

COMPARAÇÃO GENÉTICA ENTRE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. PROVENIENTES DE CAFEIEIRO E OUTRAS PLANTAS CULTIVADAS POR MEIO DE PCR/RFLP

Viviani V. MARQUES-MARÇAL^{1,2}, E-mail: vmmarcal@yahoo.com.br; Luís G. L. RAMPAZO¹; Micheli R. L. SILVA^{1,2}; Juliana S. GONÇALVES^{1,2}; Vanessa B. CAMPOS³; Luzia D. PACOLLA-MEIRELLES²; Rui P. LEITE JR.¹

¹Instituto Agronômico do Paraná, Londrina, PR; ²Universidade Estadual de Londrina, PR; ³Centro Universitário Filadélfia, Londrina, PR.

Resumo:

A variabilidade genética de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro e de outras plantas cultivadas foi estimada através da técnica de PCR/RFLP, usando primers específicos para a amplificação das regiões transcritas internas (ITS1 e ITS2) do DNA ribossomal. O produto de PCR foi digerido com enzimas e as relações entre os perfis genômicos foram analisadas com o programa NTSYS pelo método Dice/UPGMA. Os resultados obtidos permitiram dividir os isolados em dois grupos, de acordo com os isolados padrões de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* utilizados para fins comparativos. Entre os doze isolados obtidos de cafeeiro, nove apresentaram 100% de similaridade entre si e todos eles apresentaram elevada similaridade com *C. gloeosporioides*. Em relação aos isolados de outras plantas cultivadas, cinco dos treze isolados apresentaram similaridade com o *C. acutatum*. Para a maioria destes isolados, não foi possível correlacionar caracteres morfológicos, perfis genéticos e o hospedeiro de origem. Neste sentido, novas técnicas moleculares devem ser aplicadas no estudo de isolados de *Colletotrichum* spp.

Palavras-chave: Antracnose, variabilidade genética, região ITS.

GENETIC COMPARATION AMONG *Colletotrichum* spp. ISOLATES OBTAINED FROM COFFEE AND OTHER CULTIVATED PLANTS BY PCR/RFLP

Abstract:

The genetic variability of *Colletotrichum* spp. isolates obtained from coffee and other cultivated plants was studied by PCR/RFLP technique, using specific primers for the amplification of the internal transcribed (ITS1 and ITS2) regions of the ribosomal DNA. The PCR product was digested with restriction enzymes and the relations among the genomic profiles were determined by using the Dice/UPGMA method from the NTSYS software. The results allowed to divide the isolates in two major groups, according to the standard strains of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum* include in the study. Among twelve isolates obtained from coffee, nine of them showed 100% of similarity among each other and all of them showed high similarity with *C. gloeosporioides*. In relation to the isolates from other cultivated plants, five of thirteen isolates showed similarity to *C. acutatum*. For the majority of these isolates, it was not possible to correlate morphological characters, genetic profiles and the host of origin. Therefore, new molecular techniques should be used in the study of *Colletotrichum* spp. isolates.

Key words: Anthracnose, genetic variability, ITS region.

Introdução

Fungos do gênero *Colletotrichum* são responsáveis por doenças de importância econômica em diferentes plantas cultivadas em todo mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Bailey et al., 1992; Lopes, 2001). Em cafeeiro, espécies de *Colletotrichum* têm sido isoladas de ramos, folhas, flores e frutos em regiões produtoras de café em diversos países (Almeida et al., 2002; Miranda, 2003). Em países da África, *Colletotrichum kahawae* Waller & Bridge, agente causal do “Coffee Berry Disease” (CBD), tem sido o principal fator limitante à produção de cafeeiros, causando perdas que chegam a 80% (Griffiths et al., 1971; Chen, 2002; Silva et al., 2006).

No Brasil, *Colletotrichum* spp. podem ser isoladas de diferentes órgãos da planta e estão associadas principalmente a sintomas como seca de ramos e ponteiros, queda e mumificação de frutos e mancha manteigosa. Além disso, dúvidas quanto à taxonomia do patógeno e sua verdadeira relação com o hospedeiro têm sido objetos de estudos de diferentes grupos de pesquisa (Dorizzoto, 1993; Nechet & Abreu, 2002; Miranda, 2003, Silva et al., 2005). Estudos de caracterização morfológica, bioquímica e molecular de isolados *Colletotrichum* spp. isoladas no Brasil têm apontado *Colletotrichum acutatum* Simmonds e principalmente *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, como as espécies associadas à cafeeiros (Miranda, 2003; Silva et al., 2005).

A distinção entre espécies de *Colletotrichum* é de fundamental importância para o desenvolvimento ou aperfeiçoamento de práticas que visam o controle eficiente das doenças causadas por esses fungos (Freeman et al., 1998). Para este fim, a caracterização e a determinação taxonômica do gênero *Colletotrichum* têm dependido de critérios morfogenéticos e sua afinidade por hospedeiros. No entanto, verifica-se que a alta variabilidade presente no gênero sob condições de cultura e a sua inespecificidade com relação aos hospedeiros tornam critérios insuficientes para identificar com segurança as espécies do gênero (Freeman et al., 1996).

Ferramentas moleculares têm sido empregadas com sucesso para diferenciar populações de *Colletotrichum* provenientes de diferentes hospedeiros (Freeman et al., 1998). Análises moleculares incluindo RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) do DNA ribossomal (rDNA) e mitocondrial, e seqüenciamento de regiões conservadas, como as denominadas ITS (Internal Transcribed Sequence) e IGS (Internal Spacer Region) do rDNA, têm sido utilizadas para elucidar a variabilidade genética existente entre isolados de *Colletotrichum* spp. e outras espécies fúngicas (Beynon et al. 1995; Sreenivasaprasad et al., 1996; Lopez, 2001).

A técnica de PCR-RFLP utiliza enzimas de restrição para restringir fragmentos de DNA das regiões intergênicas como IGS e ITS amplificados por PCR. Regiões intergênicas do rDNA são utilizadas para este tipo de caracterização por serem menos conservadas, isto é, evoluem rapidamente, e estão presentes em todos os organismos. Além disso, estas regiões do rDNA são flanqueadas pelos genes 18S, 5,8S e 28S que permitem a construção de *primers* universais para qualquer espécie de fungo (Fungaro, 2000).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar e comparar, por meio de PCR/RFLP do rDNA, isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de cafeeiro e de outras plantas cultivadas.

Material e Métodos

Isolados de *Colletotrichum* spp.: Vinte e seis isolados de *Colletotrichum* spp. foram selecionados da coleção de fungos do laboratório de Bacteriologia e Virologia do Instituto Agrônomo do Paraná. Dentre estes destacam-se os isolados tidos como “espécie-tipo” de *C. gloeosporioides* (I-12, 8640 e 468) e *C. acutatum* (8004) para comparação entre os isolados (Tabela 1).

Extração do DNA: Genômico: Isolados de *Colletotrichum* spp. foram submetidos à extração de DNA genômico segundo protocolo descrito por Raeder e Broda (1958).

Tabela 1 – Isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiros e outras plantas cultivadas.

Nº do isolado	Cultura de origem	Órgão de isolamento	Colônia			Tipo de conídio
			Coloração	Aspecto cotonoso	Presença de setores	
121	Café	Fruto	Verde	+	-	Cilíndrico
418	Café	Ramo	Branca	+	-	Cilíndrico
420	Café	Ramo	Verde-escura	+	-	Cilíndrico
421	Café	Ramo	Branca	+	-	Cilíndrico
422	Café	Ramo	Branca	+	-	Cilíndrico
423	Café	Ramo	Branca	+	-	Cilíndrico
424	Café	Ramo	Branca	+	-	Cilíndrico
425	Café	Ramo	Branca	+	+	Cilíndrico
426	Café	Ramo	Branca	-	-	Cilíndrico
427	Café	Ramo	Branca	+	-	Cilíndrico
428	Café	Ramo	Branca	+	-	Cilíndrico
436	Abacate	Fruto	Branca	-	-	Cilíndrico
437	Abacate	Fruto	Branca	-	-	Cilíndrico
438	Abacate	Fruto	Branca	-	-	Cilíndrico
440	Maçã	Fruto	Branca	+	-	Cilíndrico
441	Maçã	Fruto	Branca	+	-	Cilíndrico
444	Mamão	Fruto	Branca	-	-	Cilíndrico
449	Tomate	Fruto	Branca	-	-	Falcado
450	Tomate	Fruto	Branca	-	-	Falcado
451	Tomate	Fruto	Branca	-	-	Cilíndrico
453	Pimentão	Fruto	Branca/Verde	-	-	Cilíndrico
455	Banana	Fruto	Branca	+	-	Cilíndrico
468 ^a	Laranja	Fruto	Cinza	-	-	Cilíndrico
I-12 * ^a	Café	Folha	Cinza/Verde	+	-	Cilíndrico
8640 ^a	Maçã	Fruto	Cinza	-	-	Cilíndrico
8004 ^b	Maçã	Fruto	Salmão	-	-	Fusiforme

* Isolado cedido pelo Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu (UFLA, Lavras, MG).

^a – *C. gloeosporioides*

^b – *C. acutatum*

Reação de PCR: As reações de amplificação foram preparadas para um volume final de 50 µL, contendo, 0,25

mM de cada primer ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White et al., 1990); tampão da enzima 1X; 0,7 mM de MgCl₂; 200 μM de dNTP; 1,25 U de *Taq* DNA polimerase; 10 – 30 ng de DNA genômico. A reação foi realizada utilizando um ciclo de 2 minutos a 95 °C, seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 3 minutos a 55 °C e 1 minuto a 72 °C, com extensão final de 5 minutos a 72 °C.

RFLP: Os fragmentos amplificados dos isolados de *Colletotrichum* spp. foram digeridos separadamente com as enzimas *Apa*I, *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Hpa*I, *Mse*I e *Rsa*I nas condições fornecidas pelo fabricante (Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA). A digestão foi paralisada com adição de 1,5 μL de EDTA 0,1M (pH 8,0) e mantidas a 65 °C durante 5 minutos seguido de choque térmico em gelo triturado. As enzimas foram selecionadas com base na seqüência de nucleotídeos das regiões intergênicas ITS1 e ITS2 e do gene 5,8S do rDNA usando o programa Webcutter 2.0.

Eletroforese: O produto de PCR foi submetido à eletroforese (5 V/cm) em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X (Tris – Ácido Acético – EDTA) corado com brometo de etídeo (0,5 μg/mL). Os produtos das reações de digestão foram submetidos à eletroforese (5 V/cm) em gel de agarose 2% em tampão TBE (Tris – Borato – EDTA) corado com brometo de etídeo 0,001μg/mL. Os géis foram fotografados no sistema Kodak EDAS 120 e a presença de polimorfismo foi verificada com base no número e disposição dos fragmentos gerados.

Análise dos Dados: Perfis genômicos únicos foram analisados conjuntamente através da determinação visual de presença ou ausência de bandas de fragmentos de DNA amplificado. A presença ou ausência de uma banda em cada posição ao longo do perfil de cada isolado foi convertida em dados binários (“1” para presença e “0” para ausência). Coeficientes de similaridade foram determinados utilizando a equação matemática proposta por Nei & Li (1979), que se baseia na proporção de fragmentos de DNA comuns entre os pares e representa o coeficiente de similaridade entre eles. As relações genéticas foram determinadas utilizando o programa computacional NTSYS e o método Dice/UPGMA (Rohlf, 1993).

Resultados e Discussão

Neste estudo, foram comparados 26 isolados de *Colletotrichum* spp. de cafeeiro e outras plantas cultivadas por meio da análise de perfis genômicos da região ITS amplificada. Fragmentos de aproximadamente 580 pb foram gerados para todos os isolados comparados (dados não apresentados).

Foi possível verificar polimorfismo entre os perfis dos isolados, principalmente quando digeridos com as enzimas *Mse*I e *Rsa*I (Fig. 1A e B). A enzima *Rsa*I tem sido utilizada em estudos similares para caracterização de *Colletotrichum* spp. patogênico para outras plantas cultivadas (Abang et al., 2002). Além disso, esta enzima é considerada como representativa para reconhecer um único sítio de restrição e gerar dois fragmentos de aproximadamente 180 e 380 pb para isolados de *C. gloeosporioides* (Freeman et al., 2000).

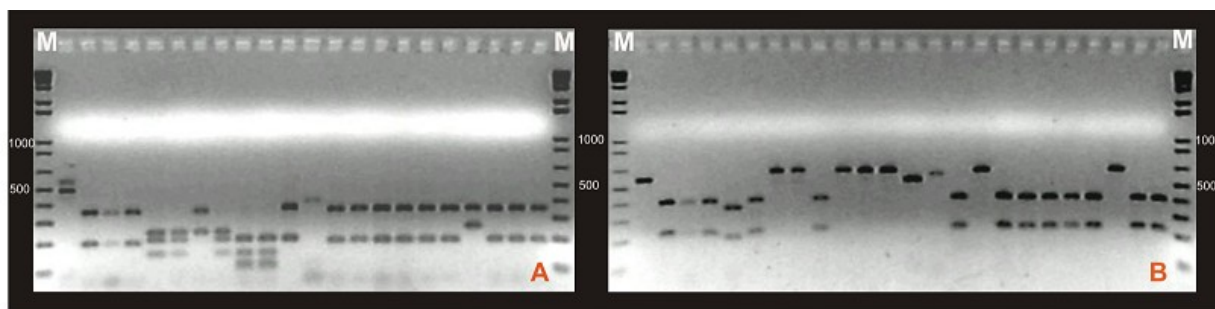


Figura 1 – Perfis genômicos das regiões ITS, de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos a partir da digestão com as enzimas *Mse*I (A) e *Rsa*I (B).

A análise filogenética deste estudo permitiu separar os isolados em dois grupos principais, o primeiro com perfil genético similar à espécie *C. gloeosporioides* (Grupo I) e o segundo com *C. acutatum* (Grupo II) (Fig. 2). Isolados de cafeeiro foram incluídos no Grupo I (Fig. 2), sendo que a maioria destes apresentaram 100% de similaridade com os isolados de banana (455), abacate (436 e 437) e laranja (468). O Grupo I reuniu ainda os demais isolados de cafeeiro (420, 425 e 426), mamão (444), tomate (451) e o isolado de maçã (8640) (Fig. 2). Entretanto, estes últimos isolados não apresentaram similaridade entre si (Fig. 2).

O Grupo II reuniu apenas isolados de outras plantas cultivadas, visto que estes apresentaram maior similaridade com *C. acutatum* (8004) (Fig. 2). Os isolados de maçã (440 e 441) e pimentão (453) apresentaram total similaridade entre si e cerca de 75% de similaridade em relação ao isolado de *C. acutatum* (8004) (Fig. 2). Já os isolados de tomateiro (449 e 450) apresentaram similaridade de aproximadamente 52% com *C. acutatum* (8004) (Fig. 2). Além disso, as observações dos caracteres morfológicos, principalmente da morfologia falcada dos conídios, e o hospedeiro de origem do isolado permite inferir que os isolados de tomateiro (449 e 450) sejam *Colletotrichum dematium* (Pers.) Groove. Observações semelhantes também podem ser feitas para os isolados 440 e 441 de maçã quando comparados com o isolado 8004 de *C. acutatum* e para todos os isolados de cafeeiro quando comparados com os isolados I-12, 468 e 8640 de *C. gloeosporioides*

(Fig. 2).

A metodologia de PCR-RFLP da região ITS permitiu detectar variabilidade entre os isolados de *Colletotrichum* spp. incluídos neste estudo e dividi-los em dois grupos de acordo com o nível de similaridade genética. Sendo assim, é possível inferir que todos os isolados obtidos de cafeeiro apresentaram similaridade com *C. gloeosporioides*. Entretanto, não foi possível relacionar o perfil genético com o hospedeiro de origem de alguns dos isolados através da técnica aplicada. Análises recentes baseadas em PCR-RFLP da região IGS têm sido aplicadas na identificação de espécies de diversos gêneros de fungos (Otero et al., 2004). A diferença genética obtida por esta metodologia está relacionada com a variabilidade intra-específica que a região IGS determina (Kin et al., 2001).

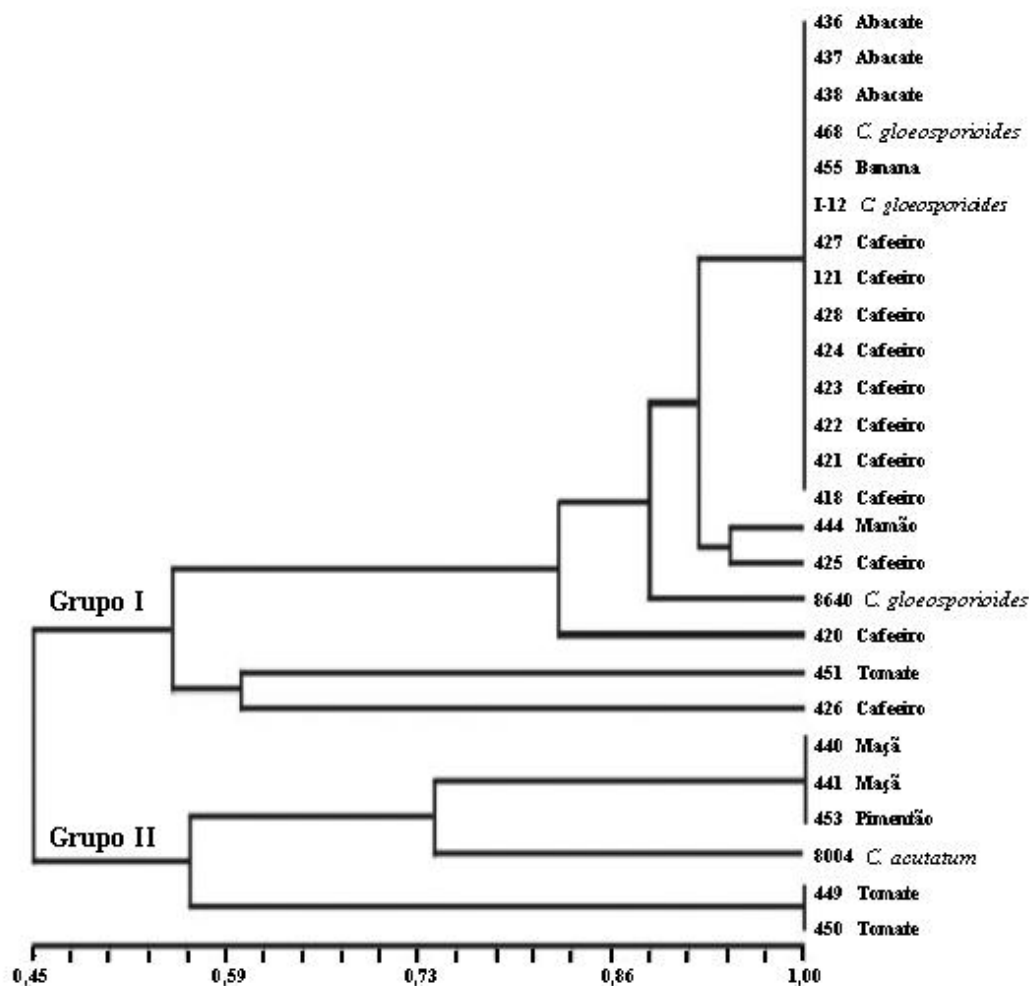


Figura 2 – Dendrograma (Dice/UPGMA) com base nas análises de PCR-RFLP das regiões ITS1 e ITS2 e do gene 5,8S do DNAr de isolados de *Colletotrichum* spp. Isolados I-12, 468 e 8640 de *Colletotrichum gloeosporioides* e 8004 de *Colletotrichum acutatum*.

Conclusões

Apesar da técnica de PCR-RFLP ser comumente empregada em análises genéticas, neste trabalho ela não foi capaz de esclarecer com precisão as diferenças filogenéticas entre os isolados analisados. O uso da região ITS permitiu detectar variabilidade entre os isolados e permitiu agrupar os isolados de cafeeiro com o isolado padrão de *C. gloeosporioides* incluído no estudo. Os demais isolados obtidos de outras plantas cultivadas apresentaram perfis similares tanto a *C. gloeosporioides* como a *C. acutatum*, não sendo possível correlacionar caracteres morfológicos, perfis genéticos e o hospedeiro de origem para todos os isolados testados. Assim, novas técnicas moleculares devem ser aplicadas no estudo de isolados de *Colletotrichum* spp.

Referências Bibliográficas

Abang, M.M.; Winter, S.; Green, K.R.; Hoffman, P.; Mignouna, H.D.; Wolf, G.A. (2002) Molecular identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing yam anthracnose in Nigeria. *Plant Pathology*, 51: 63-71.

- Almeida, A.R.; Salgado, M.; Pfenning, L.H.; Lima, C.S.; Chaves, Z.M. (2002) Fungos endofíticos de folhas e haste de café (*Coffea arabica*). In: *Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras*, v. 28. Caxambu, MG. Anais...
- Bailey, J.A.; O'Connell, R.J.; Pring, R.J.; Nasch, C. (1992) Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: Bailey, J.A.; Jeger, M.J. (Ed.) *Colletotrichum* biology, pathology and control. England: CAB.
- Beynon, S.M.; Coddington, A.; Lewis, B.G.; Várzea, V.M.P. (1995) Genetic variation in the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 46: 457-470.
- Dorizzotto, A. (1993) Caracterização morfológica e patogenicidade de *Colletotrichum* sp. associados a cafeeiros (*Coffea arabica* L.) em dois municípios de Minas Gerais. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- Freeman, S.; Katan, T.; Shabi, E. (1996) Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity tests. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1014-1020.
- Freeman, S., Katan, T.; Shabi, E. (1998) Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease*, 82:596-605.
- Fungaro, M.H.P. (2000) PCR na Micologia. *Biocombustíveis: Ciência e Desenvolvimento*, 17:12-16.
- Griffiths, E.; Gibbs, J.N.; Waller, J.M. (1971) Control of coffee berry disease. *Annual Applied Biology*, 67(1):45-74.
- Kim, H.-H.; Choi, Y.-K.; Min, B.-R. (2001) Variation of the intergenic spacer (IGS) regiões of ribossomal DNA among *Fusarium oxysporum* formae speciales. *The Journal of Microbiology*, 39(4):265-272.
- Lopes, A.M.Q. (2001) Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. *Revisão Anual de Patologia de Plantas – RAPP [S.I.]*, 9:291-338.
- Miranda, E.F.O. (2003) Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e Comparação com *Colletotrichum kahawae*. 147p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- Nechet, K.L.; Abreu, M.S. (2002) Caracterização morfológica e testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de cafeeiro. *Ciência e Agrotecnologia*, 26:1135-1142.
- Nei, M.; Li, W. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75:5269-5273.
- Otero, L.; Ducasse, D.; Miller, R.N. G. (2004) Variability in Ribosomal DNA Genic and Spacer Regions in *Verticillium dahliae* Isolates from Different Hosts. *Fitopatologia Brasileira*, 29(4):441-446.
- Raeder, U.; Broda, P. (1958) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1:17-20.
- Rohlf, F.S. (1993) Numerical taxonomy and multivariate analysis system – NTSYS-pc. *Applied Biostatistics Inc.* Setauket, NY. 18:191.
- Silva, M.R.L.; Meneguim, L.; Gonçalves, J.S.; Pistori, J.F.; Leite Jr., R.P. (2005) Caracterização de *Colletotrichum* spp. associado ao cafeeiro no Estado do Paraná. In: *IV Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*. Anais...
- Silva, M.C.; Várzea, V.; Guerra-Guimarães, L.; Azinheira, H.G.; Fernandez, D.; Petitot, A.S.; Bertrand, B.; Lashermes, P.; Nicole, M. (2006) Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18:119-147.
- Sreenivasaprasad, S.; Mills, P.R.; Meehan, B. M.; Brown, A.E. (1996) Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on DNA spacer sequences. *Genome*, 39:499-512.
- White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T. (Eds.) *PCR protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press: New York. pp. 315-322.