

Estudo da diversidade genética de isolados de *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei

KAJIWARA, T.H.¹; OLIVEIRA, R.R.²; VIDA, J.B.²; PEREIRA, R.M.³; BINNECK, E.⁴; MARIN, S.R.R.⁴; VIEIRA, N.D.⁴; SEIXAS, C. D. S.⁴; ALMEIDA, A.M.R.⁴ ¹Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP; ²Universidade Estadual de Maringá – UEM; ³Bolsista do CNPq; ⁴Embrapa Soja, Caixa Postal, 231, 86001-970, Londrina, Paraná.
e-mail: amra@cnpso.embrapa.br

Introdução

O fungo *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei foi identificado pela primeira vez no Brasil em Tarumã-SP causando necroses foliares em soja [*Glycine max* (L.) Merr.] (ALMEIDA, 1976). Esse fitopatógeno é considerado cosmopolita e inespecífico, podendo estar associado com mais de 70 espécies de plantas em países tropicais e subtropicais (SILVA *et al.*, 1995; CUTRIM & SILVA, 2003). Os principais sintomas causados por esse fungo são manchas foliares caracterizadas por lesões pardas e anéis concêntricos de coloração mais escura, de onde vem o nome mancha alvo (ALMEIDA *et al.*, 2005). Em soja, além da mancha alvo, *C. cassiicola* pode estar associado a manchas na haste e nas vagens e podridão radicular.

Um dos métodos recomendados para controlar doenças na cultura da soja é o uso de cultivares resistentes. Entretanto, é essencial o conhecimento da variabilidade do patógeno para o desenvolvimento de cultivares com resistência aumentada contra todos os patógenos (SILVA, 2003). A partir da diferenciação morfológica entre isolados é difícil obter comparações significativas, fazendo-se necessário a caracterização molecular.

Este trabalho teve por objetivo verificar a diversidade genética entre os isolados de *C. cassiicola* através de análises do DNA ribossomal (ITS1-5.8S-ITS2) e β -tubulina, sequenciando essas regiões para a construção de árvores filogenéticas.

Material e Métodos

Para a realização desse trabalho foram utilizados quarenta e seis isolados de *C. cassiicola*, obtidos de diversas espécies botânicas, coletadas em diferentes regiões do Brasil e do Japão (Tabela 1). Foram preparadas culturas monospóricas de todos os isolados e uma cultura monospórica de cada isolado foi cultivado em meio BDA (batata-dextrose-agar), contendo estreptomomicina e transferidos para meio líquido BD (batata-dextrose). Depois de incubados a 37°C, por aproximadamente 15 dias, efetuou-se a extração do DNA.

O DNA genômico foi utilizado para amplificar a região ribossômica envolvendo o ITS1-5.8S-ITS2 (Internal Transcribe Spacer), utilizando-se os iniciadores ITS 1F e ITS 4R (White *et al.*, 1990), e a região do gene β -tubulina, utilizando os iniciadores β -tub 2a e β -tub 2b (GLASS & DONALDSON, 1995), através da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

Foram escolhidos, aleatoriamente, oito isolados da região ITS e nove isolados para a região do gene β -tubulina para o sequenciamento. Os fragmentos amplificados foram purificados, inseridos

no vetor e clonados em células bacterianas eletrocompetentes para a obtenção de material necessário para o sequenciamento.

As seqüências obtidas foram submetidas a uma busca por similaridades em bancos de seqüências de nucleotídeos do *GeneBank* através do programa BLAST, as quais foram utilizadas na construção das árvores filogenéticas através do software MEGA 4.

Tabela 1. Relação dos isolados de *Corynespora cassiicola*.

Isolado	Local da coleta	Planta Hospedeira
631.1 e 631.2	São Luiz-MA	<i>Commelina benghalensis</i>
492.1 e 492.2	Japão	<i>Cucumis sativus</i>
636.1 e 636.2	São Luiz-MA	<i>Lycopersicon esculentum</i>
761.1 e 761.2	Viçosa-MG	<i>Lantana camara</i>
775.1 e 775.2	Maringá-PR	<i>Cucumis sativus</i>
786.1 e 786.2	Sertãoópolis-PR	<i>Glycine max</i>
628.1 e 628.2	São Luiz-MA	<i>Lycopersicon esculentum</i>
774.1 e 774.2	Maringá-PR	<i>Cucumis sativus</i>
493.1 e 493.2	Japão	<i>Cucumis sativus</i>
14.1 e 14.2	Manaus	<i>Hevea brasiliensis</i>
10.1 e 10.2	Manaus	<i>Carica papaya</i>
605.1 e 605.2	Sorriso-MT	<i>Glycine max</i>
12.1 e 12.2	Campo Mourão-PR	<i>Glycine max</i>
rwb 321.1 e 321.2	Viçosa-MG	<i>Coleus barbatus</i>
05.1 e 05.2	Guarapuava-PR	<i>Glycine max</i>
jls 23.1 e jls 23.2	Viçosa-MG	<i>Rubecchia sp.</i>
625.1	São Luiz-MA	<i>Carica papaya</i>
630.1	São Luiz-MA	<i>Hydrangea macrophylla</i>
624.1	São Luiz-MA	<i>Carica papaya</i>
627.1 e 627.2	São Luiz-MA	<i>Carica papaya</i>
04.1	Campo Mourão-PR	<i>Glycine max</i>
11.1 e 11.2	Sarandi-PR	<i>Glycine max</i>
607.1 e 607.2	Sorriso-MT	<i>Glycine max</i>
491	Japão	<i>Perilla sp.</i>
3	Manaus	<i>Lycopersicon esculentum</i>
777	Maringá-PR	<i>Cucumis sativus</i>
51/96	Ponta Grossa-PR	

Resultados e Discussão

A região amplificada do DNA ribossomal que corresponde às regiões internas transcritas (ITS), onde se localizam os genes 18S, 5.8S e 28S, e o gene β -tubulina, produziram fragmentos de aproximadamente 600pb e 500pb, respectivamente.

As regiões espaçadoras ITS são as mais seqüenciadas entre as espécies de fungos e servem para caracterizar esses microrganismos ao nível de espécie devido ao alto grau de variação dentro do RNA ribossomal (GARDES & BRUNS, 1993).

Os resultados do sequenciamento da região ITS e do gene β -tubulina permitiram a construção de árvores filogenéticas. Com relação a árvore obtida com as seqüências de ITS (Figura 1) pode-se deduzir que há grande diferença entre o isolado 51/96 em relação aos demais isolados. Na árvore de β -tubulina (Figura 2), os isolados tenderam a formar três grupos com a presença dos isolados de soja em um mesmo grupo.

Estes resultados mostram uma diferenciação molecular entre os isolados que podem ser úteis à área de melhoramento genético da Embrapa Soja.

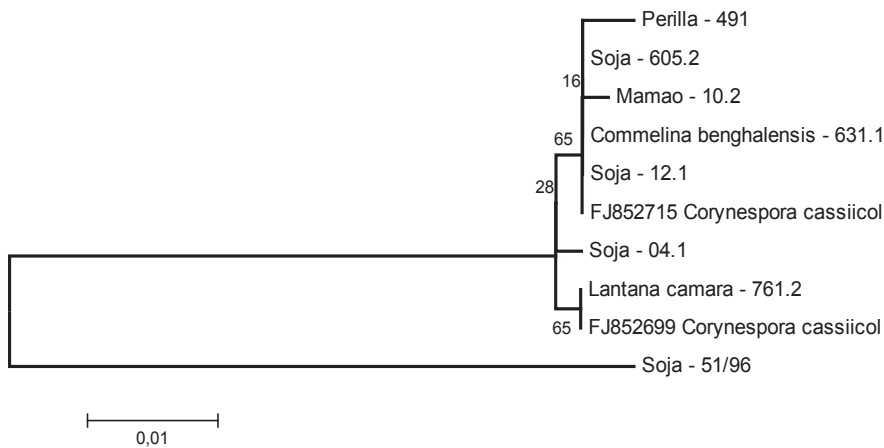


Fig. 1. Árvore filogenética construída com base na análise das sequências de DNAr ITS1 e ITS2 e do alinhamento com sequências do *GeneBank*. Os valores nos nós representam a análise de bootstrap.

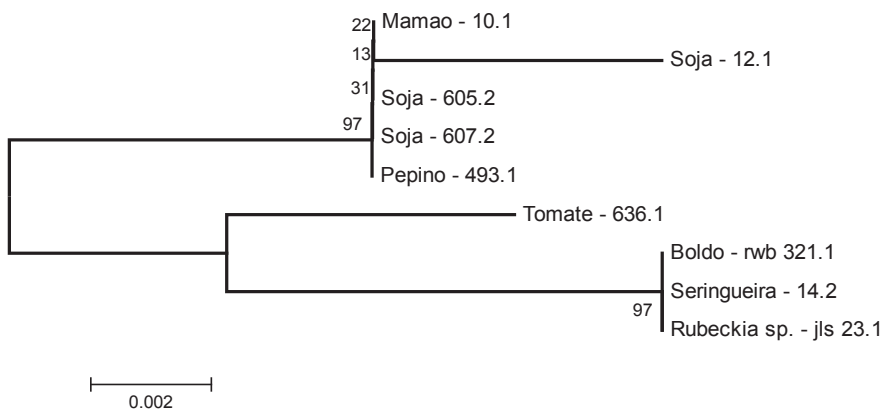


Fig. 2. Árvore filogenética construída com base na análise das sequências do gene β -tubulina.

Conclusões

Foi constatada variabilidade genética entre os isolados de *C. cassiicola* através do seqüenciamento da região espaçadora interna transcrita (ITS) e da β -tubulina.

Referências

- ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F.V.; HENNING, A.A.; GODOY, C.V.; CONSTAMILAN, L.M.; MEYER, M.C. Doenças da Soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**, 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 569-577.
- ALMEIDA, A.M.R.; MACHADO, C.C.; FERREIRA, L.P.; LEHMAN, O.S.; ANTONIO, H. Ocorrência de *Corynespora cassicola* no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 1, p.111-112, jun., 1976.
- CUTRIM, F.A.; SILVA, G.S. Patogenicidade de *Corynespora cassicola* a diferentes espécies de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.2, p.193-194, 2003.
- GARDES, M.; BRUNS, T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhiza and rusts. **Molecular Ecology**, v.2, p.113-118, 1993.
- GLASS, N.L.; DONALDSON, G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323-1330, 1995.

SILVA, W.P.K.; KARUNANAYANE, E.H.; WIJESUNDERA, R.L.C.; PRIYANKA, U.M.S. Genetic variation in *Corynespora cassiicola*: a possible relationship between host origin and virulence. **Mycological Research**, v.107, n.5, p.567-571, 2003.

SILVA, W.P.K.; MULTANI, D.S.; DEVERALL, B.J.; LYON, B.R. RFLP and RAPD analyses in the identification and differentiation of isolates of the leaf spot fungus *Corynespora cassiicola*. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v.43, n.3, p.609-618, 1995.

WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S.; TAYLOR, J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKEY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.) **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p.315-322.