

VARIABILIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. ASSOCIADOS AO CAFEIEIRO POR AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (AFLP)

Cecilia Armesto, Igor Almeida, Carolina da Silva Perez, Cibelle Tamiris de Oliveira, Ricardo Nakamura

RESUMO

No reino fungi a capacidade de causar doenças em plantas surgiu várias vezes durante o processo evolutivo. Em muitos casos, a capacidade de infectar espécies de plantas depende de genes específicos. Estes genes são responsáveis pela determinação de "fatores de virulência", que estão envolvidos na síntese de proteínas, toxinas e enzimas (VAN DER DOES & REP, 2007). A Mancha-manteigosa é uma doença que acomete a cultura do café, e tem por agente etiológico *Colletotrichum gloeosporioides*. Como sintoma característico, apresenta nas folhas manchas verde-claras de aspecto oleoso. A doença pode apresentar ainda necrose, abortamento de flores, mumificação de frutos, seca de ramos, e em estágios mais avançados, manchas de coloração verde-pálida a amarela e bordos irregulares com consequente queda das folhas (OROZCO, et al. 2002). Por meio de diversos estudos avaliando o poder de patogenicidade dos isolados observa-se, que, o referido patossistema é composto por populações de *C. gloeosporioides* que ocasionam os mais diversos sintomas. Dentro destes isolados patogênicos acredita-se que existam diferentes níveis de virulência os quais possam estar relacionados com: o aparato enzimático relacionado à patogênese, a regulação de genes específicos, bem como a diferentes sintomas observados nas plantas relacionados à germoplasmas particulares. Deste modo o presente trabalho visa avaliar os níveis de virulência de isolados de *C. gloeosporioides* por meio análise por Amplified fragment length polymorphism – AFLP e sua patogenicidade.

Palavras-chaves: Cafeicultura, Fungo, Genética, Patógenos

INTRODUÇÃO

O gênero *Colletotrichum* encontra-se amplamente distribuído por todas as regiões produtoras cafeeiras pelo mundo, ora ocorre como saprófita, ora causando doenças (PARESQUI et al, 2003). Atualmente na cultura do café, são conhecidas três espécies de *Colletotrichum*: *C. kahawae* - espécie geograficamente restrita ao continente africano, *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*.

Nas lavouras cafeeiras do Brasil predomina a espécie conhecida como *Colletotrichum gloeosporioides*, o qual está associado a um complexo de sintomas: antracnose de folhas e frutos, seca ou morte de ponteiros (*die-back*), queima-castanha (*brown blight*) e a mancha manteigosa (OROZCO et al., 2002). Apesar de ser considerado um patógeno secundário, devido as várias formas endofíticas e não patogênicas do mesmo, a gama de sintomas relacionados anteriormente associadas a provável variabilidade genética, justificam a relevância do mesmo na classificação das doenças do cafeeiro quanto a importância.

A antracnose do cafeeiro apresenta-se como manchas irregulares, grandes, de coloração castanha a castanho-acinzentada, ocorrendo comumente nas margens das folhas (OROZCO, 2003; PARADELA FILHO et al., 2001). Segundo Paradelo Filho et al. (2001), as lesões mais críticas e prejudiciais para o cafeeiro são aquelas em que o fungo incide sobre gemas, flores e chumbinho, provocando sua morte e queda; e enegrecimento e morte de ramos. Os autores relatam, ainda, que os sintomas não estão relacionados com plantas injuriadas ou culturas mal manejadas; pelo contrário, eles são mais intensos e evidentes em culturas novas e muito bem desenvolvidas.

Mansk e Matiello (1977) descreveram como sintomas característicos da mancha manteigosa, manchas verde-claras de aspecto oleoso menos brilhante que a superfície da folha, medindo de 2 a 10 mm. Em estágios mais avançados essas manchas adquirem a coloração verde-pálida a amarela e bordos irregulares,

as quais coalecem e ocasionam a queda prematura das folhas. Em ramos e frutos, as lesões apresentam-se menores, com diâmetros entre 2 a 3 mm, deprimidas, necróticas de cor marrom-clara e bordas irregulares. Ataques intensos geralmente são observados em folhas e ramos novos de plantas adultas, ocorrendo necrose e seca dos ramos na parte apical, podendo levar à morte das plantas de forma descendente (FERREIRA, 2006)

No Estado do Paraná, Silva et al. (2005) relataram a presença de *Colletotrichum* spp. em cafeeiros, e destacaram três morfotipos entre os isolados investigados, apontando para variabilidade cultural e morfológica. Julliati 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, também indicando indícios da presença de espécies e/ou raças de *C. gloeosporioides* em cafeeiros no Estado de Minas Gerais.

Pereira (2005), estudando a variabilidade do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado ao cafeeiro por meio da técnica que utiliza mutantes nit, caracterizou grupos de compatibilidade vegetativa (VCG) para isolados de *C. gloeosporioides*. Este autor relata que a variabilidade encontrada entre os isolados deve-se ao alto número de grupos de VCG, concluindo sobre a complexidade dos estudos envolvendo espécies de *Colletotrichum*, já que a alta variabilidade pode interferir nos resultados.

O componente genético da biodiversidade é fundamental para estudos de diversidade, pois é a variação genética que fornece o material básico para a seleção natural e, portanto, para a evolução de todas as espécies (ALLCOCK et al., 1995). A atuação das forças evolutivas no processo de coevolução gera variabilidade tanto nas populações de plantas como de fungos. Por meio de mutações surgem novos alelos nas populações, os quais sofrem seleção e são rearranjados, graças à recombinação genética, havendo dispersão destes alelos quando ocorrem migrações de indivíduos de um local para outro (BARBIERI; CARVALHO, 2001).

Segundo Burdon e Silk (1997), a combinação de mecanismos como seleção, deriva genética, migração e mutação definem a estrutura genética e a diversidade de todas as populações patogênicas, sendo que o papel relativo de cada um destes fatores pode variar intensamente entre diferentes associações planta-patógeno, entre os estádios do ciclo epidemiológico.

Durante muito tempo, características morfológicas e fisiológicas foram às únicas ferramentas utilizadas para a definição das filogenias. Estas, associadas aos sinais e sintomas observados, por muito tempo foram os primeiros passos para constituir estudos de identificação e diagnóstico de fitopatógenos (BENALI et al., 2011). Segundo Cannon, Bridge e Monte (2000) conceito morfológico no gênero *Colletotrichum* é difícil de definir, e as espécies são delimitadas usando poucos caracteres, como tamanho e forma de conídios, tipos de apressórios, coloração de colônias, entre outros.

Com o desenvolvimento de técnicas de genotipagem, marcadores moleculares, os estudos de variação genética foram facilitados, no entanto, critérios morfológicos, culturais e fisiológicos não podem ser abandonados, uma vez que, estes dados são complementares e importantes para a melhor compreensão de uma população (ARRIEL et al., 2006).

Nas últimas décadas, as tecnologias relacionadas aos marcadores de DNA têm revolucionado o estudo entre a relação patógeno-hospedeiro, e tem sido extensivamente empregada no campo da fitopatologia, tornando a identificação dos fitopatógenos mais rápida e eficiente (BRIDGE et al., 2003).

As técnicas baseadas em genotipagem permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores cobrindo todo o genoma do organismo. Marcadores moleculares são locos gênicos que apresentam alguma variabilidade e que podem ser associadas com o problema a ser estudado. Essa variabilidade permite comparar indivíduos, populações ou espécies diferentes.

Os marcadores de DNA podem ser classificados em duas categorias de acordo com a metodologia a ser aplicada: do tipo I, cujos marcadores estão associados a genes ou sequências de DNA conhecidas, as quais serão visualizadas por hibridização. O RFLPs são os exemplos de marcadores do tipo I mais conhecidos. Já os marcadores do tipo II geralmente estão associados a uma sequência desconhecida. Como exemplo tem-se os RAPDs, AFLPs, microsattélites (SSRs), ITSs e SNPs (BENALI et al., 2011).

Nos últimos anos diferentes técnicas foram utilizadas para caracterizar diferentes espécies de *Colletotrichum*: análises moleculares incluindo RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) do DNA ribossomal (rDNA) e mitocondrial (mDNA), sequenciamento de regiões conservadas como as denominadas ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e IGS (*Internal Spacer Region*) do rDNA, AFLP (*Amplified fragment Length Polymorphism*) e microssatélites (MARQUES-MARÇAL et al., 2010). Estas informações têm possibilitado acessar a diversidade existente entre populações, além de distinguir espécies muito próximas como *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, caracterizar a especificidade por hospedeiro, caracterizar isolados patogênicos de não patogênicos, caracterizar a produção de metabólitos e em alguns casos possibilitam a construção direta de primers específicos para estas características (MARQUES, 2009).

Dentre as inúmeras técnicas existentes, a técnica de AFLP tem ganhado popularidade na análise da diversidade genética em inúmeros fitopatógenos, devido ao elevado polimorfismo gerado, ou seja, ao grande número de loci que podem ser considerados simultaneamente.

Esta técnica desenvolvida por Vos et al. (1995) está baseada na amplificação do DNA via PCR, para detectar diferenças em um conjunto de fragmentos selecionados e digeridos com enzimas de restrição, na qual após a digestão do DNA pelas enzimas de restrição, os fragmentos gerados são ligados a adaptadores com sequências conhecidas nas duas extremidades de cada fragmento, estes fragmentos então, são submetidos a uma amplificação seletiva, utilizando primers com sequência complementar à sequência dos adaptadores, seguida da sequência específica do sítio de restrição da enzima e uma extensão de nucleotídeos seletivos na extremidade 3' (CAIXETA et al., 2009).

Ao longo dos anos, a técnica de AFLP tem se destacado por conseguir revelar diferenças entre espécies próximas, e na detecção de raças ou cepas de fitopatógenos, deste modo este trabalho teve como objetivo averiguar a correlação entre sintomatologia da mancha manteigosa e antracnose, observada em lavouras cafeeiras e a variabilidade genética dos isolados de *Colletotrichum* spp. por meio da técnica de AFLP.

METODOLOGIA

A análise por AFLP foi realizada conforme metodologia descrita por Vos et al. (1995), utilizando o kit de reagentes fornecido pela Invitrogen – AFLP Core Reagent Kit (#10482-016), seguindo o protocolo descrito pelo Fabricante.

A extração do DNA foi realizada a partir de colônias com dez dias de crescimento, conforme protocolo fornecido pelo kit de extração Promega® - Wizard Genomic DNA Purification Kit (#A1120). Após a extração foi feita a quantificação deste DNA e então as amostras foram diluídas para a concentração de 10ng.µL⁻¹.

Os primers utilizados na reação foram fornecidos pela Invitrogen na concentração 10ng. As combinações de primers, utilizados no *EcoRI* GACTGCGTACCAATTC + x (onde x = AG, AT, AC), e *MseI* GATGAGTCCTGAGTAA + y (onde y = AT, AA, AC), foram utilizadas na geração dos padrões das bandas. Os fragmentos gerados foram ligados com adaptadores de AFLP em um único passo, por 2 horas a 20°C, e então diluídos em tampão TE. As amostras foram pré-amplificadas utilizando o seguinte ciclo de PCR: 20 ciclos a 94°C por 30 segundos, 56°C por 60 segundos, e 72°C por 60 segundos; seguido por 72°C por 60 segundos e então estes foram mantidos a 4°C. As reações pré-amplificadas foram diluídas em tampão TE (1:50) antes da amplificação final específica de AFLP.

Para reação final foram utilizados 15µL da reação de pré-amplificação diluída. O programa da PCR para amplificação de AFLP será: 10 ciclo a 94° por 60 segundos, 65° por 60 segundos; 72°C por 90 segundos, no qual a temperatura de anelamento será reduzida a cada ciclo em 1°C, de 65°C até 56°C; seguido de 23 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, e 72°C por 60 segundos; seguido por um passo final, e então mantido a 4°C. Posteriormente, os fragmentos de AFLP foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida a 6%, com tampão TBE 1x (100 mM de Tris base, 100 mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA pH 8,0) no gel e tampão de corrida, conforme Lima (2006).

Os fragmentos foram analisados visualmente, sendo gerada uma matriz binária, em que 1 corresponde a presença de banda e 0 a ausência de banda. O método de agrupamento utilizado foi Neighbor Joining, com o auxílio do programa Structure 2.3.4 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000).

RESULTADOS

As três combinações de primers (EcoAG/MseAT; EcoAT/MseAA e EcoAG/MseCA) utilizadas na reação de amplificação seletiva geraram 212 bandas polimórficas entre 200 e 800 pb. Na análise de diversidade pelo método Neighbor Joining, baseadas no padrão de bandas geradas pela análise de AFLP, os isolados de *C. gloeosporioides* foram divididos em três grupos. O Grupo A foi dividido em 16 subgrupos. O grupo B dividiu-se em 14 subgrupos. O grupo C foi formado apenas por um isolado (Figura 01).

A análise de agrupamento indica a existência de possíveis patótipos de *C. gloeosporioides* infectando lavouras cafeeiras do Estado de Minas Gerais. O grupo A foi formado pelos isolados: I-1, I-2, I-11, I-12, I-13, I-14, I-19, I-25, I-26, I-27, I-28, I-29, I-30, I-32, I-33 e I-34. Os isolados: I-3, I-4, I-5, I-6, I-7, I-15, I-16, I-17, I-18, I-20, I-21, I-22, I-23 e I-24 compõe o grupo B. O grupo C foi formado apenas pelo isolado I-9.

Por meio da metodologia de AFLP, foi possível verificar a existência de grande diversidade entre os isolados analisados. Neste trabalho a distinção entre isolados que apresentaram maiores índices de agressividade e aqueles que obtiveram índices baixos, não foi tão evidente. Apenas o isolado I-9 destacou-se em relação a agressividade formando um grupo isolado.

Através da análise dos dados gerados pela AFLP evidenciou-se a tendência da formação dos grupos em relação a sua origem sintomática, no qual, 77% dos isolados que compõem o grupo A estão relacionados a sintomas da mancha manteigosa. No grupo B não foram observados isolados de mancha manteigosa, e o mesmo foi composto apenas por isolados relacionados a seca de ponteiros e antracnose, 60 e 40%, respectivamente. Ainda que, o grupo A tenha em sua formação alguns isolados relacionados a seca de ponteiros, a infomação gerada pela AFLP, sugere a diferenciação de subespécies dentro da população de *C. gloeosporioides* avaliada.

Resultado semelhantes foram obserfados por Julliat et al. (2006), com base em 33 marcadores RAPD polimórficos gerados por cinco oligonucleotídeos, evidenciaram a correlação entre o padrão molecular de isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de cafeeiros das variedades Mundo Novo e Catuaí com os dados de agressividade, em plântulas e frutos verdes, sugerindo a existência de diferentes espécies e/ou patótipos (raças) de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos e apatogênicos em cafeeiros de Minas Gerais. Já Orozco (2003) utilizando marcadores RAPD e SSR, observou altos índices de diversidade entre isolados de originários de Minas Gerais. O autor também propôs existência de raças patogênicas devido à alta variabilidade encontrada na população *C. gloeosporioides* e aos vários sintomas associados ao patógeno. SILVA-MANN et al. (2005) através de marcadores AFLP, pode observar a diferenciação de subespécies de *Colletotrichum gossypi*, no qual, um conjunto de isolados estavam relacionados a sintomas de ramulose e em outro aqueles relacionados a antracnose. EOM et al. (2004) a partir de sequências proporcionadas por marcadores AFLP, constrói primers específicos para espécies de *Colletotrichum* relacionados a frutos de caqui.

Fungos patogênicos são geralmente classificados como espécies e raças com base em sua morfologia, especialização de hospedeiro, especificidade por cultivares e modo de parasitismo. A aplicação de métodos de análise molecular tem ajudado a esclarecer as relações genéticas de fungos que não são claramente distinguidos pela sua morfologia (ADURAMIGBA-MODUPE et al., 2012). Deste modo, através da técnica de AFLP, seria possível diferenciar molecularmente diferentes variantes de isolados fúngicos

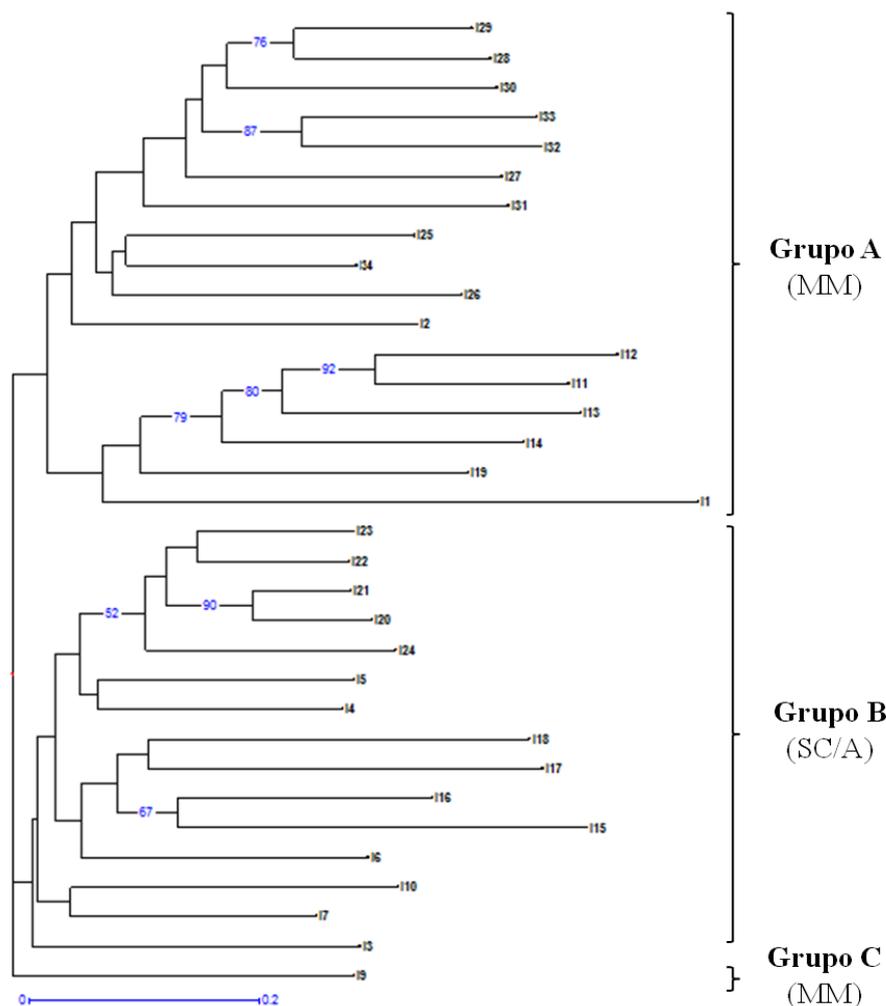


Figura1. Dendrograma originado pela análise de AFLP utilizando o método de agrupamento Neighbor Joining (bootstraps >50%), demonstrando a divisão de três grandes grupos, formado em sua maioria por: A) isolados obtidos a partir de plantas com sintomas de mancha manteigosa (MM); B) Seca de ponteiros e antracnose (SC/A); C) Mancha manteigosa (MM)

CONCLUSÃO

A análise de AFLP revelou a formação de três grandes grupos, no qual evidenciou-se a separação entre os isolados proveniente de mancha manteigosa e aqueles oriundos de seca de ponteiro/antracnose. Em vista dos resultados obtidos, avanços no patossistemas *Colletotrichum* x Cafeeiro foram alcançados. Neste trabalho, fica evidente a relação entre *Colletotrichum gleosporioides* e a mancha manteigosa, assim como a existência de variantes do fitopatógeno, as quais aparentemente estão relacionadas aos diferentes sintomas observados na planta. As características genético demonstradas confirmam a variabilidade do patógeno sob ambos os aspectos, porém sempre evidenciando danos potenciais para o hospedeiro. Deve-se, portanto atribuir ao complexo *Colletotrichum* X Cafeeiro o papel de uma doença de importância primária para a cafeicultura. Uma análise mais detalhada dos grupos formados pela análise de AFLP, em conjunto com averiguação de genes de virulência, poderá contribuir para a diferenciação dos patótipos de *C. gleosporioides* relacionado cafeeiro.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ADURAMIGBA-MODUPE, A. O. et al. Genetic diversity of *Colletotrichum gloeosporioides* in Nigeria using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. African Journal of Biotechnology, v. 11, n. 33, p. 8189-8195, Apr. 2012.

ALLCOCK, A. L. et al. Genetic diversity as a component of biodiversity. In: HEYWOOD V. H.; WATSON R. T. Global Biodiversity Assessment. Cambridge: Cambridge University Press, p. 57-88, 1995.

BARBIERI, R.; CARVALHO, I.F. Coevolução de plantas e fungos patogênicos. Revista Brasileira de Agrociência, Pelotas, v. 7, p.79-83, Mai/Ago. 2001.

BENALI, S. et al. Advances of Molecular Markers Application in Plant Pathology Research. European Journal of Scientific Research, Mahé, v. 50, p. 110-123, 2011.

BRIDGE, P., et al. On the unreliability of published DNA sequences. New Phytologist, Lancaster, v. 160, n. 1, p. 43-48, 2003.

BURDON, J. J.; SILK, J. Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi. Phytopathology, St. Paul, v. 87, n. 7, p. 664-669, 1997.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de Marcadores Moleculares In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (eds.) Marcadores Moleculares. 2ª Edição UFV, Viçosa, 2009, p.11-93.

CANNON, P.F.; BRIDGE, P.D.; MONTE, E. Linking the past, present and future of *Colletotrichum* systemics. In: PRUSKY D., FREEMAN S., DICKMAN B. (eds). *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction*. APS Press, Minnesota, p. 1–20, 2000.

JULIATTI, F. C. et al. Agressividade e divergência genética por RAPD de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* coletados em lavouras cafeeiras de Minas gerais. Bioscience Journal, Uberlândia, v. 22, p. 159-169, 2006.

MANSK, Z.; MATIELLO, J. B. Ocorrência de mancha manteigosa em café “Conilon” (*Coffea canephora*, Pierre) no Estado do Espírito Santo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 5., 1977, Guarapari. Anais... Guarapari: IBC/GERCA, 1977. p. 172-173.

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

OROZCO, E. F. M. et al. Incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos cereja e sementes de café arábica (*Coffea arabica*). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas. Anais... Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2002a. p. 59.

PARADELA FILHO, O. et al. O complexo *Colletotrichum* do cafeeiro. Campinas: IAC, 2001. 11 p. (Boletim Técnico IAC, 191).

PARESQUI, L. et al. Patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* em *Coffea arabica* L. In: III Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 3., 2003. Porto Seguro. Anais... Embrapa Café, 2003.

SILVA, M.R. et al. Caracterização de *Colletotrichum* spp. associado ao cafeeiro no Estado do Paraná Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil (4. : 2005 : Londrina, PR). Anais... Brasília, D.F. : Embrapa Café, 2005

VAN DER DOES, H.C.;, REP, M. Virulence genes and the evolution of host specificity in plant-pathogenic fungi . *Molecular Plant–Microbe Interactions* 20 : 1175 – 1182 . 2007.