

CARACTERIZAÇÃO ISOENZIMÁTICA DE ESPÉCIES DE *Oidium*

MARIA D. D. SILVA¹, ACELINO C. ALFENAS², LUIZ A. MAFFIA², EDIVAL A. V. ZAUZA²

¹Departamento de Engenharia Florestal, ²Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, MG, e-mail: aalfenas@mail.ufv.br

(Aceito para publicação em 03/03/2002)

Autor para correspondência: Acelino C. Alfenas

SILVA, M.D.D., ALFENAS, A.C., MAFFIA, L.A. & ZAUZA, E.A.V. Caracterização izoenzimática de espécies de *Oidium*. Fitopatologia Brasileira 27:303-305. 2002.

RESUMO

Isolados de *Oidium* oriundos de eucalipto (*Eucalyptus urophylla*) roseira (*Rosa* sp.), dália (*Dhalia* sp.), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) e urucunzeiro (*Bixa orellana*) foram comparados mediante técnicas de extração e eletroforese de isoenzimas, em gel de amido. Dentre 19 enzimas testadas, fosfatase ácida, enzima málica, α -esterase, 6-fosfogluconato desidrogenase, fosfogluose isomerase, hexoquinase e malato desidrogenase ofereceram atividade e resolução satisfatórias. Os isolados do patógeno oriundos de

eucalipto e de roseira apresentaram um mesmo padrão de bandas com coeficiente de similaridade igual a 100%. Os demais isolados diferiram entre si e exibiram coeficiente de similaridade inferior a 43%. Os isolados obtidos de eucalipto e de roseira, além de morfologicamente similares, apresentaram um mesmo padrão isoenzimático sendo, portanto, anamorfos de *Sphaerotheca pannosa*.

Palavras-chave adicionais: eucalyptus, isoenzimas, isozimas.

ABSTRACT

Isozyme characterization of *Oidium* species

Isolates of *Oidium* spp. obtained from eucalyptus (*Eucalyptus urophylla*), *Rosa* sp., *Dhalia* sp., common bean (*Phaseolus vulgaris*) and *Bixa orellana* were compared by isozyme analysis on starch gel electrophoresis. Among 19 enzymes tested, acid phosphatase, malic enzyme, α -esterase, 6-phosphogluconate

dehydrogenase, phosphoglucose isomerase, hexokinase, and malate dehydrogenase showed reproducible and distinct isozyme banding patterns. Based on isozyme analysis, the *Oidium* isolate from eucalypt showed identical profiles to that of rose and, therefore, was identified as anamorphs of *Sphaerotheca pannosa*.

Na ausência da fase teleomórfica, a identificação de espécies de *Oidium* baseia-se em caracteres da fase anamórfica (Braun, 1987) e, a exemplo de outros fungos, pode ser auxiliada pela análise eletroforética de isoenzimas (Micales *et al.*, 1998). Assim, neste trabalho, ajustaram-se as técnicas de extração e eletroforese de isoenzimas, em gel de amido, para a comparação de isolados de *Oidium* oriundos de eucalipto (*Eucalyptus urophylla*), roseira (*Rosa* sp.), dália (*Dhalia* sp.), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e urucunzeiro (*Bixa orellana* L.), utilizando-se a metodologia descrita por Alfenas *et al.* (1998a e b).

Para multiplicação dos isolados nos seus respectivos hospedeiros, mudas com infecção natural, em casa de vegetação, tiveram suas folhas e brotações jovens lavadas em água destilada, a fim de remover os esporos previamente formados. Após quatro a cinco dias de incubação a 20 °C (\pm 1 °C), 80 % de umidade relativa e fotoperíodo de 12 h intermitente de luz, os conídios produzidos foram macerados em solução tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 6,8. Após centrifugação, embebeu-se o sobrenadante em tiras de papel cromatográfico, as quais foram armazenadas a -80 °C para

uso posterior. A eletroforese foi conduzida em géis de amido hidrolisado a 13%, empregando-se os sistemas-tampão gel/ eletrodo nº 8, 19 e 26, descritos por Alfenas & Brune (1998b), e os géis foram corados para detecção da atividade e resolução de 19 enzimas (Brune *et al.*, 1998). Dentre as enzimas testadas, fosfatase ácida (ACP) (E.C. 3.1.3.2), enzima málica (ME) (E.C. 1.1.1.40), α -esterase (EST) (E.C. 3.1.1.1), 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) (E.C.1.1.1.44), fosfogluose isomerase (PGI) (E.C. 5.3.1.9), hexoquinase (HK) (E.C. 2.7.1.1) e malato desidrogenase (MDH) (E.C. 1.1.1.37) ofereceram atividade e resolução satisfatórias (Figura 1), ainda que as bandas fossem de baixa intensidade não permitindo a documentação por fotografia. Deste modo, optou-se pela apresentação dos dados por meio de esquemas para servir como base em futuros estudos. Em geral, esporos não germinados rendem extratos protéicos com baixa atividade enzimática (Micales *et al.*, 1998). O coeficiente de similaridade (Cs) entre os isolados foi estimado pela seguinte equação (Dias, 1998):

$$C_s = \frac{N^\circ \text{ bandas comuns} \times 100}{N^\circ \text{ bandas totais}}$$

Os isolados oriundos de eucalipto e de roseira apresentaram um mesmo padrão de bandas (Figura 1) com Cs de 100%, enquanto os demais diferiram entre si com Cs inferior a 43% (Tabela 1). Segundo caracterização morfológica e testes de patogenicidade (Silva & Alfenas, 1994), os isolados de *Oidium* obtidos de eucalipto e roseira também não diferem entre si.

Baseado nos resultados aqui obtidos, conclui-se que, na ausência da fase teleomórfica, a análise de isoenzimas pode ser útil na identificação de espécies de *Oidium*. Os isolados de *Oidium* obtidos de eucalipto e de roseira além de morfologicamente similares, apresentaram um mesmo padrão isoenzimático sendo, provavelmente, anamorfos de *Sphaerotheca pannosa* (Wallr. ex. Fries) Lév.

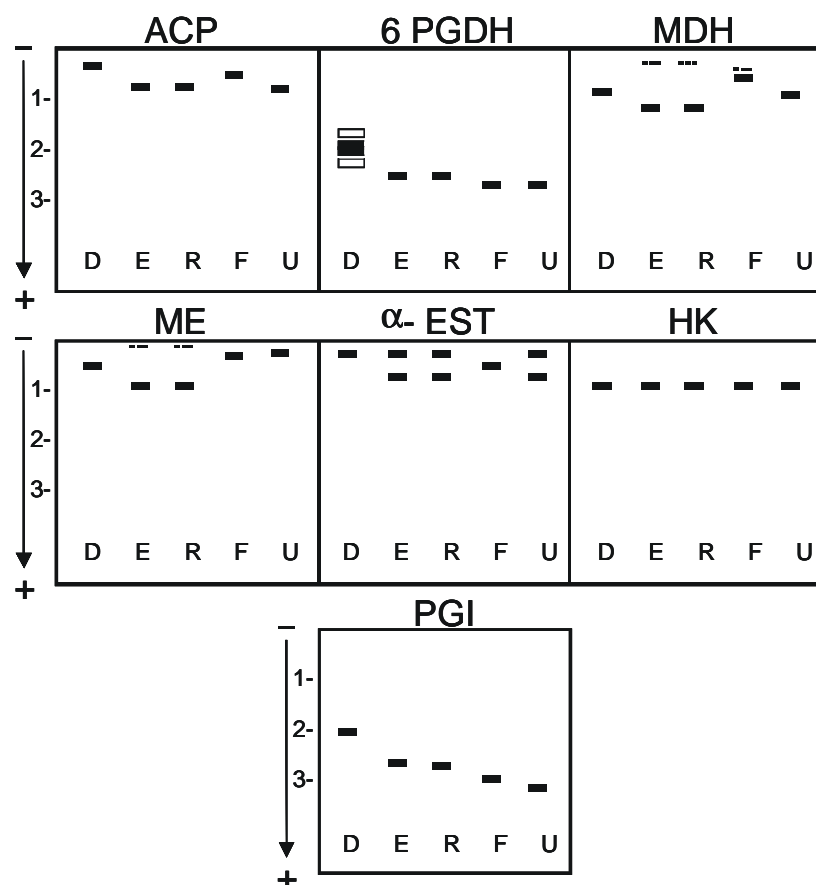


FIG. 1 - Fenótipos isoenzimáticos de fosfatase ácida (ACP), 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH), malato desidrogenase (MDH), enzima málica (ME), α -esterase (EST), hexoquinase (HK) e fosfoglucose isomerase (PGI) dos isolados de *Oidium* obtidos de : D=Dália (*Dhalia* sp.), E=Eucalipto (*Eucalyptus urophylla*), R=Roseira (*Rosa* sp), F=Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) e U=Urucunzeiro (*Bixa orellana*), em gel de amido. As linhas tracejadas representam bandas com baixa atividade.

TABELA 1 - Coeficiente de similaridade (Cs) médio (%)¹, quanto aos padrões isoenzimáticos de *Oidium* sp. entre os isolados estudados

Origem do isolado	Dália	Eucalipto	Roseira	Feijoeiro	Urucunzeiro
Dália	-				
Eucalipto	21,4	-			
Roseira	21,4	100	-		
Feijoeiro	14,3	14,3	14,3	-	
Urucunzeiro	35,7	42,9	42,9	42,9	-

Cs = $\frac{\text{N}^\circ \text{ bandas comuns}}{\text{N}^\circ \text{ bandas totais}} \times 100$ (Dias, 1998)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C., BRUNE, W., OLIVEIRA, J.R., KUNIEDA, S. & SCORTICHINI, M. Extração de proteínas para eletroforese. In: Alfenas, A.C. (Ed.) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV. 1998. pp. 85-113.
- ALFENAS, A.C. & BRUNE, W. Eletroforese em gel de amido. In: Alfenas, A.C. (Ed.) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV. 1998. pp. 115-148.
- BRAUN, U. A monograph of the Erysiphales (Powdery Mildews).

- Berlin, J. Cramer. 1987.
- BRUNE, W., ALFENAS, A.C. & JUNGHANS, T.G. Identificação específicas de enzimas em géis. In: Alfenas, A.C. (Ed.) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV. 1998. pp. 201-317.
- DIAS, L.A.S. Análises multidimensionais. In: Alfenas, A.C. (Ed.) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV. 1998. pp. 405-473.
- MICALES, J.A., ALFENAS, A.C. & BONDE, M.R. Isoenzimas na taxonomia e na genética de fungos. In: Alfenas, A.C. (Ed.) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV. 1998. pp. 477-502.
- SILVA, M.D.D. & ALFENAS, A.C. Identificação de *Oidium* originário do eucalipto, feijoeiro e urucunzeiro e influência de fatores do ambiente na germinação de conídios de *Sphaerotheca pannosa*. Fitopatologia Brasileira 19:292. 1994.