

VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Rhizoctonia solani*, DE PARTE AÉREA, ANALISADAS POR MEIO DE MARCADORES RAPD¹

Carla Vanessa Borges CASTRO²

Vicente Savonitte MIRANDA³

Paulo Sérgio Torres BRIOSO⁴

Luiz Sebastião POLTRONIERI⁵

Iulla Naif Rabelo de Souza Reis⁶

RESUMO: *Rhizoctonia solani* é um fungo cosmopolita, com vasto número de hospedeiros, e causa importantes doenças na maioria das plantas cultivadas em todo o mundo. Diferentes técnicas têm sido utilizadas com o intuito de estudar a diversidade genética de *R. solani*. Dentre elas, os marcadores de DNA do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) constituem instrumentos para caracterizar e avaliar o germoplasma rapidamente e com eficiência. Em virtude da variabilidade existente nos sintomas produzidos por esse patógeno, o objetivo do presente trabalho é avaliar a variabilidade genética de 13 isolados de *R. solani* que induzem, na sua maioria, sintomas na parte aérea dos vegetais infectados, utilizando-se marcadores moleculares de DNA, do tipo RAPD. A análise molecular do DNA extraído dos isolados com o *primers* OPA1 e OPA2 permitiu visualizar 17 bandas polimórficas com tamanhos que variavam entre 800 a 1800 bp, gerando 100% de polimorfismo entre os 13 isolados estudados. A similaridade entre as amostras, estimada pelo coeficiente de Jaccard, foi de 21,71%, sendo gerado pelo método UPGMA um dendrograma que permitiu agrupar os isolados em 7 grupos principais. Com base nas avaliações realizadas, concluiu-se que há uma grande variabilidade molecular entre os isolados de *R. solani* analisados.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: *Rhizoctonia solani*, RAPD, Similaridade.

¹ Aprovado em 24/1109 para publicação.

² Engenheira Agrônoma, Doutoranda em Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ. E-mail: carlinhaufra@hotmail.com/carlavbcastro@yahoo.com.br.

³ Biólogo, Dr., Professor Adjunto da UFRA. E-mail: vicente.miranda@ufra.edu.br.

⁴ Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor Associado da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/UFRRJ. E-mail: paulbri@ufrj.br.

⁵ Engenheiro Agrônomo, M.Sc., Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental. E-mail: poltronieri@cpatu.embrapa.br.

⁶ Engenheira Agrônoma, Doutoranda em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa/UFV. E-mail: naif_agro@yahoo.com.br.

GENETIC VARIABILITY OF *Rhizoctonia solani* ISOLATED FROM PLANT TOP PARTS AND ANALYSED BY RAPD MARKERS

ABSTRACT: *Rhizoctonia solani* is a cosmopolitan fungus with a vast number of hosts which causes important diseases in most of the cultivated plants in the whole world. Different techniques have been used to study the genetic diversity of *R. solani*. Among them, DNA markers such as RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) type constitute an important tool to perform a quick and efficient germplasm characterization and evaluation. Due to the variability of symptoms produced by this plant pathogen, the objective of this research was to determine the genetic variability of 13 isolates of *R. solani* which induces symptoms on the top parts of infected plants by using RAPD markers. The molecular analysis, performed with OPA2 and OPA3 on the isolates fungus DNA, allowed the visualization of 17 polymorphic bands with sizes varying between 800 to 1800 bp, and producing 100 % of polymorphism among the 13 isolates studied. The similarity among samples, estimated by the Jaccard coefficient, was 21.71%, according to the UPGMA method, producing a dendrogram which allowed grouping of the isolates in 7 principal groups. Based on these results, it was concluded that there was a great molecular variability among the isolates of *R. solani* analyzed.

INDEX TERMS: *Rhizoctonia solani*, RAPD, Similarity.

1 INTRODUÇÃO

O fungo habitante do solo *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk [fase anamórfica = *Rhizoctonia solani* Kühn] é um basidiomicota que ocorre mundialmente causando doenças economicamente importantes em uma grande variedade de plantas cultivadas (ANDERSON, 1982; ADAMS, 1988; VILGALYS, 1988). A maioria dos isolados deste patógeno não se reproduz sexuadamente e são conhecidos apenas por seu estágio assexual (fase anamórfica). Esse fungo representa um grupo economicamente importante e geneticamente diverso de patógenos de solo que ocorrem em várias espécies de plantas em todo o mundo (VILGALYS, 1988; VILGALYS; CUBETA, 1994).

Relatos sobre isolados de *Rhizoctonia*, fitopatogênicos ou saprofíticos, não descritos ao nível de espécie, são comuns na literatura devido às dificuldades na identificação impostas por limitações morfológicas e taxonômicas do gênero, tais como: (i) ausência

de esporos assexuais; (ii) instabilidade na morfologia de culturas e escleródios, em função de variações nas condições de cultivo (PARMETER; WHITNEY, 1970); (iii) ampla variabilidade morfológica, sendo que há espécies constituídas por diferentes grupos de isolados com afinidade para efetuar anastomose de hifas entre si (OGOSHI, 1987); (iv) necessidade de métodos específicos para se induzir estruturas basidiais *in vitro* (CARLING; SUMMNER, 1992) e (v) desconhecimento dos teleomorfos para algumas espécies anamórficas (STALPERS; ANDERSEN, 1996).

Diferentes técnicas têm sido utilizadas com o intuito de estudar a diversidade genética de *R. solani*. Dentre elas, os marcadores de DNA do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) constituem instrumentos para caracterizar e avaliar o germoplasma rapidamente e com eficiência. É considerada uma das técnicas que vem sendo mais utilizada na caracterização das espécies eucariotas

e procariotas, tendo sido desenvolvida por Williams et al. (1990). Essa técnica é uma das variantes da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que utiliza um “único” iniciador (*primer*) composto por dez pares de bases de sequências nucleotídicas arbitrárias, tendo, portanto, sua sequência alvo desconhecida (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), ao contrário das outras que requerem informações prévias de sequência de DNA alvo, para a amplificação.

Sua utilização possibilitou a detecção de vários polimorfismos em diferentes populações e/ou indivíduos através da presença ou ausência dos produtos de amplificação (WILLIAMS et al., 1990; FAIRBANKS; 1991). Essa técnica, devido à sua relativa simplicidade, rapidez e baixo custo, têm atraído muitos pesquisadores e é considerada a mais empregada com o intuito de estudar a diversidade genética de vários fungos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Por meio de estudos preliminares com a classe de marcadores RAPD, o objetivo deste trabalho é avaliar a variabilidade genética de 13 isolados de *R. solani*, que induzem, na sua maioria, sintomas na parte aérea dos vegetais infectados, utilizando-se marcadores RAPD.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário, vinculado à Área de Fitopatologia, do Departamento de Entomologia e Fitopatologia (DEF), do Instituto de Biologia (IB), da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Seropédica, RJ). Na investigação foram empregados 11 isolados de *R. solani* fornecidos pela Embrapa Amazônia Oriental, sendo todos de parte aérea; e dois isolados de *R. solani* do grupo de anastomose AG4 e AG7, provenientes de solo, pertencentes à micoteca da Área de Fitopatologia/DEF/IB (Quadro 1).

Quadro 1 – Relação dos isolados de *R. solani* obtidos de diferentes plantas, com suas respectivas identificações para as reações do tipo RAPD.

CULTURAS/ ESPÉCIE	NOME CIENTÍFICO	IDENTIFICAÇÕES DOS ISOLADOS*	ORIGEM
CHAMA	<i>Cayaponia espelina</i> (Manso) Cogn.	R1	BRASIL
RÚCULA	<i>Euruca sativa</i> (L.) Cav.	R2	BRASIL
BASTÃO DO IMPERADOR	<i>Etilingera elatior</i> (Jach) R. M. Sim	R3	BRASIL
CUPUAÇU	<i>Theobroma grandiflorum</i> (Willd. ex Spreng.)	R4	BRASIL
MELANCIA	<i>Citrullus vulgaris</i> Schrad	R5	BRASIL
PUERÁRIA	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Roxb.) Benth	R6	BRASIL
AG7	_____	R7	ESTADOS UNIDOS
AG4	_____	R8	JAPÃO
NIM	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss	R9	BRASIL
CITROS	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	R10	BRASIL
Não identificada	_____	A11	BRASIL
MILHO	<i>Zea mays</i> L	R12	BRASIL
ACÁCIA	<i>Acacia farnesiana</i> (L.) Willd.	R13	BRASIL
CAFÉ	<i>Coffea arabica</i> L.	R14	BRASIL

*A = *Alternaria* sp; R = *Rhizoctonia solani*.

Os isolados foram crescidos em meio batata-dextrose-ágar (BDA), a 25°C, e posteriormente repicados para meio líquido (MILLS; SREENIVASAPRASAD; BROWN, 1994) e mantidos sob agitação no escuro, por sete dias. Após isto, o micélio de cada isolado foi filtrado sob vácuo, recolhido para placas de Petri esterilizadas.

Para a extração do DNA dos isolados, utilizou-se o produto DNAzol (Invitrogen). O DNA genômico foi extraído de 50 mg de micélio, previamente macerado em nitrogênio líquido, utilizando-se o protocolo de extração de Williams et al. (1990), com pequenas modificações.

Os DNAs extraídos foram submetidos à eletroforese horizontal e quantificados em gel de agarose a 1%, visualizado em luz ultravioleta, a partir da comparação de concentrações crescentes de DNA *lambda* (20, 50, 100 e 200 ng/μL). Utilizou-se 5 μL de DNA, adicionando-se 2 μL de tampão de carregamento e 4 μL de água destilada e autoclavada.

A amplificação foi baseada em método descrito por Williams et al. (1990), usando dois *primers* de dez bases nucleotídicas, da marca *Operon Technologies* Inc., Alameda, CA, EUA (OPA2 e OPA3), em tubos de 0,2 ml. A amplificação se deu em um termociclador PCR Express HyBAID, sendo executados 40

ciclos de 92°C a 1 minuto (desnaturação das fitas de DNA), 36°C a 1 minuto (anelamento do *primer*), 72°C a 2 minutos (extensão e polimerização pela enzima *Taq DNA-polimerase*), seguido de um ciclo final a 72°C por 10 minutos, para a completa extensão dos produtos amplificados. Os produtos de amplificação do DNA foram separados em gel de agarose 1,5%, preparado em TAE 1X, corado com 0,5µL⁻¹ de brometo de etídio para visualização do DNA sob luz ultravioleta.

A avaliação foi realizada através da similaridade genética calculada pelo coeficiente de Jaccard (ROHLF, 1941), usando o programa NTSYS-pc 1.7.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O procedimento seguido na execução deste trabalho permitiu detectar que as extrações de DNA genômico possibilitaram a obtenção de DNA em concentrações que variaram de 10 ng/µL a 50 ng/µL.

Obteve-se um total de 17 fragmentos do tipo RAPD, com tamanhos variando de

800 a 1800 bp (pares de bases nucleotídicas), amplificados pelos dois *primers* utilizados (OPA2 e OPA3) da *Operon*, gerando 100% de polimorfismo dos 14 isolados, sendo que o OPA2 amplificou nove (9) bandas; e o OPA3, oito (8) bandas polimórficas.

As estimativas de similaridade genéticas, entre os isolados, obtidas a partir do coeficiente de Jaccard, estão presentes na Tabela 1, onde a similaridade genética média encontrada entre os isolados de *R. solani* foi de 21,71%.

Grande parte das amostras apresentou pouca ou nenhuma similaridade entre os isolados, em que a maior similaridade genética encontrada entre os isolados foi entre R7 (AG7) e R8 (AG4) com 100%. A segunda maior similaridade foi entre R5, isolado melancia, e R6, isolado puerária com 75%; enquanto A11, isolado de *Alternaria* sp., ficou completamente isolado dos demais isolados com nenhuma similaridade genética. Fato este explicado por pertencer a um gênero taxonomicamente distinto (Figura 1).

Tabela 1 - Estimativa de similaridades genéticas entre isolados de *R. solani*, baseadas em dados RAPD, pelo coeficiente de Jaccard. Embrapa Amazônia Oriental, 2007.

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14
R1	1,00													
R2	0,50	1,00												
R3	0,13	0,20	1,00											
R4	0,13	0,00	0,00	1,00										
R5	0,50	0,50	0,00	0,20	1,00									
R6	0,43	0,40	0,00	0,17	0,75	1,00								
R7	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00							
R8	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00						
R9	0,00	0,00	0,00	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00					
R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00				
R11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00			
R12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	1,00		
R13	0,13	0,00	0,00	0,50	0,20	0,40	0,00	0,00	0,17	0,00	0,00	0,00	1,00	
R14	0,20	0,29	0,29	0,00	0,13	0,25	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00	0,00	0,13	1,00

Quatro grupos foram formados por duplas, os isolados R10 (isolado citros) e R12 (isolado milho) com 50% de similaridade; R7 (isolado de *R. solani* do grupo de anastomose (AG7)) e R8 (do grupo (AG4)) com 100% de similaridade; o isolado R13 (isolado acácia) e R4 (isolado cupuaçu) com 50%; e o isolado de R3 (isolado bastão do imperador) e R14 (isolado café) com 29% de similaridade genética, conforme ilustra a Figura 1. Apenas

um grupo apresentou maior número de isolados, sendo constituído por R1 (isolado chama), R2 (isolado rúcula), R5 (isolado melancia) e R6 (isolado puerária) com 46% de similaridade. E dividiu-se em dois subgrupos, R5 (isolado melancia) e R6 (isolado puerária), com similaridade genética de 75%; e R1 (isolado chama) e R2 (isolado rúcula) com 48% de similaridade genética.

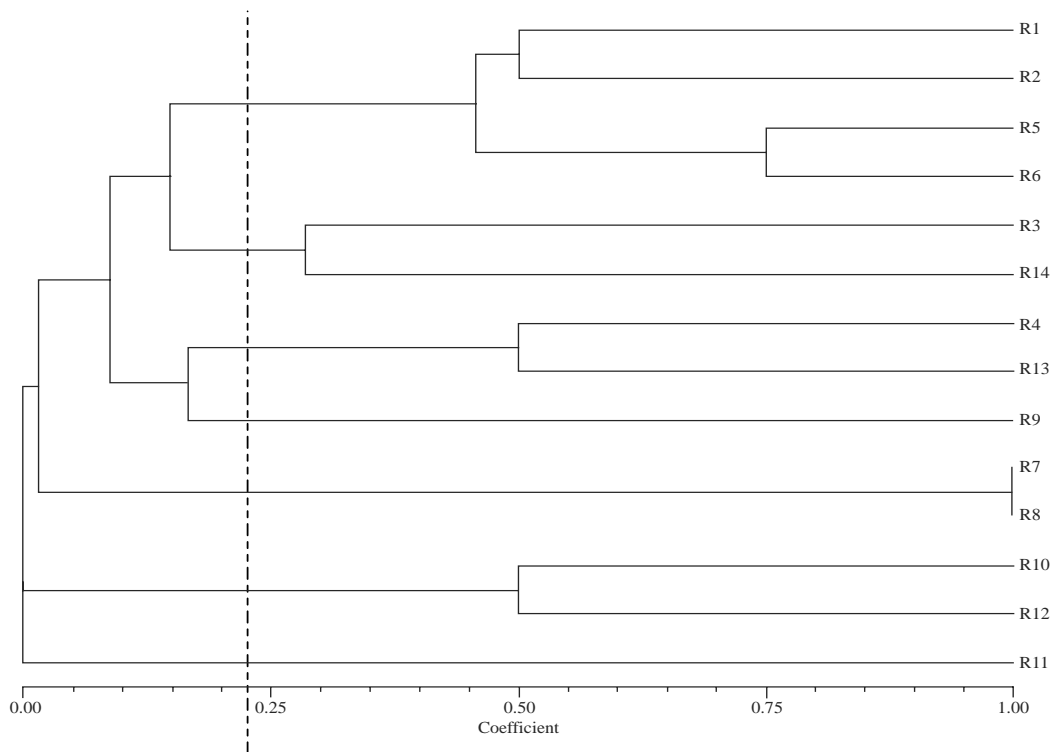


Figura 1 - Dendrograma revelando a similaridade genética entre isolados de *R. solani*, gerado pelo método de análise UPGMA para o coeficiente de Jaccard.

* A linha preta na base do dendrograma é uma linha que delimita os grupos e que ao lado esquerdo dela as espécies não são consideradas suficientemente semelhantes para serem agrupadas.

Os isolados brasileiros de *R. solani* de parte aérea (R1, R2, R3, R4, R5, R6, R9, R10, R11, R12, R13, R14) apresentaram diferença no padrão de polimorfismo, quando comparados com o isolado japonês (R8) e o isolado procedente dos Estados Unidos (R7), uma explicação para esta diferença seria o fato de o isolamento reprodutivo (origem geográfica) ser mais pronunciado entre populações de *R. solani* AG4 e AG7, que é um patógeno estritamente do solo, do que entre populações de *R. solani* brasileiras, provenientes de parte aérea foliar das culturas infectadas.

Sartorato, Nechet e Halfed - Vieira (2006), estudando 23 isolados de *R. solani*

em feijão-caupi, nos ecossistemas de mata e cerrado, através do método RAPD, observaram que os isolados coletados no cerrado são mais divergentes entre si que os isolados coletados no ecossistema de mata.

Literatura precedente também confirma haver abundante variabilidade genética na população mundial de *R. solani* do grupo de anastomose AG1 e AG4 (REYNOLDS; WENHOLD; MORRIS, 1983; VILGALYS, 1988; VILGALYS; GONZALES, 1990; LIU; DOMIER; SINCLAIR, 1993).

Desta forma, estes resultados mostram que o uso de marcadores de DNA do tipo RAPD pode ser de grande utilidade para a

identificação e diferenciação de importantes fungos fitopatogênicos, como referido nos trabalhos de Correl, Roads e Gueber (1993); Crous, Alfenas e Wingfield (1993); Sherrif et al., (1994); Sreenivasaprasad, Brown e Mills (1994); Vasconcelos et al. (1994); Sherriff et al. (1995) e Vieira (1996).

4 CONCLUSÃO

O uso da técnica RAPD permitiu determinar a variabilidade genética entre os 13 isolados de *R. solani* utilizados no presente trabalho.

De acordo com o perfil polimórfico dos isolados de *R. solani*, utilizados no presente trabalho, foi observada a formação de sete grupos genotípicos.

REFERÊNCIAS

ADAMS, G.C. *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*), a species complex of wide host range. *Advances in Plant Pathology*, London, v.6, p.535-552, 1988.

ANDERSON, N.A. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, St. Paul, v.20, p.329-344, 1982.

CARLING, E.E.; SUMMNER, D.R. *Rhizoctonia*. In: SINGLETON L.L.; MIHAIL, J.D.; RUSH, C.M. (Eds). *Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi*. Minnesota: APS Press, 1992. p.157-165.

CORREL, J. C.; RHOADS, D. D; GUEBER, J. C. Examination of mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism, DNA fingerprints and Randomly Amplified Polymorphic DNA of *Colletotrichum orbiculare*. *Phytopathology*, v.83, p. 1199-1204, 1993.

CROUS, P. W.; ALFENAS, A. C.; WINGFIELD, M. J. *Calonectria scoporia* end *Calonectria morginii* sp. Nov., and variation among isolates of their *Cylindrocladium anamorphs*. *Mycology Research*, v.6, p.701-708, 1993.

FAIRBANKS, D. J.; ANDERSEN, W. R.; MAUGHAM, P. J. *Analyses for biological resource characterization*. A laboratory manual. Provo: Brigham Young University, 1991. 27 p.

FERREIRA, M.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores RAPD em análise genética*. 3.ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

LIU, Z.L.; DOMIER, L.L.; SINCLAIR, J.B. ISG-specific ribosomal DNA polymorphism of the *Rhizoctonia solani* species complex. *Mycologia*, v. 85, p. 795-800, 1993.

MILLS, P.R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. Detection fo the antracnose pathogen *Colletotrichum*. In: SCHOTS, A.; DEWEY, F.M.; OLVER, R. (Ed.). *Modern assays for plant pathogenic fungi: identification, detection an qualication*. Wallingford: Redwood Pres, 1994. p. 183-189.

OGOSHI, A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraespecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Annual Review of Phytopathology*, v. 25, p. 125-143, 1987.

PARMETER, J. R.; WHITNEY, H. S. Taxonomy and nomenclature of the imperfect state. In: PARMETER, J.R. (Ed.). *Rhizoctonia solani*; biology and pathology. London: University of California, 1970, p.7- 19.

REYNOLDS, M.; WEINHOLD, A.R.; MORRIS, T.J. Comparison of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by acrilamide gel electrophoresis of soluble proteins. *Phytopathology*, v.73, p.903-906, 1983.

- ROHLF, F.J. *NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.80*. New York: Exeter Software, 1991.
- SARTORATO, A.; NECHET, K.L.; HALFELD-VIEIRA, B.A. Diversidade genética de isolados de *Rhizoctonia solani* coletados em feijão-caupi no estado de Roraima. *Fitopatologia Brasileira*, v.31, n.3, maio/jun., 2006.
- SHERRIFF, C.; WHELAN, M. J.; ARNOLD, G. M.; BAYLEY, J. A. rDNA sequence analysis confirms the distinction between *Colletotrichum gramilicola* and *C. sublineolum*. *Mycology Research*, v. 99, p. 475 – 478, 1995.
- _____; _____; _____; LAFAY, J. F.; BRYGOO, Y.; BAYLEY, J. A. Ribossomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. *Experimental Mycology*, v. 18, p. 121 – 138, 1994.
- SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A. E; MILLS, P. R. Coffea berry disease pathogen in Africa: genetic structure and relationship to the group species *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycology Research*, v. 8, p. 995 – 1000, 1993.
- _____; _____; _____. Nucleotide sequence of the rDNA spacer 1 enables identification of isolates of *Colletotrichum* as *c. acutatum*. *Mycology Research*, v. 98, p. 186 – 188, 1994.
- STALPERS, J.A.; ANDERSEN, T.F. A synopsis of the taxonomy of teleomorphs connected with *Rhizoctonia* S. L. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. (Ed.) *Rhizoctonia species: biology, ecology, pathology and disease control*. Dordrecht: Kluwer Academic, 1996. p. 37-47.
- VASCONCELOS, M. J. V.; MACHADO, M. A.; ALMEIDA, A. M. R.; HENNING, A. A.; BARROS, E. G.; MORREIRA, M. A. Differentiation of *Colletotrichum truncatum* isolates by Random Amplified Polymorphic DNA. *Fitopatologia Brasileira*, v. 19, p. 520 – 523, 1994.
- VIEIRA, M. G. G. C. *Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro*. 1996. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.
- VILGALYS, R. Genetic relatedness among anastomosis groups in *Rhizoctonia* as measured by DNA/DNA hybridization. *Phytopathology*, St. Paul, v.78, p.698-702, 1988.
- _____; CUBETA, M. A. Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. *Annual Review of Phytopathology*, v. 32, p.135-155, 1994.
- _____; GONZALES, D. Ribosomal DNA restriction fragment length polymorphisms in *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, v. 80, p.151-158, 1990.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, v. 18, p.6531-6535, 1990.