

# DETECÇÃO ESPECÍFICA DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* POR PCR (*Polymerase chain reaction*) COMBINADA À IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS RAÇAS EM CULTIVARES DIFERENCIADORAS

PRISCILLA AGUIAR MÖLLER<sup>1</sup>, ADRIANE WENDLAND<sup>2</sup>, MÁRCIO VINÍCIUS DE CARVALHO BARROS CORTES<sup>2</sup>, RONAIR JOSÉ PEREIRA<sup>2</sup>, MURILLO LOBO JUNIOR<sup>2</sup>, LEONARDO CUNHA MELO<sup>2</sup>, HELTON SANTOS PEREIRA<sup>2</sup>, JOAQUIM GERALDO CAPRIO DA COSTA<sup>2</sup>

**INTRODUÇÃO:** O fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop) é um patógeno de solo que se encontra amplamente distribuído em todo o território nacional, principalmente em áreas irrigadas sob pivô central devido ao cultivo sucessivo do feijoeiro comum. Este patógeno é o agente causal da murcha de fusarium, uma doença que tem crescido nos cultivos de feijão por todo o país. Em 1979 Ribeiro e Hagedorn propuseram a classificação de isolados de Fop em raças. Nascimento et al. (1995) relataram a existência apenas da raça 2 ou brasileira no país. No entanto em 1997, Ito et al. relatou a existência de quatro raças fisiológicas diferentes no Brasil, revelando a variabilidade de Fop. A técnica de PCR (*Polymerase chain reaction*) foi utilizada por Alves-Santos et al. (2002a), com base em *primers* específicos para Fop, para determinar a patogenicidade de isolados. O trabalho revelou que a técnica é precisa na determinação dos isolados patogênicos. O objetivo do presente trabalho foi combinar a técnica de PCR utilizando *primers* específicos para Fop à inoculação dos respectivos isolados em cultivares diferenciadoras, na determinação de existência de novas raças de Fop.

**MATERIAL E MÉTODOS:** O experimento constituiu-se da inoculação de seis isolados de Fop provenientes de isolamentos de plantas coletadas no Paraná e Goiás (Tabela 1), em cultivares diferenciadoras propostas por Alves-Santos et al. (2002b): A 211, BAT 477, Diacol Calima, IPA 1 e HFS-465-63-1. A inoculação foi realizada em plântulas com sete dias após a emergência pelo corte das raízes aproximadamente em 1 cm abaixo do colo da planta, seguida de imersão na suspensão de conídios (10<sup>6</sup> conídios/ml) por 5 minutos. A inoculação e avaliação foram realizadas sob condições de casa de vegetação. A avaliação ocorreu 21 dias após a inoculação utilizando-se uma escala de notas de severidade da doença proposta pelo CIAT e descrita por Schoonhoven e Pastor-Corrales (1987).

**Tabela 1.** Relação de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* com as respectivas regiões de origem e cultivares.

	ISOLADOS					
	Fop 02	Fop 42	Fop 45	Fop 46	Fop 48	Fop 51
Origem	Rio Verde/GO	Santo Antônio de Goiás/GO	Tibajit-PR	Belém de São Francisco/ PE	Foz do Jordão-PR	Santo Antônio de Goiás/GO
Cultivar	Supremo	CV 3	IAC Alvorada	não consta	Uirapuru	Horizonte

Comparou-se a expressão de resistência/susceptibilidade das cultivares diferenciadoras inoculadas, com base na sua reação pré-determinada às raças de Fop (Tabela 2). No laboratório de fitopatologia da Embrapa Arroz e Feijão fez-se a extração do DNA de todos os isolados, conforme metodologia proposta por Doyle e Doyle (1987). Para a extração de DNA, os isolados foram anteriormente cultivados em meio líquido de levedura por 10 dias em mesa agitadora a 118 rpm, seguido da filtração dos isolados à vácuo e posterior liofilização para proceder às etapas de extração de DNA previstas no protocolo. O DNA dos isolados foi utilizado na detecção pela reação de PCR com *primers* específicos de Fop: B310 e A280, segundo Alves-Santos et al. (2002a). A reação foi realizada em termociclador. Para a visualização dos fragmentos amplificados, as amostras foram resolvidas em gel de agarose a

<sup>1</sup>Graduação, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Estagiária Bolsista, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, primoller\_agronomia@hotmail.com

<sup>2</sup>Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, adrianew@cnpaf.embrapa.br

2% e reveladas em solução de brometo de etídio pela técnica da eletroforese. Na inoculação e na reação de PCR, o isolado Fop 46 foi utilizado como controle positivo de patogenicidade.

**Tabela 2.** Classificação de raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* com base em cultivares diferenciadoras propostas por Alves-Santos et al. (2002b).

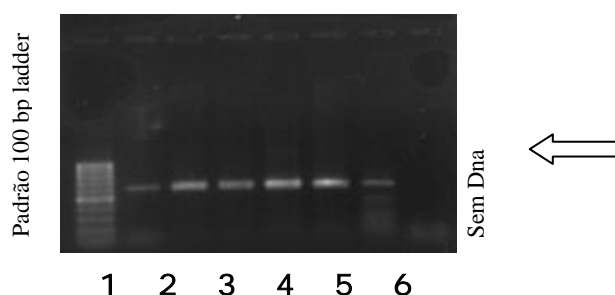
Cultivar	raça 1	raça 2	raça 3	raça 4	raça 5	raça 6	raça 7
A 211	S	S	R	S	S	S	R
BAT 477	S	R	R	S	S	S	S
DIACOL CALIMA	R	R	S	S	R	S	S
IPA 1	R	S	R	S	S	S	S
HFS-465-63-1	R	R	R	R	R	S	R

**RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Através da avaliação das inoculações nas cultivares diferenciadoras, os isolados foram classificados em raça 2 (Fop 45 e Fop 46); raça 3 (Fop 48) e raça 6 (isolados Fop 42 e Fop 51). O isolado Fop 02 não manifestou sintomas nas diferenciadoras avaliadas, sendo classificado como raça não definida. Os resultados estão discriminados na Tabela 3. A amplificação dos isolados por PCR revelou que os isolados Fop 02, Fop 42, Fop 45, Fop 46, Fop 48 e Fop 51 são patogênicos uma vez que o fragmento de DNA apresentou banda específica de 609 bp. (Figura 1). O resultado da PCR confirma a patogenicidade dos isolados Fop 42, Fop 45, Fop 46, Fop 48 e Fop 51, que foram anteriormente discriminados pelas cultivares diferenciadoras. No entanto o isolado Fop 02, que não manifestou sintomas nas cultivares diferenciadoras, foi confirmado como patogênico pela técnica de PCR, o que revela a existência de novas raças do patógeno que não estão sendo detectadas pelas cultivares diferenciadoras existentes atualmente.

**Tabela 3.** Determinação de raças de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* a partir da inoculação em cultivares diferenciadoras propostas por Alves-Santos et al. (2002b).

Cultivares	ISOLADOS					
	Fop 02	Fop 42	Fop 45	Fop 46	Fop 48	Fop 51
A 211	R	S	S	S	R	S
Bat 477	R	S	R	R	R	S
Diacol Calima	R	S	R	R	S	S
Ipa 1	R	S	S	S	R	S
HFS-465-63-1	R	S	R	R	R	S
<b>RAÇA</b>	<b>ND*</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>6</b>

\*ND: raça não definida



**Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pelos *primers* específicos de Fop: B310 e A280. Os números de 1 a 6 correspondem respectivamente aos isolados Fop 48, Fop 46, Fop 45, Fop 42, Fop 51 e Fop 02. A seta indica as bandas amplificadas a 609 pb, demonstrando a patogenicidade dos isolados.

Os resultados endossam que há outras raças do patógeno presentes no território nacional além da raça 2, o que também foi relatado por Ito et al. (1997) e por Henrique et al. (2011). Também revelaram a existência de novas raças do patógeno ainda não identificadas, as quais as cultivares diferenciadoras atualmente utilizadas não são capazes de identificar. Uma vez que ainda não se tem cultivares diferenciadoras capazes de identificar as novas raças (principalmente isolados que não manifestam sintomas nessas plantas), a técnica de PCR é capaz de comprovar a sua patogenicidade, uma vez que a técnica é específica para isolados patogênicos (ALVES-SANTOS et al., 2002a). Estudos mais aprofundados serão conduzidos para a discriminação das novas raças existentes. As cultivares diferenciadoras utilizadas isoladamente não são capazes de discriminar totalmente a variabilidade de raças existentes, sobretudo as raças novas, ainda não identificadas. O uso combinado das diferenciadoras com a técnica de PCR se mostra essencial na identificação de novas raças ainda não identificadas.

**CONCLUSÃO:** Foram encontradas duas raças de Fop (raça 3 e raça 6) além da já relatada raça 2, revelando a variabilidade de raças de Fop presente no Brasil. A patogenicidade dos isolados enquadrados nessas raças foi confirmada pela PCR. O isolado Fop 02 não manifestou sintomas nas cultivares diferenciadoras inoculadas, resultando em uma nova raça não definida e patogênica devido a sua amplificação por PCR.

## REFERÊNCIAS

- ALVES-SANTOS, F. M.; RAMOS, B.; GÁRCIA-SANCHEZ, M. A.; ESLAVA, A.P.; DÍAZ-MÍNGUEZ, J. M. A DNA-Based Procedure for In Planta Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Phytopathology**, vol. 92, n. 03, p. 237-244, 2002a.
- ALVES-SANTOS, F. M.; CORDEIRO-RODRIGUES, L.; SAYAGUÉS, J. M.; MARTÍN-DOMINGUEZ, R.; GARCÍA-BENAVIDES, P.; DÍAZ-MÍNGUEZ, J. M.; ESLAVA, A. P. Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. **Plant Pathology**, vol. 51, p. 605-611, 2002b.
- DOYLE, J. J. T. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, vol. 12, p:13-15, 1987.
- HENRIQUE, F. H; CARBONELL, S. A. M. ; ITO, M. F.; GONÇALVES, J. G. R.; PERINA, E. F.; LOPES, R. L. T.; CHIORATO, A. F. Classificação e Caracterização de Raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em feijoeiro comum. 6º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, CD-ROM Búzios-RJ, 2011. **Anais...**
- ITO, M. F.; CARBONELL, S. A. M.; POMPEU, A. S.; RAVAGNANI, S.; LOT, R. C.; RODRIGUES, L. C. N. Variabilidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, supl., p. 270-271, 1997.
- NASCIMENTO, S. R. C.; KUROZAWA, C.; MARINGONI, A. C. Avaliação de raças fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira** v. 20, n. 2, p. 214-217, 1995.

RIBEIRO, R. L. D.; HAGEDORN, D. J. Screening for resistance to and pathogenic specialization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* the causal agent of the bean yellows. **Phytopathology**, Ithaca, v. 69, n. 3, p. 272-276, 1979.

SCHOONHOVEN, A.; PASTOR-CORRALES, M. A. **Sistema Éstandar para La Evaluación de Germoplasma de Frijol**. Editora CIAT, Cali, p. 7-8, p. 22, p. 42, 1987.