

ANÁLISE DE PROTEÍNAS E ISOENZIMAS DE ISOLADOS DE *Rhizoctonia* spp. PATOGENICOS A *Eucalyptus**

SILVALDO F. SILVEIRA¹ & ACELINO C. ALFENAS²

¹Laboratório de Proteção de Plantas, Universidade Estadual do Norte Fluminense, CEP 28015-620, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil, fax (24) 2726 3873, e-mail: silvaldo@uenf.br; ²Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36.571-000, Viçosa, MG

(Aceito para publicação em 26/10/2001)

Autor para correspondência: Silvaldo Felipe da Silveira

SILVEIRA, S.F. & ALFENAS, A.C. Análise de proteínas e isoenzimas de isolados de *Rhizoctonia* spp. patogênicos a *Eucalyptus*. Fitopatologia Brasileira 27:033-041. 2002.

RESUMO

Objetivou-se caracterizar isolados de *Rhizoctonia solani* AG1 e AG4 e isolados binucleados de *Rhizoctonia* spp. patogênicos a *Eucalyptus*, por meio de eletroforese de proteínas, em gel de poliacrilamida, e de isoenzimas (ACP, 6-PGDH, LAP, SOD, MDH e IDH), em gel de amido. Para comparação, incluíram-se alguns isolados brasileiros de outros hospedeiros e isolados-padrões de *R. solani* AG1, procedentes do Japão. Observaram-se diferenças nos padrões gerais de proteínas e nos fenótipos isoenzimáticos entre isolados binucleados e multinucleados e entre isolados de diferentes grupos e subgrupos de anastomose. Isolados de *R. solani* AG1, procedentes do Brasil e Japão, apresentaram baixa similaridade nos padrões de

proteínas e de isoenzimas. Isolados brasileiros morfologicamente semelhantes a *R. solani* AG1-IB (microesclerodiais) apresentaram padrões de proteínas similares e um maior número de fenótipos isoenzimáticos idênticos entre si. Esta tendência foi independente do hospedeiro e da origem geográfica. Variações nos padrões de proteínas e de isoenzimas foram também observadas dentre isolados brasileiros de *R. solani* AG4. Discute-se o uso da eletroforese de proteínas e isoenzimas na caracterização de isolados de *Rhizoctonia* spp. e em estudos genéticos e filogenéticos de fungos deste gênero.

Palavras-chave adicionais: *Rhizoctonia solani*, eletroforese de proteínas, gel de amido.

ABSTRACT

Protein and isozyme analysis of isolates of *Rhizoctonia* spp. pathogenic to *Eucalyptus*

Isolates of *Rhizoctonia solani* (anastomosis groups AG1 and AG4) and binucleate isolates of other unidentified species, all pathogenic to *Eucalyptus* in Brazil, were characterized by protein and isozyme (ACP, 6-PGDH, LAP, SOD, MDH e IDH) analysis. Japanese strains of *R. solani* AG1 and other Brazilian isolates from other hosts were also included for comparison. Differences in protein patterns and isozyme phenotypes were observed between binucleate and multinucleate isolates, and among isolates of different anastomosis groups and subgroups. The protein patterns and isozyme phenotypes of Japanese isolates of *R. solani*

AG1 differed from those of Brazilian isolates of the same anastomosis groups and the same morphological subgroups. Some Brazilian isolates morphologically similar to *R. solani* AG1-IB presented high similarity in protein patterns and isozyme phenotypes. This similarity was independent of the host plant and geographical origin. Polymorphisms in protein and isozyme patterns were also observed within the Brazilian *R. solani* AG4 group. We discuss the usefulness of protein and isozyme analyses for characterization of *Rhizoctonia* spp. isolates and for genetic and phylogenetic studies of fungi of this genus.

INTRODUÇÃO

O gênero *Rhizoctonia* (DeCandolle) inclui fungos agomicetos provenientes do solo e que produzem escleródios indiferenciados (não constituídos internamente por camadas de células especializadas). Muitas espécies de *Rhizoctonia* constituem fitopatógenos, algumas das quais apresentam ampla gama de espécies hospedeiras (Sneh *et al.*, 1991). Relatos sobre isolados de *Rhizoctonia*, fitopatogênicos ou saprofíticos, não descritos em nível específico, são comuns na literatura devido às dificuldades na identificação impostas

por limitações morfológicas e taxonômicas do gênero, tais como: (i) ausência de esporos assexuais, (ii) instabilidade na morfologia de culturas e escleródios, em função de variações nas condições de cultivo (Parmeter & Whitney, 1970), (iii) ampla variabilidade morfológica, sendo que há espécies constituídas por diferentes grupos de isolados com afinidade para efetuar anastomose de hifas entre si (Ogoshi, 1987), (iv) necessidade de métodos específicos para se induzir estruturas basidiais *in vitro* (Carling & Sumner, 1992) e (v) desconhecimento dos teleomorfos para algumas espécies anamórficas (Stalpers & Andersen, 1996). Marcadores moleculares e bioquímicos complementam a identificação e a caracterização de isolados de *Rhizoctonia* (Hall, 1973; Sneh *et al.*, 1991; Vilgalys & Cubeta, 1994). Vários estudos

* Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor. Universidade Federal de Viçosa. (1996)

demonstraram o potencial da eletroforese de proteínas e isoenzimas na caracterização de grupos de anastomose em *Rhizoctonia* spp. (Reynolds *et al.*, 1983; Liu *et al.*, 1990; Liu & Sinclair, 1992; Liu & Sinclair, 1993; Liu *et al.*, 1993).

No Brasil, em viveiros de propagação clonal de eucalipto (*Eucalyptus* spp. L'Hérit), verificou-se que diferentes isolados de *Rhizoctonia solani* (Kühn), pertencentes aos grupos de anastomose de hifas AG1 e AG4, bem como isolados binucleados de *Rhizoctonia* spp. são capazes de induzir a mela das estacas, durante a fase de enraizamento (Silveira *et al.*, 2000). *R. solani* AG1 foi o agente causal predominante nos isolamentos a partir de estacas com sintomas de mela e de plantas no campo e no jardim-clonal, durante epidemias severas de queima foliar, em Ipatinga (MG) e em Aracruz (ES). Isolados de *Rhizoctonia solani* AG4 e isolados binucleados de *Rhizoctonia* spp., originários de eucalipto, foram igualmente virulentos a estacas e causaram tombamento de plântulas de *Eucalyptus*. O insucesso na indução da esporulação impossibilitou a identificação específica de teleomorfos binucleados (Silveira *et al.*, 2000). A caracterização dos isolados de *R. solani* AG1 e AG4, em nível de subgrupos de anastomose (Ogoshi, 1987), utilizando para comparação culturas-padrões de grupos de anastomose de hifas de *R. solani*, originárias do Japão, foi dificultada pela alta variabilidade morfológica apresentada pelos isolados multinucleados (Silveira *et al.*, 2000). Com o objetivo de se complementar a caracterização prévia, baseada em características morfológicas, número de núcleos nas células de hifas vegetativas e anastomose de hifas, propôs-se, neste trabalho, comparar padrões de proteínas e isoenzimas de isolados de *Rhizoctonia* spp. patogênicos a *Eucalyptus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Padronização das condições de cultivo e produção do micélio

Para que a extração de proteínas fosse feita a partir de culturas em fase de crescimento ativo, curvas de crescimento micelial (peso seco) em meio líquido semi-sintético [10 g sacarose; 2 g L-asparagina; 2 g extrato de levedura; 1 g KH_2PO_4 ; 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,44 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,48 mg FeCl_3 ; 0,36 mg $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; água destilada q.s.p. 1 l; pH 5,3 com NaOH (Alfenas *et al.*, 1998)] foram determinadas para quatro isolados que apresentaram taxas diferenciais de crescimento radial em meio de batata-dextrose-ágar (BDA). Para isso, transferiu-se um fragmento de cultura ativa em BDA para 50 ml de meio Líquido semi-sintético, em frascos Erlenmeyers de 125 ml de capacidade. Incubou-se por quatro dias, a 25 °C, sob escuro contínuo e sem agitação. Durante a coleta da massa micelial, por filtragem sob vácuo, o micélio foi lavado com jatos de água destilada. Removeu-se o excesso de água por prensagem da massa micelial entre papel-filtro. Para se obter massa micelial suficiente para extração de proteínas, o número de culturas em meio líquido (frascos) por isolado variou de dois até cinco, em função da velocidade de crescimento do isolado.

Extração de proteínas e eletroforese em gel de poliacrilamida

A produção de massa micelial em meio líquido, a extração de proteínas de cada isolado e os ensaios eletroforéticos foram repetidos por duas vezes. No preparo das amostras para eletroforese em gel de poliacrilamida empregou-se o método de Reynolds *et al.* (1983), modificado. Amostras de 0,8 g de micélio fresco foram trituradas em 4 ml de tampão (Tris-HCl 0,62 M - pH 6,8), com o auxílio de homogeneizador Polytron (Brinkman Instruments®), por 3 min, na presença de N_2 líquido. Após 12 h, em geladeira (4 °C), o macerado foi centrifugado a 20.000 g, a 4 °C por 30 min. O sobrenadante foi precipitado por adição de igual volume de ácido tricloroacético (TCA) 7,5% (p/v em água destilada) e, em seguida, centrifugado a 20.000 g por 15 min. Foram efetuadas duas lavagens consecutivas do precipitado protéico em 1 ml de acetona, seguidas por centrifugação a 20.000 g/15 min e descarte da acetona. Após 4 h em ambiente aberto, para permitir a evaporação da acetona, o pó de proteína foi pesado e suspenso em tampão da amostra (Tris-HCl 0,06 M - pH 6,8, glicerol 20%, SDS 2%, 2- β -mercaptoetanol 2% e azul de bromofenol 0,005%), na proporção de 2 mg/ml. A desnaturação de proteínas foi concluída em banho-maria, a 100 °C, por 3 min. Em cada cavidade do gel (poliacrilamida 10%, espessura 1,2 mm) foram aplicados 50 μl de amostra, equivalentes a 100 μg de proteína/cavidade. Após eletroforese, os géis foram corados em solução aquosa de azul de Comassie 1%, fixados e secos entre papel celofane e fotoarquivados em processador Stratagene (Eagleeye II®) (Alfenas & Brune, 1998).

Extração de proteínas e eletroforese de isoenzimas em gel de amido

Como para a eletroforese em gel de poliacrilamida, a produção da massa micelial, a extração de proteínas e os ensaios eletroforéticos foram repetidos por duas vezes. Na segunda vez, para confirmação dos padrões obtidos no primeiro ensaio, todos os isolados foram repicados a partir de pontas de hifas para produção da massa micelial. O número de culturas em meio líquido (frascos) variou com a velocidade de crescimento dos isolados, para obtenção de massa micelial em quantidade suficiente para a extração de proteínas. Para a extração de enzimas, 200 mg do micélio de cada isolado foram triturados em almofariz pré-congelado, em 1 ml do tampão de extração de Liu *et al.* (1990), contendo polivinilpirrolidone (PVP = 40.000 PM), a 100 mg / ml de tampão. O extrato protéico foi embebido em tiras (1,2 x 0,5 cm) de papel cromatográfico, as quais foram armazenadas em tubos Eppendorf® de 1,5 ml, a -80 °C, por até 30 dias após extração. As sobras do micélio produzido, envoltas em papel-alumínio, foram mantidas em "deep-freezer", a -80 °C, para uso posterior. Nesta condição, não houve perda de atividade para a maioria das enzimas testadas, mesmo após um ano de armazenamento da massa micelial (dados não apresentados). Avaliaram-se, preliminarmente, a atividade e a resolução de 22 enzimas, de acordo com o sistema-tampão gel/eletrodo

(dados não apresentados). As seguintes combinações de enzimas e sistemas de tampão gel-eletródos foram selecionadas: fosfatase ácida - ACP (E.C. 3.1.3.2.), 6-fosfogluconato desidrogenase - G6PDH (E.C. 1.1.1.44) e isocitrato desidrogenase - IDH (E.C.1.1.1.42), no Sistema de Soltis *et al.* (1983) [tampão do eletrodo = Tris-base 0,223 M, ácido cítrico 0,086 M, pH 7,5 com NaOH 1N e gel = tampão do eletrodo a 3,5% (p/v), pH 7,5, amido a 14% p/v]; leucina-amino peptidase -LAP (E.C. 3.4.11.1) e super-óxido dismutase - SOD (E.C. 1.15.1.1) no Sistema de Ridgway *et al.* (1970) [tampão do eletrodo = Tris-base 0,5 M, ácido bórico 0,65 M, NaEDTA 0,02 M, pH 8,1 e gel = tampão do eletrodo diluído 1:10, amido a 13% (p/v)] e malato desidrogenase - MDH (E.C. 1.1.1.37) no Sistema de Micales *et al.* (1986) [tampão do eletrodo = ácido cítrico 0,04 M, pH 6,1 com morfolina, gel = tampão do eletrodo diluído 1:20, pH 7,1 com morfolina, sacarose a 3%, amido a 13% (p/v)]. Os protocolos para preparo, revelação de atividade enzimática e fixação dos géis foram como descritos por Alfenas & Brune (1998). Após coloração, os géis foram lavados por uma vez em água de torneira e por até quatro vezes em água destilada. Logo em seguida, os géis foram fotoarquivados, fixados e secos entre lâminas de papel-celofane.

Análise dos resultados

Os padrões de proteínas totais foram comparados aos pares, identificando-se as bandas conforme migração relativa (%) à banda mais comum, designada banda 100, de 22,4 kDa, conforme Reynolds *et al.* (1983). Para isoenzimas, análises comparativas foram realizadas com base na similaridade de bandas (número de bandas comuns/ número de bandas comuns + número de bandas distintas) e identidade fenotípica (número de fenótipos idênticos / número de enzimas testadas) entre os isolados. A partir das matrizes de similaridade e de identidade fenotípica, foram realizadas análises de agrupamento pelo método de ligações simples, no programa SAEG (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas - Euclides, 1983).

RESULTADOS

Proteínas Totais

Os isolados japoneses de *R. solani* AG1 apresentaram crescimento vagaroso, nas condições de cultivo utilizadas (dados não apresentados). Mesmo mantendo-se a proporção de micélio em tampão de extração, a menor disponibilidade de massa micelial dificultou os procedimentos de extração de proteínas desses isolados. Independente disso, os padrões de bandas de maior intensidade para um mesmo isolado foram similares, em ambos os ensaios, os quais envolveram: cultivo, extração e eletroforese.

Os isolados analisados por eletroforese de proteínas totais foram classificados em cinco grupos, conforme seus padrões protéicos (Tabela 1). Os isolados brasileiros similares a *R. solani* AG1-IB apresentaram padrão protéico semelhantes entre si, independentemente do hospedeiro de origem (Figura 1A, amostras 1, 2, 3, 4, 16, 17, 18, 19, 20 e 21). Porém,

apresentaram padrões protéicos distintos daqueles de outros isolados brasileiros pertencentes a *R. solani* AG4 e de isolados brasileiros binucleados (Figura 1A e 1B). O isolado RH-18 apresentou padrão pouco distinto dos demais isolados de *R. solani* AG1-IB, com algumas bandas em diferentes posições no gel e ausência da banda 118 (Figura 1A, amostra 18). Os padrões protéicos dos isolados japoneses de *R. solani* AG1-IB (B19 e SHIBA-2, Figura 1A, amostras B9 e S2) foram idênticos entre si, mas diferiram dos padrões de isolados brasileiros de mesmo grupo de anastomose (Figura 1A, amostras 1, 2, 3, 4, 16, 17, 18, 19, 20, 21). Nos padrões de isolados japoneses de *R. solani* AG1-IB observaram-se fracamente as bandas 73 e 105, ausência da banda 118 e ausência de bandas intensas, de menor peso molecular (de maior migração no gel), quando comparados aos isolados brasileiros de mesmo grupo de anastomose (Figura 1A). O aumento na quantidade de amostra aplicada nos géis, não resultou em melhoria na resolução de bandas das amostras de isolados japoneses e nem, tampouco, aumentou a intensidade de bandas de proteínas de menor peso molecular (de migração maior). Contudo, houve alguma coincidência na posição de bandas de maior peso molecular, com migração inferior a banda 100, entre os padrões de isolados brasileiros e japoneses de *R. solani* AG1-IB. A maior intensidade de bandas com maior migração no gel (peptídios de menor peso molecular) para os isolados brasileiros de *R. solani* AG1-IB (Figura 1A, amostras 1, 2, 3, 4, 16, 17, 18, 19, 20, 21), pode ser indicação de atividade autolítica, por ocasião da coleta do micélio. Tal atividade seria necessária para suprir a taxa elevada de crescimento e a formação de estruturas sclerodiais, que se iniciava logo após quatro dias de incubação, como foi observado nos ensaios preliminares de crescimento em meio líquido (dados não apresentados).

O isolado brasileiro RH-15 (Figura 1A, amostra 15) apresentou padrão protéico distinto daqueles apresentados pelos isolados japoneses, BV7 e F2 (Figura 1B, amostras B7 e F2), sendo todos classificados em *R. solani* AG1-IC. Os isolados de *R. solani* AG-4, RH-6, RH-7, RH-8, RH-11 e RH-12 (Silveira *et al.*, 2000), apresentaram padrões protéicos distintos dos outros grupos, mas com variações de algumas bandas de maior intensidade para alguns isolados do grupo (Figura 1B, amostras 6, 7, 8, 11 e 12). Os padrões protéicos de RH-8 e RH-12 foram muito similares (Figura 1B, amostras 8 e 12). Já, RH-6, RH7 e RH-11 apresentaram algumas bandas polimórficas de maior intensidade (Figura 1B, amostras 6, 7 e 11, respectivamente). Em geral, nos padrões dos isolados de *R. solani* AG4, observou-se uma baixa intensidade da banda 73 e ausência das bandas 105 e 118, as quais foram evidentes nos padrões dos isolados brasileiros de *R. solani* AG1. Os isolados binucleados, RH-5 (Figura 1B, amostra 5) e RH-10, apresentaram padrões protéicos idênticos entre si, com ausência das bandas 55, 73 e 105 e presença de duas outras bandas evidentes, nas posições 90 e 128, bem como ausência de várias outras bandas secundárias, de menor intensidade, as quais estão presentes nas amostras dos outros isolados de *R. solani*.

TABELA 1 - Grupos de isolados de *Rhizoctonia* spp. formados com base na similaridade fenotípica de isoenzimas e de padrões de proteínas totais (SDS-PAGE) e origem e identificação de cada isolado

Grupo por Padrões de Isoenzimas*	Grupo por padrões de Proteínas**	Denominação dos Isolados***	Origem***		Identificação***
			Hospedeiro / Sintomas / Procedência / Ano		
1	1	RH-1	<i>Eucalyptus</i> sp. / Queima foliar / Brasil, Ipatinga, MG/ 1987		<i>R. solani</i> AG1-IB similar
1	1	RH-3	<i>Eucalyptus</i> sp. / Queima foliar / Brasil, T. de Freitas, BA/1991		<i>R. solani</i> AG1-IB similar
1	1	RH-4	<i>Eucalyptus</i> sp. / Queima foliar/ Brasil, T. de Freitas, BA/1992		<i>R. solani</i> AG1-IB similar
1	(-) ^{****}	RH-19	<i>Eucalyptus</i> sp. / Queima foliar / Brasil, Aracruz, ES/1992		<i>R. solani</i> AG1-IB similar
1	1	RH-20	<i>Eucalyptus</i> sp. / Queima foliar / Brasil, Eunápolis, BA/1993		<i>R. solani</i> AG1-IB similar
1	1	RH-21	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. / Mela / Brasil, Linhares, ES/1993		<i>R. solani</i> AG1-IB similar
1	(-)	RH-25	<i>Eucalyptus</i> sp. / Queima foliar / Brasil, Ipatinga, MG/1994		<i>R. solani</i> AG1-IB similar
1	(-)	RH-27	<i>Eucalyptus</i> sp. / Queima foliar / Brasil, Ipatinga, MG/1995		<i>R. solani</i> AG1-IB similar
1	(-)	RH-29	<i>Eucalyptus</i> sp. / Queima foliar / Brasil, Viçosa, MG/1995		<i>R. solani</i> AG1-IB similar
2	1	RH-17	<i>Eucalyptus</i> sp. / Mela de estacas / Brasil, Aracruz, ES/1992		<i>R. solani</i> AG1-IB similar
2	1	RH-18	<i>Eucalyptus</i> sp. / Mela de estacas / Brasil, Aracruz, ES/1992		<i>R. solani</i> AG1-IB similar
2	(-)	RH-22	<i>Eucalyptus</i> sp. / Queima foliar / Brasil, T. de Freitas, BA/1993		<i>R. solani</i> AG1-IB similar
3	1	RH-16	<i>Eucalyptus</i> sp. / Mela de estacas / Brasil, Aracruz, ES/1992		<i>R. solani</i> AG1-IB similar
3	(-)	RH-28	<i>Eucalyptus</i> sp. / Queima foliar / Brasil, São José dos Campos, SP/1995		<i>Rhizoctonia</i> binucleada
4	2	SHIBA-2	Solo / Japão		<i>R. solani</i> AG1-IB
4	2	B19	<i>Beta vulgaris</i> L. / Queima foliar / Japão		<i>R. solani</i> AG1-IB
nd ^{****}	1	RH-2	<i>Eucalyptus</i> sp. / Queima foliar/ Brasil, Rio Jari, PA/1991		<i>R. solani</i> AG1-IB similar
nd	(-)	RH-26	<i>P. vulgaris</i> / Mela / Brasil, Ponte Nova, MG/1994		<i>R. solani</i> AG1-IB similar
5	3	F2	<i>Triticum</i> sp. / Tombamento / Japão/1954		<i>R. solani</i> AG1-IC
5	3	BV7	<i>B. vulgaris</i> L. / Tombamento / Japão/1961		<i>R. solani</i> AG1-IC
nd	nd	RH-15	<i>Eucalyptus</i> sp. / Queima foliar / Brasil, T. de Freitas, BA/1992		<i>R. solani</i> AG1-IC
nd	(-)	CSIW	<i>Oriza sativa</i> L. / Queima da Bainha / Japão/1961		<i>R. solani</i> AG1-IA
nd	(-)	CSKA	<i>O. sativa</i> L. / Queima da Bainha / Japão		<i>R. solani</i> AG1-IA
6	4	RH-6	<i>Eucalyptus</i> sp. / Queima foliar plântulas / Brasil, Viçosa, MG/1988		<i>R. solani</i> AG4
6	4	RH-7	<i>Gossypium</i> sp. / Tombamento / Brasil, Viçosa, MG/1988		<i>R. solani</i> AG4
6	4a	RH-8	<i>E. grandis</i> H.ex M. / Tombamento / Brasil, Viçosa, MG/1988		<i>R. solani</i> AG4
nd	4a	RH-12	<i>P. vulgaris</i> L. / Tombamento / Brasil, Venda Nova, ES/1992		<i>R. solani</i> AG4
7	4	RH-11	<i>Eucalyptus</i> sp. / Mela de estacas / Brasil, Aracruz, ES/1991		<i>R. solani</i> AG4
7	5	RH-5	<i>Eucalyptus</i> sp. / Mela de estacas / Brasil, Aracruz, ES/1992		<i>Rhizoctonia</i> binucleada
7	5	RH-10	<i>Eucalyptus</i> sp. / Mela de estacas / Brasil, T. de Freitas, BA/1988		<i>Rhizoctonia</i> binucleada
nd	(-)	RH-23	<i>Caesalpinia echinata</i> LAM. / Queima foliar / Brasil, Viçosa, MG/1993		<i>Rhizoctonia</i> binucleada
nd	(-)	RH-24	<i>Thuja</i> sp. / Tombamento / Brasil, Viçosa, MG/1994		<i>Rhizoctonia</i> binucleada

* Grupos de isolados que apresentaram no mínimo quatro fenótipos isoenzimáticos idênticos entre si;

** Grupos e subgrupos de isolados formados com base na similaridade dos padrões de proteínas totais;

*** Fonte: SILVEIRA *et al.* (2000);

**** nd Grupo não determinado por apresentar baixa similaridade nos padrões protéicos e poucos fenótipos isoenzimáticos idênticos em relação aos demais isolados incluídos no presente estudo; (-) Isolado não analisado por proteínas-totais

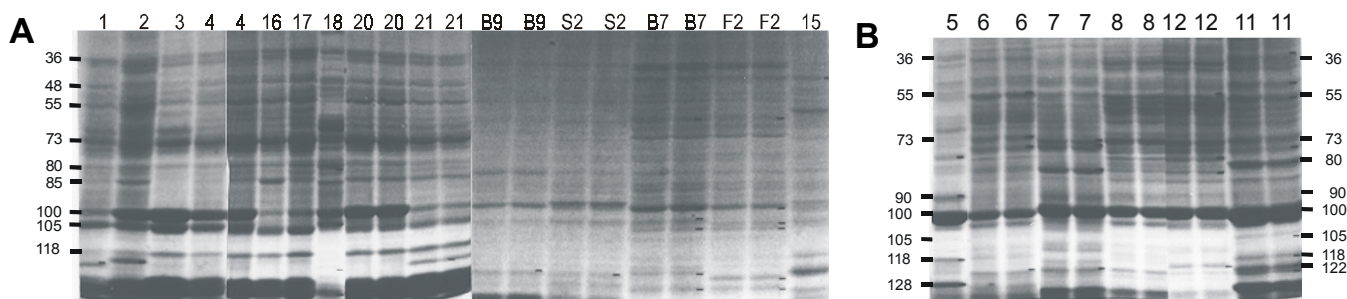


FIG. 1 - Padrões de proteínas totais de isolados de *Rhizoctonia* estudados. Os números e letras das amostras correspondem aos isolados: A - *Rhizoctonia solani* AG1: 1 = RH-1, 2 = RH-2, 3 = RH-3, 4 = RH-4, 16 = RH-16, 17 = RH-17, 18 = RH-18, 20 = RH-20, 21 = RH-21, B9 = B19, S2 = SHIBA 2, B7 = BV7, F2 = F2 e 15 = RH-15. Notar que as amostras B9, S2, B7, F2, 20 e 21 foram aplicadas em duplicatas em gel de mesmo ensaio. A amostra 4, relativa ao isolado RH-4, encontra-se repetida, mas em géis distintos; B - *Rhizoctonia* sp. binucleada: 5) isolado RH-5; e *R. solani* AG4: 6 = RH-6, 7 = RH-7, 8 = RH-8, 12 = RH-12 e 11 = RH-11. Notar que as amostras 6, 7, 8, 11 e 12 encontram-se em duplicatas em mesmo gel. Um pequeno traço marca bandas polimórficas (que distinguem padrões protéicos).

Isoenzimas

Dentre 32 isolados estudados e seis sistemas isoenzimáticos testados, foram observados 52 fenótipos. Poucos isolados apresentaram fenótipos idênticos para todas as seis enzimas analisadas (Figura 2). Designaram-se grupos àqueles constituídos por isolados com no mínimo quatro fenótipos isoenzimáticos idênticos (Tabela 1). A interpretação da análise de agrupamento com base na matriz de similaridade, incluindo-se todos os isolados, foi dificultada pelo fato de isolados não relacionados, que diferiram quanto ao número de núcleos / célula, anastomose de hifas e morfologia (Silveira *et al.*, 2000), terem sido agrupados por apresentarem relativamente poucas bandas isoenzimáticas de migração relativa coincidentes (dados não apresentados). Optou-se, assim, por prosseguir a análise com a identidade fenotípica de isoenzimas. Para isso, padrões de bandas com migração relativa próxima, mas que apresentaram diferenças marcantes em intensidade e espessura foram considerados como fenótipos distintos (Figura 2). A análise de agrupamento com base na identidade fenotípica apresentou maior coerência quando se incluíram apenas isolados de *R. solani* AG1 (Figura 3). Raros foram os isolados brasileiros que apresentaram fenótipos isoenzimáticos idênticos aos isolados japoneses em *R. solani* AG1 (Figura 3). Porém, observou-se uma forte tendência de isolados brasileiros de mesmo subgrupo morfológico em *R. solani* AG1 apresentarem maior número de fenótipos isoenzimáticos idênticos entre si, independentemente da origem geográfica e de hospedeiro (Figura 3, Tabela 1). Os isolados brasileiros similares a *R. solani* AG1-IB foram divididos em dois grupos por isoenzimas (Tabela 1 e Figura 3). O mais numeroso constituiu-se principalmente por isolados microesclerodiais brasileiros causadores de queima foliar em eucalipto e de outro, RH-21, causador de mela do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Outro grupo de isolados microesclerodiais brasileiros causadores de queima foliar em eucalipto separado por isoenzimas foi constituído pelos isolados RH-17, RH-18 e RH-22. Já, o isolado RH-16, de

mesmo grupo e subgrupo de anastomose e de mesma origem geográfica que RH-17 e RH-18, não apresentou nenhum fenótipo isoenzimático idêntico em relação a estes isolados.

Os isolados RH-6 (queima de folha em mudas de eucalipto), RH-7 (tombamento em algodoeiro) e RH-8 (tombamento em eucalipto) classificaram-se em um mesmo grupo, apresentando quatro fenótipos isoenzimáticos idênticos entre si e poucos fenótipos comuns em relação aos demais isolados estudados. O isolado binucleado RH-28 apresentou até quatro fenótipos idênticos aos do isolado multinucleado RH-16 (*R. solani* AG1-IB similar). Os isolados binucleados RH-5 e RH-10 apresentaram todos os seis fenótipos idênticos entre si, quatro fenótipos idênticos em relação aos do isolado multinucleado RH-11 e três fenótipos idênticos aos do isolado binucleado RH-24. Os outros isolados brasileiros, RH-2, RH-12, RH-15, RH-23, RH-24 e RH-26, e os isolados japoneses, CSIW e CSKA, não foram enquadrados em quaisquer dos grupos com base em identidade fenotípica por isoenzimas (Tabela 1 e Figura 3).

DISCUSSÃO

No presente estudo, diferenças significativas foram observadas nos padrões de proteínas totais entre isolados binucleados e multinucleados e entre isolados pertencentes a distintos grupos e subgrupos de anastomose de *Rhizoctonia* spp. Porém, isolados de um mesmo grupo de anastomose e até mesmo de um mesmo subgrupo morfológico, especialmente quando de origem geográfica distante (Brasil vs Japão), apresentaram variações quanto aos padrões de proteínas e aos fenótipos isoenzimáticos. Resultados similares foram obtidos por Reynolds *et al.* (1983), que observaram diferenças maiores nos padrões de proteínas entre isolados pertencentes aos cinco principais grupos de anastomose de *R. solani*, AG1, AG2, AG3, AG4 e AG5. Porém, os mesmos autores observaram variações nos padrões de proteínas entre isolados de um mesmo grupo de anastomose, procedentes de países

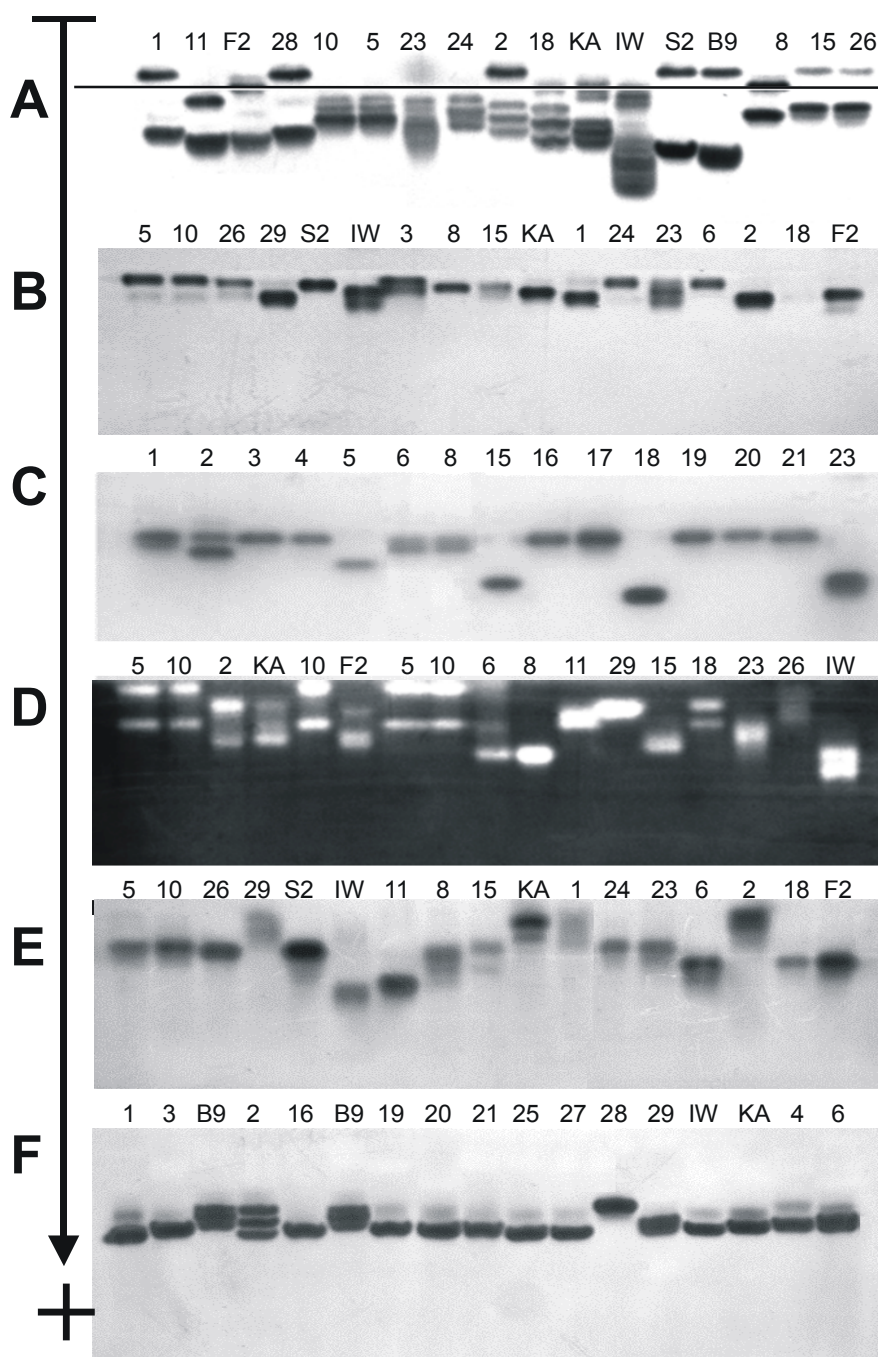


FIG. 2 - Padrões isoenzimáticos apresentados por isolados de *Rhizoctonia* spp. patogênicos ao eucalipto (*Eucalyptus* spp.), mediante eletroforese em gel de amido. A- Malato desidrogenase (MDH); B- Fosfatase ácida (ACP); C- Leucina amino peptidase (LAP); D- Super-óxido dismutase (SOD); E- Isocitrato desidrogenase (IDH); F- 6-Fosfogluconato desidrogenase (6-PGDH). As amostras numeradas de 1 a 29 correspondem respectivamente aos isolados brasileiros de RH-1 a RH-29. As amostras IW, KA, B9, S2, B7 e F2, correspondem respectivamente aos isolados-padrões japoneses de *Rhizoctonia solani* AG1: CSIW, CSKA, B19, SHIBA-2, BV7 e F2. As fotos correspondem aos últimos géis efetuados, nos quais as amostras foram dispostas em seqüências variáveis objetivando facilitar a comparação de fenótipos similares e evidenciar o polimorfismo encontrado.

distantes geograficamente (Japão vs Estados Unidos), em *R. solani* AG1 (três isolados) e em *R. solani* AG4 (quatro isolados).

Não foi possível identificar marcadores isoenzimáticos que permitissem clara demarcação de grupos de isolados, classificados previamente com base em condição nuclear, anastomose de hifas e morfologia (Silveira *et al.*, 2000). Isolados japoneses apresentaram fenótipos isoenzimáticos distintos dos apresentados por isolados brasileiros de mesmo grupo de anastomose e de mesmos subgrupos, definidos com base em morfologia (AG1-IB e AG1-IC). Variações quanto às exigências fisiológicas para crescimento micelial *in vitro*, decorrentes do isolamento geográfico, entre os isolados brasileiros e os japoneses, podem explicar as variações obtidas nos padrões de proteínas e de isoenzimas. Literatura precedente também confirma haver abundante variabilidade genética na população mundial de *R. solani* AG1 e AG4 (Reynolds *et al.*, 1983; Vilgalys, 1988; Liu & Sinclair, 1993; Vilgalys & Gonzales, 1990).

Não foram determinados marcadores isoenzimáticos únicos para delimitar subgrupos morfológicos em *R. solani* AG1. Mesmo dentre isolados brasileiros causadores de queima-foliar em *Eucalyptus*, de morfologia similar a *R. solani* AG1-IB (“microesclerodiais”), foram poucos os que apresentaram fenótipos isoenzimáticos idênticos entre si, para todas as seis enzimas analisadas. Entretanto, observou-se forte tendência dos isolados brasileiros, agrupados por morfologia, anastomose de hifas e patogenicidade (Silveira *et al.*, 2000),

apresentarem maior similaridade nos padrões de proteínas e maior número de fenótipos isoenzimáticos idênticos entre si. O critério patogenicidade acima referido compreende principalmente tipo de doença e sintomas, pois, o hospedeiro de origem não se correlacionou com a identidade fenotípica por isoenzimas. Dentre os isolados brasileiros de *R. solani* AG1, a origem geográfica também apresentou pequena correlação com identidade fenotípica por isoenzimas. Como exemplo, cita-se o isolado RH-21, causador da mela do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), obtido de Linhares-ES, classificado no grupo brasileiro de *R. solani* “AG1-IB similar” (Silveira *et al.*, 2000). Os padrões de proteínas e de isoenzimas de RH-21 foram idênticos aos de isolados procedentes de diferentes regiões, obtidos de plantas de eucalipto, com sintomas de queima foliar. Para isolados brasileiros de *R. solani* AG4, porém, a origem geográfica apresentou maior correlação com a identidade fenotípica. Três isolados de *R. solani* AG4, provenientes de Viçosa-MG [dois causadores de tombamento em mudas de eucalipto e outro causador de tombamento em algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)], classificaram-se em mesmo grupo com base em isoenzimas, mas, diferiram de outros dois isolados de *R. solani* AG4, provenientes do Estado do Espírito Santo. Uma explicação para esta diferença seria o fato do isolamento reprodutivo ser mais pronunciado entre populações de *R. solani* AG4, que é um patógeno estritamente do solo, do que entre populações de *R. solani* AG1-IB, patógeno de parte aérea. Tal afirmativa, porém, carece de confirmação na pesquisa.

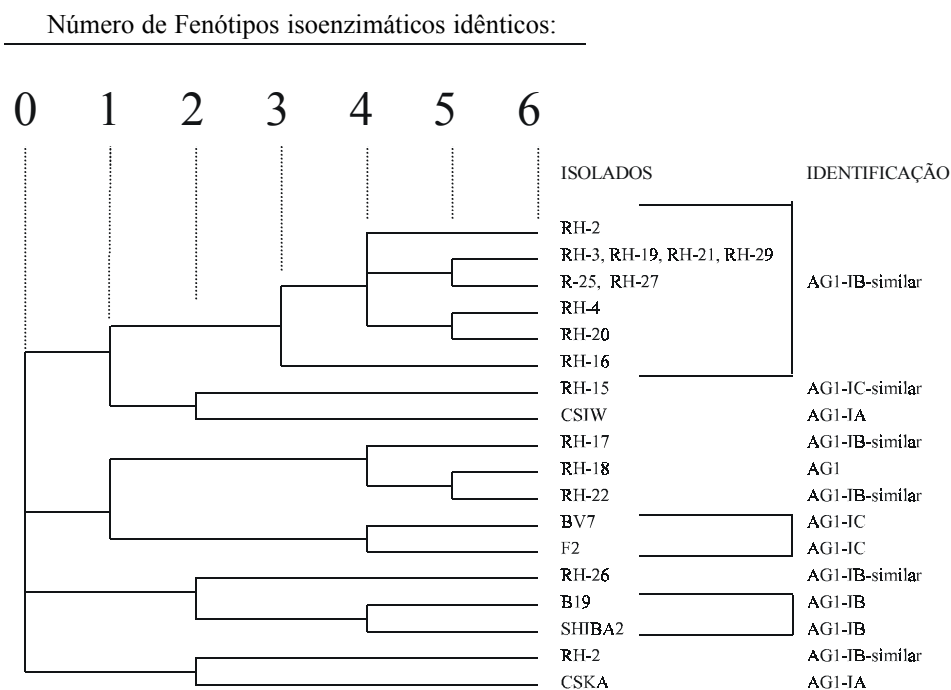


FIG. 3 - Dendrograma da análise de agrupamento com base no número de fenótipos isoenzimáticos idênticos entre isolados de *Rhizoctonia solani*, pertencentes ao grupo de anastomose AG-1. Os isolados identificados como RH-1 até RH-29 são provenientes do Brasil, a partir de diversos hospedeiros. CSIW e CSKA, B19 e SHIBA2, BV7 e F2 correspondem a isolados-padrões japoneses de *R. solani* AG1-IA, AG1-IB e AG1-IC, respectivamente.

Resultados análogos aos do presente trabalho, para isoenzimas, foram obtidos por Liu & Sinclair (1993). Com base na comparação de padrões RFLPs de seqüências espaçadoras ITS do rDNA nuclear de 61 isolados de origem diversa, Liu & Sinclair (1993) descreveram seis grupos intraespecíficos (ISG) em *R. solani* AG1. Quatro destes grupos foram homogêneos, ou seja, apresentaram isolados pertencentes a somente um subgrupo de *R. solani* AG1 (-1A, -1B ou 1C), previamente descritos com base em morfologia de culturas e escleródios, hospedeiro de origem e sintomas induzidos. Porém, no mesmo trabalho, a partir de dez sistemas isoenzimáticos, os autores obtiveram um pequeno número de marcadores restritos aos mesmos subgrupos definidos com base nos padrões de RFLP (Liu & Sinclair, 1993). Vilgalys & Gonzales (1990), também, observaram variabilidade nos padrões de RFLPs do rDNA, entre isolados de um mesmo subgrupo de AG1-1A, AG1-1B e AG1-1C, sugerindo a existência de sub-populações adicionais e geneticamente divergentes, além das três tradicionalmente conhecidas. Tal variabilidade, observada em nível de marcadores bioquímicos e moleculares, coloca em dúvida os critérios para subdivisão de subgrupos intraespecíficos em *R. solani*, considerando-se a ausência de diferenças quanto a características de maior significado prático, tais como morfologia, patogenicidade, exigências nutricionais e ecologia (Ogoshi, 1987). Neste trabalho, o polimorfismo de proteínas-totais e isoenzimas observado dentre isolados não relacionados por morfologia, grupo de anastomose e origem geográfica, dificultou a análise de agrupamento e sua interpretação. A probabilidade de se encontrar fenótipos idênticos é baixa em populações heterogêneas de *Rhizoctonia* spp., como a estudada no presente trabalho. Mesmo restringindo-se a análise aos isolados de *R. solani* AG1, o polimorfismo obtido no presente trabalho foi superior ao observado por Liu & Sinclair (1993). No presente trabalho, a partir de somente quatro enzimas, ACP, IDH, LAP e 6-PGDH, foram obtidos 25 fenótipos, para somente 22 isolados de *R. solani* AG1. Utilizando as mesmas enzimas, Liu & Sinclair (1993) obtiveram somente 10 fenótipos, para 60 isolados de *R. solani* AG1. Tais diferenças não podem ser atribuídas unicamente à diversidade genética entre as duas populações analisadas, mas, também, se deve em parte à diferenças de: metodologias de extração de proteínas, idade das culturas em meio líquido para extração do micélio, composição do meio de cultura utilizado na produção do micélio e critérios para definição dos fenótipos.

Nenhum dos isolados microesclerodiais brasileiros foi morfologicamente idêntico aos representantes japoneses de *R. solani* AG1-1B (Silveira *et al.*, 2000). Os resultados das análises de proteínas e isoenzimas corroboram a proposta de não se enquadrarem os isolados brasileiros no mesmo subgrupo morfológico que os isolados japoneses. Assim, os isolados microesclerodiais brasileiros, causadores de queima foliar em eucalipto, permanecem caracterizados como *R. solani* "AG1-1B-similar". Estudos comparativos a partir de uma coleção mundial ampla de isolados deverá, ainda, validar a importância relativa dos critérios morfológicos e patológicos

na delimitação de subgrupos em *R. solani* AG1.

Assim como para isolados de *R. solani* AG1, observaram-se variações análogas nos padrões de proteínas e de isoenzimas dentre os isolados classificados em *R. solani* AG4 (RH-6, RH-7, RH-8, RH-11 e RH-12). O mesmo foi observado por Reynolds *et al.* (1983). Segundo esses autores, tais variações são, em parte, decorrentes da inerente variabilidade genética em AG4, que inclui isolados fitopatogênicos de ampla gama de hospedeiros e isolados saprofíticos habitantes do solo. Para isolados binucleados, não há trabalho precedente de caracterização utilizando análises de proteínas e isoenzimas. Os isolados binucleados, RH5 e RH10, morfologicamente idênticos e pertencentes a um mesmo grupo de anastomose (Silveira *et al.*, 2000), constituem-se, provavelmente, clones de um mesmo isolado, uma vez que apresentaram perfis protéicos e fenótipos isoenzimáticos idênticos, para todas as seis enzimas analisadas. Pelo fato destes isolados terem sido registrados como procedentes de localidades distantes (Silveira *et al.*, 2000), acredita-se que houve erro de identificação durante o manuseio destas culturas. Trabalhos adicionais deverão ser conduzidos para se comparar, por morfologia e anastomose de hifas, os isolados binucleados à culturas-padrão representantes de espécies, grupos e subgrupos de anastomose.

A freqüência de anastomose de hifas, ainda que baixa, observada entre isolados pertencentes a certos grupos e subgrupos de anastomose de hifas (Ex: *R. solani* AG2), tem sido interpretada como uma medida de parentesco genético, ainda que remoto, entre subpopulações de *Rhizoctonia* (Sneh *et al.*, 1991). Porém, em *R. solani* AG1, a ocorrência mundial de subpopulações que diferem grandemente em morfologia e que, apesar do isolamento geográfico, mantêm a capacidade de efetuar anastomose de hifas entre si, sugere ser este um marcador muito conservado e de utilidade limitada em estudos de variabilidade genética. Pode-se especular que, assim como no caso das seqüências espaçadoras ITS do rDNA (Vilgalys & Gonzales, 1990), os genes que controlam anastomose de hifas devem se localizar em posições conservadas do genoma. Por outro lado, o alto polimorfismo isoenzimático observado no presente estudo reforça a relevância da análise de isoenzimas em estudos genéticos em *R. solani*, porém, limita sua utilidade como critério filogenético de classificação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C. & BRUNE, W. Identificações específicas de enzimas em géis. In: Alfenas, A.C. (Ed). Eletroforese de Isoenzimas e Proteínas Afins: Fundamentos e Aplicações em Plantas e Microrganismos. Viçosa. Editora UFV. 1998. pp. 201-328.
- ALFENAS, A.C., BRUNE, W., OLIVEIRA, J.R., KUNIEDA-DE-ALONSO, 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. Editora UFV. 1998. pp.85-114.
- CARLING, E.E. & SUMMNER, D.R. *Rhizoctonia*. In: Singleton,

- L.L., Mihail, J.D. & Rush, C.M. (Eds). Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi. Minnesota, USA. APS Press. 1992. pp.157-165.
- EUCLIDES, R.F. Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG) - Manual provisório. CPD/UFV, Divisão de Pesquisa e Desenvolvimento, Viçosa, MG. 1983.
- HALL, R. Electrophoretic protein profiles as criteria in the taxonomy of fungi and algae. Symposium on the use of electrophoresis in the taxonomy of algae and fungi. Bulletin of the Torrey Botanical Club 100:253-259. 1973.
- LIU, Z.L. & SINCLAIR, J.B. Differentiation of intra-specific groups within anastomosis group 1 of *Rhizoctonia solani* using ribosomal DNA internal transcribed spacer and isozyme comparisons. Canadian Journal of Plant Pathology 15:272-280. 1993.
- LIU, Z.L. & SINCLAIR, J. B. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2. Phytopathology 82:778-787. 1992.
- LIU, Z.L., DOMIER, L.L. & SINCLAIR, J.B. ISG-specific ribosomal DNA polymorphism of the *Rhizoctonia solani* species complex. Mycologia 85:795-800. 1993.
- LIU, Z.L., NICKRENT, D.L. & SINCLAIR, J.B. Genetic relationships among isolates of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 based on isozyme analysis. Canadian Journal of Plant Pathology 12:376-382. 1990.
- MICALES, J.A., BONDE, M.R. & PETERSON, G.L. The use of isozyme analysis in fungal taxonomy and genetics. Mycotaxon 27:405-449. 1986.
- OGOSHI, A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intra-specific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. Annual Review of Phytopathology 25:125-143. 1987.
- PARMETER, J.R. & WHITNEY, H.S. Taxonomy and nomenclature of the imperfect state. In: Parmeter, J.R. (Ed.) *Rhizoctonia solani*, Biology and Pathology. London. University of California Press. 1970. pp.7-19.
- REYNOLDS, M., WEINHOLD, A.R. & MORRIS, T.J. Comparison of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by acrilamide gel electrophoresis of soluble proteins. Phytopathology 73:903-906. 1983.
- RIDGWAY, G.J., SHERBURNE, S.W. & LEWIS, R.D. Polymorphisms in the sterase of atlantic herring. Transaction of American Fisheries Society 99:147-151, 1970.
- SILVEIRA, S.F., ALFENAS, A.C., FERREIRA, F.A. & SUTTON, J.C. Characterization of *Rhizoctonia* species associated with foliar necrosis and leaf scorch of clonally-propagated *Eucalyptus* in Brazil. European Journal of Plant Pathology 106:27-36. 2000.
- SNEH, B., BURPEE, L. & OGOSHI, A. Identification of *Rhizoctonia* species. Saint Paul, Minnesota, USA. APS Press. 1991.
- SOLTIS, D.E., HAUFLE, C.H., DARROW, D.C. & GASTONY, G.J. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. American Fern Journal 73:9-27. 1983.
- STALPERS, J.A., ANDERSEN, T.F. A synopsis of the taxonomy of teleomorphs connected with *Rhizoctonia* S. L. In: Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S. & Dijst, G. (Eds.) *Rhizoctonia* species: Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Dordrecht, Netherlands. Kluwer Academic Publishers. 1996. pp.37-47.
- VILGALYS, R. & CUBETA, M. A. Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. Annual Review of Phytopathology 32:135-155. 1994.
- VILGALYS, R. & GONZALES, D. Ribosomal DNA restriction fragment length polymorphisms in *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 80:151-158. 1990.
- VILGALYS, R. Relatedness among anastomosis groups in *Rhizoctonia* as measured by DNA/DNA hybridization. Phytopathology 78:698-702. 1988.