

DIVERSIDADE GENÉTICA POR MARCADORES ISSR DE ISOLADOS DE *Colletotrichum gloeosporioides* PROVENIENTES DE CAFEIEIRO

Viviani Vieira. Marques Marçal¹; Laurival A. Vilas-Boas²; Luciana Meneguim³; Luzia D. Paccola-Meirelles⁴; Rui P. Leite Jr⁵

Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – CBP&D/Café

¹ Pesquisador, M.Sc., Embrapa Café, Londrina - PR, vmmarcal@yahoo.com.br

² Pesquisador, D.Sc., Embrapa Café, Londrina - PR laurival.vboas@gmail.com

³ Doutoranda em Agronomia, M.Sc., Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR, lmenegui@iapar.br

⁴ Pesquisador, D. Sc, Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR, paccola@uel.br

⁵ Pesquisador, D. Sc, Instituto Agrônomo do Paraná, Londrina - PR, ruileite@iapar.br

RESUMO: No Brasil, espécies do gênero *Colletotrichum* são frequentemente isoladas de cafeeiro e associadas a sintomas de necrose e mumificação em frutos verdes, mancha manteigosa em folhas e queima de folhas e ponteiros. Os métodos moleculares de identificação de fungos possibilitam uma avaliação mais precisa da variabilidade genética, em relação aos métodos morfológicos. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar por ferramentas de análise molecular isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de cafeeiros das regiões Noroeste, Norte e Oeste do Estado do Paraná. Os isolados do fungo foram purificados e culturas monospóricas foram utilizadas para a produção de massa micelial. O DNA extraído foi utilizado para amplificação com *primers* específicos por meio da técnica de ISSR. Foram testados três *primers* e o resultado do conjunto dos *primers* foi utilizado para construção de um dendrograma. Os resultados indicaram que o método foi capaz de mostrar diversidade genética entre dos isolados de cafeeiro bem como estabelecer correlação geográfica de uma subpopulação. Os dados serão posteriormente correlacionados com outras características de interesse visando compreender a relação do fungo com o seu hospedeiro.

Palavras - Chave: *Coffea arabica*; diversidade genética, antracnose.

GENETIC DIVERSITY BY ISSR MARKERS OF *Colletotrichum gloeosporioides* STRAINS OBTAINED FROM COFFEE PLANTS

ABSTRACT: In Brazil, species of *Colletotrichum* are usually isolated from coffee plants and associated with symptoms of necrosis and mummified green fruits, buttery spot and die-back. Molecular methods for fungi identification are more accurate for assessment of genetic variability compared to morphological methods. The objective of this study was to characterize by ISSR markers isolates of *C. gloeosporioides* obtained from coffee plants of the Northwest, North and West regions of Paraná State. Isolates of *Colletotrichum* were purified and monosporic cultures were used to produce mycelium mass. The extracted DNA was used for PCR amplification with specific primers through the technique of ISSR. Three primers were tested and the amplified products were used to construct a dendrogram. The results indicated that the ISSR markers was able to show genetic diversity within isolates of coffee and to establish a geographical correlation to a subpopulation of this pathogen. The data will be correlated with other characteristics of interest to understand the relationship of the fungus with its host.

Key words: *Coffea arabica*; genetic diversity; anthracnose.

INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Colletotrichum* são responsáveis por várias doenças como manchas em folhas, murchas, antracnoses e podridões em frutos, em diversas culturas de importância econômica BAILEY et al., 1992; GARRIDO et al., 2008).

No Brasil, espécies do gênero *Colletotrichum* são frequentemente isoladas de cafeeiro e associadas a sintomas de necrose e mumificação de frutos verdes, mancha manteigosa em folhas e queima de folhas e ponteiros (NECHET e ABREU, 2002; SERA et al., 2005).

A identificação das espécies de *Colletotrichum* é fundamental para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de práticas que visam o controle das doenças causadas por esses fungos (FREEMAN et al., 1998). A determinação taxonômica do gênero *Colletotrichum* é feita com base em caracteres morfológicos, testes de patogenicidade e comparações bioquímicas (GUNNELL & GUBLER, 1992; FREEMAN et al, 1998). Com base nestas características, três espécies de *Colletotrichum* têm sido identificadas em cafeeiro de diversos países onde a espécie *Coffea* sp. está presente. Porém, existem limitações para a identificação de espécies muito próximas como *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, principalmente porque, isolados destas espécies apresentam uma ampla variação genética e morfológica (SUTTON, 1992).

Vários estudos comparando espécies de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* por meio de ferramentas

moleculares como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) do DNA mitocondrial (SREENIVASAPRASAD et al., 1993; FREMAN et al., 1993), *primers* específicos construídos com base em regiões conservadas do rDNA (FREEMAN et al., 2001; TALHINHAS et al., 2002; TALHINHAS et al., 2005), análise de regiões ricas em A+T (FREEMAN et al., 2001), RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*) e primers arbitrários (AP-PCR) ou ISSR (*Simple Sequence Repeats*) (AFANADOR-KAFURI et al., 2003; WHITELAW-WECKERT et al., 2007), RFLP da amplificação do gene da β -tubulina (WHITELAW-WECKERT et al., 2007); RFLP e sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Sequence*) do DNA ribossomal (rDNA) (AFANADOR-KAFURI et al., 2003; TALHINHAS et al., 2005; WHITELAW-WECKERT et al., 2007) e, recentemente, PCR em tempo real tem sido realizados (GARRIDO et al., 2008).

No Brasil, por meio de critérios morfológicos, culturais, bioquímicos, moleculares e de patogenicidade, verificou-se variabilidade entre isolados de *Colletotrichum* spp. coletados em regiões produtoras de café no Estado de Minas Gerais (DORIZZOTO, 1993; NECHET & ABREU, 2002; OROZCO-MIRANDA, 2003). Julliat et al., (2006) utilizando o método de RAPD relataram a diversidade entre 22 isolados de *C. gloeosporioides* com distância genética máxima de 23,6% sugerindo uma associação da análise molecular com resultados de patogenicidade de oito dos isolados, indicando a presença de espécies e/ou raças de *C. gloeosporioides* em cafeeiros no Estado de Minas Gerais.

No Estado do Paraná, Silva e colaboradores (2005) relataram a presença de *Colletotrichum* spp. em cafeeiros, e destacaram três morfotipos entre os isolados investigados, apontando para variabilidade cultural e morfológica. No entanto, não existem relatos sobre a diversidade genética em *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro no Estado e neste contexto este trabalho teve como objetivo identificar e avaliar a diversidade genética entre isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro do Estado do Paraná por meio de marcadores ISSR.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo e extração do DNA genômico

Foram selecionados 79 isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de cafeeiro pertencentes à coleção de microrganismos fitopatogênicos do Laboratório de Bacteriologia e Virologia do Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR. Culturas monospóricas de cada isolado, cultivadas em meio PGA (0,28%², Glucose, 1,23% MgSO₄7H₂O, 0,27% KH₂PO₄, 0,20% Peptona de Soja e 1,5% Ágar) foram transferidas para tubos contendo 15 mL de YPD líquido (10 g de extrato de levedura, 20 g de peptona, 20 g de dextrose, 1000 ml de água destilada, pH 6-7) e mantidos sob agitação de 90 rpm a 24 °C por sete dias. Após o período de crescimento, o micélio foi filtrado a vácuo e estocado a -80 °C. A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Raeder & Broda (1985).

Variabilidade genética por marcadores ISSR

Para a amplificação, foram utilizados *primers* derivados de regiões microssatélites: AP1 (5'-CAGCAGCAGCAGCAG-3'); AP3 (5'-GACACGACACGACAC-3') (GUPTA et al., 1994) e AP4 (5'-GACAGACAGACAGACA-3') (WEISING et al., 1989). A reação de amplificação foi realizada com volume final de 50 μ l, contendo tampão da enzima, 0,14 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1 U de Taq DNA polimerase, 0,25 mM de cada *primer*, 10 - 100 ng do DNA genômico e água milli-Q (q.s.p.). As amplificações foram realizadas em termociclador PTC100™ usando o seguinte programa: um passo inicial de desnaturação a 95 °C por 5 min; 35 ciclos de 30 seg a 95 °C, 30 seg a 60 °C (AP1) e 48 °C (AP3 e AP4) e 1,5 min a 72 °C; foi realizada uma etapa de extensão final a 72 °C por 15 min e manutenção a 4 °C. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em agarose 2,5% em tampão TBE 0,5X contendo 0,2 μ g de brometo de etídio/ml. Os geis foram registrados utilizando o sistema Kodak EDAS 2.0 e a avaliação do polimorfismo foi realizada com o auxílio do programa BioNumerics (*Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, Versão 1.01*). Para agrupamento e construção dos dendrogramas foram utilizados os algoritmos UPGMA e coeficiente de Pearson com tolerância de 1%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de ISSR gerou diferentes fragmentos, com tamanho variando de 300 a 2000 pb aproximadamente. Com base nestes resultados, foi possível observar que a amplificação com os três *primers* com base nas sequências repetitivas, foi capaz de evidenciar polimorfismos entre os isolados.

Os perfis de amplificação gerados por cada *primer* foram analisados individualmente e em conjunto pelo software Bionumerics. Todos os *primers* testados mostraram-se eficientes para evidenciar o polimorfismo em isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de cafeeiro (dados não mostrados). No entanto, o melhor agrupamento foi obtido pelo *primer* AP-4 que gerou agrupamento semelhante ao mostrado pela análise polifásica (Figura 1).

A análise do dendrograma (Figura 1) mostra a ocorrência de dois grupos bem definidos com similaridade inferior a 60% (grupos I e II). Distribuição semelhante foi observada quando se avaliou o agrupamento com os *primers* isoladamente, mostrando consistência nos resultados.

O grupo I, que compreende 83,1% dos isolados, se divide em outros dois subgrupos com divergência de cerca de 25 %. Não foi observada a presença de clones dentro da população.

A análise comparativa dos isolados, considerando a origem geográfica, indicou que 84% dos isolados (11 isolados) classificados no grupo II são provenientes de cafeeiro da região Norte, sendo que somente dois isolados tiveram sua origem nas regiões Noroeste e nenhum na região Oeste. Entretanto, os genótipos correspondentes ao grupo I estão distribuídos nas diferentes regiões avaliadas. Isto indica uma relação geográfica, observando uma prevalência de genótipo do grupo II em cafeeiros da região Norte.

Os resultados mostram que a técnica utilizada foi capaz de indicar a existência de diversidade dentro do grupo, apesar da alta conservação evidenciada na região ribossomal. Novas análises serão feitas visando à correlação dos dados de amplificação com outras características como morfológicas e de patogenicidade. Serão incluídos ainda novos isolados, bem como isolados *C. gloeosporioides* obtidos de outras culturas

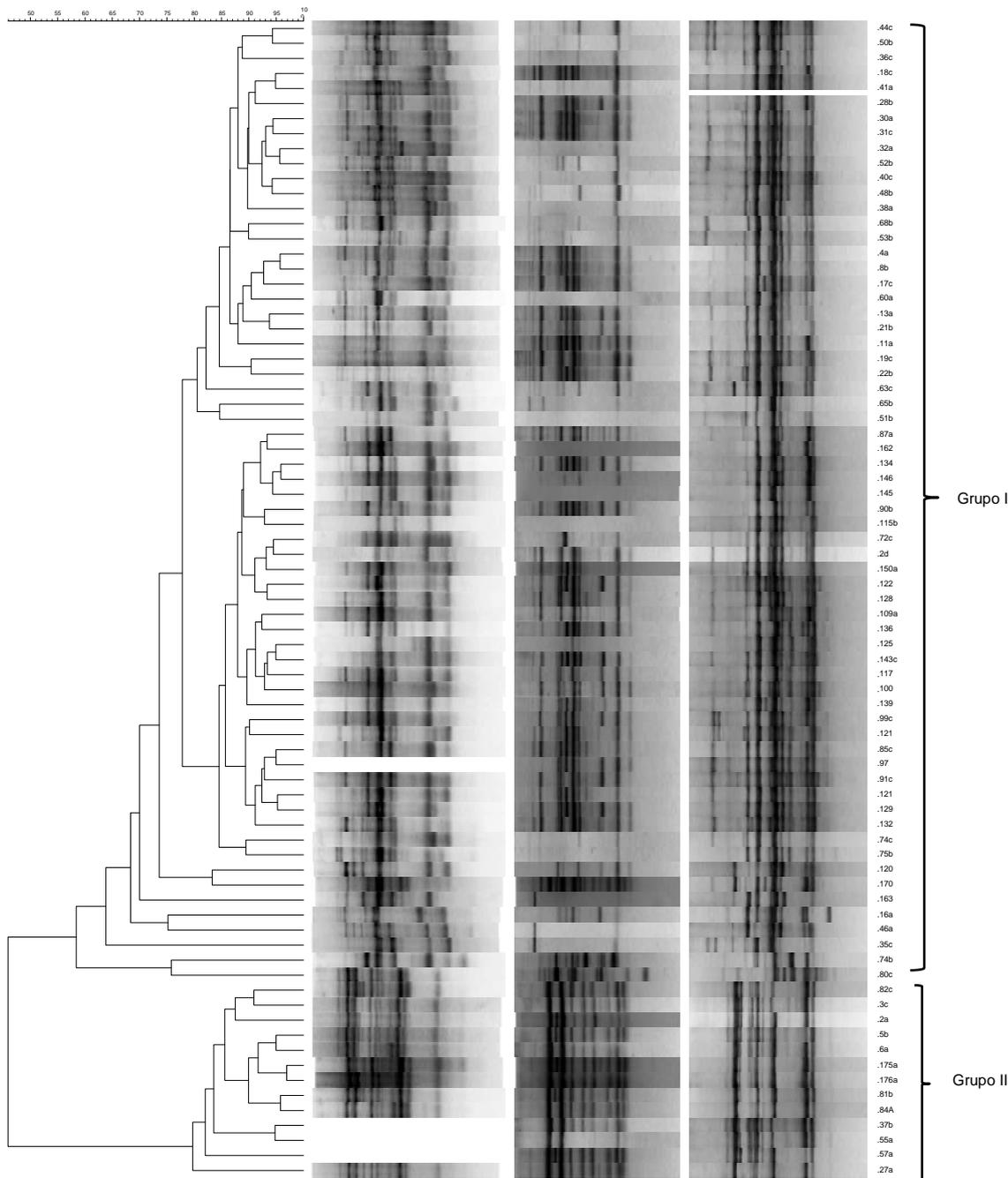


Figura 1. Dendrograma gerado a partir da análise das bandas obtidas com os *primers* AP1, AP3 e AP4 do ISSR com isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de cafeeiro do Estado do Paraná.

CONCLUSÕES

A técnica de ISSR é capaz de acessar a diversidade presente na população de *C. gloeosporioides* isolada de cafeeiros do Estado do Paraná.

A população de *C. gloeosporioides* isolada de cafeeiro apresenta diversidade genética que pode ser correlacionada com características de interesse.

A análise da diversidade permite estabelecer correlação entre população de isolados de *C. gloeosporioides* e a região Norte do Paraná.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFANADOR-KAFURI, L., MINZ, D., MAYMON, M. FREEMAN, S. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. **Phytopathology**. v.93, p.579-587, 2003.

BAILEY, J.A.; O'CONNEL, R.J.; PRING, R.J.; NASCH, C. **Infection strategies of *Colletotrichum* species**. In: Bailey, J.A.; Jeger, M.J. (Ed.) *Colletotrichum* Biology, pathology and control. England: CAB, 1992.

BEYNON, S.M.; CODDINGTON, A.; LEWIS, B.G.; VÁRZEA, V.M.P. Genetic variation in the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae*. **Physiology Molecular Plant Pathology**, v.46, p. 457-470, 1995.

DORIZZOTTO, A. **Caracterização morfológica e patogenicidade de *Colletotrichum* sp. associados a cafeeiros (*Coffea arabica* L.) em dois municípios de Minas Gerais**. 1993. 67p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FREEMAN, D.S., MINZ, D., MAYMON, M.; ZVEIBIL, A. Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum sensu* Simmonds. **Phytopathology**. v.91. p.586-592. 2001
FREEMAN, S., KATAN, T. SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**. v.82, p.596-605, 1998.

GARRIDO, C.; CARBÚ, M.; FERNÁNDEZ-ACERO, F.J.; BOOMHAM, M.; COLYER, A. Development of protocols for detection of *Colletotrichum acutatum* and monitoring of strawberry anthracnose using real-time PCR. **Plant Pathology**, v.58, p.43-51, 2008.

GUNNEL, P.; GUBLER, W. D. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. **Mycologia**, v.84, p.157-16, 1992.

GUPTA, M.; CHYI, Y.S.; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, J.R. Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical Applied Genetics**. v.89, p.998-1006, 1994.

JULIATTI, F.C. SILVA, C.C.N.; GIOVANINI, M.P.; GOULART, L.R.; JULIATTI, F.C.; POLIZEL, A.C.; Agressividade e divergência genética por rapd de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* coletados em lavouras cafeeiras de Minas Gerais. **Bioscience Journal**. v.22, p.159-169. 2006.

NECHET, K.L. Caracterização morfológica e testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**. v.26, p.1135-1142, 2002.

OROZCO, M. E. F. **Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae***. 2003. 147p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) Universidade Federal de Lavras, Lavras.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**. v.1, p.17-20, 1985.

- SERA, G.H.; ALTEIA, M.Z.; SERA, T.; PETEK, M.R.; ITO, D.S. Correlação entre a ocorrência de *Colletotrichum* spp. e outras características agrônômicas em cafeeiros, **Bragantia**. v.64, p.435-440, 2005.
- SILVA, M. R. L.; MENEGUIM, L; GONÇALVES, J. S.; PISTORI, J. F.; LEITE Jr.; R. P. Caracterização de *Colletotrichum* spp. associado ao cafeeiro no Estado do Paraná. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 5, 2005. **Anais...** Londrina: EMBRAPA, 2005. CD-ROM
- SREENIVASAPRASAD, S.; MILLS, P.R.; BROWN, A.E. Genetic structure and relationship to the group species *Colletotrichum gloeosporioides*. **Micological Research**., v.97, p.995-1000, 1993.
- SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph. In: BAILEY, J.A.; JEGUER, M.J. (Eds.). **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. England, CAB International. p.1-26, 1992.
- TALHINHAS, P.,SREENIVASAPRASAD, S.; NEVES-MARTINS, J.; OLIVEIRA, H. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. **Applied and Environmental Microbiology**. v.71, p.2987-2998, 2005.
- TALHINHAS, P.; SREENIVASAPRASAD, S.; NEVES-MARTINS, J.; OLIVEIRA, H. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. **Phytopathology**. v.92, p. 986-996, 2002.
- WEISING, K., WEIGAND, F., DRIESEL, A., KAHL, G., ZISCHER, H., EPPLEN, J.T. Polymorphic sample GATA/GACA repeats in plant genomes. **Nucleic Acid Research**. v.17, p.10128, 1989.
- WHITELAW-WECKERT, M.A.; CURTIN, S.J.; HUANG, R.; STEEL, C.C.; BLANCHARD, C.L.; ROFFEY, P.E. Phylogenetic relationships and pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* isolates from grape in subtropical Australia. **Plant Pathology**. v.56, p.448-463, 2007.