

Variabilidade genética de *Sclerotinia sclerotiorum* em cultura de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)

¹Lorena Félix Magalhães, ¹Camilla Pires Rosa Cunha ²Silvana Petrofeza da Silva

Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Brasil

lorenafelix21@gmail.com, petrofez@uol.com.br

Palavras-chaves: *Sclerotinia sclerotiorum*, RAPD, variabilidade genética, grupo de compatibilidade micelial, marcadores moleculares.

1 INTRODUÇÃO

O fungo patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary pertencente à classe dos Ascomycetos, é conhecido por causar a doença mofo branco em numerosas culturas economicamente importantes, dentre as quais se destacam o feijão, a soja, o girassol e a canola. Este patógeno apresenta uma alta distribuição geográfica em termos mundiais e pouca especificidade de hospedeiros, atacando mais de 400 espécies de plantas (HEGEDUS & RIMMER, 2005)

Estudos sobre a estrutura populacional de *S. sclerotiorum* têm demonstrado a ocorrência de diversidade genética e a ocorrência tanto de reprodução clonal como sexuada. Em geral, a reprodução clonal foi observada ser predominante em regiões temperadas, enquanto que a recombinação sexuada contribui para a estrutura da população em clima mais ameno (CUBETA *et al*, 1997; KOHLI & KOHN, 1998; CARPENTER *et al*, 1999; ATALAH, *et al.*, 2004; MALVAREZ *et al*, 2007; ARBAOUI *et al*, 2008). Os isolados são classificados em linhagens clonais pelo uso de dois ou mais marcadores independentes, tais como grupos de compatibilidade micelial (MCG), marcadores de DNA, como microssatélites ou padrões de RAPD (AUCLAIR *et al*, 2004; HAMBLETON *et al.*, 2002; KOHN *et al*, 1991).

A classificação dos isolados por meio de grupos de compatibilidade micelial (MCG) é comumente usada como um rápido marcador genotípico entre as populações de *S. Sclerotiorum*. Estes grupos são determinados com base na capacidade de anastomose de hifas entre diferentes isolados quando combinados em cultura, isolados incompatíveis produzem uma barreira de células mortas entre si, deixando uma linha de reação, que é macroscopicamente visível (SCHAFER & KOHN, 2006). Grupos de compatibilidade micelial podem ser visto como uma medida indireta da diversidade genética nas populações, uma vez

Revisado pelo orientador. ¹Graduando(a) de Ciências Biológicas - Laboratório de Biologia Molecular de Fungos, ICB/UFG., Goiânia, GO, Brasil; ² Orientador - Laboratório de Biologia Molecular de Fungos, ICB/UFG., Goiânia, GO, Brasil.

que não revelam o grau de parentesco entre ou dentro de MCG. No entanto, umas séries de técnicas moleculares estão disponíveis para a investigação da variabilidade genética dentro e entre MCG. Estes incluem a amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD) (WILLIAMS *et al.*, 1990), uma técnica que tem sido mostrado útil em espécies e subespécies de outros gêneros de fungos. Em *S. sclerotiorum*, marcadores RAPD foram muito eficazes na identificação de diferenças genéticas entre isolados de diferentes regiões e plantas hospedeiras na China (LI *et al.*, 2009). E recentemente, Litholdo Júnior e colaboradores (2011) demonstraram baseado em análise de RAPD, alta variabilidade entre isolados de *S. Sclerotiorum* provenientes de diferentes culturas e regiões de coleta no Brasil.

Para vencer a barreira imposta pela parede celular das plantas durante o processo de invasão, o fungo *S. Sclerotiorum* produz de uma ampla e complexa variedade de enzimas líticas, como celulases, hemicelulases, xilanases, cutinases, pectinases e proteases. Sequencialmente à secreção destas enzimas líticas facilitam a penetração, colonização e maceração, e também geram uma importante fonte de nutrientes (BOLTON *et al.* 2006).

2. OBJETIVOS

O objetivo deste projeto foi avaliar a variabilidade genética em populações de *S. sclerotiorum* em sistemas irrigados cultivados com o feijoeiro comum. Para isto foram analisados os seguintes parâmetros: (1) variabilidade genética entre os isolados e/ou populações de *S. sclerotiorum* através do uso de marcadores moleculares RAPD; (2) níveis de atividade de poligalacturonases; xilanases e celulases, enzimas envolvidas no processo de interação planta-patógeno; (3) grupos de compatibilidade micelial dos isolados coletados.

3. METODOLOGIA

3.1. Crescimento dos isolados

Foram utilizados 30 isolados (Tabela 1) coletados em diferentes regiões do Brasil e em diversas áreas de produção de feijão irrigado, gentilmente cedidos pela Embrapa Arroz e Feijão. A purificação dos escleródios foi realizada em solução de álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito 1:1 por 20 segundos e lavados com água Mili-Q. Em seguida foram cultivados em meio BDA (Batata-dextrose-agar) em estufa BOD a 20°C por 5 dias. De cada isolado foi extraído o DNA conforme protocolo descrito Zolan & Pukkila (1986).

Tabela 1. – Isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* coletados em cultura de Feijoeiro em regiões do Brasil.

| N°. Ref. | Isolados | Cultura | Localização |
|-----------------|-----------------|----------------|-----------------------------|
| ss30 | GO1 | Feijão | Goiânia – GO |
| ss32 | GO2 | Feijão | Santo Antonio de Goiás – GO |
| ss39,1 | GO3 | Feijão | Formosa – GO |
| ss39,2 | GO18 | Feijão | Formosa – GO |
| ss40,0 | GO4 | Feijão | Formosa – GO |
| ss40,1 | GO5 | Feijão | Formosa – GO |
| ss40,2 | GO6 | Feijão | Formosa – GO |
| ss41,0 | GO7 | Feijão | Formosa – GO |
| ss41,1 | GO8 | Feijão | Formosa – GO |
| ss41,2 | GO9 | Feijão | Formosa – GO |
| ss41,3 | GO10 | Feijão | Formosa – GO |
| ss41,4 | GO11 | Feijão | Formosa – GO |
| ss43,0 | GO12 | Feijão | Formosa – GO |
| ss43,1 | GO13 | Feijão | Formosa – GO |
| ss43,3 | GO19 | Feijão | Formosa – GO |
| ss46,1 | MT1 | Feijão | Lucas do rio verde – MT |
| ss46,2 | MT2 | Feijão | Lucas do rio verde – MT |
| ss46,4 | MT3 | Feijão | Lucas do rio verde – MT |
| ss46,5 | MT4 | Feijão | Lucas do rio verde – MT |
| ss46,6 | MT5 | Feijão | Lucas do rio verde – MT |
| ss46,7 | MT6 | Feijão | Lucas do rio verde – MT |
| mc07 | MG1 | Feijão | Monte Carmelo – MG |
| mc08 | MG2 | Feijão | Monte Carmelo – MG |
| mc14 | MG3 | Feijão | Monte Carmelo – MG |
| mc19 | MG4 | Feijão | Monte Carmelo – MG |
| mc21 | MG5 | Feijão | Monte Carmelo – MG |
| m14 | GO14 | Feijão | Montividiu – GO |
| m24 | GO15 | Feijão | Montividiu – GO |
| m48 | GO16 | Feijão | Montividiu – GO |
| m96 | GO17 | Feijão | Montividiu – GO |

3.2. Análises da diversidade genética: RAPD (“Random amplified polymorphic DNA”)

A variabilidade genética dos isolados foi avaliada através do polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD). Para tanto, as amostras de DNA obtidas dos diferentes isolados foram processadas individualmente em reações de amplificação utilizando oligonucleotídeos, de seqüência aleatória, do sistema OPERON (Operon Biotechnology). Estas reações foram realizadas em um volume final de 25µl sendo o sistema composto de: DNA (10ng); tampão da enzima *Taq*. (500 mM KCl; 100mM Tris-HCl, pH8.4; 15mM MgCl₂); dNTP a 2.5 mM; primer (20 ng); *Taq* DNA polymerase (1 U). As reações de amplificação processadas utilizando a seguinte seqüência de reações: 98°C por 2 minutos para uma desnaturação inicial, seguidos de 30 ciclos de 92°C por 2 min, 42°C por 1 min e 72°C por 2.5 min. Sendo que no último ciclo o período de extensão final é de 72°C por 5 min. Os fragmentos foram analisados em gel de agarose 1.5% corado com brometo de ethidium (Sambrook *et al.*, 1989). O gel assim tratado foi fotografado para posterior análise. Cada isolado foi identificado quanto à presença ou ausência de bandas (fragmento de DNA amplificado) com cada oligonucleotídeo testado.

A análise da variabilidade genética foi realizada pelo agrupamento dos isolados segundo os princípios adotados em taxonomia numérica. Foi utilizado o coeficiente de similaridade de Jaccard, que permite calcular similaridades com base em variáveis binárias (0 ou 1 para a presença de bandas) (Sneath and Sokal, 1973). As unidades existentes foram agrupadas através do método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average), que é um modelo de agrupamento hierárquico, que permite a construção de dendogramas (Sneath and Sokal, 1973). Matrizes e dendogramas foram elaboradas com o auxílio do programa NTSYS-PC.

3.3. Ensaio de Atividade Enzimática

Os isolados de *S sclerotiorum* foram inoculados em 50 mL de meio mínimo (2g/L NH₄NO₃, 1g/L KH₂PO₄, 0,1g/L MgSO₄ 7H₂O; 0,5g/L extrato de levedura, 3g/L ácido D-málico e 1g/L NaOH) suplementado com 1% de extrato de parede celular de plantas de feijoeiro, e mantidos a 20°C com agitação a 120 rpm por 72 horas. Após o crescimento, o micélio foi filtrado a vácuo e o sobrenadante da cultura utilizado para a dosagem da atividade enzimática.

A atividade da enzima β-1,3-glucanase foi determinada por medida da liberação de glicose a partir da laminarina, usada como substrato, como descrito por Boller (1993). A atividade de poligalacturonase foi determinada através da quantificação dos grupos redutores liberados da solução de pectina. Para determinação da atividade de Xilanases foi utilizada a metodologia

citado por Macdonald & Odds (1980). A atividade de Celulases foi determinada medindo-se a quantidade de açúcar redutor liberado após incubação das amostras com Carboxi-Metil Celulose (CMC) (Sigma Chemical Company). O teor de açúcares redutores livres presentes nos sobrenadantes foi determinado pelo método do DNS (MILLER, 1959). Os testes foram feitos em triplicata, sendo adaptados para reações em placas de 96 poços, os ensaios foram feitos em termociclador e as absorbâncias a 550 nm foram obtidas em leitor de ELISA. A quantificação das proteínas totais foi feita utilizando o método de Bradford (1976).

3.4. Grupos de Compatibilidade Micelial

Os grupos de compatibilidade micelial entre os isolados de *S. sclerotiorum* foram determinados pelo método descrito por Kohn e colaboradores (1990). Os isolados foram pareados em meio BDA contendo 30 gotas / L de corante alimentício. Os pares de isolados foram avaliados após 4 dias de crescimento a 20°C. As reações compatíveis foram consideradas quando as duas colônias foram fundidas em um crescimento contínuo. Reações incompatíveis foram consideradas quando houver a formação de uma linha de reação entre as duas colônias.

4. RESULTADOS.

4.1. Variabilidade Genética.

Para a determinação da variabilidade genética foram testados 7 oligonucleotídeos do sistema Operon (OPC 02; OPC 10/OPC04; OPC20/OPE 04; OPE06/OPE09; OPE 09/OPE 17; OPC13/OPE10), destes somente um (OPC13/OPE10) não apresentaram produto de amplificação. Baseado na análise destes marcadores gerados foi observado um elevado número de bandas monomórficas. De acordo com o coeficiente de similaridade de Jaccard, um elevado grau de diversidade foi observado entre os isolados, variando de 68% a 100%, sendo os isolados GO9 e GO11 os mais próximos entre si com 100% de similaridade. A análise de agrupamento (UPGMA) ao nível de 76% distribuiu os isolados em quatro grupos (Figura 1). Os grupos III e IV apresentaram um menor número, com 3 e 2 isolados respectivamente. O grupo 2 foi o que apresentou maior número de indivíduos, com 15 isolados e média de similaridade de aproximadamente 77%.

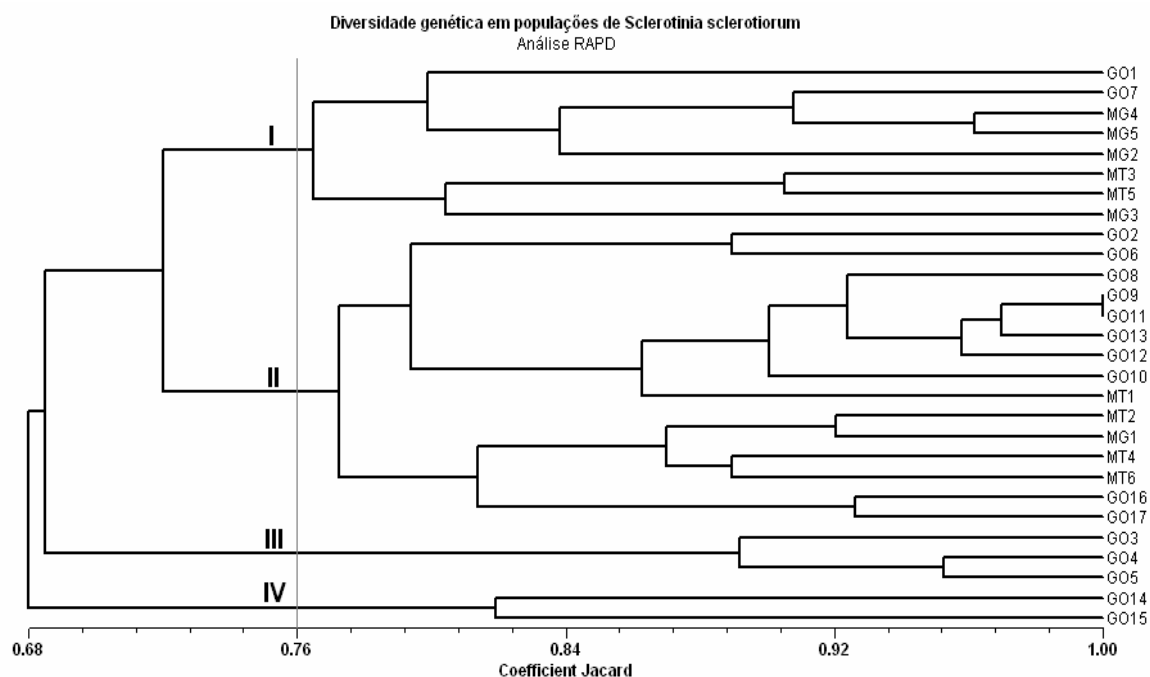


Figura 1. Diversidade genética em populações de *S. sclerotiorum*. Dendograma dos 28 isolados de *S. sclerotiorum* baseado no polimorfismo de DNA amplificado.

A análise dos dados sugere uma tendência para a formação de grupos com isolados da mesma região como, por exemplo, os grupos III e IV, onde foram observados isolados provenientes de Goiás. Entretanto, apesar desta tendência, os grupos I e II foram constituídos de isolados de diferentes regiões (Figura 1).

4.2. Atividades de enzimas envolvidas no processo de invasão.

Foram detectadas atividades para todas as enzimas testadas, indicando que mesmo em sistema de indução *in vitro*, simulando o processo de invasão, ocorre a secreção de enzimas envolvidas na degradação dos componentes da parede celular da planta hospedeira.

Os resultados obtidos demonstraram que as enzimas Poligalacturonases, β -1,4 glucanases e Xilanases apresentaram maior variação nos índices de atividade observados entre os isolados analisados (Figura 2). Não foi observado tendência nas atividades em relação ao local de coleta dos isolados.

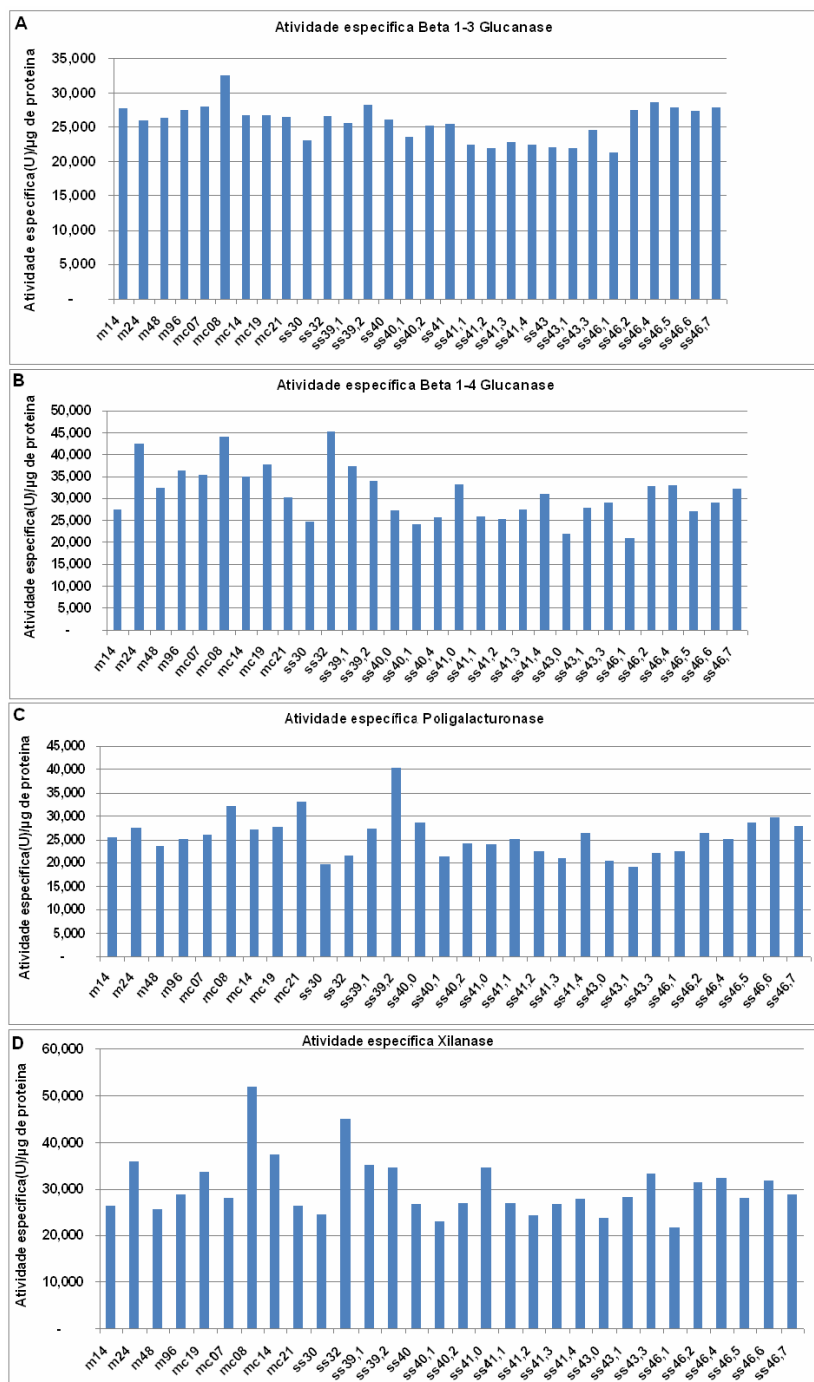


Figura 2- Atividade enzimática em sobrenadante de cultura de *S. Sclerotiorum*. Isolados de *S. Sclerotiorum* provenientes da cultura de feijoeiro foram crescidos em meio mínimo suplementado com 1% de parede de feijoeiro como fonte de carbono. A atividade das enzimas (A) Beta 1-3 Glucanase; (B) Beta 1-4 Glucanase; (C) Poligalacturonase e (D) Xilanase foram determinadas como descrito em Material e métodos.

4.3. Grupos de Compatibilidade Micelial

Os isolados de *S. Sclerotiorum* utilizados neste estudo foram distribuídos em oito grupos de compatibilidade micelial (Tabela 2) baseados na presença ou ausência de uma linha de confronto (Figura 3). Dentre estes GCM foi obtido apenas um grupo apresentando maior número de isolados, GCM1 com 8 isolados e os demais foram constituídos de cinco a um isolado.

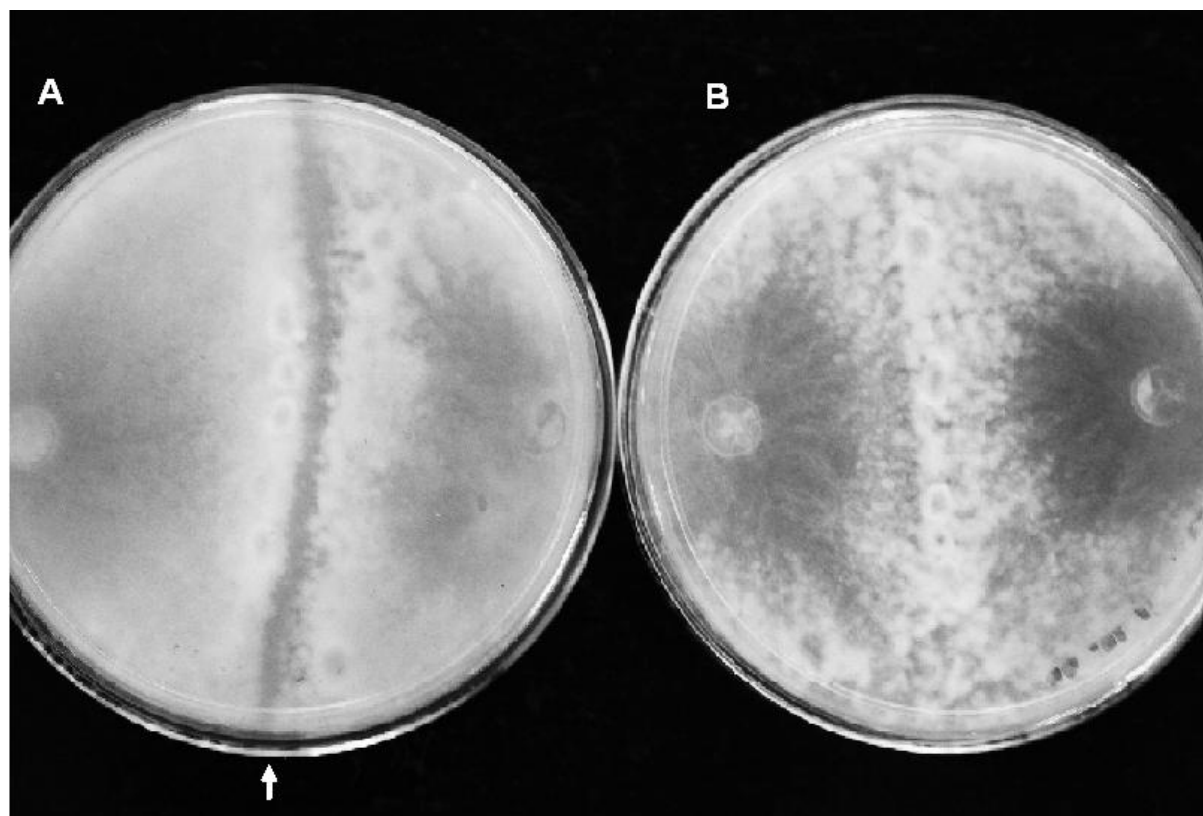


Figura 3. Determinação de grupos de compatibilidade micelial em isolados de *S. sclerotiorum*. (A): isolados incompatíveis. (B): Isolados compatíveis. MCGs foram determinados usando a metodologia descrita por Kohn *et al.* (1990).

Tabela 2. Grupos de Compatibilidade Micelial de isolados de *S. sclerotiorum*.

| Nome do Grupo | Isolados pertencentes ao grupo |
|---------------|---|
| GCM1 | GO10; MT6; GO4; MG1;GO18 MT4; GO3; GO5; |
| GCM2 | GO13; GO7; GO8 |
| GCM3 | GO19; GO12 |
| GCM4 | MT2; GO15; MT1; GO17; GO16 |
| GCM5 | MT3; GO9; MT5; GO11 |
| GCM6 | MG4; MG5; GO6 |
| GCM7 | MG2; MG3 |
| GCM8 | GO14 |

Os grupos de compatibilidade micelial se mostraram heterogêneos em relação à sua localização de origem dos isolados (Tabela 2). Como por exemplo, no GCM1 onde foram agrupados isolados provenientes de Formosa – Goiás, Lucas de Rio Verde – Mato Grosso e Monte Carmelo – Minas Gerais.

5. DISCUSSÃO

De acordo com os marcadores RAPD, uma elevada variabilidade genética foi observada em populações de *S. Sclerotiorum* provenientes da cultura de feijoeiro. Corroborando com esses dados, marcadores RAPD foram muito eficazes na identificação de vários níveis de diversidade genética em cinco populações de *S. Sclerotiorum* provenientes de três Países (China, Canada e Inglaterra) (LI *et al.*, 2009). Também neste sentido, recentemente em nosso grupo de pesquisa, Litholdo Júnior e colaboradores (2011) utilizando esta mesma técnica observaram elevada variabilidade entre isolados de *S. Sclerotiorum* provenientes de diferentes culturas e regiões de coleta no Brasil. Outros trabalhos utilizando marcadores microssatélite, também tem demonstrado a ocorrência de variabilidade genética entre populações de *S. Sclerotiorum* em diferentes culturas, como batata (ATALAH *et al.*, 2004), alface (MALVAREZ *et al.*, 2007) e canola (SEXTON & HOWLETT, 2004; ARBAOUI *et al.*, 2008). A análise das atividades das enzimas Beta 1-3 glucanase; Beta 1-4 glucanase; poligalacturonase e xilanase envolvidas no processo de invasão, demonstrou variações que podem estar associadas a diferentes níveis de agressividade dos isolados. A associação dessas enzimas entre si, confere ao fungo a habilidade de degradação da parede celular da planta hospedeira para sua invasão com maior facilidade e eficiência (OLFA, 2006). Não foi observado nenhuma tendência entre o nível de atividade enzimática e local de coleta dos isolados ou grupo de compatibilidade micelial. Até o presente momento, este é o primeiro relato da atividade dessas enzimas, relacionadas ao processo de invasão do fungo *S. Sclerotiorum*, em sistema de indução com parede de plantas de feijoeiro.

Assim como o apresentado, outros trabalhos realizados na Austrália com isolados provenientes da cultura de canola também demonstraram um pequeno número de grupos de compatibilidade micelial (SEXTON & HOWLETT, 2004), este fator também foi observado no Estado da Califórnia em culturas de alface (WU *et al.*, 2006). No entanto, houve trabalhos realizados no Estado de Washington em cultivares de batata e na Carolina do Norte em cultivares de repolho que demonstraram um alto número de grupos de compatibilidade micelial entre seus isolados (ATALAH *et al.*, 2004; CUBETA *et al.*, 1997). Não houve um agrupamento exclusivo dos isolados em GCMs em relação ao local de coleta, mesmo se

tratando de coletas em um hospedeiros específicos, e estes dados foram também observados nos trabalhos citados.

A elevada variabilidade genética observada neste estudo, assim como o pequeno número de grupos de compatibilidade micelial, sugerem que além da reprodução clonal, a ocorrência de reprodução sexuada com trocas de informação genética entre os isolados. Outros trabalhos demonstraram elevada variabilidade genética e sua relação com a provável ocorrência de reprodução sexuada em populações de *S. Sclerotiorum* (CUBETA *et al*, 1997; KOHLI & KOHN, 1998; CARPENTER *et al*, 1999; ATALAH *et al.*, 2004; MALVAREZ *et al*, 2007; ARBAOUI *et al*, 2008).

6. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos neste trabalho, concluímos que:

1. Elevada variabilidade genética foi observada entre os isolados de *S. sclerotiorum* provenientes da cultura de feijoeiro;
2. Os marcadores gerados pela técnica de RAPD foram eficientes para estimar a variabilidade em populações deste patógeno;
3. Um baixo número de grupos de compatibilidade micelial foi observado, em detrimento da elevada variabilidade genética nesta população;
4. Todos os isolados analisados apresentaram atividade para as enzimas hidrolíticas (Beta 1-3 glucanase; Beta 1-4 glucanase; poligalacturonase e xilanase) quando na indução com parede celular de feijoeiro.

7 REFERÊNCIAS

- ARBAOUI M, KRAIC J, HUSZAR J. Genetic variation of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from different conditions. **Pol'nohospodárstvo** 54:36-39, 2008.
- ATALLAH, Z. K., LARGET, B., CHEN, X., AND JOHNSON, D. A.. High genetic diversity, phenotypic uniformity, and evidence of outcrossing in *Sclerotinia sclerotiorum* in the Columbia Basin of Washington State. **Phytopathology** 94:737-742, 2004.
- AUCLAIR J, BOLAND GJ, KOHN LM, RAJCAN I. Genetic interactions between *Glycine max* and *Sclerotinia sclerotiorum* using a straw inoculation method. **Plant Dis** 88:891-895, 2004.

- BOLTON, M.D.; THOMMA, B.P.H.J.; NELSON, B.D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Mol Plant Pathol.** 7:1–16, 2006.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 248-254, 1976.
- LITHOLDO JÚNIOR, C.G.; GOMES, E.V.; LOBO JÚNIOR, M.; NASSER, L.C.B.; PETROFEZA, S. Genetic diversity and mycelial compatibility groups of the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* in Brazil. **Genetics and Molecular Research.** 10(2):868-877, 2011
- CARPENTER, M. A.; FRAMPTON, C.; STEWART, A. Genetic variation in New Zealand populations of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science,** 27:13 – 21. 1999
- CUBETA, M.A.; CODY, B.R.; KOHLI, Y.; KOHN, L. M.; Clonality in *Sclerotinia sclerotiorum* on infected cabbage in Eastern North Carolina. **Phytopathology** 87:1000-1004, 1997.
- HEGEDUS, D.D.; RIMMER, S.R. *Sclerotinia sclerotiorum*: When “to be or not to be” a pathogen?. **FEMS microbiology Letters** 251: 177-184, 2005.
- KOHLI, Y.; KOHN, L.M. Detection of random association among loci in clonal populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Genetics and Biology.** v. 23, p. 139-149, 1998.
- KOHN, L., CARBONE, I. and ANDESON, J. Mycelia interaction in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Exp. Mycol.** 14:255-267, 1990.
- LI, Z.; WANG, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, J.; FERNANDO, W.G.D. Genetic diversity and differentiation of *Sclerotinia sclerotiorum* populations in sunflower. **Phytoparasitica** 37:77-85, 2009.
- MALVÁREZ M, CARBONE I, GRÜNWARD NJ, SUBBARAO KV, SCHAFER M and KOHN LM. New populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from lettuce in California and peas and lentils in Washington. **Phytopathology** 97:470-483, 2007.

- MILLER G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** (31):426-428, 1956.
- OLFA, E.; MONDHER, M.;ISSAM, S.; FERID, L.; NEJIB, M. M. Induction, properties and application of xylanase activity from *sclerotinia sclerotiorum* s2 fungus. **Journal of Food Biochemistry** 31: 96–107, 2007.
- SCHAFFER, M.R.; KOHN, L.M. An optimized method for mycelial compatibility testing in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Mycologia** 98: 593-597, 2006
- SEXTON A.C. & HOWLETT, B.J. Microsatellite markers reveal genetic differentiation among populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from Australian canola fields. **Curr Genet** 46: 357–365, 2004.
- WILLIAMS, J.G., 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 Res.**, 18:6531-6535, 1990.
- WU, B. M., AND SUBBARAO, K. V. Analyses of lettuce drop incidence and population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor*. **Phytopathology** 96:1322-1329, 2006.
- ZOLAN, M. PUKKILA, P. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. **Mol. Cell Biol.** 6:195-200, 1986