

DIVERSIDADE GENÉTICA POR AFLP DE *Colletotrichum gloeosporioides* E *C. kahawae* ISOLADOS DE CAFEZEIROS

Alessandra Barbosa FERREIRA¹, Eunize Maciel ZAMBOLIM¹, Eveline Teixeira CAIXETA^{1,2}, Everton de Arruda FRANCHINI¹, Hécio COSTA³, Laércio ZAMBOLIM¹

¹Universidade Federal de Viçosa (UFV)/BIOAGRO, Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro, 36570-000, Viçosa - MG. E-mail: biocafe@ufv.br;

²Embrapa Café; ³Incaper. Apoio financeiro: PNP&D/CAFÉ

Resumo:

A diversidade genética entre 33 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* oriundos de diferentes lavouras cafeeiras e um isolado (DNA) de *C. kahawae*, cedido pelo CIFC, Portugal, foi estudada utilizando o marcador AFLP. As três combinações de pares de oligonucleotídeos AFLP geraram 187 bandas polimórficas que foram utilizadas no agrupamento UPGMA. De acordo com o dendrograma, ao nível de 90% de distância genética foram definidos quatro grupos: 1) formado de 15 isolados de Minas Gerais, 2 de São Paulo e 1 do Paraná; 2) um isolado de MG; 3) 10 de MG, 3 do Espírito Santo e um de SP; 4) composto apenas por *C. kahawae*. Alguns dos isolados de *C. gloeosporioides* compartilharam alta similaridade entre eles, e outros, apresentaram grande distância genética. Não ocorreu associação de *C. gloeosporioides* com as regiões geográficas amostradas e as variedades de onde foram isolados. A análise do dendrograma mostrou que *C. kahawae* (patogênico ao cafeeiro) não agrupou com nenhum dos isolados de *C. gloeosporioides*, mostrando alta divergência genética (aproximadamente 100%) em relação a eles. O padrão de bandas AFLP mostrou que *C. kahawae* é geneticamente distinto de *C. gloeosporioides*.

Palavras-chave: *Colletotrichum gloeosporioides*, marcadores moleculares, *Coffea arabica*.

GENETIC DIVERSITY BY AFLP OF *Colletotrichum gloeosporioides* AND *C. kahawae* ISOLATED FROM COFFEE TREES

Abstract :

The genetic diversity among 33 isolates of *C. gloeosporioides* from various Brazilian coffee plantations and one isolate (DNA) of *C. kahawae*, obtained from CIFC, Portugal, were studied using AFLP marker. The three AFLP primer-pair combinations generated 187 polymorphic bands which were used to construct a dendrogram with the UPGMA method. According to the dendrogram, at 90% level of genetic distance the isolates were clustered into four groups: 1) formed by 15 isolated of Minas Gerais, two from São Paulo and one from Paraná; 2) only one isolated from MG; 3) included 10 isolates from MG, three from Espírito Santo and one from São Paulo; 4) composed only by *C. kahawae*. Some of the isolates of *C. gloeosporioides* shared high similarity among themselves, and others, showed large genetic distance. There were no correlation between genetic polymorphism and geographical origin of *C. gloeosporioides* and their varieties sources. The analysis of the dendrogram showed that *C. kahawae* (pathogenic to coffee) did not group with any isolates of *C. gloeosporioides*, revealing to be highly divergent (approximately 100%). The AFLP pattern of the two species showed that *C. kahawae* is genetically distinct from *C. gloeosporioides*.

Key words: *Colletotrichum gloeosporioides*, molecular markers, *Coffea arabica*.

Introdução

O gênero *Colletotrichum* engloba mais de 900 espécies de fungos mitospóricos, incluindo saprófitas e fitopatógenos. Estes fungos estão presentes em toda parte, causando doenças com sintomas conhecidos como antracnose em frutos, folhas e ramos, podendo as plantas serem infectadas em todas as fases de desenvolvimento (Baxter et al., 1985).

Na cultura do cafeeiro, a doença conhecida com CBD, *Coffe Berry Disease*, tem como agente causal o patógeno *Colletotrichum kahawae* Waller & Bridge, afetando frutos verdes em desenvolvimento. Essa doença constitui fator limitante à produção de café na África, ocasionando perdas de 20 a 80% da produção, entretanto, não há relatos dessa espécie no continente americano (Massaba e Waller, 1992).

No cafeeiro, *Colletotrichum gloeosporioides* tem sido freqüentemente associado à seca de ramos e frutos. Entretanto, a sua patogenicidade à esta cultura ainda é objeto de estudo, visto que os sintomas associados ao fungo são constantemente atribuídos a causas fisiológicas e a condições climáticas. Assim, até o momento, não foi possível comprovar se *C. gloeosporioides* é patogênico ao cafeeiro. Estudos têm relatado que o fungo apresenta período de latência ou em associação endofítica com o cafeeiro. Latência de *Colletotrichum* spp. foi observada a partir dos apressórios formados na superfície do hospedeiro mesmo sem a penetração do fungo, o que explica como muitas destas espécies persistem sobre os tecidos de plantas (Bergstrom e Nicholson, 1999). O conhecimento da diversidade genética de *C. gloeosporioides* e a sua relação filogenética com *C. kahawae* (patogênico ao cafeeiro) podem auxiliar no entendimento do seu comportamento na planta.

Marcadores moleculares como AFLP têm sido muito utilizados na caracterização e análise de diversidade genética de isolados de *Colletotrichum* spp. de diferentes culturas, mostrando serem úteis e importantes nestes estudos. González et

al (1998), em um estudo comparativo, demonstraram que a técnica AFLP é mais eficiente em termos do número de análise necessária para obter dados suficientes e que diferentes subconjuntos de dados são altamente correlacionados quando comparado com o marcador RAPD.

O presente trabalho teve como objetivos estudar a diversidade genética de *C. gloeosporioides* isolados de diferentes regiões geográficas do país e variedades de cafeeiros por AFLP e verificar a distância genética entre *C. gloeosporioides* e *C. kahawae* (DNA proveniente de CIFC, Oeiras-Portugal).

Material e Métodos

Material genético

Na Tabela 1 estão listados os 33 isolados de *C. gloeosporioides* de cafeeiro de diferentes regiões do país e um isolado de *Colletotrichum kahawae* (DNA proveniente de CIFC, Oeiras/Portugal) selecionados para este estudo.

Extração de DNA e confirmação de espécie

O DNA foi extraído seguindo o protocolo descrito por Raeder & Broda (1985), com modificações. A qualidade do DNA foi testada em gel de agarose e a quantificação foi realizada em espectrofotômetro Smart Spec (BioRad). Para confirmar a espécie, o DNA de cada isolado foi submetido a técnica de PCR, utilizando-se os primers CgInt e ITS4, específicos para *C. gloeosporioides*.

Técnica AFLP

A análise da diversidade dos isolados de *C. gloeosporioides* por AFLP foi feita segundo o protocolo descrito por Vos et. al. (1995), com modificações. As amostras de DNA foram digeridas com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *MseI*. Os fragmentos obtidos foram ligados aos adaptadores *EcoRI* e *MseI*. Em seguida, foi feita uma reação de pré-amplificação com primers sem nucleotídeos adicionais (primers E+0 e M+0). O programa de amplificação pré-seletiva foi de 23 ciclos constituídos da desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 56° C por 60 segundos e extensão a 72° C por 60 segundos. Os produtos da reação foram utilizados como molde para amplificação seletiva utilizando dois primers selecionados aleatoriamente (E AAC/ M CAA, E AAG/ M CAC e E ACA/ M CAA). O programa de amplificação seletiva consistiu-se de 13 ciclos de desnaturação de 94° C por 30 segundos, anelamento de 65° C por 30 segundos (com rebaixamento de 0,7° C a cada ciclo) e extensão de 72° C por 60 segundos. A seguir foram realizados 23 ciclos de 94° C por 30 segundos, 56° C por 30 segundos e 72° C por 60 segundos. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poli-acrilamida desnaturante 6% no aparelho de eletroforese "Sequi-Gen GT" (BioRad). Os géis foram revelados por meio de coloração de prata segundo protocolo de Creste et al., (2001), com modificações.

Análise estatística

Para análise e interpretação dos géis de poli-acrilamida foram utilizadas apenas as bandas consistentes, sendo avaliados pela presença (1) ou ausência de bandas (0). De posse desses dados, foi construída uma matriz de 0 e 1. A distância genética foi calculada aos pares, utilizando-se o índice de similaridade de Jaccard. A representação simplificada das distâncias genéticas foi efetuada por meio de dendrograma obtido pelo método hierárquico aglomerativo da média aritmética entre pares não-ponderados (UPGMA). Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GENES.

Resultados e Discussão

As três combinações de primers (EcoAAC/MseCAA; EcoAAG/MCAC e EcoACA/MCAA) utilizadas na reação de amplificação seletiva geraram 187 bandas polimórficas (Figura 1).

O dendrograma gerado pela matriz de similaridade genética de Jaccard, ao nível de 90% de distância genética, revelou quatro grupos. O grupo I foi formado por 18 isolados, sendo 15 de Minas Gerais, 3 do Espírito Santo e um de São Paulo. O grupo II foi formado por apenas um isolado de Minas Gerais. O grupo III foi formado por 14 isolados, sendo 10 de Minas Gerais, 3 do Espírito Santo e um de São Paulo. O grupo 4 foi composto apenas por *C. kahawae*.

Alguns isolados de *C. gloeosporioides* de cafeeiro compartilham alta similaridade e outros apresentaram grande distância genética. Os isolados 6 e 7 procedentes de Cachoeirinha/MG e Bom Jesus do Galho/MG, respectivamente, apresentaram 90% de similaridade. Os isolados 12 e 23 de Ibatiba/ES e Patrocínio/MG apresentaram mais de 95% de divergência. Já os isolados 22 e 26 procedentes de Oratório/MG e Perdizes/MG apresentaram aproximadamente 55% de similaridade genética.

A análise dos quatro grupos formados mostrou que não ocorreu associação genética de *C. gloeosporioides* com as regiões geográficas amostradas (Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo) e nem com as variedades de cafeeiros analisadas (Catuaí vermelho, Catuaí amarelo e Mundo novo). Em contraste com estes resultados, González et al (1998) demonstraram associação entre a distribuição geográfica e os grupos obtidos pela análise da distância genética, utilizando o marcador AFLP.

Tabela 1. Fonte e procedência de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* selecionados para o estudo de diversidade genética por AFLP

Isolados	Espécie	Hospedeiro	Precedência
1	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> 'Catuaí vermelho'	Alto Caparaó/MG
2	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Catuaí vermelho	Alto Jequitibá/MG
3	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Catuaí vermelho	Araponga/MG
4	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Catuaí vermelho	Araxá/MG
5	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Catuaí vermelho	Bocaína/MG
6	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Catuaí vermelho	Bom Jesus do Galho/MG
7	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Catuaí vermelho	Cachoeirinha/MG
8	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Mundo novo	Cambuquira/MG
9	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Mundo novo	Campinas/SP
10	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Catuaí vermelho	Caratinga/MG
11	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Mundo novo	Fervedouro/MG
12	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Catuaí vermelho	Ibatiba/ES
13	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Catuaí amarelo	Ibiraci/MG
14	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Catuaí vermelho	Itamogi/MG
15	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Catuaí vermelho	Iuna/ES
16	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Mundo novo	Jeriquara/SP
17	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Catuaí vermelho	Laginha/MG
18	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Mundo novo	Lambari/MG
19	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Catuaí vermelho	Londrina/PR
20	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Catuaí vermelho	Manhuaçu/MG
21	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Catuaí vermelho	Martins Soares/MG
22	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Catuaí vermelho	Oratório/MG
23	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Catuaí amarelo	Patrocínio/MG
24	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Catuaí vermelho	Patrocínio Paulista/SP
25	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Catuaí amarelo	Pedregulho/MG
26	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Mundo novo	Perdizes/MG
27	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Catuaí vermelho	Realeza/MG
28	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Catuaí amarelo	Sacramento/MG
29	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Catuaí vermelho	São Tomás de Aquino/MG
30	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Catuaí vermelho	Serra do Brigadeiro/MG
31	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Catuaí vermelho	Teixeiras/MG
32	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Catuaí vermelho	Venda Nova do Imigrante/ES
33	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. arabica</i> Catuaí vermelho	Viçosa/MG
34	<i>C. kahawae</i>	<i>Coffea</i> spp	CIFC/Portugal

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 35 36 37 38 34 M

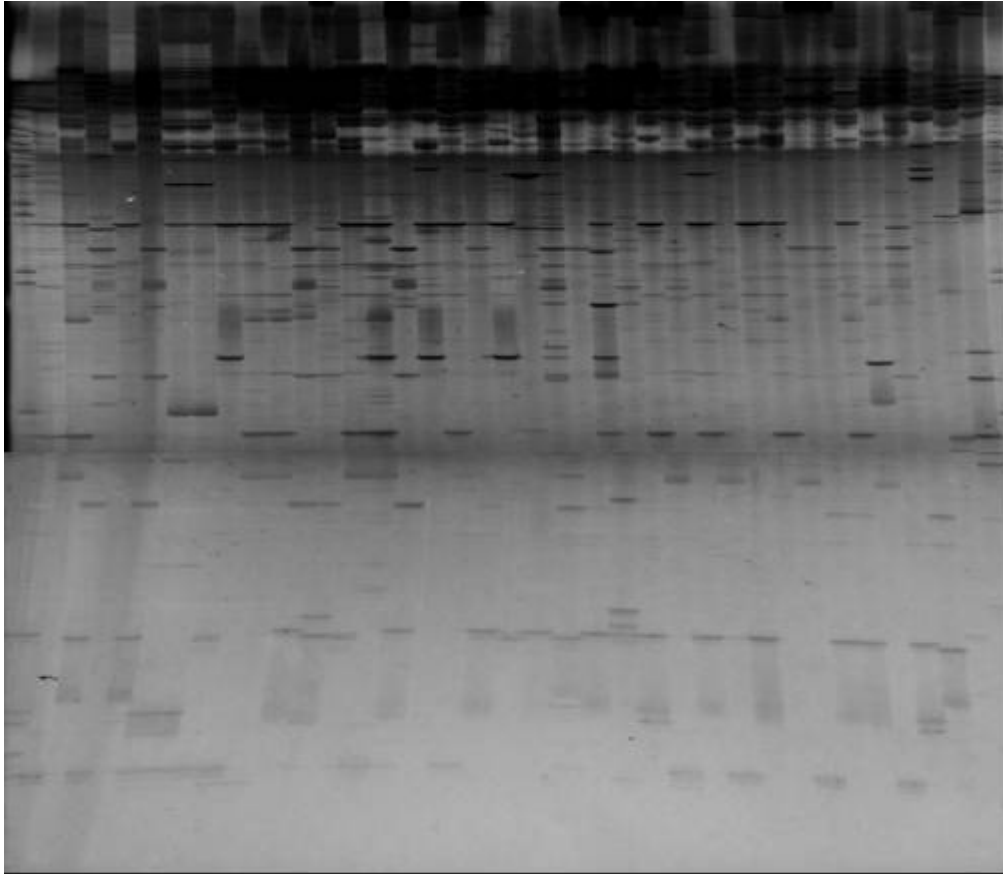


Figura 1. Padrões de bandas AFLP dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* (linhas 1-33) e *Colletotrichum kahawae* (linha 34) obtidas pela amplificação por AFLP e a combinação de *primers* E AAC/ M CAA. M – marcador (linha 1).

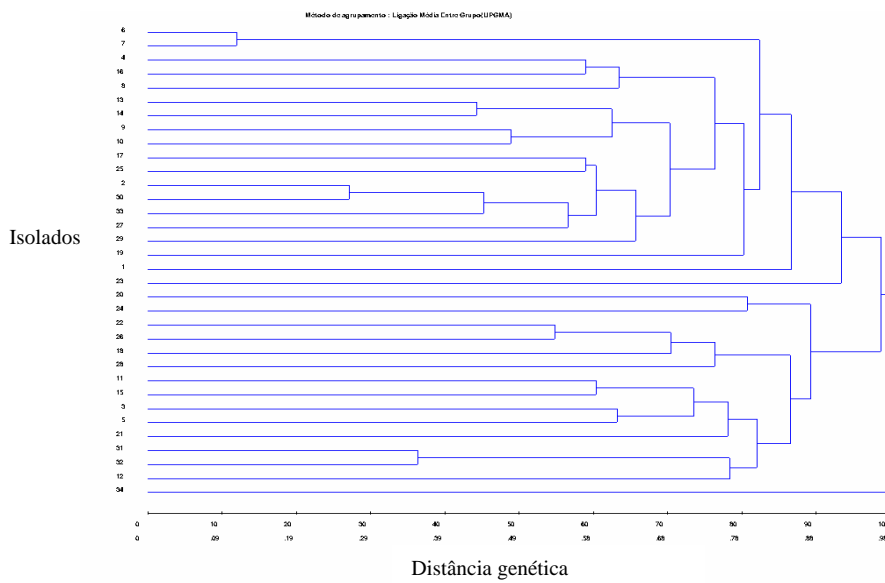


Figura 2: Dendrograma obtido por meio do método UPGMA a partir de distâncias genéticas expressas em complementos de Jaccard, estimadas entre 33 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* e um isolado de *Colletotrichum kahawae*, baseadas em 187 marcas e três combinações de *primers*.

A análise do dendrograma mostrou que *C. kahawae* não agrupou com nenhum isolado, apresentando alta divergência genética (aproximadamente 100%) em relação a *C. gloeosporioides*. Isto indica que o padrão genético de *C. kahawae* é totalmente diferente dos isolados brasileiros de *C. gloeosporioides*.

Conclusões:

- Os isolados de cafeeiros de *C. gloeosporioides* apresentam elevada variabilidade genética;
- Não há associação dos isolados de *C. gloeosporioides* com as regiões geográficas de origem (Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo), bem como com as variedades de cafeeiro (Catuaí vermelho, Catuaí amarelo e Mundo novo). O padrão genético do *C. kahawae* é totalmente diferente de *C. gloeosporioides*, não sendo, portanto, possível associá-los em relação à patogenicidade.

Referências Bibliográficas

Baxter, A.P., Van der Westhuizen, G.C., Eicker, A. (1985) A review of literature on the taxonomy, morphology and biology of the fungal genus *Colletotrichum*. *Phytopathology*, v.17, p.15-188.

Berstrom, G.C., Nicholson, R.L. (1999) The biology of corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management. *Plant Disease*, v.83, n.7, p.596-608.

Crest, S., Tulmann, N., A, F. A. (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol Biol Repor*, 19:4:299-306.

Cruz, C. D. (1998) *Genes versão 98.2.0*: Programa para análise e processamento de dados baseado em modelos de genética e estatística experimental. Viçosa, MG: UFV.

González, M., Rodriguez, R., Zavala, M.E., Jacobo, J.L., Hernandez, F., Acosta, J., Martínez, O., Simpson, J. (1998) Characterization of Mexican Isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. *Ecology and Population Biology*, v.88, n.4, p.292-299.

Jaccard, P. (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vanddoise des Sciences Natureles*, v.44, p.223-270.

Massaba, D., Waller, J.M. (1992) Coffee berry disease: the current status. In: BAILEY, J.A, JEGUER, M.J. *Colletotrichum: biology, pathology and control*, CAB International, p.237-249.

Raeder, U., Broda, P. (1985) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letter of Applied Microbiology*, v.1, p. 17-20.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Pelman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1996) AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, v.23, p4407-4414.

Waller, J.M., Bridge, P.D. (2003) Recent advances in understanding *Colletotrichum* diseases of some tropical perennial crops. In: Derso e Waller. Variation among *Colletotrichum* isolates from diseased coffee berries in Ethiopia. *Crop Protection*, v.22, p.561-565.