

**ANA KARINA RODRIGUES ABADIO**

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE  
*Phaeoisariopsis griseola* POR MEIO DE MARCADORES  
MOLECULARES**

**Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.**

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2007**

**ANA KARINA RODRIGUES ABADIO**

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE  
*Phaeoisariopsis griseola* POR MEIO DE MARCADORES  
MOLECULARES**

**Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.**

**APROVADA: 15 de agosto de 2007.**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Elza Fernandes de Araújo  
(Co-orientadora)**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Tânia Maria Fernandes Salomão  
(Co-orientadora)**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Denise Mara Soares Bazzolli**

---

**Prof. Olinto Liparini Pereira**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Marisa Vieira de Queiroz  
(Orientadora)**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me proporcionou vencer mais esta etapa da minha vida.

Aos meus pais, Abel e Luiza, pelo apoio e pela ajuda em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Luciano, Leandro e Gabriela, à minha prima Letícia e a todos os meus familiares, pelo apoio e incentivo.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia da UFV, pela oportunidade de realizar este curso de Mestrado.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO-Viçosa-UFV), pelo espaço cedido em seus laboratórios para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa de estudos.

À professora Marisa Vieira de Queiroz, pela competente orientação, pela confiança e pelo apoio durante toda a realização desse trabalho.

Às professoras conselheiras, Elza Fernandes de Araújo e Tânia Maria Fernandes Salomão, pelas sugestões e pela disponibilidade durante todo o desenvolvimento desse trabalho.

Ao pesquisador Aloísio Sartorato e ao Professor Everaldo Gonçalves de Barros, por terem cedido os isolados de *Phaeoisariopsis griseola* utilizados nesse trabalho.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, pelos conhecimentos transmitidos durante o curso.

Aos funcionários da UFV, principalmente do BIOAGRO e da secretaria do Departamento de Microbiologia, pelo auxílio.

Ao pesquisador Luiz Carlos Bhering Nasser, pela orientação, amizade e incentivo durante minha Iniciação Científica.

Aos amigos de Brasília, em especial ao Clayton, ao Ricardo e à Luciana, pela amizade e pelo constante incentivo.

À amiga Adriana, pela amizade incondicional mesmo estando longe.

À amiga Aline, pela grande amizade e por ter participado de todos os momentos enquanto estive em Viçosa.

Às amigas-irmãs de República, Susan, Lílian, Larissa, Mariane e Lorena, por tornarem nossa vida em Viçosa muito mais feliz e agradável.

Às amigas Nádia e Ludmila, pelos momentos divertidos que tivemos.

À amiga Patrícia, pelas boas risadas nesses dois anos.

Às amigas Darlene e Irene, pela atenção e pela ajuda na condução dos trabalhos.

Ao amigo Rafael, pelo auxílio na bioinformática.

Aos amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos Guilherme, Daniel, Maycon, Tatiana, Swiany, Mariana, Leandro, Leonardo e Natália, pela ajuda e por tornarem o ambiente de trabalho mais agradável.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biologia Geral, pela contribuição na realização da técnica de ISSR.

A todos os amigos e colegas do Departamento de Microbiologia, pela convivência agradável.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão desse objetivo.

## **BIOGRAFIA**

Ana Karina Rodrigues Abadio, filha de Abel Abadio e Luiza Maria Rodrigues Abadio, nasceu em Brasília, DF.

Em 2001, iniciou o Curso de Ciências Biológicas na Universidade de Brasília, e graduou-se em março de 2005.

Foi bolsista de iniciação científica de agosto de 2002 a julho de 2004.

Em agosto de 2005, iniciou o Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, defendendo dissertação em 15 de agosto de 2007.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1. Microrganismos e condições de cultivo.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2. Extração de DNA total.....</b>	<b>11</b>
<b>2.3. Análise da região ITS do rDNA.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3.1. Condições de amplificação e eletroforese.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3.2. Análise por RFLP.....</b>	<b>13</b>
<b>2.4. Amplificação de seqüências ERIC, BOX e ISSR.....</b>	<b>13</b>
<b>2.4.1. Condições de amplificação e eletroforese.....</b>	<b>13</b>
<b>2.4.2. Análise dos dados.....</b>	<b>15</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>33</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>34</b>

## RESUMO

ABADIO, Ana Karina Rodrigues, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2007. **Análise da diversidade genética de isolados de *Phaeoisariopsis griseola* por meio de marcadores moleculares.** Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Co-orientadoras: Elza Fernandes de Araújo e Tânia Maria Fernandes Salomão.

A mancha-angular, causada pelo fungo *Phaeoisariopsis griseola*, também conhecido como *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun, é uma das doenças mais importantes que ocorre no feijoeiro, causando sérios prejuízos na produção. A forma mais econômica de controle dessa doença é a utilização de cultivares resistentes. Entretanto, estudos relacionados à diversidade genética de *P. griseola* têm demonstrado grande variabilidade genética nesse fungo, o que tem dificultado a obtenção dessas cultivares. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi verificar se as técnicas ERIC-PCR, BOX-PCR, ISSR-PCR e PCR-RFLP da região ITS do rDNA são apropriadas para a detecção de polimorfismos genéticos que permitam estimar a diversidade genética de isolados de *P. griseola* provenientes dos estados de Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo e Paraná. O DNA total de 29 isolados de *P. griseola* foi extraído e, posteriormente, utilizado para amplificação de seqüências ERIC, BOX, ISSR e ITS utilizando oligonucleotídeos específicos. As clivagens da região ITS com as enzimas de restrição *AluI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HpaI*, *MboI*, *MspI* e *RsaI* produziram perfis de restrição idênticos para todos os isolados, e, portanto, a seqüência ITS nas

condições empregadas não forneceu marcadores que pudessem diferenciar os isolados de *P. griseola*. Por meio da análise de agrupamento dos resultados obtidos pelas técnicas BOX-PCR, ERIC-PCR e ISSR-PCR, foram detectados 2, 5 e 28 genótipos, respectivamente, entre os isolados estudados. Os resultados obtidos mostraram que as técnicas BOX-PCR e ERIC-PCR foram menos eficientes na detecção de polimorfismo genético entre os isolados de *P. griseola*. Os melhores resultados foram obtidos com o emprego da técnica ISSR-PCR, que mostrou grande capacidade de detecção de marcadores polimórficos entre os isolados. A diversidade genética estimada poderá auxiliar no desenvolvimento de estratégias adequadas para a obtenção de variedades de feijoeiro resistentes a esse fungo.

## ABSTRACT

ABADIO, Ana Karina Rodrigues, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2007. **Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* isolates revealed by molecular markers.** Adviser: Marisa Vieira de Queiroz. Co-Advisers: Elza Fernandes de Araújo and Tânia Maria Fernandes Salomão.

The angular leaf spot, caused by *Phaeoisariopsis griseola*, also known as *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun, is one of the most important diseases in the bean plant, causing serious damages to the production. The most efficient cost strategy for the management of plant diseases is the use of resistant cultivars. However, studies related to the genetic diversity of *P. griseola* have been demonstrating great genetic variability in this fungus, what has been hardening the achievement of those cultivars. Therefore, the aim of this work was to verify if the techniques of ERIC-PCR, BOX-PCR, ISSR-PCR and PCR-RFLP of the rDNA ITS region are able to detect the genetic diversity of the *P. griseola* isolates from Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo and Paraná states. The total DNA of the 29 *P. griseola* isolates were extracted and, later, amplified using specific primers for ERIC, BOX, ISSR and ITS sequences. The cleavages of the ITS region with the restriction enzymes *AluI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HpaI*, *MboI*, *MspI* e *RsaI* produced identical restriction profiles for all the isolates, and, therefore, the ITS sequence under used conditions supply markers that could differ the isolates of *P. griseola*. Through the grouping analysis of the results obtained

by the BOX-PCR, ERIC-PCR and ISSR-PCR techniques, 2, 5, and 28 genotypes were revealed, respectively, among the isolates studied. Those results showed that BOX-PCR and ERIC-PCR techniques were less efficient to detect the genetic variability of *P. griseola* isolates. The best results were obtained using the ISSR-PCR technique, revealing high capacity in the polymorphism detection among the isolates. The genetic diversity observed can help in the development of appropriate strategies to obtain resistant bean plant varieties to this fungus.

## 1. INTRODUÇÃO

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos mais importantes constituintes da dieta da população brasileira, por ser reconhecidamente uma excelente fonte protéica, além de possuir bom conteúdo de carboidratos e de ser rico em ferro. O Brasil é o maior produtor mundial de feijão-comum, e Minas Gerais é o segundo maior Estado produtor, respondendo por aproximadamente 15% da produção nacional (VIEIRA et al., 2006).

Além da sua relevância na dieta do brasileiro, o feijão é um dos produtos agrícolas de maior importância econômico-social, em razão de ser cultivado em várias áreas e da mão-de-obra empregada durante o ciclo da cultura. Estima-se que no cultivo do feijão sejam utilizados cerca de 7 milhões de homens/dia-ciclo de produção, envolvendo aproximadamente 295.000 produtores apenas em Minas Gerais. Esta leguminosa é cultivada em todas as regiões desse estado, com os mais variados níveis tecnológicos e sistemas de produção (VIEIRA et al., 2006).

A maioria do feijão consumido ainda é produzida por pequenos agricultores com poucos recursos tecnológicos e que, frequentemente, consorciavam essa leguminosa com outras culturas, sobretudo o milho. Esses agricultores geralmente não controlam pragas e doenças (VIEIRA et al., 2006).

Por ser cultivada durante todo o ano numa grande diversidade de ambientes, essa leguminosa é afetada por várias doenças. Muitas destas podem causar, dependendo das condições climáticas, redução significativa

na produção ou mesmo inviabilizar determinadas áreas para o cultivo. Dentre as doenças mais importantes do feijoeiro, a mancha-angular, causada pelo fungo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, tem sido apontada como a principal doença da parte aérea da planta e encontra-se distribuída em todas as regiões do mundo onde essa leguminosa é cultivada, causando sérios prejuízos (VIEIRA et al., 2006). Até o final da década de 1980, a mancha-angular era reconhecida como doença de pequena importância econômica (VIEIRA, 1964; OLIVEIRA et al., 1980; GOULART, 1988). Estimativas de perda na produção causada pela mancha-angular atingem 70% no Brasil, dependendo das condições ambientais e da suscetibilidade das cultivares (RAVA et al., 1985; SARTORATO & RAVA, 1992). As perdas são maiores quanto mais precoce for o aparecimento da doença (OLIVEIRA et al., 2004).

*Phaeoisariopsis griseola* é um fungo mitospórico, pertencente ao grupo dos cercosporóides (BRAUN, 1995). Com base em dados morfológicos e de filogenia molecular, *Phaeoisariopsis* é considerado gênero anamórfico de *Mycosphaerella* (CROUS et al., 2001). O fungo foi descoberto primeiramente por Saccardo na Itália e foi nomeado *Isariopsis griseola* Sacc. (SACCARDO, 1878). Posteriormente, FERRARIS (1909) propôs uma nova combinação incluindo-o no gênero *Phaeoisariopsis* e recentemente, com base em estudos de morfologia e de filogenia molecular, CROUS et al. (2006) propuseram *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun como o novo nome a ser conferido ao agente etiológico da mancha-angular do feijoeiro. Entretanto, por esse trabalho ser muito recente e por toda complexidade envolvida no processo de alteração de nomenclatura, será usado o nome *Phaeoisariopsis griseola*.

A mancha-angular pode afetar toda a parte aérea da planta, podendo causar a queda prematura das folhas com conseqüente redução na produção. Além disso, o ataque às vagens pode levar à infestação ou infecção das sementes a serem utilizadas no próximo plantio. Os esporos do fungo são disseminados pela chuva, por partículas de solo infestadas, pelas sementes (com baixa taxa de transmissão) e, principalmente, pelas correntes de ar (SARTORATO, 2005).

O processo de infecção ocorre a partir da germinação do conídio na superfície inferior da folha do feijoeiro, onde um tubo germinativo se estende e forma uma estrutura semelhante a um apressório nas junções das células epidérmicas e também sobre os estômatos. Ocorre assim a penetração do fungo através do estômato. Após a penetração na folha, as hifas crescem intercelularmente e ocorre a produção e liberação de toxinas pelo patógeno, causando danos celulares. Os sintomas iniciais da doença nas folhas são pequenas lesões de cor cinza e com um formato angular. As lesões coalescem, tornam-se amarronzadas e causam o amarelecimento das folhas, que caem prematuramente. Lesões podem também aparecer nas vagens e nos caules (MONDA et al., 2001).

Para o controle da doença, as principais medidas recomendadas são: boas práticas culturais, incluindo rotação de culturas, época adequada de semeadura, uso de sementes sadias e remoção de restos culturais; controle químico; e o uso de variedades resistentes. A utilização de variedades resistentes é apresentada como a forma mais econômica de controle da doença (SARTORATO et al., 1996). Entretanto, a alta variabilidade do patógeno torna difícil encontrar cultivares de feijoeiro com resistência ampla e duradoura a esta doença (SARTORATO et al., 1991; SARTORATO & RAVA, 1992; FALEIRO et al., 2001). Devido à variabilidade de *P. griseola*, cultivares que se comportam como resistentes em determinadas regiões apresentam-se como suscetíveis em outras (OLIVEIRA et al., 2004). Assim, estudos freqüentes da variabilidade genética do patógeno, bem como de sua distribuição geográfica e a determinação de fontes com adequado nível de resistência, são pontos-chave em programas de melhoramento visando resistência a esta doença (OLIVEIRA et al., 2004).

A correta identificação e classificação de microrganismos são de extrema importância prática não só no aspecto clínico, mas também fitopatológico, biotecnológico e ambiental. Os métodos utilizados na discriminação de gêneros, espécies e estirpes de microrganismos podem ser divididos em métodos fenotípicos e genotípicos. Os métodos fenotípicos baseiam-se em fenômenos bioquímicos e fisiológicos, enquanto os métodos genotípicos detectam polimorfismo em nível dos ácidos nucléicos, ou variação alélica em nível de enzimas. A tipagem de microrganismos, isto é, a

capacidade de identificá-los ao nível da espécie e de discriminar entre indivíduos da mesma espécie, sofreu grandes avanços nos últimos anos, tendo sido concretizada por uma série de novos métodos que fazem uso da grande variação encontrada no DNA destes microrganismos. O entendimento dessa variabilidade é crucial para o desenvolvimento de estratégias adequadas para a obtenção de variedades resistentes (PYNDJI, 1993).

A diversidade genética de *P. griseola* foi inicialmente avaliada por ALVAREZ-AYALA e SCHWARTZ (1979), por meio da inoculação de esporos dos isolados em cultivares de feijoeiro resistentes e suscetíveis. BURUCHARA (1983), na Colômbia, utilizou seis variedades diferenciadoras de feijoeiro e 21 isolados de *P. griseola*, classificando-os em cinco raças. Em 1987, CORREA-VICTORIA avaliou 55 isolados de *P. griseola* provenientes dos EUA, de países da América Latina e da África por meio de análises isoenzimáticas. Os isolados foram divididos em dois grupos, os africanos e os dos EUA e da América Latina.

SARTORATO et al. (1991) inocularam esporos de 24 isolados de *P. griseola* em 15 cultivares, observando que esses isolados interagem diferentemente com os cultivares do hospedeiro. Esses resultados indicaram uma variabilidade patogênica entre os isolados.

Com o advento das técnicas modernas de biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente em nível de DNA. Inicialmente, a utilização de enzimas de restrição permitiu a análise de comprimento de fragmentos de restrição de DNA. O polimorfismo de seqüências é o resultado de pequenas diferenças na seqüência de DNA, usualmente alterações únicas de pares de bases, encontradas nos diferentes organismos. Algumas das alterações de seqüência afetam os sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição, resultando numa variação do tamanho de certos fragmentos do DNA produzidos pela digestão com uma enzima de restrição particular. Estas diferenças de tamanho são referidas como polimorfismos do comprimento dos fragmentos de DNA de restrição (RFLPs). O desenvolvimento do processo de amplificação em cadeia utilizando uma DNA polimerase (PCR) levou à descrição de outras técnicas moleculares, como as análises de

polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

PASTOR-CORRALES e JARA (1995) estimaram a diversidade genética de *P. griseola* e sua co-evolução com o feijoeiro na América Latina por meio de variedades diferenciadoras e marcadores moleculares RAPD. Eles confirmaram a diversidade de *P. griseola* e a separação dos fenótipos de virulência em dois grupos: Andino, que infecta somente os cultivares de origem andina e Mesoamericano, que infecta tanto cultivares Andinos quanto Mesoamericanos.

Estudos relacionados à classificação de isolados em raças por meio de variedades diferenciadoras e à caracterização por meio da técnica de RAPD têm demonstrado grande diversidade em *P. griseola* (NIETSCHE et al., 2001; MAHUKU et al., 2002; NIETSCHE et al., 2002; SARTORATO 2004; STENGLEIN & BALATTI, 2006).

O desenvolvimento de técnicas moleculares de tipagem de microrganismos abriu novas possibilidades nos campos da classificação, identificação e diagnóstico. Qualquer método de tipagem genética deve permitir a diferenciação clara de estirpes e, principalmente, deve ter uma elevada reprodutibilidade. Nem todos os métodos moleculares de tipagem são igualmente eficazes, diferindo na capacidade discriminatória em diferentes níveis taxonômicos. Dessa forma, a escolha do método a ser aplicado deve ser feita de acordo com a finalidade pretendida, por exemplo, identificação, diferenciação, reprodutibilidade, poder discriminatório e custos envolvidos. Em decorrência de problemas de reprodutibilidade com RAPDs, outros métodos têm sido desenvolvidos para distinguir entre genótipos. O método de tipagem denominado rep-PCR é baseado na amplificação, via PCR, de elementos de DNA repetitivos presentes em genomas bacterianos. Três famílias de seqüências repetitivas foram identificadas, a seqüência REP (“Repetitive Extragenic Palindromic”) de 35-40 pb (HIGGINS et al., 1982), a seqüência ERIC (“Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus”) de 124-127 pb (HULTON et al., 1991), e o elemento BOX de 154 pb (MARTIN et al., 1992).

Estudos baseados em rep-PCR foram descritos inicialmente em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* (HIGGINS et al., 1982; HULTON

et al., 1991) e posteriormente em *Pseudomonas* e *Xanthomonas* (LOWS et al., 1994; SCORTICHINI et al., 2002). Essas seqüências de DNA repetitivas têm sido recentemente adaptadas para tipagem de genomas eucarióticos, com aplicações na discriminação de populações de *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. & De Not. (JEDRYCZKA et al., 1999), diferenciação de espécies no gênero *Tilletia* (McDONALD et al., 2000), análise da diversidade genética de isolados de *Stemphylium solani* G. F. Weber (MEHTA et al., 2002), caracterização da diversidade genética entre isolados de *Crinipellis perniciosus* (Stahel) Singer de diferentes plantas hospedeiras (ARRUDA et al., 2003), discriminação de membros dos gêneros *Phaeoacremonium* e *Phaeomoniella* (ALVES et al., 2004) e na caracterização da diversidade genética entre isolados de *Pandora neoaphidis* (Remaud. & Henneleert) Humber de diferentes hospedeiros e origens geográficas (TYMON & PELL, 2005).

Um outro método empregado para a detecção de variabilidade genética é a técnica conhecida como ISSR (“Inter Simple Sequence Repeat”) (ZIETKIEWICZ et al., 1994). Essa técnica permite a amplificação de segmentos de DNA localizados entre duas seqüências microssatélites idênticas orientadas em direções opostas. Microssatélites são pequenas seqüências repetidas de DNA de 2 a 5 pares de bases.

O princípio da técnica de ISSR baseia-se na amplificação do DNA por PCR, usando como oligonucleotídeos iniciadores seqüências de nucleotídeos, com cerca de 16 a 25 pb de comprimento, complementares a sítios de microssatélites aleatórios (ZIETKIEWICZ et al., 1994). Estes oligonucleotídeos podem ser não ancorados ou ancorados em uma das extremidades (5’ ou 3’) por uma pequena seqüência de 1 a 4 nucleotídeos. A ancoragem serve para fixar o pareamento do oligonucleotídeo em uma única posição no sítio alvo, o que resulta em baixo nível de pareamento inespecífico. Apesar da técnica de ISSR ter sido originalmente desenvolvida para a diferenciação genética entre grupos de plantas, recentemente, esta ferramenta tem sido utilizada com sucesso em estudos de populações de fungos, insetos e vertebrados (WOLFE, 2005).

Estudos realizados por TYMON & PELL (2005) permitiram estimar a diversidade genética de 30 isolados, de diferentes origens geográficas, do

fungo entomopatogênico *P. neoaphidis* por meio das técnicas ISSR, ERIC e RAPD. Um maior número de bandas foi produzido quando utilizou-se oligonucleotídeos ERIC, entretanto um número maior de bandas polimórficas foi obtido a partir de ISSR. O número de bandas polimórficas obtidas por meio de RAPD foi semelhante ao de ISSR. Os resultados obtidos mostraram altos níveis de variação intraespecífica entre os isolados de *P. neoaphidis*, mas não foi detectada uma relação entre essa variação e a origem geográfica dos isolados.

STENGLEIN e BALATTI (2006) estimaram a diversidade genética de 45 isolados de *P. griseola* por meio de variedades diferenciadoras e das técnicas moleculares de RAPD e ISSR. A partir de RAPD e ISSR foram identificados 9 e 17 genótipos, respectivamente, verificando assim que estas duas técnicas detectam altos níveis de diversidade entre os isolados.

A detecção de polimorfismo por análises PCR-RFLP da região interna transcrita (ITS) do DNA ribossomal (rDNA) também tem sido usada com sucesso na caracterização de fungos, incluindo *Rhizoctonia solani* J. G. Kühn (MEINHARDT et al., 2002), *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch (WADA et al., 2003) e *Aspergillus* spp. (MARTÍNEZ-CULEBRAS & RAMÓN, 2007).

Os genes que codificam o rDNA da maioria dos genomas eucarióticos são altamente repetidos e contêm regiões com graus variados de divergência de seqüência. Genes que codificam 17S, 5,8S e 25S, ou seus equivalentes, são separados por seqüências espaçadoras formando uma única unidade repetida que é arranjada em cópias múltiplas (IBRAHIM et al., 1994). Enquanto as subunidades do rDNA são altamente conservadas, o espaçador intergênico (IGS) e o espaçador interno transcrito (ITS) são polimórficos e constituem ferramentas úteis para estudos filogenéticos e taxonômicos (HENRION et al., 1994).

Uma das técnicas empregadas na análise da região ITS é a de PCR-RFLP, que requer pequena quantidade de DNA e dois oligonucleotídeos específicos que flanqueiam a região ITS (WHITE et al., 1990). Esse processo de amplificação e digestão com enzimas de restrição propicia a formação de várias cópias da região ITS e possibilita a análise da seqüência de DNA e detecção da variabilidade genética (MITCHELL et al., 1995).

MEINHARDT et al. (2002) estimaram a diversidade genética de 18 isolados de *R. solani* de feijoeiro cultivado na região da Mata Atlântica de São Paulo por meio de PCR-RFLP da região ITS. O padrão obtido permitiu identificar cinco genótipos entre os isolados, formando três grupos principais levando-se em consideração 65% de similaridade. Entretanto, nem sempre é possível identificar variabilidade genética intraespecífica por meio da análise da região ITS. SILVA (2007) analisou a diversidade genética de 46 isolados de *C. pernicioso* derivados de tecido infectado de *Theobroma cacao* L., coletados na Amazônia, por meio PCR-RFLP da região ITS e não verificou variabilidade genética entre os isolados.

A detecção de elevado grau de polimorfismo, alta reprodutibilidade, necessidade de pequenas quantidades de DNA e custo relativamente baixo são algumas das vantagens da utilização das técnicas mencionadas para a detecção de polimorfismos genéticos. Além do que, os marcadores ERIC, BOX e ISSR permitem a análise da variabilidade de todo o genoma analisado.

O objetivo desse trabalho foi verificar se as técnicas ERIC-PCR, BOX-PCR, ISSR-PCR e PCR-RFLP da região ITS do rDNA são apropriadas para a detecção de polimorfismos genéticos que permitam estimar a diversidade genética de isolados de *P. griseola* provenientes dos estados de Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo e Paraná.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Microrganismos e condições de cultivo

Foram analisados, neste trabalho, 29 isolados do fungo *Phaeoisariopsis griseola* (Tabela 1) cedidos gentilmente por Aloísio Sartorato, pesquisador da EMBRAPA Arroz e Feijão localizada na cidade Santo Antônio de Goiás, do estado de Goiás e por Everaldo Gonçalves de Barros, professor do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

O fungo foi mantido em placas de Petri contendo meio de cultivo de polpa de tomate (200 mL de polpa de tomate Pomodoro, 800 mL de água destilada, 15 g de agar e 3 g de carbonato de cálcio). De cada placa contendo a cultura do patógeno, foi obtida uma suspensão de conídios e fragmentos de micélio, a partir da adição de água estéril. Essa suspensão foi espalhada em placas contendo meio de cultivo de polpa de tomate. Em seguida, as placas foram incubadas a 24°C por, aproximadamente, 12 dias.

**Tabela 1.** Identificação, patótipo e procedência dos isolados de *Phaeoisariopsis griseola*

Isolados	Raça	Procedência
29-3	63-55	Lambari, MG
97-2	31-15	Coimbra, MG
158-1	63-23	Afonso Cláudio, ES
592-3	—	Anápolis, GO
397	55-23	Sto. Antônio de Goiás, GO
410	63-31	Sto. Antônio de Goiás, GO
419-3	—	Lapa, PR
419-6	—	Lapa, PR
478-2	—	Pato Branco, PR
811	63-23	Damolândia, GO
836	63-7	Damolândia, GO
838	63-23	Damolândia, GO
848	63-47	Damolândia, GO
858	63-15	Damolândia, GO
868	63-63	Damolândia, GO
1018	—	Ponta Grossa, PR
1033	—	Sto. Antônio de Goiás, GO
1038	—	Sto. Antônio de Goiás, GO
1111	—	Sto. Antônio de Goiás, GO
1190	—	Sto. Antônio de Goiás, GO
1191	—	Sto. Antônio de Goiás, GO
1205	—	Goiânia, GO
1206	—	Goiânia, GO
1207	—	Goiânia, GO
1209	—	Goiânia, GO
1213	—	Goiânia, GO
1214	—	Unaí, MG
1218	—	Unaí, MG
1285	—	Sto. Antônio de Goiás, GO

— Raça ainda não identificada.

## 2.2 Extração do DNA total

A extração do DNA total dos isolados de *P. griseola* foi realizada segundo o protocolo estabelecido para fungos do gênero *Aspergillus* (PREBBLE & ANDERSON, 1998), com algumas modificações.

Esporos e fragmentos de micélio foram inoculados em meio GPYECH líquido (ANSARI et al., 2004) e mantidos à 24°C, por dez dias. Após esse período de incubação, o micélio foi lavado com água destilada, seco em papel toalha, congelado em nitrogênio líquido e armazenado à -80°C.

Para iniciar a extração, o micélio foi macerado em gral de porcelana contendo nitrogênio líquido até transformar-se em um pó fino. O pó obtido foi transferido para um tubo de polipropileno, onde foram adicionados 15 mL de tampão de extração (Tris-HCl 200 mM pH 8,0, EDTA 50 mM, NaCl 250 mM, SDS 2%).

Após a adição do tampão de extração, as amostras foram incubadas a 70°C, em banho-maria, por aproximadamente 20 minutos. Posteriormente, foi adicionado um volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) aos tubos, os quais foram mantidos no gelo por 30 minutos e centrifugados a 14.500 g por 40 minutos.

Em seguida, adicionou-se ao sobrenadante 1 volume de isopropanol gelado e a mistura foi incubada a -4°C por 12 horas. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4.300 g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com etanol 70% (v/v) e seco à temperatura ambiente, sendo posteriormente ressuspensionado em 1 mL de água ultra pura.

Após homogeneização da solução de ácidos nucleicos, o conteúdo foi dividido em tubos de 1,5 mL, adicionado de acetato de amônio 7 M para uma concentração final de 2,6 M, incubado no gelo por 1 hora e centrifugado a 12.000 g por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e foi adicionado igual volume de fenol-clorofórmio. Os tubos foram incubados no gelo por 5 minutos, sendo agitados a cada minuto, e centrifugados a 12.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e foi adicionado igual volume de clorofórmio. Os tubos foram incubados no gelo por 5 minutos, sendo agitados a cada minuto, e centrifugados a 12.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos.

Para a precipitação dos ácidos nucleicos, foi adicionado NaCl a uma concentração final de 100 mM e um volume de isopropanol gelado correspondente ao volume do sobrenadante, e os tubos foram incubados a -4°C durante 30 minutos. Uma última centrifugação foi feita a 12.000 g por 30 minutos. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% (v/v), seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 50 µL de água ultra pura.

Para digerir o RNA total, foram adicionados 3 µL de RNase A (10mg/mL) e a solução foi incubada a 37°C, por 30 minutos.

A quantificação do DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, usando o DNA do fago λ como marcador de quantidade.

## **2.3 Análise da região ITS do rDNA**

### **2.3.1 Condições de amplificação e eletroforese**

A região ITS foi amplificada via PCR de acordo com WHITE et al. (1990), utilizando os oligonucleotídeos ITS 1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS 4 (5' GTAGTCATATGCTTGTCTC 3') sintetizados pela GIBCO-BRL (Life Technologies). As reações de PCR possuíam um volume de 25 µL contendo 50 ng do DNA molde; 120 pmoles de cada oligonucleotídeo (ITS 1 e ITS 4); 10 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de cada dNTP (dGTP, dCTP, dATP e dTTP) e 2U de *Taq* DNA polimerase. As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.), programado para realizar uma desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, 40 ciclos a 94°C por 1 minuto, 50 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e 30 segundos, e uma extensão final de 72 °C por 7 minutos. Reações controle, sem DNA, foram realizadas com o propósito de verificar a presença de DNA contaminante.

O produto de amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1 X (2 mM EDTA; 0,1 M Tris-HC pH 8,0 e 0,1 M ácido bórico), sob uma voltagem constante de 4 Vcm<sup>-1</sup>, visualizado por exposição à luz UV dos géis contendo brometo de etídeo (0,5 µg/mL), e digitalizado utilizando o sistema de fotodocumentação Eagle Eye II. Para

estimar o tamanho dos fragmentos de DNA amplificados, amostras de 1 Kb DNA Ladder foram utilizadas como marcador molecular de tamanho.

### **2.3.2 Análise por RFLP**

O produto da amplificação foi clivado separadamente com as enzimas de restrição: *AluI* (Promega), *HaeIII* (Promega), *HhaI* (Promega), *HpaII* (Stratagene), *MboI* (Stratagene) *MspI* (Promega), e *RsaI* (Stratagene). Cada reação de clivagem continha 10 µL do produto de amplificação, 5 unidades de enzima, 2 µL de tampão da enzima num volume total de 20 µL, e a digestão foi realizada a 37°C por 4 horas.

Os fragmentos de DNA obtidos foram analisados em gel de agarose 2,0% em tampão TBE 1 X, sob uma voltagem constante de 4 V.cm<sup>-1</sup>, e estes foram visualizados por exposição à luz UV dos géis contendo brometo de etídeo (0,5 µg/mL), e digitalizados usando o sistema de fotodocumentação Eagle Eye II. Para estimar o tamanho dos fragmentos de DNA de restrição, foi utilizado como marcador molecular de tamanho o DNA do bacteriófago Φx174 clivado com a enzima de restrição *HaeIII*.

A análise dos dados foi feita mediante comparação dos perfis de restrição de cada isolado.

## **2.4 Amplificação de seqüências BOX, ERIC e ISSR**

### **2.4.1 Condições de amplificação e de eletroforese**

A região BOX foi amplificada via PCR de acordo com RADEMAKER et al. (1997), utilizando o oligonucleotídeo BOX 1R (5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3') sintetizado pela Promega. As reações de PCR possuíam um volume de 25 µL contendo 50 pmoles do oligonucleotídeo (BOX 1R); 50 ng de DNA genômico molde; 2,5 mM de cada um dos quatro dNTPs; 2 U de *Taq* DNA polimerase (Gigco) e 1 mg.mL<sup>-1</sup> de BSA (soro albumina bovina, Gibco). As amplificações foram feitas em

termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.), programado para realizar uma desnaturação inicial a 95°C por 7 minutos, 35 ciclos a 94°C por 3 segundos, 92°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto, 65°C por 8 minutos, e uma extensão final a 65°C por 8 minutos.

A região ERIC foi amplificada via PCR de acordo com LOUWS et al. (1994), utilizando os oligonucleotídeos ERIC 1R (5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC 3') e ERIC2 (5' AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG 3') descritos por VERSALOVIC et al. (1991) e sintetizados pela Promega. As reações de PCR possuíam um volume de 25 µL, contendo 50 pmoles de cada um dos dois oligonucleotídeos (ERIC1R e ERIC2); 50 ng de DNA total molde; 2,5 mM de cada um dos quatro dNTPs; 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Gibco) e 1 mg.mL<sup>-1</sup> de BSA (soro albumina bovina, Gibco). As amplificações foram feitas em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.), programado para realizar uma desnaturação inicial a 95°C por 7 minutos, 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto, 65°C por 8 minutos, e uma extensão final a 65°C por 15 minutos.

A região ISSR foi amplificada via PCR de acordo com STENGLEIN & BALATTI (2006), com modificações. Anteriormente, 100 oligonucleotídeos foram testados e 8 desses foram escolhidos (Tabela 2). As reações de PCR possuíam um volume de 25 µL contendo 50 ng de DNA total; dNTPs a 200 µM; 0,5 U de *Taq* DNA polimerase; 50 pmoles de oligonucleotídeo e 2,5 µL de tampão 10 X. As amplificações foram feitas em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.), programado para realizar uma desnaturação inicial de a 94 °C por 3 minutos, 40 ciclos a 92°C por 1 minuto, 2 minutos à temperatura de pareamento do oligonucleotídeo (que varia de acordo com o oligonucleotídeo utilizado), 72°C por 2 minutos, e uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Para garantir a reprodutibilidade dos fragmentos de DNA amplificados, todas as reações de PCR foram conduzidas em duplicatas para cada isolado e reações sem DNA foram realizadas com o propósito de verificar a presença de DNA contaminante.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1 X, sob uma voltagem constante de 4

V.cm<sup>-1</sup>, e estes foram visualizados por exposição à luz UV dos géis contendo brometo de etídeo (0,5 µg/mL), e digitalizados utilizando o sistema de fotodocumentação Eagle Eye II. Para estimar o tamanho dos fragmentos de DNA amplificados, amostras de 1 Kb DNA Ladder foram utilizadas como marcador molecular de tamanho.

**Tabela 2.** Oligonucleotídeos usados na amplificação de seqüências ISSR

Oligonucleotídeo	Seqüência	Temperatura de pareamento (°C)
UBC 809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	53
UBC 836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	50
UBC 842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	48
UBC 880	GGAGAGGAGAGGAGA	53
UBC 888	BDBCACACACACACACA	50
UBC 889	DBDACACACACACACCA	52
UBC 890	VHVGTTGTGTGTGTGTGT	57
UBC 891	HVHTGTGTGTGTGTGTG	55

Y = (C,T); B = (C,G,T); D = (A,G,T); H = (A,C,T); V = (A,C,G).

#### 2.4.2 Análise dos dados

Para a análise dos dados, a cada banda com uma mobilidade eletroforética diferente foi designada um número de posição e uma marca de 1 ou 0 baseado na presença ou ausência da banda. A similaridade genética foi estimada por meio do coeficiente de Jaccard (1908). O coeficiente de similaridade de Jaccard foi calculado pela divisão do número de bandas que ocorreu em ambas as tipagens pelo número total de bandas (comum e única) em ambas as tipagens. Análises de agrupamento foram realizadas, permitindo a construção de dendrogramas a partir dos dados do coeficiente de similaridade de Jaccard pelo método UPGMA (“unweighted pair-group

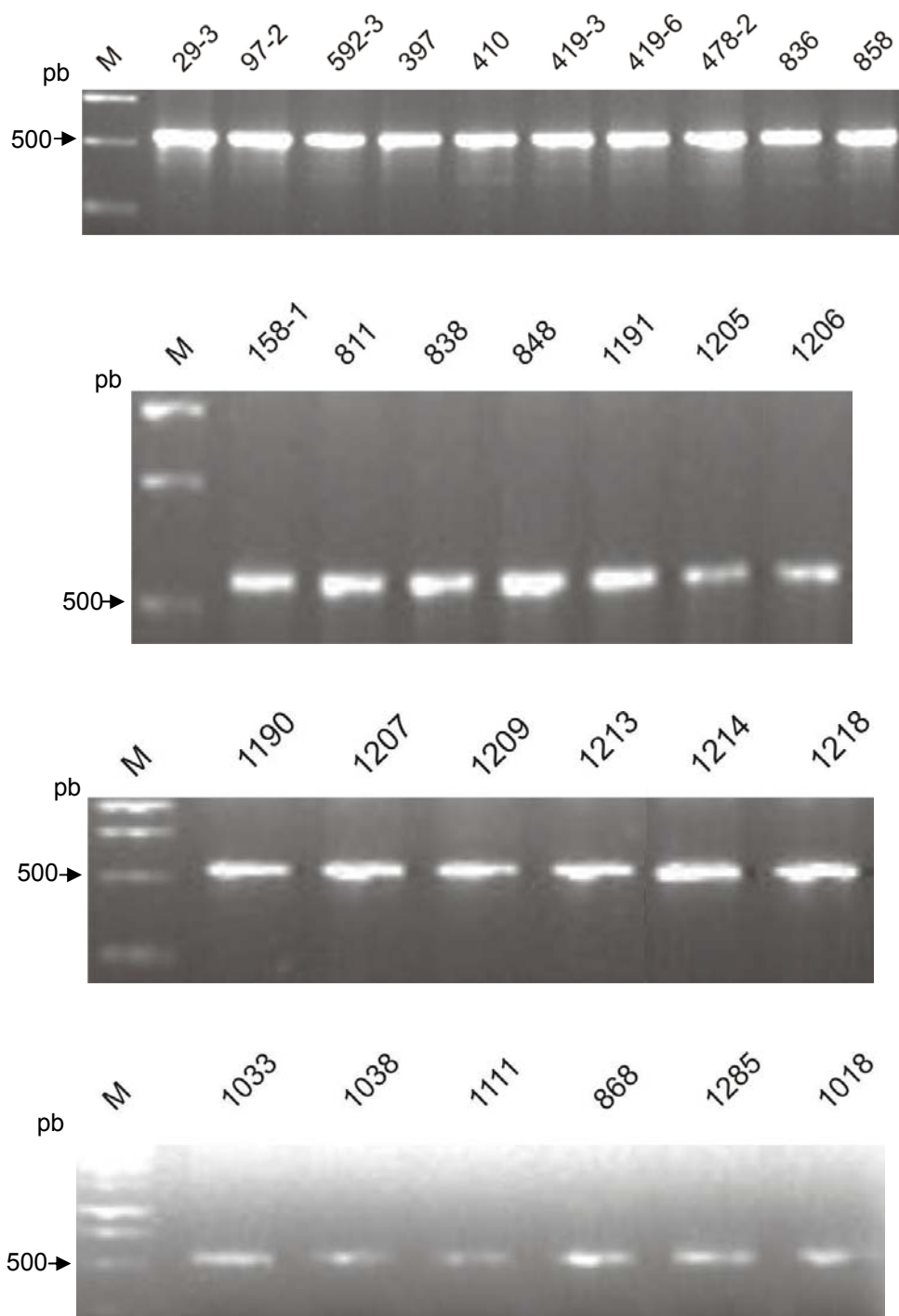
method using arithmetic means”), utilizando o programa GENES (CRUZ, 1997).

A análise de variância molecular (AMOVA), dos dados obtidos a partir da técnica ISSR-PCR, foi utilizada para revelar a distribuição da variabilidade genética dentro e entre as populações de isolados coletados nos quatro Estados. Nesta análise, a diversidade genética total foi particionada em dois níveis hierárquicos distintos: diferença entre populações e entre isolados dentro de população. A AMOVA foi realizada de acordo com EXCOFFIER et al. (1992), com o auxílio do programa Arlequin 3.01 (EXCOFFIER et al., 2006). A significância da diferenciação foi testada com 1000 permutações.

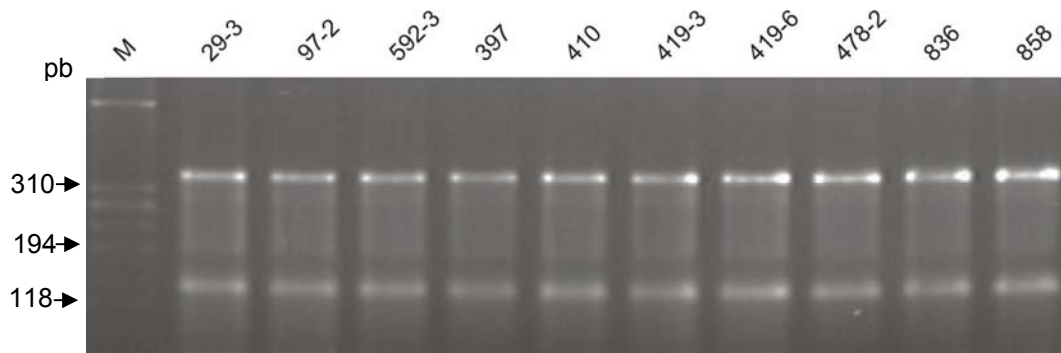
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados de *P. griseola* foram analisados empregando diferentes marcadores moleculares. Os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4 foram utilizados para amplificar as regiões espaçadoras transcritas do rDNA ITS1 e ITS2, incluindo o gene 5,8S. A amplificação com esses iniciadores resultou em um único fragmento de DNA de aproximadamente 520 pb a partir do DNA total de 29 isolados (Figura 1). Foram detectados sítios de restrição *AluI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HpaI*, *MboI*, *MspI* e *RsaI* nos fragmentos de todos os isolados analisados foram detectados (Tabela 3). A figura 2 ilustra o resultado da digestão da região ITS com *AluI*, onde foram detectados dois fragmentos de DNA de aproximadamente 370 e 150 pb.

As clivagens com todas as enzimas de restrição, das regiões ITS e de 5,8S amplificadas, resultaram em perfis de bandas idênticos para todos os isolados quando analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%. Portanto, esta análise, nas condições empregadas, não foi apropriada para a detecção de polimorfismo genético entre os isolados analisados.



**Figura 1.** Amplificação da região ITS do rDNA de isolados de *P. griseola*, utilizando os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4. M - 1 Kb DNA Ladder, utilizado como marcador de tamanho molecular.



**Figura 2.** RFLP da região ITS do rDNA de isolados de *P. griseola* com a enzima *AluI*. M - DNA do bacteriófago  $\Phi$ x174 clivado com a enzima de restrição *HaeIII*.

Estes resultados estão de acordo com outros autores. Por meio da análise da região ITS, SILVA (2007) caracterizou a diversidade genética de 46 isolados de *C. pernicioso* derivados de tecido infectado de *T. cacao*. O produto da amplificação foi digerido separadamente com as enzimas de restrição *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HindIII*, *PstI*, *HinfI* e *MspI*. Dentre essas enzimas, *HinfI* e *MspI* foram selecionadas por digerirem os fragmentos de DNA amplificados. Essas clivagens resultaram em perfis de bandas idênticos para todos os isolados. Diante desses resultados e dos obtidos no presente trabalho, pode-se observar que a técnica PCR-RFLP da região ITS nas condições empregadas foi ineficiente na detecção de variabilidade genética intraespecífica de *C. pernicioso* e *P. griseola*. Entretanto, dados mostram que essa técnica tem sido empregada com sucesso na caracterização de outros fungos. MEINHARDT et al. (2002), estimaram a diversidade genética de 18 isolados de *R. solani* de feijoeiro cultivado na região de Mata Atlântica de São Paulo por meio da análise da região ITS. O produto da amplificação da região ITS foi digerido separadamente com as enzimas de restrição *AvaI*, *HaeIII*, *HhaI*, *MboI*, *MseI*, *MspI*, *NciI* e *TaqI*. Sítios *HaeIII*, *HhaI*, *MseI* e *TaqI* foram detectados e diferentes perfis de restrição foram identificados, o que permitiu separar os isolados em cinco genótipos. A análise de PCR-RFLP da região ITS com essas enzimas mostrou ser efetiva na diferenciação dos isolados de *R. solani*, diferenciação essa que não foi evidenciada no presente trabalho.

**Tabela 3.** Fragmentos de DNA (pb) da região ITS do rDNA dos 29 isolados de *Phaeoisariopsis griseola* obtidos por clivagem com diferentes enzimas de restrição

Enzima	Tamanho dos fragmentos de DNA (pb)
<i>AluI</i>	370
	150
<i>HaeIII</i>	450
	70
<i>HhaI</i>	200
	180
	140
<i>HpaII</i>	280
	150
	90
<i>MboI</i>	330
	190
<i>MspI</i>	280
	150
	90
<i>RsaI</i>	430
	90

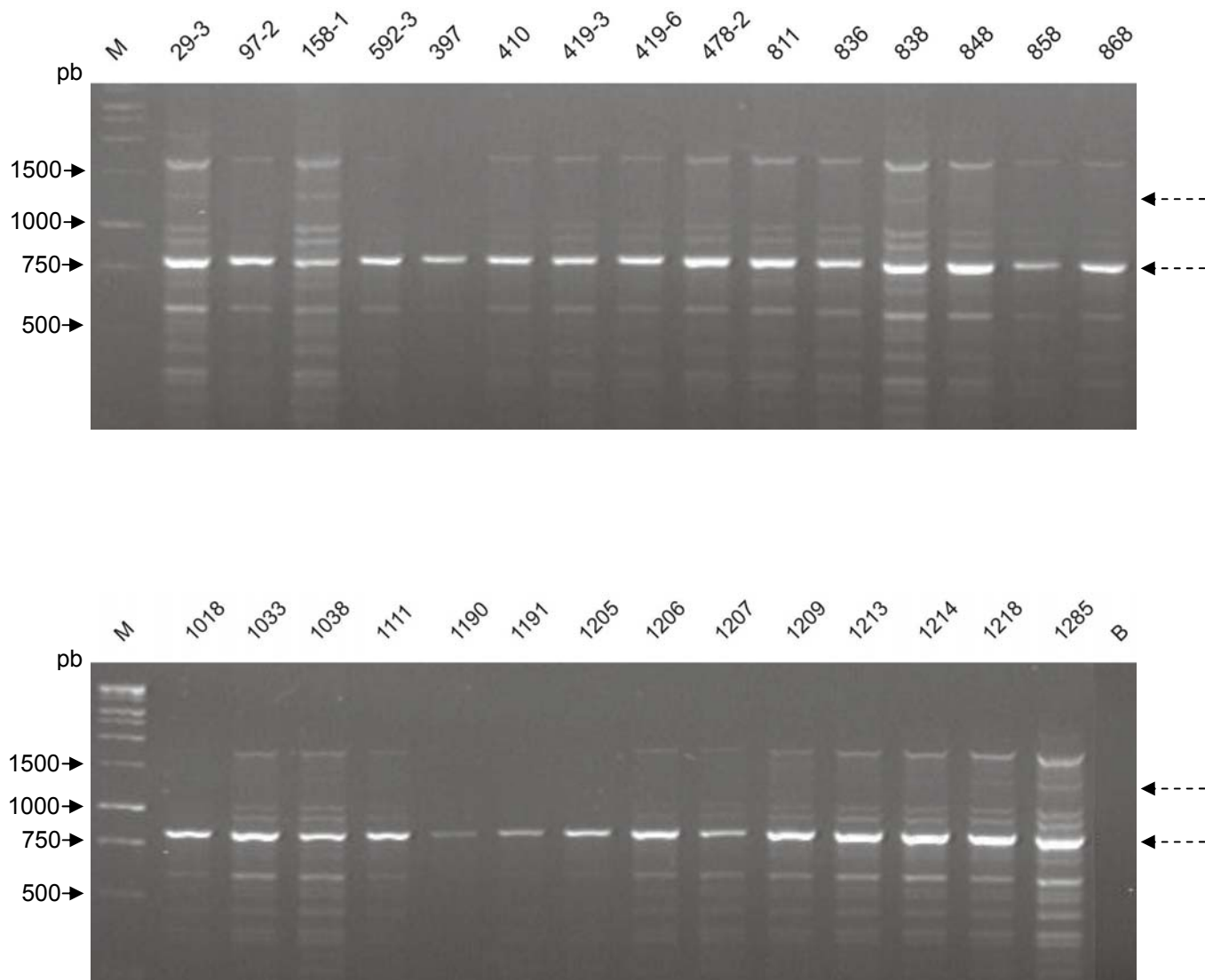
A técnica ERIC-PCR do DNA total de 29 isolados de *P. griseola* resultou em um total de 15 bandas distintas, com tamanhos de 400 a 1600 pb aproximadamente (Figura 3). Dessas, 53,3% foram polimórficas entre os isolados testados. Foram consideradas para as análises as bandas mais definidas e que tiveram repetibilidade nas ampliações.

A análise de agrupamento dos dados de ERIC mostrou cinco genótipos, organizados em 3 grupos distintos, designados A, B e C (Figura 4) com aproximadamente 18% de dissimilaridade genética, revelando uma variação entre os três grupos. No grupo A, todos os isolados foram coletados em Goiás e no grupo B, os isolados foram coletados em Goiás, Minas Gerais e Espírito Santo. No grupo C, que contém a maioria dos isolados, estes

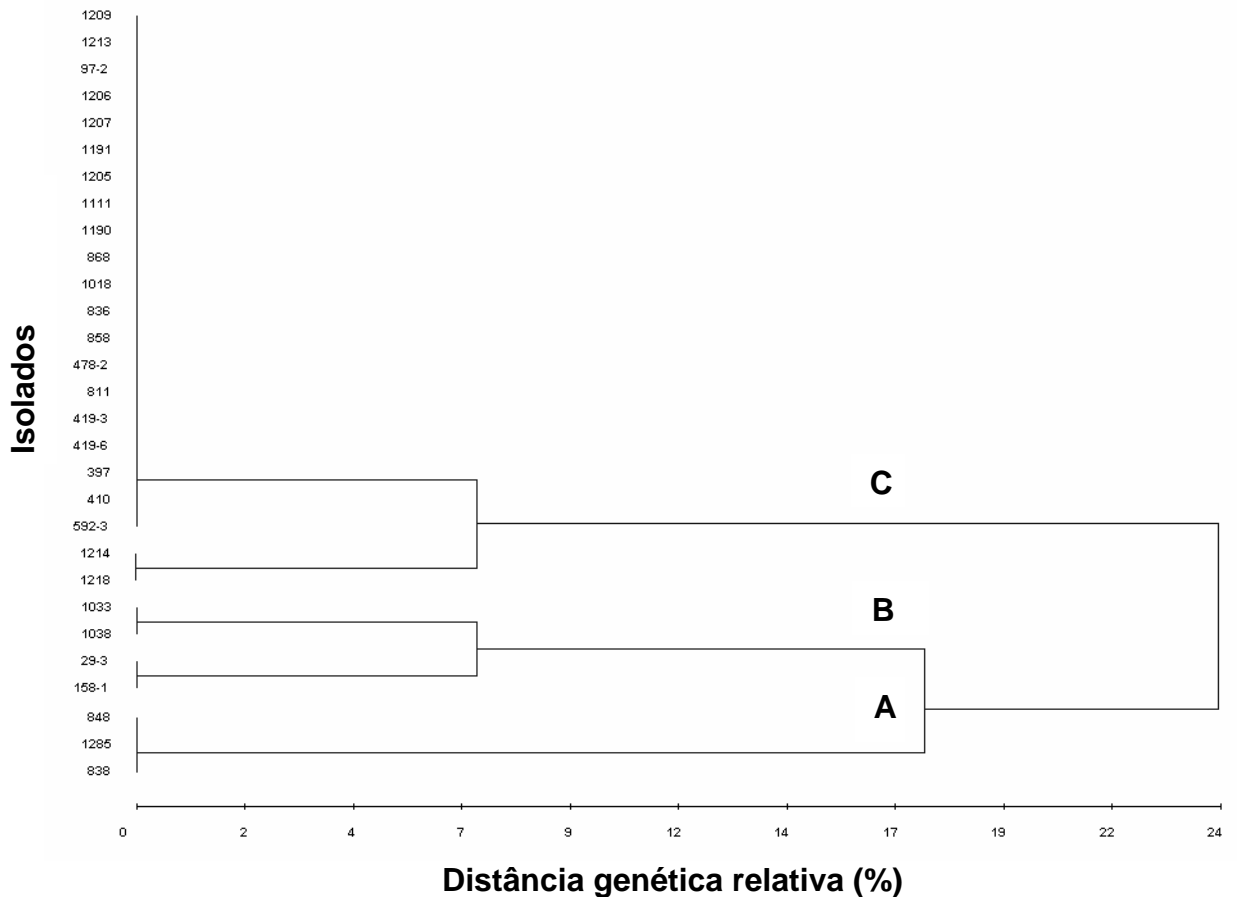
foram coletados em Goiás, Minas Gerais e no Paraná. Os grupos B e C foram divididos em subgrupos, sendo alguns formados por isolados do mesmo local de origem e outros com isolados de origem distinta. Esses resultados mostram que não foi possível identificar uma estruturação dos isolados de acordo com o local de origem.

Apesar de não ter sido possível a diferenciação dos isolados de *P. griseola* de acordo com a origem geográfica, em outros trabalhos foi possível observar essa diferenciação. ARRUDA et al. (2003), caracterizando a diversidade genética entre isolados de *C. pernicioso* de diferentes plantas hospedeiras por meio de ERIC-PCR, mostraram uma variabilidade intraespecífica considerável em *C. pernicioso* de *T. cacao*, estruturando a maioria dos isolados com base no local de origem. MEHTA et al. (2002) também fizeram a análise da diversidade genética de isolados de *S. solani* levando-se em consideração a planta hospedeira, algodão e tomate, e o local de origem dos isolados. Esse trabalho mostrou um baixo nível de polimorfismo entre os isolados de algodão, mas diferenças claras foram observadas entre os isolados de algodão e tomate. Além disso, observaram diferenças entre os isolados de tomate de diferentes locais de origem.

A partir dos resultados desses trabalhos, e levando em consideração a espécie em estudo, pode-se observar que ERIC-PCR foi uma técnica capaz de detectar polimorfismo intraespecífico, entretanto, em alguns casos, não foi possível identificar uma relação dos isolados com o local de origem.



**Figura 3.** Seqüências ERIC de isolados de *P. griseola*. M - 1 Kb DNA Ladder, usado como marcador de tamanho molecular. B - Amostra sem DNA. As setas pontilhadas indicam bandas polimórficas.



**Figura 4.** Dendrograma obtido pelo método UPGMA mostrando as relações genéticas entre isolados de *P. griseola*, com base na tipagem ERIC-PCR.

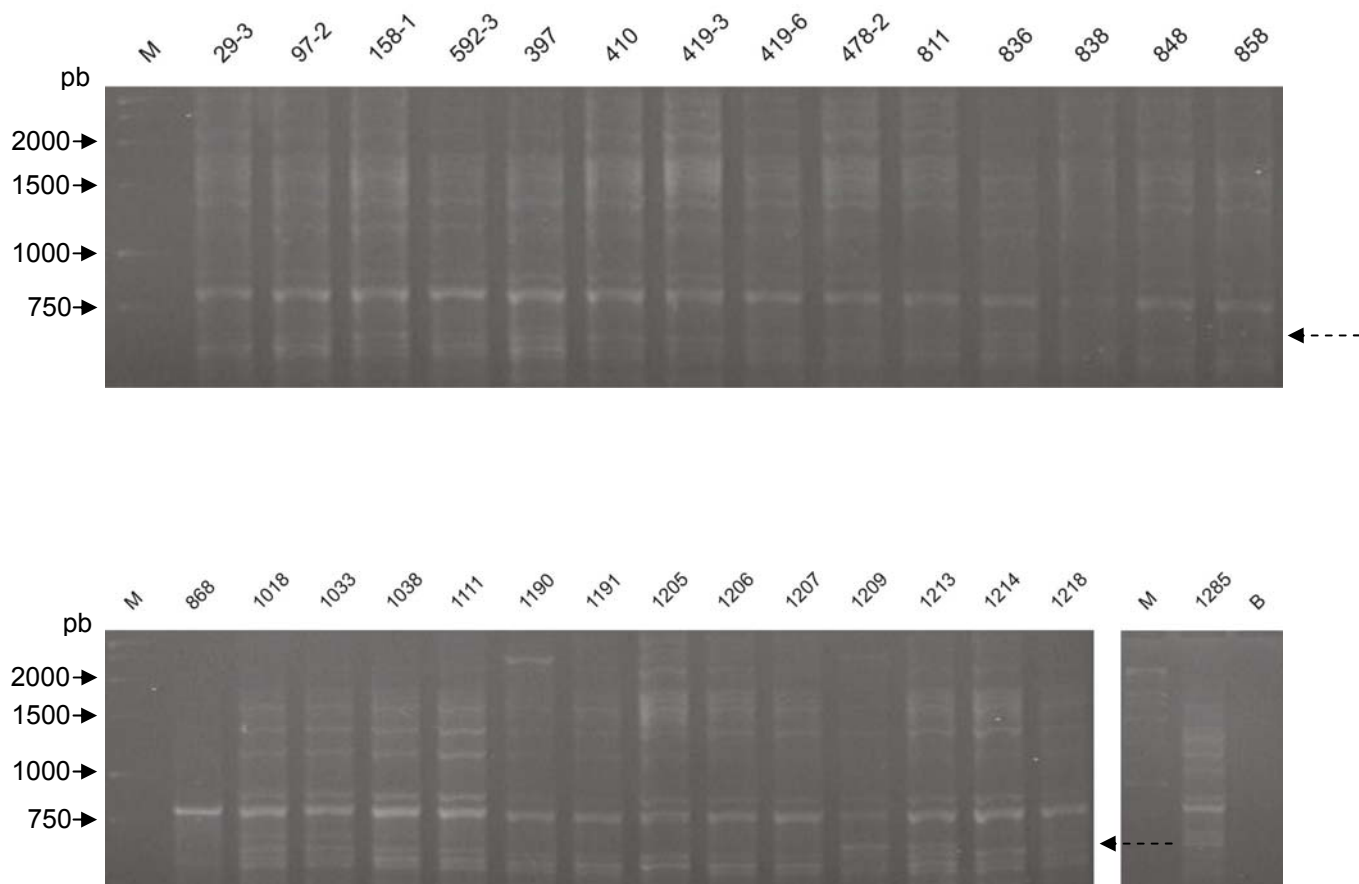
A técnica BOX-PCR do DNA total de 29 isolados de *P. griseola* resultou em um total de 10 bandas distintas, com tamanhos de 500 a 2000 pb aproximadamente (Figura 5). Apenas uma dessas 10 bandas (10,0%) foi polimórfica entre os isolados testados. As bandas identificadas foram, de modo geral, pouco definidas e com intensidade bastante uniforme, dificultando a visualização. De qualquer forma, o padrão obtido permitiu identificar apenas dois genótipos entre os isolados.

A análise de agrupamento dos dados de BOX revelou dois genótipos, organizados em 2 grupos distintos, designados A e B (Figura 6), apresentando 10% de dissimilaridade genética. A variabilidade genética foi menor que àquela encontrada na análise de ERIC-PCR. No grupo A, um

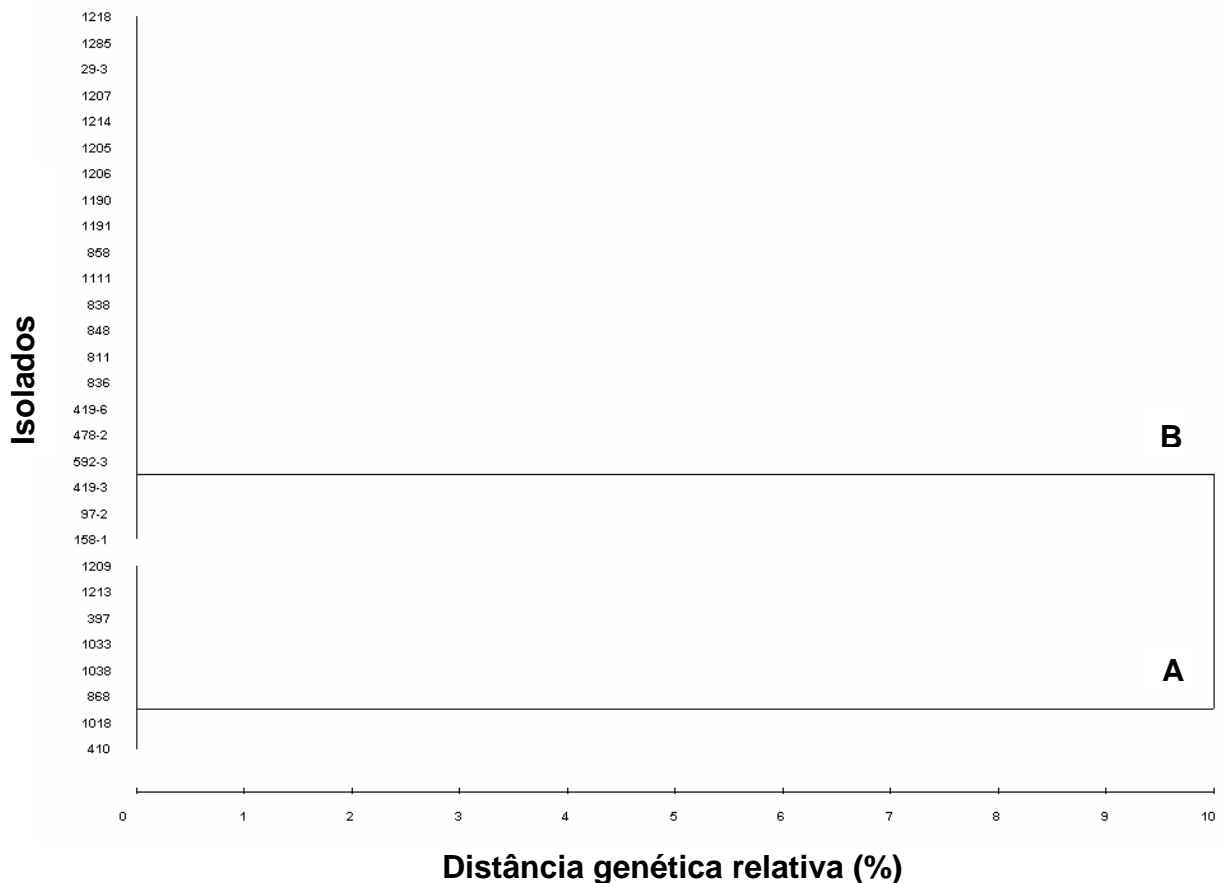
isolado foi coletado no Paraná e todos os outros em Goiás. No grupo B, que contém a maioria dos isolados, estes foram coletados em Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo e no Paraná. Esses resultados também mostram que não foi possível identificar uma estruturação dos isolados de acordo com o local de origem.

Embora baixo nível de polimorfismo tenha sido identificado entre os isolados de *P. griseola*, existem estudos que demonstram que esta técnica foi eficiente na diferenciação de isolados de outras espécies fúngicas. JEDRYCZKA et al. (1999), utilizando ERIC, REP e BOX-PCR para a caracterização de populações de *L. maculans*, mostraram que seqüências ERIC, REP e BOX estão presentes no genoma do fungo e que constituem ferramentas úteis para a caracterização dos isolados analisados. O polimorfismo entre os isolados de *L. maculans* obtido a partir de BOX-PCR foi bem maior que o observado no presente trabalho. Tal como observado no presente estudo, as bandas de DNA resultantes da análise por BOX-PCR realizada por JEDRYCZKA et al. (1999) também apresentaram intensidade uniforme.

McDONALD et al. (2000) também utilizaram as técnicas ERIC, REP e BOX-PCR para diferenciar espécies no gênero *Tilletia*. A análise das três técnicas combinadas revelou que as espécies foram reunidas em 3 grupos principais. Os resultados desse estudo demonstram que ERIC-PCR e BOX-PCR foram eficientes na caracterização das espécies. Entretanto, diferentemente do nosso trabalho, as bandas geradas por BOX-PCR foram bem definidas, não apresentando problemas na visualização.



**Figura 5.** Seqüências BOX de isolados de *P. griseola*. M - 1 Kb DNA Ladder, utilizado como marcador de tamanho molecular. B - Amostra sem DNA. A seta pontilhada indica banda polimórfica.



**Figura 6.** Dendrograma obtido pelo método UPGMA mostrando as relações genéticas entre isolados de *P. griseola*, com base na tipagem BOX-PCR.

A técnica ISSR-PCR do DNA total de 29 isolados de *P. griseola*, utilizando oligonucleotídeos ISSR (Tabela 2), resultou em um total de 61 bandas distintas, com tamanho variando de 300 a 2000 pb aproximadamente. Dessas, 70,5% foram polimórficas. Bandas com baixo nível de resolução não foram utilizadas nas análises. Os perfis de bandas obtidos com os oligonucleotídeos UBC 836 e UBC 888 estão mostrados nas Figuras 7 e 8, respectivamente.

A análise de variância dos dados moleculares (AMOVA) permitiu uma divisão da variação genética em dois níveis: dentro de populações e entre populações. Foi observada maior variação genética dentro das populações, ou seja, entre os isolados dentro de cada Estado, com 98,69% da variação

total. Apenas 1,31% da variação genética foi observada entre populações, ou seja, entre os isolados dos quatro Estados analisados (Tabela 4). Isso revela que não há evidência de estruturação populacional entre os Estados.

**Tabela 4.** Análise de variância molecular (AMOVA) dentro e entre populações de *Phaeoisariopsis griseola*

Fonte de variação	g.l	Soma dos quadrados	Componente de variância	Varição total (%)
Entre populações	3	15,834	0,06614	1,31
Dentro de populações	25	124,200	4,96800	98,69
Total	28	140,034	5,03414	

g.l= grau de liberdade. As probabilidades foram calculadas por 1000 permutações ao acaso

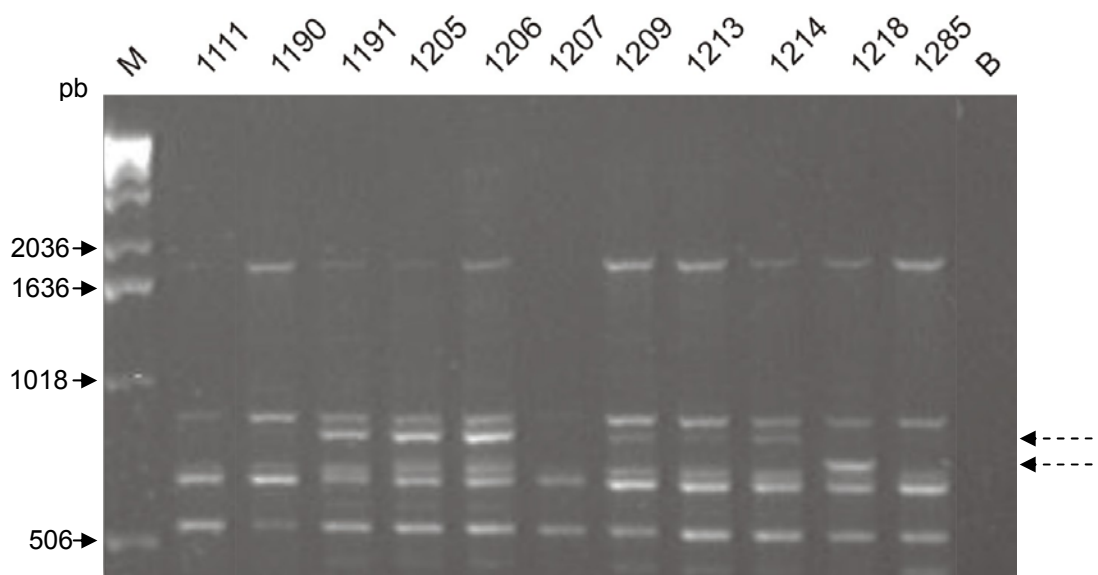
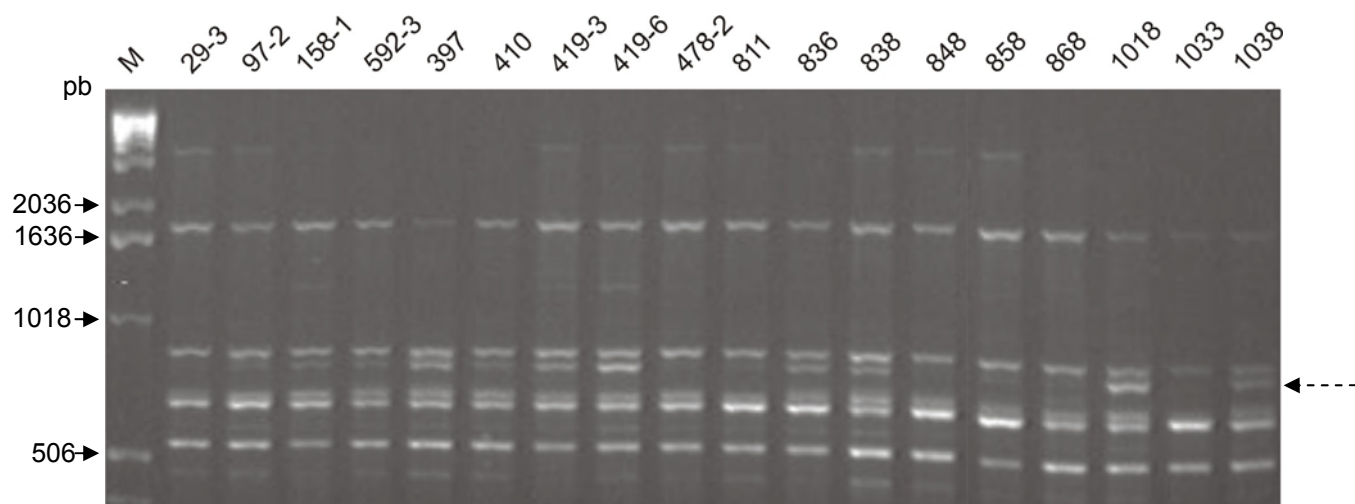
A análise de agrupamento dos dados de ISSR resultou em um dendrograma que separou os isolados em 28 genótipos (Figura 9), detectando variabilidade mais eficientemente do que ERIC-PCR e BOX-PCR. O alto nível de polimorfismo detectado mostra que a técnica ISSR-PCR foi apropriada para a discriminação de genótipos em *P. griseola*.

De acordo com a metodologia utilizada, e baseado na distância genética relativa de aproximadamente 31%, os isolados foram divididos em quatro grupos A, B, C e D, contendo cada um deles, 1, 3, 1 e 24 isolados, respectivamente. O grupo A contém um único isolado coletado no estado de Goiás. O grupo B inclui isolados procedentes de Goiás e Minas Espírito Santo. O grupo C também contém um único isolado coletado no estado de

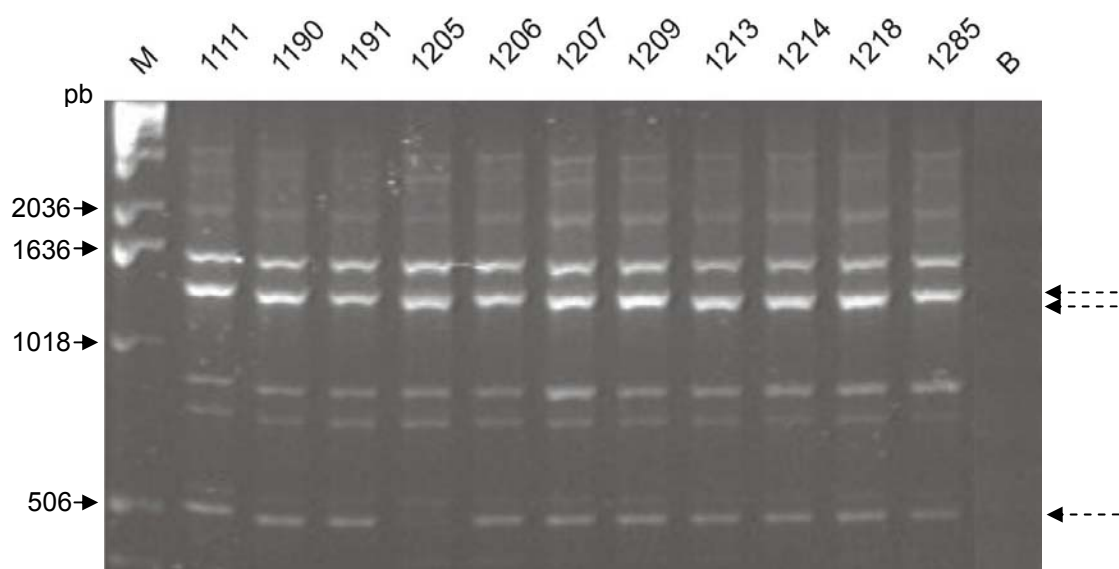
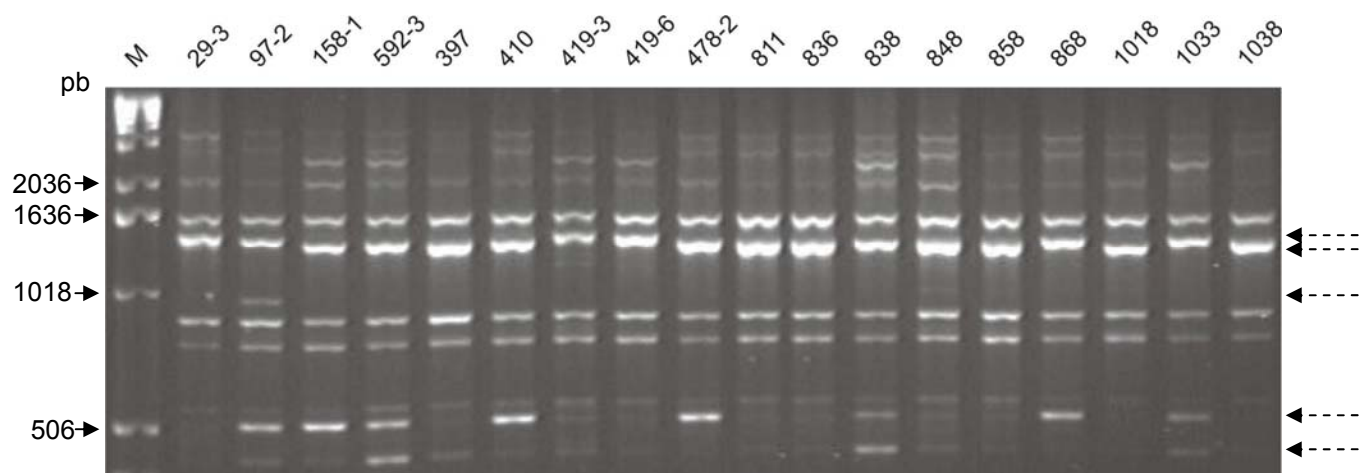
Minas Gerais, e o grupo D contém a maioria dos isolados, sendo eles procedentes dos quatro Estados amostrados.

Curiosamente, o isolado 868, pertencente ao grupo A, divergiu muito dos demais isolados, ficando separado. Uma importância maior deve ser dada na caracterização desse isolado, visto que ele pertence à raça 63-63, significando que todas as cultivares utilizadas na identificação desse isolado dentro de uma raça foram suscetíveis a ele, sendo assim um isolado de destaque, mais virulento.

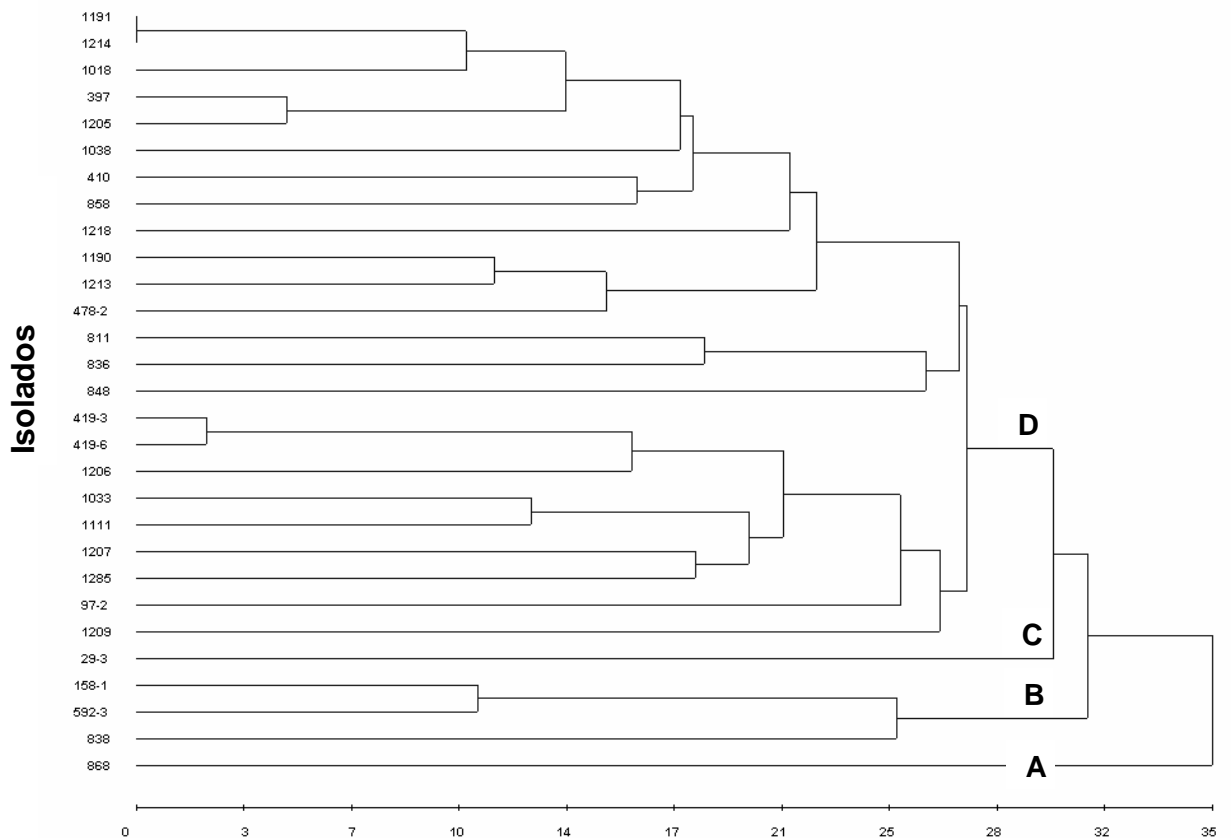
Os resultados obtidos por ISSR-PCR, assim como por ERIC-PCR e BOX-PCR, não mostraram uma relação entre diversidade genética e as origens geográficas dos isolados. Da mesma forma, estudos realizados por TYMON & PELL (2005) com 30 isolados, de diferentes origens geográficas, do fungo entomopatogênico *P. neoaphidis* por meio das técnicas ISSR, ERIC e RAPD, mostraram altos níveis de variação intraespecífica entre os isolados de *P. neoaphidis*, não identificando uma estruturação dos isolados de acordo com o local de origem. Estudos realizados por SARTORATO (2004), onde o objetivo foi estimar a diversidade genética de 96 isolados de *P. griseola* coletados em duas cidades do estado de Goiás por RAPD, mostraram grande diversidade genética entre os isolados, não sendo possível, também, agrupá-los de acordo com suas origens geográficas.



**Figura 7.** Perfis de isolados de *P. griseola* utilizando o oligonucleotídeo ISSR UBC 836. M - 1 Kb DNA Ladder, utilizado como marcador de tamanho molecular. B - Amostra sem DNA. As setas pontilhadas indicam bandas polimórficas.



**Figura 8.** Perfis de isolados de *P. griseola* utilizando o oligonucleotídeo ISSR UBC 888. M - 1 Kb DNA Ladder, utilizado como marcador de tamanho molecular. B - Amostra sem DNA. As setas pontilhadas indicam bandas polimórficas.



**Distância genética relativa (%)**  
**Figura 9.** Dendrograma obtido pelo método UPGMA mostrando as relações genéticas entre isolados de *P. griseola*, com base na tipagem ISSR-PCR.

A grande diversidade genética estimada entre os isolados de *P. griseola* foi também reportada em outros estudos com este fungo. Recentemente, STENGLEIN e BALATTI (2006) estimaram a diversidade genética de 45 isolados de *P. griseola* da Argentina utilizando uma série de cultivares de feijão diferenciadora e marcadores do tipo ISSR e RAPD. A combinação de RAPD e ISSR definiu 18 genótipos, enquanto que o teste com a série diferenciadora identificou apenas 13. Além de demonstrar a grande variabilidade genética entre os isolados, esses resultados também sugerem que isolados da mesma raça não estão necessariamente relacionados com os dados obtidos pelas análises do DNA. Esses resultados estão de acordo com os obtidos no presente trabalho, em que a alta diversidade genética entre os isolados de *P. griseola* do Brasil foi verificada

e que isolados pertencentes à mesma raça, como por exemplo, os isolados 811 e 838 que pertencem à raça 63-23, apresentaram diferentes perfis moleculares, sendo agrupados separadamente a partir dos dados obtidos pelas análises do DNA.

Algumas outras informações podem ser obtidas em relação aos isolados de *P. griseola*, mesmo não tendo sido realizada ainda a identificação da raça da maior parte dos isolados analisados, e o local de origem de cada isolado. A partir de ERIC-PCR, por exemplo, os isolados 811 e 838, coletados em Damolândia/GO, e o isolado 158-1, coletado em Afonso Cláudio/ES, pertencem à raça 63-23 e foram agrupados separadamente, considerando os subgrupos formados. Isso mostra que esses isolados, mesmo apresentando o mesmo fenótipo de virulência identificado por meio de plantas diferenciadoras, apresentam uma variabilidade genética adicional. Por outro lado, os isolados 29-3, coletado em Coimbra/MG, e 158-1 pertencem às raças distintas 63-55 e 63-23, respectivamente, e estão no mesmo subgrupo. No caso de ISSR-PCR, por exemplo, os isolados 811 e 838 também foram agrupados separadamente. Isso mostra que, possivelmente, a classificação em raças realizada por plantas diferenciadoras ainda não é um método perfeito e que marcadores moleculares poderão representar uma ferramenta que complementarará essa classificação. Assim, não foi possível observar uma relação direta entre isolado, raça e origem geográfica. De qualquer forma, a identificação de raças em diferentes localidades e da diversidade genética entre os isolados pertencentes a essas raças é de grande importância para os programas de melhoramento do feijoeiro, uma vez que essas informações são essenciais para a obtenção de cultivares resistentes.

A origem dessa ampla diversidade genética em *P. griseola* não é muito clara, uma vez que esse fungo não apresenta ciclo sexual conhecido. Entretanto, mecanismos como mutação, recombinação, reprodução parassexual e migração poderiam ser responsáveis por essa grande diversidade (MAHUKU et al., 2002).

#### 4. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos nesse trabalho, pôde-se verificar que a análise das regiões ITS acrescidas do gene 5,8S não foi apropriada para o estudo de variabilidade genética intraespecífica de *P. griseola*.

Os resultados obtidos por meio dos métodos de tipagem baseados na amplificação via PCR de elementos de DNA repetitivos, mostraram que os elementos repetitivos ERIC e BOX estão presentes também no genoma de *P. griseola*.

As análises por BOX-PCR e ERIC-PCR resultaram em dados pouco informativos, considerando que baixos níveis de polimorfismo foram detectados. Os melhores resultados, no entanto, foram obtidos com o emprego da técnica ISSR-PCR, que mostrou elevada capacidade na detecção de polimorfismo entre os isolados e mostrou ser uma excelente técnica para caracterização rápida e eficiente de um grande número de isolados de *P. griseola*.

Não foi verificado, tanto por meio de ERIC-PCR quanto por ISSR-PCR uma relação entre diversidade genética e origem geográfica dos isolados.

Constatou-se nesse trabalho, principalmente por meio de ISSR-PCR, alta diversidade genética entre isolados de *P. griseola*. A estimada diversidade observada poderá auxiliar no desenvolvimento de estratégias adequadas para a obtenção de variedades de feijoeiro resistentes a esse fungo.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ-AYALA, G.; SCHWARTZ, H. F. Preliminary investigations of pathogenic variability expressed by *Isariopsis griseola*. **Annual Report Bean Improvement Cooperation** 22:86-88, 1979.

ALVES, A.; HENRIQUE, I.; FRAGOEIRO, S.; SANTOS, C.; PHILLIPS, A. J. L.; CORREIA, A. Applicability of rep-PCR genomic fingerprinting to molecular discrimination of members of the genera *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella*. **Plant Pathology** 53:629-634, 2004.

ANSARI, K. I.; PALACIOS, N.; ARAYA, C.; LANGIN, T.; EGAN, D.; DOOHAN, F. M. Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum lindemuthianum* isolates of different geographic origins. **Plant Pathology** 53:635-642, 2004.

ARRUDA, M.C.C. DE; MILLER, R.N.G.; FERREIRA, M.A.S.V.; FELIPE, M.S.S. Comparison of *Crinipellis pernicioso* isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequence-based PCR genomic fingerprinting. **Plant Pathology** 52:236-244, 2003.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**. Minneapolis, Minnesota, USA: Burgess Publishing Co, 1972.

BRAUN U. A monograph of *Cercospora*, *Ramularia*, and allied genera (phytopathogenic *Hyphomycetes*). **IHW-Verlag (Eching bei München)** volume 1, 1995.

BURUCHARA, R.A. Determination of pathogenic variation in *Isariopsis griseola* Sacc. and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. **Tese de Doutorado**, Universidade de Nairobi, Kenya, 1983.

CORREA-VICTORIA, F. J. Pathogenic variation, production of toxic metabolites, and isoenzyme analysis in *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr. **Tese de Doutorado**, Michigan State University, 1987.

CROUS, P. W.; KANG, J.C.; BRAUN, U. A phylogenetic redefinition of anamorph genera in *Mycosphaerella* based on ITS rDNA sequence and morphology. **Mycologia** 93:1081-1101, 2001.

CROUS, P. W.; LIEBENBERG, M. M.; BRAUN, U.; GROENEWALD, J. Z. Re-evaluating the taxonomic status of *Phaeoisariopsis griseola*, the causal agent of leaf spot of bean. **Studies in Mycology** 55:163-173, 2006.

CRUZ, C. D. **Programa Genes** - Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG: UFV, 1997.

ELLIS, M.B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew, UK: CAB International Mycological Institute, 1971.

EXCOFFIER, L., SMOUSE, P.E., QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** 131: 479-491, 1992.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. **ARLEQUIN version 3.01**: an integrated software package for population genetics data analysis. University of Bern, Zoological Institute, 2006.

FALEIRO, F.G.; NIETSCHÉ, S.; RAGAGNIN, V.A.; BORÉM, A.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Resistência de cultivares de feijoeiro comum à ferrugem e a mancha-angular em condições de casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira** 26:86-89, 2001.

FERRARIS T. Osservazioni micologiche su specie del gruppo Hyphales (Hyphomycetae). **Annales Mycologici** 7:273-286, 1909.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. **EMBRAPA-CENARGEM** documento 20, 1995.

GOULART, A. C. P. Doenças do feijoeiro na região Norte de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira** 13:230-232, 1988.

HENRION, B.; CHEVALIER, G.; MARTIN, F. Typing truffle by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. **Mycological Research** 98:37-43, 1994.

HIGGINS, C.F.; AMES, G.F.; BARNES, W.M.; CLEMENT, J.M.; HOFNUNG, M. A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons. **Nature** 298:760-2, 1982.

HULTON, C.S.; HIGGINS, C.F.; SHARP, P.M. ERIC sequence: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology** 5:825-834, 1991.

IBRAHIM, S. K.; PERRY, R. N.; BURROWS, P. R.; HOOPER, D. J. Differentiation of species and populations of *Aphelenchoides* and of *Ditylenchus angustus* using a fragment of ribosomal DNA. **Journal of Nematology** 26:412-421, 1994.

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles** 44: 223-270, 1908.

JEDRYCZKA, M.; ROUXEL, T.; BALESDENT, M.H. Rep-PCR based genomic fingerprinting of isolates of *Leptosphaeria maculans* from Poland. **European Journal of Plant Pathology** 105:813-823, 1999.

LOUWS, F.J.; FULBRIGHT, D.W.; STEPHENS, C.T.; DE BRUIJN, F.J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology** 60:2286-2295, 1994.

MAHUKU, G. S.; JARA, C.; CUASQUER, J. B.; CASTELLANOS, G. Genetic variability within *Phaeoisariopsis griseola* from Central America and its implications for resistance breeding of common bean. **Plant Pathology** 51:594-604, 2002.

MARTIN, B.; HUMBERT, O.; CAMARA, M.; GUENZI, E.; WALKER, J.; MITCHELL, T.; ANDREW, P.; PRUDHOMME, M.; ALLOING, G.; HAKENBERCK, R.; MORRISON, D.A.; BOULNOIS, G.J.; CLAVERY, J.P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research** 20:3479-3483, 1992.

MARTÍNEZ-CULEBRAS, P. V.; RAMÓN, D. An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. **International Journal of Food Microbiology** 113:147-153, 2007.

McDONALD, J.G.; WONG, E.; WHITE, G.P. Differentiation of *Tilletia* species by rep-PCR genomic fingerprinting. **Plant Disease** 84:1121-1125, 2000.

MEHTA, Y. R.; MEHTA, A.; ROSATO, Y. B. ERIC and REP-PCR banding patterns and sequence analysis of the internal transcribed of rDNA of *Stemphylium solani* isolates from cotton. **Current Microbiology** 44:323-328, 2002.

MEINHARDT, L. W.; WULFF, N. A.; BELLATO, C. M.; TSAI, S. M. Genetic analyses of *Rhizoctonia solani* isolates from *Phaseolus vulgaris* grown in the Atlantic Rainforest region of São Paulo, Brazil. **Fitopatologia Brasileira** 27:259-267, 2002.

MITCHELL, R.; ROBERTS, P. J.; MOSS, S. T. Sequence or structure? A short review on the application of nucleic acid sequence information to fungal taxonomy. **Mycologist** 9:67-75, 1995.

MONDA, E.O.; SANDERS, F.E.; HICK, A. Infection and colonization of bean by *Phaeoisariopsis griseola*. **Plant Pathology** 50:103-110, 2001.

NIETSCHKE, S.; BORÉM, A.; DE CARVALHOS, G. A.; JÚNOR, T. J. DE P.; FERREIRA, C. F.; DE BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in the State of Minas Gerais, Brazil. **Euphytica** 117:77-84, 2001.

NIETSCHKE, S.; BORÉM, A.; ALZATE-MARIN, A. L.; COSTA, M.; ROCHA, R. C.; CAIXETA, E. T.; DE BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Variabilidade genética da patogenicidade de *Phaeoisariopsis griseola* no Brasil. **Summa Phytopathologica** 28:331-335, 2002.

OLIVEIRA, A. C. S.; FELÍCIO FILHO, A.; MOURA, P. A. M. **Diagnóstico da cultura do feijão em Minas Gerais**. Belo Horizonte, EPAMIG, 1980.

OLIVEIRA, E.J.; ALZATE-MARIN, A.L.; BORÉM, A.; MELO, C.L.P.; DE BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Reação de cultivares de feijoeiro comum a quatro raças de *Phaeoisariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira** 29 (2):220-223, 2004.

PASTOR-CORRALES, M.A.; JARA, C. E. La evolución de *Phaeoisariopsis griseola* con el frijol comun en América Latina. **Fitopatología Colombiana** 19:15-22, 1995.

PREBBLE, E.; ANDERSON, M. DNA extraction: miniprep. The *Aspergillus* website [www.aspergillus.man.ac.uk](http://www.aspergillus.man.ac.uk), 1998.

PYNDJI, M.M. Pathogenic variability of *Phaeoisariopsis griseola* in the Great Lakes region. In: **PAN African Bean Pathology Working Group Meeting**, Thinka, Kenya, 1993.

RADEMAKER J.L.W., LOWS, F. J.; BRUIJIN, F. J. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. Pages 1-26 in: **Molecular microbial ecology manual**. A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas, & F. J. de Bruijin, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 1997.

RAVA, S.C.A., SARTORATO, A.; CARVALHO, J.R.P. Yield losses in dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) caused by angular leaf spot (*Isariopsis griseola* Sacc.). **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative** 28:5-6, 1985

SACCARDO, P.A. Fungi veneti novi vel critivi vel mycologiae venetae addendi *Isariopsis griseola* Sacc. **Michelia** 1, 239-275, 1878.

SARTORATO, A., RAVA, C.A., MENTEN, J.O.M.; BERGAMIM-FILHO, A. Resistência vertical do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Isariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira** 16:43-46, 1991.

SARTORATO, A.; RAVA, C.A. Influência da cultivar e do número de inoculações na severidade da mancha-angular (*Isariopsis griseola*) e nas perdas na produção do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*). **Fitopatologia Brasileira** 17:247-251, 1992.

SARTORATO, A., RAVA, C.A.; RIOS, G.P. Doenças fúngicas e bacterianas da parte aérea. In: Araújo, R.S., Rava, C.A., Stone, L.F. & Zimmermann, M.J.O. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Potafós 669-700, 1996.

SARTORATO, A. Pathogenic variability and genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* isolates from two counties in the State of Goiás, Brazil. **Journal of Phytopathology** 152:385-390, 2004.

SARTORATO, A. Origem dos conídios de *Phaeoisariopsis griseola* para iniciar uma epidemia de mancha angular no feijoeiro comum. **VIII Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão**, Goiânia. 1:33-36, 2005.

SCORTICHINI, M.; ROSSI, M.P.; MARCHESI, U. Genetic, phenotypic and pathogenic diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* strains question the representative nature of the type strain. **Plant Pathology** 51:374-381, 2002.

SILVA, J. R. Q. Caracterização da diversidade genética de isolados Amazônicos de *Crinipellis pernicioso* oriundos de tecido infectado de *Theobroma cacao*. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de São Paulo, 2007.

STENGLEIN, S. A.; BALATTI, P. A. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina as revealed by pathogenic and molecular markers. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 68:158-167, 2006.

TYMON, A. M.; PELL, J. K. ISSR, ERIC and RAPD techniques to detect genetic diversity in the aphid pathogen *Pandora neoaphidis*. **Mycological Research** 109: 285-293, 2005.

VERSALOVIC, T. KOEUTH, J.O.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in Eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research** 19:6823- 6831, 1991.

VIEIRA, C. Melhoramento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Estado de Minas Gerais. **Experientiae** 4:1-68, 1964.

VIEIRA, C.; JÚNIOR, T. J. DE P.; BORÉM, A. **Feijão**. Viçosa: Ed. UFV, 2006.

WADA, S.; HORITA, M.; HIRAYAE, K.; SHIMAZU, M. Discrimination of Japanese isolates of *Beauveria brongniartii* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) by RFLP of the rDNA-ITS regions. **Applied Entomology and Zoology** 38:551-557, 2003.

WHITE TJ, BRUNNS T, LEE S, TAYLOR J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Celfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. Academic Press, San Diego. 315-322, 1990.

WOLFE, A. D. ISSR techniques for evolutionary biology. **Molecular Evolution: Producing the biochemical data, Part B Methods in Enzymology** 395: 134-144, 2005.

ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKIM, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics** 20:176-183, 1994.