

## MARCADORES QUÍMICOS E MOLECULARES APLICADOS AO ESTUDO DE DIVERSIDADE DE *Pyricularia grisea*

Maycon Eduardo Nicoletti<sup>(1)</sup>, Cristiane Maria da Silva<sup>(2)</sup>, Gustavo Emygdio Halfen<sup>(3)</sup>, Fernando Adami Tcacenco<sup>(4)</sup>, Francisco Carlos Deschamps<sup>(4)</sup>. <sup>1</sup>Biólogo Bacharel, bolsista do CNPq, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Epagri – Estação Experimental de Itajaí, C.P. 277, 88301-970 Itajaí, SC, e-mail: maycon\_bio@hotmail.com. <sup>2</sup>Mestranda em RGV da UFSC. <sup>3</sup>Graduando em Ciências Biológicas, Universidade do Vale do Itajaí (Univali), Bolsista do CNPq. <sup>4</sup>Pesquisador, Estação Experimental de Itajaí, Epagri.

A brusone, causada pelo fungo *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc., é considerada a principal doença da cultura do arroz (*Oriza sativa*). Esse fungo apresenta alta variabilidade genética, resultando em mais de 256 raças fisiológicas. As causas da diversidade de *P. grisea* não são muito bem entendidas, acreditando-se que estejam associadas a mutações, deleções e trocas genéticas entre cepas, e a inserção de elementos transponíveis (Kistler & Miao, 1992). De maneira convencional, o estudo de variabilidade de *P. grisea* é realizado através da avaliação da virulência de isolados, inoculados em vários genótipos de arroz, com diferentes genes de resistência à brusone. Mais recentemente, com o emprego de marcadores moleculares, foi possível melhorar o agrupamento dos isolados. A rep-PCR é a técnica mais recentemente utilizada nos estudos populacionais e se baseia na identificação de polimorfismo pela amplificação das seqüências entre as cópias do elemento repetitivo Pot-2 distribuídas ao longo do genoma.

Além da seqüência nucleotídica, os produtos de sua transcrição e da atividade celular, tais como proteínas e especialmente lipídeos, apresentam potencial para serem usados como marcadores na caracterização de raças de fungos. Os ácidos graxos (AGs) são marcadores taxonômicos úteis e já foram utilizados na classificação de vários grupos de microrganismos (KRIEGER *et al.*, 2003).

A partir destes conhecimentos, objetivou-se, com esse trabalho, comparar os agrupamentos formados através da análise por marcador molecular (rep-PCR) e de perfil de ácidos graxos.

Foram utilizados 20 isolados de *P. grisea* pertencentes à raça IG-1 originados da cultivar Epagri 107. Para a extração dos lipídios, a biomassa fúngica foi processada conforme protocolo adotado por Krieger *et al.* (2003) e a análise dos ésteres metílicos foi realizada em cromatógrafo a gás. A avaliação dos dados quantitativos foi realizada através de análise de conglomerados, considerando o quadrado da distância Euclidiana.

Para a obtenção das amostras de DNA, foram coletados fragmentos de papel-filtro com sobreposição de micélio provenientes de cepas de *P. grisea* em meio BDA, conforme metodologia proposta por Scoz *et al.* (2006), sendo a extração do DNA baseada no protocolo descrito por Scott *et al.* (1993). A quantificação e a qualificação do DNA foram feitas através de fluorômetro e corrida eletroforética por 90 min. em géis de agarose 0,8% corados com SYBR<sup>®</sup> Safe (Invitrogen). O DNA genômico dos isolados de *P. grisea* foi submetido à técnica de rep-PCR em reações de 25µL, nas condições descritas por George *et al.* (1998). Os fragmentos foram submetidos a corrida eletroforética em géis de agarose 0,9% por 150 min. e corados com SYBR<sup>®</sup> Safe. Para estimativa do tamanho dos fragmentos, foi utilizado o marcador 1 kb Plus (Invitrogen<sup>®</sup>). Os dados foram convertidos em presença/ausência de bandas em uma matriz de similaridade e a análise foi realizada através do coeficiente de Jaccard pelo método UPGMA em NT-SYSpC.

Foi observado que os ácidos graxos palmítico, esteárico, oléico e o linoléico estavam presentes em todos os acessos de *P. grisea* avaliados (Tabela 1). Este perfil, que em princípio pode ser considerado relativamente simples, já foi relatado em outros estudos (Silva *et al.*, 1998; Pupin *et al.*, 2000; Krieger, 2003).

Através da análise de agrupamento foi possível observar a formação de três grupos (Figura 1): grupo I, com nove indivíduos; grupo II, com três indivíduos; e grupo III, com oito

indivíduos, sendo o ácido linoléico de maior concentração em todos os grupos. Os grupos I e II apresentaram maior semelhança quanto à concentração de ácidos graxos. O grupo II destaca-se por apresentar a maior concentração dos ácidos palmítico, esteárico e oléico, dentre os grupos.

A análise molecular via rep-PCR resultou na amplificação de 13 bandas, com peso molecular variando entre 1.200 e 7.000 pares de bases (pb); destas, somente a banda de 1350pb foi polimórfica (Figura 2). O dendrograma formado através do coeficiente de Jaccard (dados não mostrados) agrupou os 20 isolados em apenas dois grupos (grupos A e B, em destaque na Figura 1), sendo o primeiro com 16 indivíduos e o segundo com quatro indivíduos. Ambos os grupos apresentaram 77,5% de similaridade entre si, indicando a baixa variabilidade genética entre os isolados testados. Este resultado é consequência de origem dos isolados, provenientes da mesma cultivar de arroz e pertencentes à mesma raça fisiológica segundo testes de virulência realizados através do método convencional.

Os 20 isolados agruparam-se diferentemente quando os perfis de ácidos graxos e de rep-PCR são comparados, distribuindo-se de forma aleatória no dendrograma. Na análise do perfil de ácidos graxos, verifica-se maior diferença entre os isolados quando comparada ao método molecular. Por exemplo, os isolados 4, 9, 10 e 18, em destaque na Figura 1, formam um conglomerado distinto (grupo B), com 100% de similaridade entre os indivíduos, quando analisados através de rep-PCR, porém os mesmos indivíduos distribuem-se entre os grupos I e III do perfil de ácidos graxos.

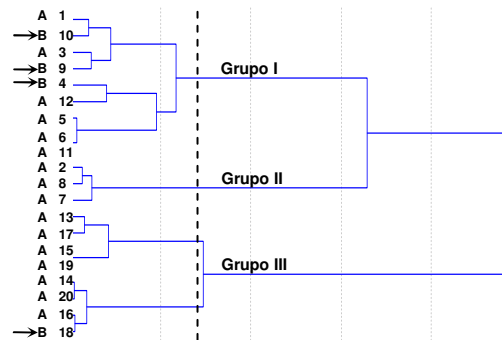
Pelos resultados obtidos neste trabalho, constata-se que não há similaridade entre os métodos de análise. Sendo assim, eles devem ser considerados como métodos distintos e independentes, devendo ser analisados isoladamente, caso sejam adotados como método de diferenciação de cepas de *P. grisea*.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

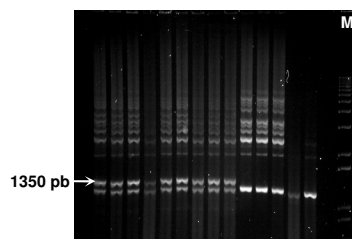
- GEORGE, M.L.C.; NELSON, R.J.; ZEIGLER, R.S.; LEUNG, H. Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequences. **Phytopathology**, St. Paul, v.88, n.3, p.223-229, 1998.
- KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas Cultivadas**, 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, 1997 p. 85-88.
- KISTLER, H.C.; MIAO, V.P. New modes of genetic change in filamentous fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.30, p.131-152, 1992.
- KRIEGER, I.; FIAMONCINI, J.; SILVA, C.M. da; MIURA, L.; DESCHAMPS, F.C. Ácidos graxos como marcadores químicos de *Pyricularia grisea*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 3. **Anais...** 2003, Balneário Camboriú, SC. Itajaí: Epagri, 2003 p.323-325.
- PUPIN, A.M.; MESSIAS, C.L.; PIEDRABUENA, A.E.; ROBERTS, D.W. Total lipids and fatty acids of strains of *Metarhizium anisopliae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 121-128, 2000.
- SCOTT, R.P.; ZEIGLER, R.S.; NELSON, R.J. A procedure for miniscale preparation of *Pyricularia grisea* DNA. **Intl. Rice Res. Notes**, v.18, n.1, p.47-48, 1993.
- SCOZ, L.B.; NICOLETTI, M.E.; MIURA, L.; TCACENCO, F.A. Nova metodologia para obtenção de material genético para estudos de biodiversidade de *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 58., 2006, Florianópolis. **Anais eletrônicos...** São Paulo: SBPC/UFSC, 2006. Disponível em: <http://www.sbpnet.org.br/livro/58ra>. Acesso em: 27/03/07.
- SILVA, M.; MANFIO, G.P.; CANHOS, V.P. Caracterização de linhagens de mucorales através do perfil de ácidos graxos. **Revista de Microbiologia**, 1998, v.29, n.4, p.276-281.

**Tabela 1.** Composição de ácidos graxos nos três grupos de isolados de *Pyricularia grisea* formados através da análise de agrupamento. Itajaí, SC, 2007.

| Grupos | Palmitico     | Estearico | Oléico | Linoléico | Linolênico |
|--------|---------------|-----------|--------|-----------|------------|
|        | ----- % ----- |           |        |           |            |
| I      | 19,6          | 4,1       | 11,0   | 48,3      | 17,1       |
| II     | 23,2          | 5,3       | 13,9   | 45,2      | 12,4       |
| III    | 19,4          | 3,6       | 12,4   | 42,7      | 21,9       |



**Figura 1.** Comparação de 20 isolados de *Pyricularia grisea* através de agrupamentos derivados da análise do perfil de ácidos graxos (grupos I, II e III) e de rep-PCR (Grupos A e B). As setas indicam os isolados pertencentes ao grupo B formado a partir de rep-PCR, com 100% de homologia entre os indivíduos, e que se distinguiram através do perfil de ácidos graxos, distribuindo-se em grupos diferentes. Itajaí, SC, 2007.



**Figura 2.** Produtos de amplificação de rep-PCR derivados de diferentes isolados de *Pyricularia grisea*. Os fragmentos foram submetidos a corrida eletroforética em géis de agarose 0,9% por 150 min e corados com SYBR® Safe (Invitrogen). M = marcador de peso molecular de 1Kb Plus Invitrogen®. Itajaí, SC, 2007.

Agradecimentos: Ao CNPq, pelas bolsas concedidas a G.E.H e M.E.N. (Projeto 507096/2004-5).