

Compatibilidade vegetativa e caracterização isoenzimática de isolados de *Sclerotium rolfsii* Sacc.

Suzana Alencar Freire DANTAS¹; Sônia Maria Alves OLIVEIRA²; Roberto Luiz Xavier SILVA²; Francisco de Assis DANTAS³

RESUMO: Compatibilidade vegetativa e análise isoenzimática têm sido usadas para caracterizar diversos fungos fitopatogênicos. Visando avaliar a compatibilidade vegetativa de isolados de *S. rolfsii* obtidos de feijoeiro em diferentes sub-regiões de Pernambuco: Zona da Mata, Agreste e Sertão, os mesmos foram pareados em placas de Petri de 9 cm de diâmetro em BDA e incubados a temperatura ambiente. A avaliação procedeu-se por exame macroscópico após 10 dias de incubação dos isolados, observando-se a formação de zonas de aversão entre os mesmos. Para a análise isoenzimática foram avaliados os sistemas α , β -esterase, fosfatase ácida e leucina aminopeptidase em gel de poliacrilamida 7%. Os perfis eletroforéticos foram analisados através da mobilidade relativa das bandas, a partir dos quais foram confeccionados zimogramas para cada enzima analisada. Os isolados da Zona da Mata e do Agreste foram similares com relação a compatibilidade vegetativa e padrões isoenzimáticos. O isolado do Sertão foi vegetativamente incompatível com os demais e apresentou padrão isoenzimático diferente.

Palavras-chave: *Sclerotium rolfsii*, *Phaseolus vulgaris*, compatibilidade vegetativa, análise isoenzimática.

INTRODUÇÃO

Sclerotium rolfsii Sacc. é um patógeno habitante do solo com ampla gama de hospedeiros, cerca de 500 espécies botânicas, incluindo dicotiledôneas e monocotiledôneas. Este fungo sobrevive no solo sob a forma de escleródios por longos períodos (Punja, 1985), possuindo capacidade de competição saprofitica e produzindo elevado número de escleródios (Cardoso, 1994). Isolados de *S. rolfsii* originados de diferentes áreas geográficas e hospedeiros, freqüentemente mostram variação nas características morfológicas (Punja & Grogan, 1983).

Diferenças em espécies são facilmente identificadas pelo tamanho cor e forma de seus escleródios (Punja & Rahe, 1992). Entretanto, não está devidamente esclarecido que quaisquer dessas diferenças sejam suficientes para garantir a separação de isolados dentro da espécie *S. rolfsii* (Harlton et al., 1995). A compatibilidade vegetativa tem sido usada para examinar a variabilidade genética em diversos fungos patogênicos a plantas (Leslie, 1993). Nakata (1925) separou isolados de *S. rolfsii* com base na formação de zona de aversão, ou ausência da mesma, quando os isolados foram pareados em meio de cultura, sendo os mesmos agrupados em grupos de compatibilidade vegetativa (GCV). Esse método também foi utilizado por Harlton et al. (1995) em estudo de diversidade genética de *S. rolfsii* e espécies relacionadas, juntamente com análise filogenética através de reação da polimerase em cadeia (PCR) e polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs). Eletroforese de isoenzimas também tem sido utilizada para caracterizar, identificar e distinguir grupos taxonômicos subespecíficos. A análise de proteínas e isoenzimas para a caracterização de virulência de fungos pode auxiliar métodos tradicionais, como o uso de hospedeiros diferenciadores, uma vez que a

variação isoenzimática por eletroforese aproxima-se da variação gênica (Alfenas, 1998). Já quando se deseja apenas distinguir indivíduos ou clones entre si, o conjunto de bandas produzido no zimograma pode ser suficientemente informativo (fingerprinting) e nesse caso o conjunto de isoenzimas representa um fenótipo particular (Robinson, 1998).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar isolados de *S. rolfsii*, com base na compatibilidade vegetativa e análise isoenzimática.

MATERIAL E MÉTODOS

Compatibilidade vegetativa de grupos

Os três isolados utilizados foram provenientes de diferentes sub-regiões de Pernambuco: S₁. Zona da Mata, S₂. Agreste, S₃. Sertão. Os isolados foram repicados de culturas puras com sete dias de incubação e pareados em placa de Petri de nove centímetros de diâmetro, contendo BDA (batata-dextrose-ágar), sendo colocado um disco de micélio de seis milímetros de diâmetro, distribuídos de forma equidistante um do outro e incubados a temperatura ambiente. Utilizando-se quatro repetições. A compatibilidade foi avaliada macroscopicamente após 10 dias de incubação, observando-se a presença ou não de antagonismo (zona de aversão) na região de contato micelial, caracterizando ou não a compatibilidade vegetativa.

Análise isoenzimática em gel de poliacrilamida

Três escleródios de cada isolado de *S. rolfsii*, com sete dias de incubação em BDA foram transferidos para Erlenmeyers (150mL), contendo 50mL de meio líquido BD (batata-dextrose). Após sete dias de incubação à temperatura ambiente o micélio foi filtrado, lavado em água destilada e secado em papel de

¹Doutoranda do PPGF/UFRPE;

²UFRPE/DEPA-Fitossanidade, 52.171-900, Recife-PE

³Pesquisador da SPRRA-DEFIS

filtro. Em seguida, 0,5g de massa micelial foi macerada em almofariz, com auxílio de um pistilo, empregando-se 30mL de nitrogênio líquido, 3mL de tampão Tris-glicina a 0,125 M, pH 8,2 e 300mg de polivinilpirrolidona (PVP). Durante a maceração o almofariz foi mantido em banho de gelo. Após a maceração, as amostras foram transferidas para geladeira e mantidas a 4° C, por quatro horas, sendo posteriormente centrifugadas a 4000g por cinco minutos. O sobrenadante foi armazenado em freezer e utilizado como extrato protéico.

Para a análise eletroforética foi utilizado gel de poli(acrilamida) (PAGE) a 7% (AA/BIS, acrilamida e bis - acrilamida). Inicialmente, foi realizada a dissolução de 5,32g de acrilamida e 0,28g de bis-acrilamida na solução tampão Tris-glicina 0,125 M. Nesta mistura adicionou-se 0,1mL de TEMED (Tetrametilidiamida) e 2,8mL de persulfato de amônia a 1%. Em seguida, a solução foi vertida lentamente entre as placas, separadas por meio de um espaçador com 3mm de espessura. Após a polimerização completa do gel de poli(acrilamida), removeu-se o espaçador juntamente com a placa de acrílico, ficando o gel na placa de vidro. Os extratos de cada isolado foram colocados com o auxílio de micropipetas, nas cavidades do gel, empregando-se 20µL por cavidade. Utilizou-se corante azul de bromofenol como marcador. A corrida eletroforética processou-se durante quatro horas a 150 volt, em cuba horizontal contendo tampão Tris-glicina a 0,125 M, pH 8,2, fazendo-se uso de uma fita de tecido perfex como ponte de conexão.

A revelação dos géis seguiu os protocolos apresentados por Alfenas *et al.* (1991). Para detecção da peroxidase (PO), utilizou-se tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0 (100mL), 3-amino-9-etil-carbazole (0,05g), dimetilformamida (5mL), CaCl₂ 1M (2mL), H₂O₂ 3% (6mL) e em seguida o gel foi incubado no escuro, a 30 - 37°C, durante 30 minutos. Para esterase (EST) foi utilizado tampão fosfato a 0,05 M, pH 6,0 (100mL), α ou β-naftil-acetado 1% em acetona 50% (4,5mL) e fast blue RR (0,01g). As revelações de α e β-esterase foram feitas separadamente, sendo o gel incubado no escuro a temperatura ambiente, por uma hora. Para fosfatase ácida (ACP) a solução corante foi preparada com tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0 (100mL), α-naftil (0,05g), fast garnet (0,05g), MgCl₂ (1%) (1mL) e logo após o gel foi incubado no escuro, a 30°C, durante uma hora. Para leucina aminopeptidase (LAP) foi empregada a solução com L-leucina-β-naftilamida (0,02g), dimetilformamida (DMF) (5mL), fast black K sal (0,05g), tampão fosfato de potássio 0,1M pH 6,0. A fixação das cores foi feita com glicerol a 10%. Na detecção das proteínas totais, a coloração foi realizada incubando-se o gel por 12 horas em solução de

0,1g do corante Coomassie blue R250 dissolvido no fixador PAGE (45mL de metanol a 50%, 10mL de ácido acético glacial e 45mL de água destilada). Em seguida, efetuaram-se lavagens sucessivas com a solução PAGE, para remover o excesso de corante e fixar as bandas de proteínas.

A preservação dos géis foi realizada após a coloração, fixação e análise, sendo o gel mantido em uma solução constituída de metanol (65%) e glicerol (5%), sob agitação lenta, por 15 minutos. Cada unidade foi colocada em uma placa de vidro, revestida com papel celofane apropriado para a eletroforese, umedecido em água. Em seguida, a placa de gel foi coberta com folha de papel celofane igualmente umedecida em água e de mesma dimensão. A secagem foi feita à temperatura ambiente por 48 horas, sendo os géis removidos da placa de vidro, etiquetados e arquivados.

Os perfis eletroforéticos apresentados pelos isolados foram analisados comparativamente em função do número de bandas visualizadas, espessura das bandas, intensidade de coloração (Forte, Média e Fraca), e mobilidade relativa (RF), sendo confeccionados zimogramas para cada enzima analisada.

A mobilidade relativa foi calculada de acordo com a fórmula descrita por Alfenas *et al.* (1991) $RF = (d/D) \times 100$, onde: RF = mobilidade relativa das proteínas, d = distância percorrida pela molécula, D = distância percorrida pela linha frontal do corante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Compatibilidade vegetativa de grupos

No pareamento de hifas os isolados S₁ e S₂, provenientes da Zona da Mata e do Agreste, respectivamente, formaram anastomose hifálica (Figura 1), indicando que são compatíveis vegetativamente e agrupados em um mesmo GCV. Isto sugere similaridade genética e uma provável origem geográfica comum (Punja & Grogan, 1983), tendo em comuns atributos biológicos, fisiológicos e patogênicos (Katan *et al.*, 1991). No isolado S₃, proveniente do Sertão, não foi observada anastomose de hifas, quando pareados com os isolados S₁ e S₂, ocorrendo uma zona de aversão com os mesmos, indicando incompatibilidade e provavelmente dissimilaridade genética, ou seja, o isolado S₃ pertence a outro GCV. Kohn *et al.* (1991) constataram que isolados de um mesmo grupo de compatibilidade vegetativa (GCV) são talvez mais similares geneticamente do que isolados de *S. rofsii* de diferentes grupos. Harlton *et al.* (1995), verificaram que isolados de uma mesma região geográfica freqüentemente pertenciam a um mesmo GCV, embora alguns isolados provenientes de diferentes regiões geográficas pertencessem a um mesmo grupo. Esse grupo de interação pode ter ocorrido quando colônias

distintas de homocários de basidiósporos foram estabelecidos, seguidos por fusão de hifas compatíveis, ou durante o isolamento geográfico e adaptação de estirpes aos nichos ecológicos selecionados, seguidos por disseminação vegetativa (Coe & O'Neill, 1983).

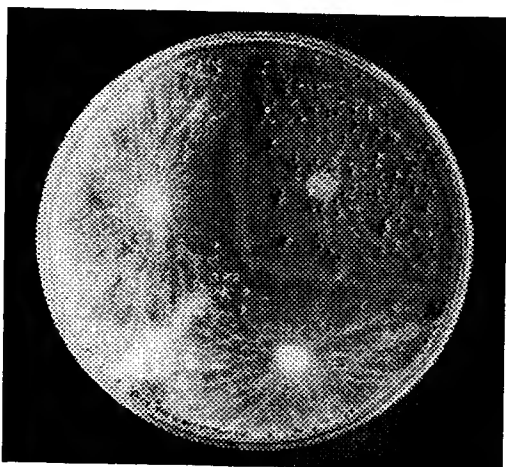


Figura 1 - Pareamento de isolados de *Sclerotium rolfsii* mostrando reação compatibilidade (S_1 e S_2) e incompatibilidade de S_3 , após 10 dias de incubação em BDA.

Análise isoenzimática em gel de poliacrilamida

Os resultados dos padrões eletroforéticos para proteínas totais foram de pouca resolução, não permitindo a distinção das bandas apresentadas. Das cinco enzimas testadas, apenas peroxidase não apresentou nenhuma atividade enzimática. Sendo os resultados das enzimas que apresentaram atividade enzimática representados em zimogramas (Figura 2).

Os padrões enzimáticos para α, β -esterase mostraram que os isolados S_1 e S_2 apresentaram semelhança quanto ao número, espessura e mobilidade relativa (Rf) das bandas, diferindo quanto a intensidade. Esses dois isolados apresentaram cinco bandas de isoesterase (Figuras 2A e 2B), indicando uma provável similaridade genética. Enquanto que o isolado S_3 apresentou seis bandas com mobilidades diferentes das apresentadas pelos isolados S_1 e S_2 , porém com bandas em comum na posição de Rf 35,00 e 46,66.

Para o padrão enzimático de fosfatase ácida (Figura 2C), os três isolados mostraram duas bandas praticamente iguais, tendo o isolado S_3 apresentado uma das bandas com mobilidade relativa ligeiramente maior que as reveladas pelos isolados S_1 e S_2 (Rf 50,00).

Com relação aos resultados do padrão enzimático para leucina aminopeptidase (Figura 2D), os isolados S_1 e S_2 apresentaram apenas uma banda de mobilidade relativa e espessuras

iguais, diferindo na intensidade, enquanto que o isolado S_3 apresentou duas bandas, tendo uma das bandas mobilidade relativa semelhante à apresentada pelos isolados S_1 e S_2 (Rf 44,00), que foi comum aos três isolados, indicando que provavelmente o isolado S_3 não apresenta similaridade genética com os isolados S_1 e S_2 .

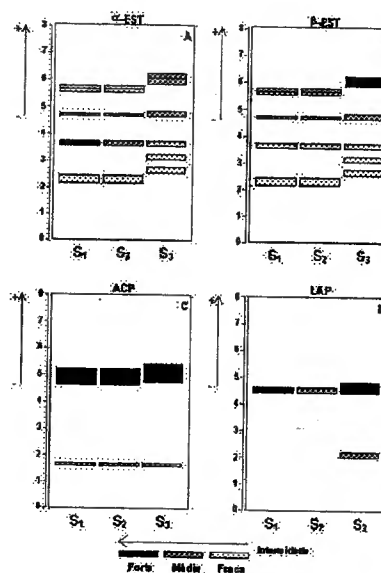


Figura 2 - Zimograma das atividades isoenzimáticas de *Sclerotium rolfsii* em gel de poliacrilamida: A. α -EST (α -esterase); B. β -EST (β -esterase); C. ACP (fosfatase ácida); D. LAP (leucina aminopeptidase).

A presença de uma banda a mais no isolado S_3 apresentada nos padrões eletroforéticos de esterases e leucina aminopeptidase, pode ser atribuída a uma variação intraespecífica dentro de *S. rolfsii*. Leucina aminopeptidase e esterase distinguiram claramente os três isolados de *S. rolfsii*. Resultados semelhantes foram obtidos por outros pesquisadores, como Hassan & Leslie (1985), quando estudaram a caracterização isoenzimática de espécies de *Asterophora* Ditmar. Sincox *et al.* (1992) também, através da técnica de eletroforese, em estudos de polimorfismo isoenzimático de *Cochiobolus carbonum* Nelson, distinguiram três raças deste patógeno pela presença ou não de esterase e leucina aminopeptidase, enquanto que Powers *et al.* (1989) diferenciaram consistentemente espécies e formas especiais do gênero *Cronartium* Fr., através de esterase.

Os resultados apresentados sugerem que os isolados da Zona da Mata e Agreste são similares, mostrando-se diferentes do isolado do Sertão.

ABSTRACT

Vegetative compatibility and isoenzymatic characterization of the isolates of *Sclerotium rolfsii*

Vegetative compatibility and isoenzyme analysis have been used to characterize several phytopathogenic. Seeking to evaluate the vegetative compatibility of isolate of *S. rolfsii* obtained of common bean in different area of Pernambuco: Zona da Mata, Agreste and Sertão, the same were placed in plates of Petri of 9 cm of diameter in BDA and incubated in room temperature. The evaluation was proceeded by macroscopic exam after 10 days of incubation of the isolates, being observed the formation or no of aversion zones between the isolates. For the isoenzyme analysis they were appraised the systems α , β -esterase, acid phosphatase and leucine aminopeptidase in polyacrylamida gel 7%. The electrophoretic patterns were analyzed through the relative mobility of the bands, starting from which fingerprinting was made for each analyzed enzyme. The isolate of the Zona da Mata and Agreste were similar phenotypes in relation to the vegetative compatibility and electrophoretic patterns. The isolate of the Sertão was vegetative incompatible with the others and it presented standard different electrophoretic standard patterns.

Key words: *Sclerotium rolfsii*, *Phaseolus vulgaris*, Vegetative compatibility, isozyme analysis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ALFENAS, A.C. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa: UFV, 1998. 574p.
- 2 ALFENAS, A.C. et al. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Viçosa: UFV, 1991. 242 p.
- 3 CARDOSO, J.E. Podridão do colo. In: SARTORATO, A.; RAVA, C.A. Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.165-172.
- 4 COE, G.; O'NEILL, N.R. Selecting sugarbeet seedlings in the greenhouse for resistance to *Sclerotium rolfsii*. Journal of the American Society Sugar Beet Technology, v.22, p.35-45, 1983.
- 5 HARLTON, C.E.; LÉVESQUE, C. A.; PUNJA, Z. K. Genetic diversity in *Sclerotium (Athelia) rolfsii* and related species. Phytopathology, St. Paul, v.85, p.1269-1281, 1995.
- 6 HASSAN A.M.; LESLIE P.K. Isozyme characterization of Ascospheales associated with bees. II. *Ascophaera major*, *Ascophaera atra*, and *Ascophaera asterophora*. Mycology, v.77, p. 366-372, 1985.
- 7 KATAN, T.; ZAMIR, D.; SARFATTI, M. Vegetative compatibility in *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Phytopathology, St. Paul, v.81, p.255-262, 1991.
- 8 KOHN, L.M.; CARBONE, I.; ANDERSON, J.B. Mycelial interactions in *Sclerotinia sclerotiorum*. Experimental Mycology, New York, v.14, p.255-26, 1991.
- 9 LESLIE, J.F. Fungal vegetative compatibility. Annual Review Phytopathology, Palo Alto, v.31, p.127-150, 1993.
- 10 NAKATA, K. Studies on *Sclerotium rolfsii* Sacc. Part I. The phenomenon of aversion and its relation to the biologic forms of the fungus. Bulletin Science Fakult Terkult., v.1, p.177-190, 1925.
- 11 POWERS, H.R.JR.; LIN, D.; HUBBES, M. Interspecific and intraspecific differentiation within the genus *Cronartium* by isozyme and protein patern analysis. Plant Disease, St. Paul, v.73, p.691-694, 1989.
- 12 PUNJA, Z.K. The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii*. Annual Review Phytopathology, Palo Alto, v.23, p.97-127, 1985.
- 13 PUNJA, Z.K.; GROGAN, R.G. Basidiocarp induction, nuclear condition, variability, and heterokaron incompatibility in *Athelia (Sclerotium rolfsii)*. Phytopathology, St. Paul, v.73, p.1273-1278, 1983.
- 14 PUNJA, Z.K.; RAHE, J.E. *Sclerotium*. In: SINGLETON, L.L.; MIHAIL J.D.; RUSH, C.M. (Ed.). Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi. St. Paul: APS Press, 1992. p. 166-170.
- 15 ROBINSON, I.P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. IN: ALFENAS, A.C. (Ed.). Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa: UFV, 1998. p. 329-380.
- 16 SINCOX, K.D.; NICKRENT, D.; PEDERSEN, W.L. Comparison of isozyme polymorphism in races of *Cochliobolus carbonum*. Genetics, Chapel Hill, v.82, p.621-624. 1992.