

Variabilidade genética de *Colletotrichum guaranicola* usando marcadores AFLP

Jânia Lilia da Silva BENTES¹, Pedro Queiroz COSTA NETO²

RESUMO

Foi detectada a variabilidade genética de vinte isolados de *Colletotrichum guaranicola* (Albuq.) provenientes de diferentes localidades produtoras de guaraná no Amazonas, utilizando-se marcadores moleculares AFLP. Foi possível separar os isolados em dois grupos. O coeficiente de variação genética entre os isolados foi de 0,0216 e a similaridade genética foi de 94,95%, confirmando que os isolados pertencem à mesma espécie, no entanto, foi observada variabilidade intra-específica.

PALAVRAS-CHAVE: Antracnose, guaranazeiro, marcador molecular

Variability of *Colletotrichum guaranicola* using AFLP markers

ABSTRACT

The genetic variability of twenty *Colletotrichum guaranicola* (Albuq.) isolates from different fields of guarana in Amazonas, was studied using molecular AFLP markers. The isolates were separated into two groups. The genetic variability coefficient was 0.0216 and the genetic similarity was 94.5%, confirming that the isolates belongs to the same species, however, an intra-specific variability was observed.

KEYWORDS: Anthracnose, guaranazeiro, molecular marker.

¹ Universidade Federal do Amazonas. jlbentes@ufam.edu.br

² Universidade Federal do Amazonas. senaneto16@ufam.edu.br

INTRODUÇÃO

O Brasil é o único produtor, em termos comerciais, de guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) do mundo. Estima-se que pelo menos 70% da produção nacional sejam utilizadas pelos fabricantes de refrigerantes, enquanto o restante é comercializado na forma de xarope, bastão, pó, extrato e outras. Em 2008, o Amazonas produziu 751 toneladas de sementes secas de guaraná em 7.815 ha, com um rendimento médio de 96 kg ha⁻¹ (IBGE 2008). Esta produção é baixa quando comparada com a obtida pelo estado da Bahia que, no mesmo ano, produziu 2.070 toneladas de sementes secas, em uma área de 6.512 ha, tendo um rendimento médio de 317 kg ha⁻¹. (IBGE 2008). De acordo com Tavares *et al.* (2005) os clones lançados pela EMBRAPA produzem pelo menos 400 kg ha⁻¹ano⁻¹ de sementes secas.

Um dos fatores limitantes da produção e expansão da guaranicultura no Amazonas é a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque, considerada a doença mais importante da cultura. O gênero *Colletotrichum* notoriamente apresenta uma grande variação morfológica, o que reflete a ampla variabilidade genética que ocorre entre e dentro das espécies deste gênero (Sutton 1992).

Estudos indicam que *C. guaranicola* possui uma ampla base genética (Duarte *et al.* 1995; Vêras *et al.* 1997; Bentes e Gasparotto 1999), o que pode ter implicação na durabilidade da resistência de clones de guaranzeiro em campo, devido à seleção de variantes do fungo capazes de suplantar a resistência da hospedeira. Duarte *et al.* (1995) estudaram características morfológicas de oito isolados de *C. guaranicola* e observaram variação no fenótipo do fungo. Verás *et al.* (1997) avaliaram a variabilidade morfo-fisiológica de *C. guaranicola* em diferentes substratos, tendo observado uma grande variabilidade fenotípica entre os isolados. Bentes e Gasparotto (1999) avaliaram a virulência de três isolados de *C. guaranicola* em sete clones de guaranzeiro, e observaram variação na virulência dos isolados em cada hospedeira testada.

A técnica de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Vós *et al.* 1995) foi utilizada para análises moleculares em diversos microrganismos fitopatogênicos (O'Neill *et al.* 1997; Tálhinas *et al.* 2002; Peres *et al.* 2003; Dini-Andreote *et al.* 2009) permitindo a análise de um grande número de *locos* por reação com reprodutibilidade dos resultados (Ferreira e Grattapaglia 1996) e pode ser aplicada também a estudos de segregação de genes, visando determinar as bases genéticas e moleculares de fenômenos biológicos em fungos fitopatogênicos, virulência e em estudos taxonômicos (O'Neill *et al.* 1997; Silva-Mann *et al.* 2005; Rodrigues 2010).

Devido ao potencial da guaranicultura no Amazonas e devido às limitações impostas a esta cultura pela ocorrência da antracnose na região, foi avaliada a diversidade genética

de isolados de *C. guaranicola* usando marcadores AFLP com o intuito de fornecer subsídios para o manejo da doença e melhoramento da cultura, baseado no conhecimento da variabilidade do patógeno.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados do fungo e morfologia

Os isolados utilizados foram obtidos a partir de plantas naturalmente infectadas em cultivos de guaranzeiro nos municípios de Manaus, Maués, Presidente Figueiredo e Iranduba, no Amazonas. As amostras das folhas apresentaram sintomas típicos da doença, estas foram coletadas e levadas ao laboratório para o isolamento do patógeno, dando-se preferência às folhas com lesões pequenas, em fase inicial de desenvolvimento. Com o intuito de obter isolados com diversidade genética, dentro de um mesmo campo de cultivo, foram retirados fragmentos de cada lesão de uma mesma folha, para isolamento do fungo. Uma lesão surge a partir de um único esporo, e um esporo pode ser geneticamente distinto dos outros. Os fragmentos selecionados foram submetidos à desinfestação em álcool 70%, hipoclorito de sódio 2%, e lavagens em água destilada autoclavada. O isolamento foi feito em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). As placas foram incubadas à temperatura de 27 °C durante 24-48 horas. Após este período, as hifas surgidas a partir dos fragmentos de folha foram repicadas para novas placas contendo o mesmo meio de cultura utilizado para o isolamento das colônias. Estas novas placas foram incubadas em temperatura ambiente (28 °C) e expostas à luz fluorescente contínua durante dez dias, visando à esporulação do fungo. Após a obtenção da cultura pura, os isolados foram repicados para BDA em tubos de ensaio, e estocados em incubadora com temperatura de 18 °C sem iluminação.

Para a confirmação da espécie dos fungos isolados foi realizada uma avaliação morfométrica dos conídios. Para isso, foram preparadas lâminas para microscopia e os conídios foram medidos ao microscópio ótico Olympus CX40 (Japão), sob objetiva de 40X, onde foram tomadas as medidas de comprimento e largura dos conídios, usando-se uma ocular micrométrica. Foram medidos 100 conídios de cada isolado e os dados obtidos foram comparados com os descritos na literatura (Albuquerque 1961; Sutton 1980; Bentes e Barreto 2004).

Genotipagem com marcadores AFLP

A purificação do DNA genômico foi feita a partir de culturas monospóricas de vinte isolados do patógeno, cultivados em 200 mL em BD (batata-dextrose), sob agitação contínua a 120 rpm, durante cinco dias a 26 °C. O micélio foi coletado por filtração à vácuo, utilizando-se filtro (Milipore®, Estados Unidos da América) 0,45 µm, em câmara de fluxo

laminar. O DNA foi extraído pelo método fenol/clorofórmio descrito por Raeder e Broda (1985) com adaptações, onde a maceração do micélio do fungo foi feita em tampão CTAB 2% (Tris 2,42 g; NaCl 8,2 g; EDTA 0,74 g; Água Mili-Q® 100 mL) e com sílica (dióxido de silício, partículas de 10-20 nm, Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América). A quantificação do DNA obtido foi feita em gel de agarose 0,8%, com marcador de 50 ng e 100 ng (105ng µL⁻¹, Jena Bioscience, Alemanha)

As análises de AFLP foram realizadas de acordo com o método descrito por Vos *et al.* (1995). Aliquotas de 10 µL de DNA genômico (50-250 ng µL⁻¹) foram digeridas com as enzimas *EcoRI* (Invitrogen, São Paulo) e *MseI* (NEB, São Paulo) a 37 °C durante três horas e aquecidas a 70 °C durante 15 minutos para a inativação das enzimas. Os fragmentos de DNA foram ligados aos adaptadores *EcoRI* R (5'AAT TGG TAC GCA GTC TAC 3'); *EcoRI* F (5' CTC GTA GACTGC GTA CC 3') e *MseI* R (5' TACTCA GGA CTC AT 3'); *MseI* F (5' GAC GAT GAG TCC TGA G 3') (Invitrogen, São Paulo), em temperatura de 23 °C durante três horas. Após a reação de ligação, os fragmentos foram pré-amplificados em 26 ciclos de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), com temperaturas de 94 °C por 60 segundos, 56 °C por 60 segundos e 72 °C por 60 segundos, em termociclador (Eppendorf, Alemanha), utilizando dois conjuntos de *primers EcoRI + A* e *MseI + C*; *EcoRI + T* e *MseI + C*. Após a amplificação seletiva as amostras foram diluídas com 80 µL de água.

Para amplificação seletiva dos fragmentos de DNA foram utilizados dois nucleotídeos seletivos em três combinações diferentes de *primers: EcoRI + AG*, *EcoRI + AT*, e *EcoRI + TA*. A efetividade de cada um destes foi averiguada em combinação com o *primer MseI + C*. Uma alíquota de 3 µL de DNA pré-amplificadas de cada amostra foram submetidos à amplificação seletiva utilizando 12 ciclos de PCR com programa: 94 °C por 30 segundos; 65 °C por 30 segundos; 72 °C por um minuto, seguidos de 23 ciclos de 94 °C por 30 segundos; 56 °C por 30 segundos e 72 °C por um minuto. De cada amostra, 15 µL dos produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% contendo uréia 7,5 M. A corrida foi realizada em equipamento Sequi-Gen GT (BIO-RAD®, Estados Unidos da América), durante quatro horas a 80 W e 3.000 V, com temperatura de 50 °C. A revelação do gel foi feita com nitrato de prata (Creste *et al.* 2001).

ANÁLISE DE DADOS

Para cada amostra no gel foi quantificada a presença de bandas com massa molecular entre 50 e 300 pb. A frequência de bandas foi submetida à análise pelo programa Genes (Cruz 2006). A similaridade genética entre os genótipos foi estimada usando-se o coeficiente de Jaccard (Jaccard 1901). A matriz de similaridade foi analisada pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-group Method with*

Arithmetic Average) (Sneath e Sokal 1973). A consistência das ramificações do dendrograma foi verificada por meio da amostragem repetitiva de dados (*Bootstrapping*), com 1.000 repetições, utilizando o programa POPGEN versão 1.31 (Yeh *et al.* 1999). A correlação cofenética foi analisada pelo teste de Mantel (Mantel 1967).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos vinte isolados do fungo *C. guaranicola*. Os isolados EM1, EM2, EM4, EM6, EM7, EM8, e EM9 foram provenientes do campo experimental da EMBRAPA Amazônia Ocidental, Manaus-AM, os PF11, PF12, PF13, PF17, PF20, PF22, PF23, e PF24 de Presidente Figueiredo-AM, os isolados IRB25 e IRB27 de Iranduba-AM, o isolado MU28 de Maués-AM e os isolados MF218 e MF418 da fazenda experimental da Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM.

Os dados morfométricos dos conídios variaram 10,5 – 15,5 x 3,0 – 4,5 µm, de acordo com a descrição originalmente feita por Albuquerque (1961) e revisada por Bentes e Barreto (2004), de *C. guaranicola*. De acordo com Sutton (1992) a identificação de espécies do gênero *Colletotrichum* é baseada em características morfológicas do fungo, podendo ser utilizada gama de hospedeiras.

A definição de espécies deste gênero é difícil devido à ampla variação das características morfológicas, sendo estas delimitadas usando-se poucos caracteres como tamanho e forma de conídios e apressórios e características das colônias, como textura e coloração. A grande plasticidade morfológica é um reflexo da grande variabilidade genética que ocorre neste gênero, além da forte influência do ambiente em alguns caracteres como a formação de setas e produção de conídios (Menezes 2002). Vale ressaltar que estudos relacionados com especificidade fisiológica em uma gama de plantas hospedeiras ainda são bastante importantes para a descrição das espécies (Sutton 1992).

Para *C. guaranicola* alguns estudos referentes aos aspectos morfológicos já foram realizados (Duarte *et al.* 1995; Verás *et al.* 1997; Bentes e Gasparotto 1999) indicando uma ampla variabilidade entre isolados do fungo.

O estudo desta variabilidade genética usando marcadores AFLP em isolados de *C. guaranicola*, apresentou 97 bandas polimórficas, sendo 57 amplificadas com o *primer EcoRI + AG* e 40 amplificadas com o *primer EcoRI + AT*, em combinação com o *primer MSeI + C*. Para o *primer EcoRI + TA*, não houve amplificação. Bandas apresentando massa molecular acima de 300 pb foram descartadas devido à resolução ser insuficiente para discriminar as bandas.

Com base no dendrograma produzido a partir dos dados de AFLP (Figura 1) os isolados foram separados em dois grupos. O grupo I apresentou dois subgrupos, A e B. No

subgrupo A estão inseridos os isolados EM1, EM2, EM4, EM6, PF24, IRB25, PF13, PF20, PF23, MF218, MF418, EM9 e PF22, no subgrupo B estão os isolados EM7, PF12, PF11 e IRB27. No grupo II estão os isolados EM8, PF17 e MU28. A correlação cofenética apresentou valor de $r = 0,99$. A similaridade genética variou de acordo com a procedência dos isolados, demonstrando uma variação intra-específica, onde isolados de mesma procedência foram distribuídos em diferentes grupos e subgrupos, evidenciando a variabilidade genética existente entre isolados provenientes da mesma localidade.

O coeficiente de variação genética entre os isolados foi de 0,0216 e a similaridade genética entre todos os indivíduos foi de 94,95%, indicando que os isolados pertencem à mesma espécie, concordando com as observações morfológicas. Diferente do observado por Freeman *et al.* (2000) que caracterizaram isolados de *Colletotrichum* spp. causadores de antracnose em diferentes hospedeiras, usando caracteres morfológicos e marcadores moleculares, e observaram divergências entre os resultados obtidos para identificação das espécies, quando compararam dados morfológicos aos dados de marcadores moleculares. No estudo de Peres *et al.* (2003) que avaliaram a variabilidade morfocultural e genética por meio de marcadores AFLP, de fungos associados à podridão peduncular em mamoeiro (*Carica papaya* L.), incluindo *C. gloeosporioides*, evidenciou uma ampla variabilidade morfológica entre os isolados, não havendo relação entre as características morfológicas e as análises moleculares.

Quanto às observações da procedência, os isolados provenientes de Presidente Figueiredo-AM apresentaram

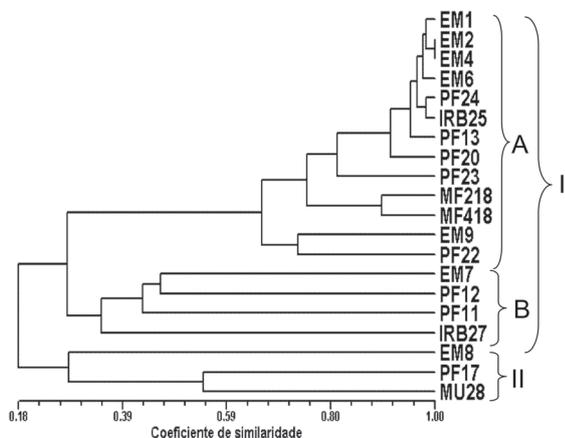


Figura 1- Dendrograma de similaridade genética de isolados de *Colletotrichum guaranicola*. Isolados EM1, EM2, EM4, EM6, EM7, EM8, e EM9 provenientes do campo experimental da EMBRAPA Amazônia Ocidental, Manaus-AM; PF11, PF12, PF13, PF17, PF20, PF22, PF23 e PF24 de Presidente Figueiredo-AM; IRB25 e IRB27 de Iranduba-AM; MU28 de Maués-AM; MF218 e MF418 da fazenda experimental da Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM. Os números em cada forquilha representam os valores de *bootstrap*.

85,6% de *loci* polimórficos por *loci*, os do campo experimental da EMBRAPA Amazônia Ocidental-AM 79,80%, indicando maior variabilidade genética entre os isolados provenientes destas localidades. Este resultado pode ser devido à maior quantidade de isolados analisados destas procedências, evidenciando maior número de *loci* polimórficos.

Para o município de Iranduba-AM, foram analisados dois isolados, que apresentaram 53,54% de *loci* polimórficos, evidenciando a variabilidade genética entre isolados da mesma procedência mesmo entre poucos indivíduos. A menor variabilidade observada foi entre os isolados obtidos da Fazenda Experimental da UFAM – Manaus-AM, com 7,07% de polimorfismo.

A variabilidade genética observada entre os isolados pode ser decorrente de diversos mecanismos geradores de variabilidade em fungos mitospóricos, como mutação e recombinação parassexual (Agrios 2005; Azevedo 2009) que podem ocorrer em condições naturais. Levando em consideração que a antracnose é uma doença endêmica em áreas de cultivo de guaranazeiro no Amazonas, onde múltiplas infecções ocorrem constantemente resultando em alta taxa de reprodução do patógeno, o que favorece a ocorrência de variantes dentro da espécie.

Ainda são necessários estudos adicionais visando esclarecer a identidade taxonômica do agente causal da antracnose do guaranazeiro, comparando o mesmo com outras espécies dentro do gênero *Colletotrichum*, em virtude da fragilidade dos caracteres morfológicos utilizados para a descrição da espécie. De acordo com O'Neill *et al.* (1997) a técnica de AFLP pode facilitar a identificação de genes específicos associados com a especificidade por hospedeiro, virulência e avirulência, fornecendo subsídios para investigação de mecanismos geradores de variação genética em fungos.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*. 5º Ed. Elsevier Academic Press, Burlington –USA. 922 pp.
- Albuquerque, F.C. 1961. *Guarana anthracnose*. Ministério da Agricultura/Serviço de Informação Agrícola: Rio de Janeiro. 22 pp. (in Portuguese)
- Azevedo, J.L. 2009. *Microorganisms Genetics*. Editora UFG, Goiânia-GO. 536 pp. (in Portuguese).
- Bentes, J.L.S.; Barreto, R.W. 2004. Taxonomic reevaluation of *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque causal agent of guaraná anthracnose. *Acta Amazonica*, 34: 129-131. (in Portuguese, with abstract in English).
- Bentes, J.L.S.; Gasparotto, L. 1999. Pathogenicity of *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque isolates in clones of guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). *Fitopatologia Brasileira*, 24: 267 (in Portuguese).
- Creste, S.; Tulmann Neto, A.; Figueira, A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide

- sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 299-306.
- Cruz, C.D. 2006. *Program Genes: multivariate analysis and simulation*. UFV, Viçosa-MG. 175 pp. (in Portuguese).
- Dini-Andreote, F.; Pietrobbon, V.C.; Dini-Andreoti, F.; Romão, A.S.; Spósito, M.B.; Araújo, W.L. 2009. Genetic variability of Brazilian isolates of *Alternaria alternata* detected by AFLP and RAPD techniques. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40: 670-677.
- Duarte, M.L.R.; Albuquerque, F.C.; Correa, M.P.F. 1995. Physiological and morphological changes in *Colletotrichum guaranicola* isolates. *Fitopatologia Brasileira*, 20: 141-144. (in Portuguese).
- Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. 1996. *Introduction to use of molecular markers in genetic analysis*. 2. ed. EMBRAPA, Cenargen, Brasília-DF. 220 pp. (in Portuguese).
- Freeman, S.; Katan, T.; Shabi, E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose disease of various fruits. *Plant Disease*, 82: 596-605.
- Jaccard, P. 1901. Comparative study of the floral distribution in a portion of the Alps and the Jura. *Bulletin of the Voudoise Society of Natural Sciences*, 37: 547-579. (in French)
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209-220.
- Menezes, M. 2002. Biological and taxonomic aspects of *Colletotrichum* species. *Fitopatologia Brasileira*, 27: 23-24 (in Portuguese).
- O'Neill, N.R.; van Berkum, P.; Lin, J.; Kuo, J.; Ude, G.N.; Kenworthy, W.; Saunders, J. A. 1997. Application of amplified restriction fragment length polymorphism for genetic characterization of *Colletotrichum* pathogens of alfalfa. *Host Genetics and Resistance*, 87: 745-750.
- Peres, A.P.; Silva-Mann, R.; Vieira, M.G.G.C.; Machado, J.C. 2003. Morfocultural variability and genetics of fungi associated with stalk rot of papaya. *Ciência e Agrotecnologia*, 27: 1053-1062 (in Portuguese, with abstract in English).
- Raeder, U.; Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1: 17-20.
- Rodrigues, L.M.R. 2010. Assessment of aggression and genetic characterization of strains of *Ralstonia solanacearum* isolated from different host plants. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo. 68pp. (in Portuguese, with abstract in English).
- Silva-Mann, R.; Vieira, M.G.G.C.; Machado, J.C.; Bernardino Filho, J.R.; Salgado, K.C.C.; Stevens, M.R. 2005. AFLP markers differentiate isolates of *Colletotrichum gossypii* from *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. *Fitopatologia Brasileira*, 30: 169-172. (in English, with abstract in Portuguese).
- Sneath, P.H.A.; Sokal, R.R. 1973. *Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. W.H. Freeman, San Francisco, USA. 573 pp.
- Sutton, B.C. 1980. *The Coleomyces*. CABI Publishing, Surrey, England. 696 pp.
- Sutton, B.C. 1992. The Genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*, p. 1-26. In: Bailey, J.A., Jeger, M.J. (Eds.) *Colletotrichum: biology, pathology and control*. CAB International, Wallingford, U.K.
- Talhinhas, P.; Sreenivasaprasad, S.; Neves-Martins, J. Oliveira, H. 2002. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. *Phytopathology*, 92: 986-996.
- Tavares, A.M.; Atroch, A.L.; Nascimento Filho, F.J.; Pereira, J.C.R.; Araújo, J.C.A.; Moraes, L.A.C.; Santos, L.P.; Garcia, M.V.B.; Arruda, M.R.; Souza, N.R.; Anagelo, P.C.S. 2005. *Culture of guaraná in the Amazon* (4º Ed.) Sistemas de Produção 2. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus – AM. 40 pp. (in Portuguese).
- Véras, S.M.; Gasparotto, L. E; Menezes, M. 1997. Physio-morphological variability of *Colletotrichum guaranicola* on different substrates. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 40: 297-305. (in Portuguese, with abstract in English).
- Vos, P.R.; Hogers, M.; Bleeker, M.; Van De Lee Reijans, T.; Hornes, M.; Fritjers, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M.; Zabeau, M. 1995. AFLP: A new concept for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23:4407-4414.
- Yeh, F.C.; Yang, R.C., Boyle, T. 1999. *Microsoft Windows bases freeware for population genetic analysis. POPGEN*. Release 1.31. Edmonton, University of Alberta.

Recebido em 10/02/2010

Aceito em 12/09/2010

