

# ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DE DNA RIBOSSOMAL AMPLIFICADO (ARDRA) PODE DIFERENCIAR *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* DE *F. solani* f. sp. *glycines*

VIRGÍNIA C. de OLIVEIRA\* & JEFFERSON L. S. da COSTA\*

Embrapa Tabuleiros Costeiros, Cx. Postal 44, CEP 49001-970, Aracaju, SE, fax: (079) 226-1369, e-mail: jcosta@cpatc.embrapa.br

(Aceito para publicação em 20/08/2002)

Autor para correspondência: Jefferson Luis da Silva Costa

OLIVEIRA, V.C. de & COSTA, J.L.da S. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* de *F. solani* f. sp. *glycines*. Fitopatologia Brasileira 27:631-634. 2002.

## RESUMO

Métodos moleculares têm sido utilizados para caracterizar a diversidade entre isolados de *Fusarium* spp. patogênicos e não patogênicos a uma cultura e, para determinar relações genéticas entre *formae speciales*. Testes de patogenicidade realizados em soja (*Glycine max*) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) com 17 isolados de *Fusarium solani* não demonstraram especificidade de hospedeiros. Utilizou-se a técnica ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) para analisar a região ITS1 – 5,8S rDNA – ITS2, amplificada com os primers ITS5 e ITS4. Os produtos amplificados foram digeridos com as enzimas de restrição *Hae* III e *Msp* I. Os padrões de bandas gerados

pela digestão com a enzima *Hae* III permitiram diferenciar três grupos entre os isolados de *F. solani*, sendo um grupo específico para isolados de *F. solani* f. sp. *phaseoli* com 100% de similaridade entre os 11 isolados. Entre os isolados de *F. solani* f. sp. *glycines* foram observados dois padrões distintos de restrição. A técnica de ARDRA utilizando a enzima *Hae* III apresenta, portanto, potencial para utilização como um marcador para diferenciação entre as *formae speciales phaseoli* e *glycines*, dentro do complexo *F. solani*.

**Palavras-chave adicionais:** *formae specialis*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*.

## ABSTRACT

### Restriction analysis of rDNA (ARDRA) can differentiate *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* from *F. solani* f. sp. *glycines*

Molecular methods have been used to characterize diversity among pathogenic and non pathogenic isolates of *Fusarium* spp. and to determine genetic relationships among *formae speciales*. Pathogenicity tests performed on dry beans (*Phaseolus vulgaris*) and soybeans (*Glycine max*) with 17 isolates of *Fusarium solani* did not demonstrate host specificity. Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) was used to analyze the ITS1 – 5,8S rDNA – ITS2 region, amplified with primers ITS4

and ITS5. The amplified products were digested with the restriction enzymes *Hae* III and *Msp* I. Banding patterns generated by the enzyme *Hae* III enabled the differentiation of three groups within *F. solani*, one specific for isolates of *F. solani* f. sp. *phaseoli* and the other two for *F. solani* f. sp. *glycines*. The ARDRA technique, using the enzyme *Hae* III, is a promising marker to differentiate the *formae speciales phaseoli* from *glycines* within the *F. solani* complex.

*Fusarium solani* (Mart.) Sacc. é um fungo do solo com ampla gama de hospedeiros que apresenta variação em sua morfologia, fisiologia e patogenicidade. A tradicional classificação e identificação de espécies no gênero *Fusarium* é baseada em características morfológicas como: morfologia da colônia de cultura monospórica de isolados em meios de cultura específicos, pigmentação e taxa de crescimento, especificidade de hospedeiros e perfil de metabólitos secundários (Thrane, 1990). Devido à plasticidade e variações de características fenotípicas no gênero *Fusarium*, a taxonomia baseada somente em conceitos morfológicos não é confiável, especialmente nas seções *Martiella* e *Ventricosum* (Snyder & Hansen, 1953). Ocasionalmente, alguns isolados são considerados “intermediários”, dificultando a separação entre espécies. No gênero *Fusarium*, há uma série de variações

nas características morfológicas e patogênicas, resultando em uma classificação complexa dividida em seções, *formae speciales* e raças.

O conceito *forma specialis* foi ampliado por Snyder & Hansen (1953) para reconhecer isolados patogênicos que foram morfológicamente semelhantes a isolados saprofitos de mesma espécie, mas que diferenciam em sua habilidade para parasitar hospedeiros específicos. Estes isolados patogênicos estão classificados dentro de mais de 120 *formae speciales* e raças (Armstrong & Armstrong, 1981). Entre estes, *F. solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *phaseoli* (Burkholder) Snyder & Hansen causa grandes danos na cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), onde já foram constatadas reduções de até 86% na produção, comprometendo a planta em situações de reduzido crescimento radicular devido à seca ou encharcamento. Ainda neste complexo inclui-se a síndrome da morte súbita da soja [*Glycine max* (L.) Merrill], causada

\*Bolsista do CNPq

por *F. solani* (App. & Wollenw.) Snyder & Hans f. sp. *glycines*. Os sintomas são o apodrecimento das raízes secundárias da planta em solo úmido, necrose da base da planta e clorose interveinal das folhas. A doença tem sido encontrada nas principais regiões produtoras de sementes do Sul e das regiões altas dos cerrados, podendo exterminar até 100% da plantação (Ferreira *et al.*, 1981; Gazzoni, *et al.*, 1995). Além destas culturas, existe ainda uma gama de hospedeiros de *F. solani* o que resultou na subdivisão da espécie em dez grupos subespecíficos. Na realidade, a especificidade de hospedeiro ocorre, mas não para todas as *formae speciales* (Armstrong & Armstrong, 1981). Para algumas *formae speciales*, a classe de hospedeiros é ampla. Por esta razão, a sistemática molecular é uma ferramenta que oferece considerável segurança no estabelecimento de um sistema de classificação para fungos com base nas relações filogenéticas. A elucidação da taxonomia em *F. solani*, assim como dos agentes causais da podridão radicular e morte súbita, respectivamente, *F. solani* f. sp. *phaseoli* e *F. solani* f. sp. *glycines*, contribuiria para a definição das estratégias no controle destas doenças.

Diferentes técnicas têm sido utilizadas a fim de estudar a variabilidade genética em *Fusarium* spp. e identificar marcadores em nível de *formae speciales* e raças. Entre as técnicas utilizadas, o uso de marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é utilizado como diagnóstico para a identificação de isolados de *F. solani* f. sp. *glycines* e *F. solani* f. sp. *phaseoli* (Achenbach *et al.*, 1996). Por outro lado, a técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) foi utilizada para a determinação de grupos genéticos e sua relação com patogenicidade (Manicom *et al.*, 1990). A unidade de DNA ribossomal (rDNA) nuclear consiste de uma série repetitiva (tandem) de três regiões gênicas (18S, 5.8S e 28S) e duas regiões espaçadoras intergênicas (ITS e IGS). Recentemente, a análise destas regiões espaçadoras do rDNA e estudos comparativos de seqüências de nucleotídeos de genes do rDNA, através da técnica ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) têm sido utilizados. O valor deste método está na sua rapidez e habilidade para avaliar diferenças entre grupos filogenéticos, efetuando análises em vários níveis de classificação, inclusive em estudos de evolução, gerando novos marcadores para estudos de genética de populações (Jorgensen & Cluster, 1989).

Análise da região ITS foi efetuada em *F. solani* visando a reconstrução filogenética (O'Donnel & Gray, 1995). Estudos de populações evidenciaram diversidade genética existente dentro da espécie de *F. solani* associada à batata (*Solanum tuberosum* L.) (Miller *et al.*, 1999). Em *Fusarium oxysporum*, tem-se caracterizado, através de DNA mitocondrial, a diversidade entre isolados patogênicos com o objetivo de determinar relações genéticas entre *formae speciales* (Kim *et al.*, 1993).

Este trabalho relata a análise da região ITS do rDNA através da técnica ARDRA para relacionar geneticamente isolados de *F. solani* f. sp. *phaseoli* e *F. solani* f. sp. *glycines* patogênicos ao feijão e/ou à soja.

Testes de patogenicidade foram efetuados previamente, através de inoculações cruzadas, com 11 isolados de *F. solani* f. sp. *phaseoli* e seis isolados de *F. solani* f. sp. *glycines* coletados do feijoeiro e soja, respectivamente, em várias localidades: Goiânia-GO, Acreúna-GO, Paranapanema-SP, Taquarituba-SP, Silvânia-GO e Londrina-PR (Tabela 1) (Oliveira & Costa, 1999).

Para a extração de DNA, os isolados fúngicos foram cultivados em meio de cultura BDA e incubados a 27 °C por sete dias. Discos de BDA contendo o micélio do fungo foram inoculados em 60 ml de meio líquido extrato de levedura (10 g de extrato de levedura, 10 g de dextrose, 10<sup>-1</sup> M de ampicilina, 1 l de H<sub>2</sub>O destilada), incubados a 27 °C, agitados a 120 rpm durante sete dias. O micélio foi lavado em água destilada estéril, coletado por filtração a vácuo e liofilizado. A extração do DNA foi efetuada pelo método CTAB (cetil-trimetil brometo de amônio) (Zolan & Pukilla, 1986). Efetuada a extração, quantificou-se o DNA em fluorômetro, procedendo-se as diluições para a concentração final de 10 ng/μl. Para a amplificação, foram utilizados os primers ITS5 ('5GGAAGTAAAAGTCGTAACAA 3') e ITS4 ('5 TCCTCC GCTTATTGATATGC 3') (Escola Paulista de Medicina, São Paulo) (White *et al.*, 1990). Cada reação de amplificação de 25 μl foi composta de 2,5 ng de DNA genômico; 13 μl de água estéril; 10 mM de Tris-HCl; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM de dNTP's; 1.25U de *Taq* DNA polimerase; 0,4 μM de cada primer. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PTC 100 (MJ Research). Os ciclos de amplificação constituíram-se de uma etapa de desnaturação a 95 °C por 4 min, uma etapa de anelamento a 55 °C por 1 min e uma etapa de extensão a 72 °C por 2 min. Depois de 40 ciclos, foi efetuada uma última etapa de extensão a 72 °C por 5 min. De um total de 25 μl do produto amplificado (em torno de 600 pb), 5 μl foram digeridos utilizando-se 10U das enzimas de restrição *Hae* III e *Msp* I (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) diluídas em 1,5 μl de tampão e 8 μl de água estéril destilada. Os produtos de digestão foram separados em gel de agarose a 1,4% contendo 0,5 μg/ml de brometo de etídeo, imerso em tampão TBE (Tris Borato 90,0 mM, EDTA 1,0 mM, pH 8,0) a 80 V. O tamanho do produto amplificado foi estimado pela comparação com um marcador molecular de 100 pb (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA). As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas com o sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene).

Os resultados do teste de patogenicidade efetuando-se inoculação cruzada através do método de corte de raízes estão demonstrados na Tabela 1. Todos os isolados identificados como *F. solani* f. sp. *glycines* foram patogênicos ao feijoeiro. Dos isolados de *F. solani* f. sp. *phaseoli*, apenas três foram patogênicos apenas à cultura do feijoeiro, os demais isolados, foram patogênicos também à soja. Este resultado está de acordo com Armstrong & Armstrong (1981), segundo os quais a especificidade de hospedeiro não ocorre para todas as *formae speciales*, não tendo sido aplicado para *forma specialis* de *Fusarium* spp. (apenas gênero) (Tosa, 1992). Estes mesmos

**TABELA 1 - Patogenicidade, forma specialis, procedência e grupo ARDRA/região ITS de isolados de *Fusarium solani* patogênicos ao feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) e/ou a soja (*Glycine max*)**

Isolado	Origem	Forma specialis	Procedência	Patogenicidade		Grupo ARDRA região ITS/ <i>Hae</i> III
				Feijão	Soja	
F01	Feijão	<i>phaseoli</i>	Goiânia-GO	+	+	I
F03	Feijão	<i>phaseoli</i>	Acreúna-GO	+	+	I
F14	Feijão	<i>phaseoli</i>	Silvânia-GO	+	-	I
F20	Soja	<i>glycines</i>	Silvânia-GO	+	+	IIB
F24	Feijão	<i>phaseoli</i>	Unaí-MG	+	+	I
F26	Feijão	<i>phaseoli</i>	Unaí-MG	+	-	I
F31	Soja	<i>glycines</i>	Unaí-MG	+	+	IIA
F33	Feijão	<i>phaseoli</i>	Stº Antônio de GO	+	+	I
F34	Feijão	<i>phaseoli</i>	Stº Antônio de GO	+	+	I
F36	Feijão	<i>phaseoli</i>	Stº Antônio de GO	+	-	I
F39	Feijão	<i>phaseoli</i>	Silvânia-GO	+	+	I
F40	Feijão	<i>phaseoli</i>	Silvânia-GO	+	+	I
F41	Soja	<i>glycines</i>	Paranapanema-SP	+	+	IIA
F42	Soja	<i>phaseoli</i>	Taquarituba-SP	+	+	I
F43	Soja	<i>glycines</i>	Silvânia-GO	+	+	IIA
F44	Soja	<i>glycines</i>	Barreiras-BA	+	+	IIA
F45	Soja	<i>glycines</i>	Londrina-PR	+	+	IIA

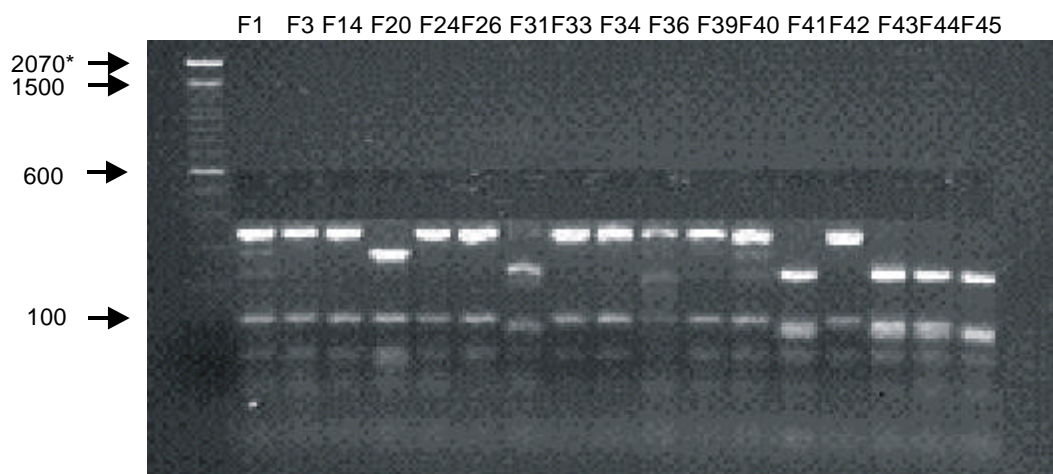
(+) patogênico.

(-) não patogênico.

autores (Armstrong & Armstrong, 1981) verificaram que isolados de *F. oxysporum* f. sp. *raphani* Ken. & Snyder e *F. oxysporum* f. sp. *mathioli* Snyder & Hans. e raças de *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* (Wholl.) Snyder & Hans, são igualmente patogênicos ao repolho (*Brassica oleraceae* L.) e rabanete (*Raphanus sativus* L.).

Neste trabalho, os produtos gerados pela amplificação da região ITS e digestão pelas enzimas *Hae* III e *Msp* I não permitiram diferenciar os isolados que foram patogênicos à soja ou ao feijoeiro dos que foram patogênicos a ambas as culturas. Entretanto, a digestão dos produtos com *Hae* III, permitiram diferenciar *F. solani* f. sp. *glycines* de *F. solani* f. sp. *phaseoli* (Figura 1) formando três grupos distintos. O

grupo I mostrou-se homogêneo e constituído exclusivamente dos 11 isolados identificados como *F. solani* f. sp. *phaseoli*, com 100% de similaridade. Contudo, em *F. solani* f. sp. *glycines*, revelou-se a existência de dois grupos, sendo cinco isolados inclusos no grupo IIA e um único isolado representando o grupo IIB (Tabela 1). Contrastando com estes resultados, O'Donnel & Gray (1995) demonstraram, baseados no sequenciamento e análise de RFLP da região ITS e parte da subunidade de 28S do rDNA, que isolados que causam a morte súbita da soja podiam ser inclusos na forma specialis *phaseoli*. Entretanto, como este grupo também inclui isolados que não causam a doença, estes isolados que causam a morte súbita, devem representar uma população distinta dentro desta



**FIG. 1 - Produtos amplificados da região ITS-rDNA e digeridos com a enzima de restrição *Hae* III de isolados de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* e *F. solani* f. sp. *glycines*.**

\*Tamanho dos fragmentos em pares de bases (marcador 100 pb)

*forma specialis* (O'Donnell & Gray, 1995). Achenbach *et al.* (1996) demonstraram a aplicabilidade de RAPD para diferenciar isolados de *F. solani* que causam a morte súbita dos isolados de *F. solani* que não causam sintomas foliares, típicos da doença, inclusive *F. solani* f. sp. *phaseoli*. Este trabalho, reportou o uso da técnica ARDRA como um marcador potencial para identificação de isolados, diferenciando *F. solani* f.sp. *phaseoli* de *F. solani* f. sp. *glycines*. A região ITS amplificada digerida pela enzima de restrição *Hae* III, nestes resultados preliminares, mostrou-se um marcador molecular eficiente, sendo uma técnica adicional de estudo para a complexa classificação taxonômica de *Fusarium* spp, e sobretudo poder elucidar controvérsias quanto à classificação dentro de *forma specialis*. Portanto, os marcadores moleculares provam ter tanta importância quanto os métodos baseados na morfologia e fisiologia, ampliando o nível de esclarecimentos na identidade e variabilidade do patógeno.

### AGRADECIMENTO

Os autores agradecem pelo suporte financeiro do CNPq na realização deste trabalho.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHENBACH, A.L., PATRICK, J. & GRAY, L. Use of RAPD markers as diagnostic tool for the identification of *Fusarium solani* isolates that cause soybean sudden death syndrome. *Plant Disease*: 80:1228-1232. 1996.
- ARMSTRONG, G.M. & ARMSTRONG, J.K. *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In: Nelson, P.E., Toussoun, T.A. & Cook, R.J. (Eds.). *Fusarium: Disease, Biology, and Taxonomy*. University Park. Pennsylvania State University Press. 1981. pp.391-399.
- FERREIRA, L.P., LEHMAN, P.S. & ALMEIDA, A.M.R. Moléstias e seu controle. In: Miyazaka, S. & Medina, J.C. (Eds). *A soja no Brasil*. Campinas, SP, Brasil, Fundação Cargill. 1981. pp. 603-627.
- GAZZONI, D.L. YORINORI, J.T. Manual de identificação de pragas e doenças da soja. Brasília: EMBRAPA – SPI, 1995.
- JORGENSEN, R.A. & CLUSTER, P.D. Modes and temps in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. *Annual Missouri Botanical Garden* 75:1238-1247. 1989.
- KIM, D.H., MARTYN, R.D. & MAGILL, C.W. Mitochondrial DNA (mtDNA) - Relatedness among *formae speciales* of *Fusarium oxysporum* in the Cucurbitaceae. *Phytopathology* 83:91-97. 1993.
- MANICOM, B.Q., BAR-JOSEPH, M., KOTZE, J.M. & BECKER, M.M. A restriction fragment length polymorphism probe relating vegetative compatibility groups and pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Phytopathology* 80:336-339. 1990.
- MILLER, R.N.G., QUEZADO-SOARES, A.M. & LOPES, C.A. Molecular comparison of *Fusarium* populations causing eumartii wilt and dry rot of potato in Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 24:149-155. 1999.
- O'DONNELL, K. & GRAY, E.L. Phylogenetic relationships of the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* inferred from rDNA sequence data and PCR primers for ITS identification. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8:709-716. 1995.
- OLIVEIRA, V. C. de, COSTA, J.L. da S. Patogenicidade de *formae specialis* de *Fusarium solani* no feijão e na soja. Resumos, XXXII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Curitiba, PR. 1999. p.330.
- SNYDER, W.C. & HANSEN, H.N. Species concept, genetics, and pathogenicity in *Hypomyces solani*. *Phytopathology* 44:338-342. 1953.
- THRANE, U. Grouping *Fusarium* section *Discolor* isolates by statistical analysis of quantitative high performance liquid chromatographic data on secondary metabolite production. *Journal Microbiologic Methods* 12:23-39. 1990.
- TOSA, Y.A. model for the evolution of *formae speciales* and races. *Phytopathology* 82:728-730. 1992.
- ZOLAN, M.E. & PUKILLA, P.J. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Molecular and Cellular Biology* 6:195-200. 1986.
- WHITE, T.J., BRUNS, T.D., LEE, S. & TAYLOR, J.W. Amplification and sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego. Academic Press, Inc. 1990. pp.315-322.