, G. (1991). *Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 242p.

8. FALCÃO, T.M.M.A. de. (1984). **Polimorfismos protéicos em populações naturais de abelhas brasileiras.** Ribeirão Preto. (Tese de Doutorado). 231 p.
9. AYALA, F.J.; POWER, J.R.; TRACEY, M.L.; MOURAU, C.A. & PEREZ-SALAS, S. (1972). Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group; IV. Variation in natural populations of *D. willistoni*. **Genetics**, Princeton, (70), p.113-139.
10. FIGUEIREDO, G.; ALFENAS, A.C. & BROMMONSCHENKEL, S. (1989). Variabilidade isoenzimática de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, (14), p.118. Resumo

