

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Colletotrichum guaranicola* ALBUQ. AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE NO GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)

Viviane Brito NOGUEIRA¹; Gilvan Ferreira da SILVA²; Rogério Eiji HANADA³; ⁴Luiz Alberto Guimarães de ASSIS.

¹Bolsista PIBIC/CNPq; ²Coorientador - Embrapa; ³Orientador COTI/INPA; ⁴Colaborador COTI/ INPA.

1.Introdução

O Brasil é o único país produtor, em termos comerciais, de guaraná do mundo. No Amazonas, o guaranazeiro é uma cultura plantada tanto por grandes como por pequenos produtores. Em 2010, o Amazonas produziu 3.739 toneladas de sementes secas de guaraná em 10.552 ha, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010).

A antracnose é causada pelo fungo *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque, e é considerada a doença mais importante em culturas de guaranazeiros (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) na maioria das regiões produtoras de guaraná no Brasil (Pereira e Arruda, 2007). Em guaranazeiros, os sintomas são o ataque às folhas jovens e hastes tenras, manifestando inicialmente sintoma primário de crestamento, caracterizado por áreas necróticas de coloração marrom-escura e contornos definidos. A variação dos sintomas pode estar relacionada ao estágio fenológico dos indivíduos e à variabilidade genética do patógeno (Araújo *et al.* 2007).

O marcador ISSR (*Inter-simple Sequence Repeat*) é considerado útil para a identificação de organismos, mapeamento do genoma e estudos populacionais (Zietkiewicz *et al.* 1994). O marcador ISSR baseia-se na detecção de polimorfismos entre dois microssatélites vizinhos do mesmo tipo, e em orientação oposta. Eles mostram elevado grau de polimorfismo, baixo custo, simplicidade e não require conhecimento prévio da sequência do genoma a ser analisado (Reddy *et al.* 2002). Outro marcador molecular que também pode ser aplicado ao estudo da diversidade e estrutura genética de população são os baseados em retrotransposons. Os elementos transponíveis do tipo LTRs (*Long terminal repeats*) são utilizados para desenvolvimento do marcador molecular denominado de IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*), cujo polimorfismo é baseado na amplificação entre retroelementos vizinhos (Daboussi e Capy, 2003).

Deste modo, este trabalho tem como objetivo analisar a variabilidade genética de diferentes isolados de *C. guaranicola* no Estado do Amazonas, por meio dos marcadores ISSR e IRAP.

2.Material e Métodos

2.1 Isolamento, cultivo monospórico e extração de DNA de fungo

Amostras de tecido foliar de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) com sintomas de antracnose foram coletadas em municípios produtores de guaraná do Estado do Amazonas, a saber: Presidente Figueiredo, Maués, Boa Vista do Ramos, Manacapuru e Itacoatiara. O fungo foi isolado a partir de tecidos infectados, por isolamento direto, e os isolados foram submetidos a cultivo monospórico. As extrações de DNA foram feitas segundo Specht *et al.* (1982), exceto pela troca do tampão de extração pelo descrito por Kuramae-Izioka (1997), quantificados por espectrofotometria por meio do Nanodrop (Thermo) e em gel de agarose 0,8%.

2.2 Caracterização utilizando ISSR (*Inter simple sequence repeat*)

A sequência dos *primers* usados para amplificação das regiões ISSR foram baseadas na lista set#9 (*primers* 801-900) da *University of British Columbia* (UBC). As condições de amplificação foram padronizadas e a seleção de oligos, que amplificam fragmentos polimórficos foi realizada. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com 0,3 µg/mL de brometo de etídio. Os *primers* selecionados após essa triagem foram utilizados no estudo da diversidade de *C. guaranicola*. A reação de PCR teve volume final de 15 µL contendo: 1X Tampão da Taq (Fermentas) [20mM de Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 100 mM de KCl, 0,5% (v/v) Nonidel P40, 0,5% (v/v), Tween 20 e 50% (v/v) de glicerol]; 1,5 mM de MgCl₂ (Fermentas); 0,5 mM de dNTP, 0,2 µM/L do *primer*; 50 ng de DNA e 1U de Taq DNA polymerase (Fermentas EP0402). Os parâmetros de amplificação para ISSR foram 40 ciclos de 94 °C por 30s, 45 °C por 1 min e 72 °C por 2 min. O nível final de extensão foi 7 min a 72 °C.

2.3 Caracterização usando IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*)

Para o marcador IRAP foram utilizados *primers* descritos por Santos *et al.* (2011) denominados de CLIRAP1 (5' CGTACGGAACACGCTACAGA 3') e CLIRAP4 (5'CTTTTGACGAGGCCATGC 3'), assim como todos os parâmetros da reação de PCR e amplificação de DNA.

1.4 Análise dos dados

Os produtos da amplificação visualizados em gel, produzidos por cada marcador, foram utilizados na elaboração de uma matriz de similaridade genética, por meio do registro da presença ou ausência da banda no perfil eletroforético de cada isolado. A similaridade genética foi estimada por meio do coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1901). Para a visualização do agrupamento dos isolados, foi elaborado um dendrograma empregando o método da média aritmética não ponderada UPGMA (*Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Average*) (Sneath e Sokal, 1973), utilizando o *software* NTSYS versão 2.1.

3. Resultados e Discussão

Por meio de isolamento direto do tecido foliar infectado de *P. cupana* var. *sorbilis* foram extraídos DNA de 35 isolados monospóricos de *C. guaranicola*, provenientes dos municípios do Estado do Amazonas. Para fins comparativos, foi utilizado um isolado de *C. graminicola*, proveniente do milho, para as análises de diversidade.

Para ISSR, dos 97 iniciadores testados, 47 amplificaram fragmentos variando de 300 pb a 1650 pb e 14 foram selecionados, para análise de polimorfismos e estudo da diversidade na população de *C. guaranicola*, os quais continham mais de 5 bandas amplificadas.

Os oligonucleotídeos que apresentaram o maior percentual de polimorfismo foram os de número 811, 844 e 849, com oito bandas amplificadas em cada isolado e o marcador 849 com 13 bandas em média. Os marcadores apresentaram elevado grau de polimorfismo, variando de 95,23% a 100%. Foram obtidas no total 120 bandas a partir destes quatro iniciadores utilizados, das quais 119 (99,1%) foram polimórficas, resultando numa média de 40 bandas polimórficas por marcador utilizado (Figura 1 a).

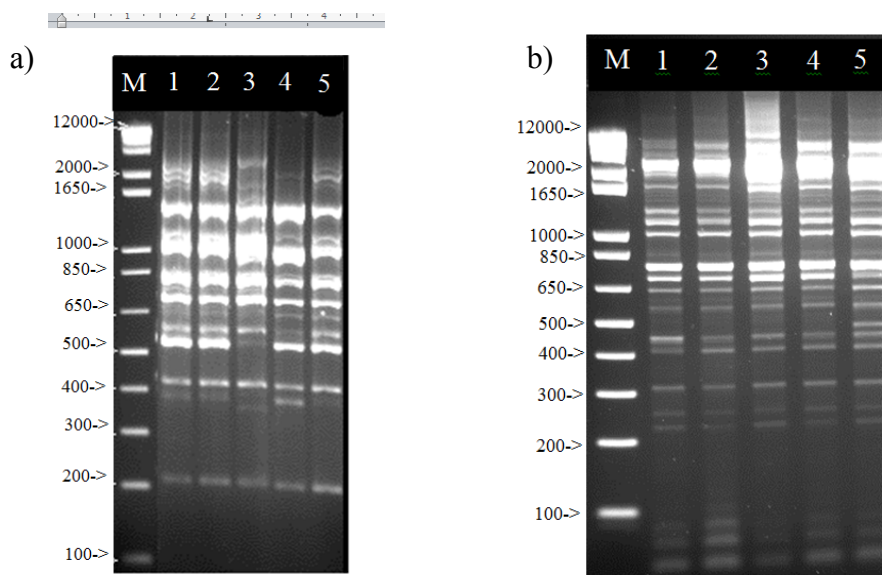
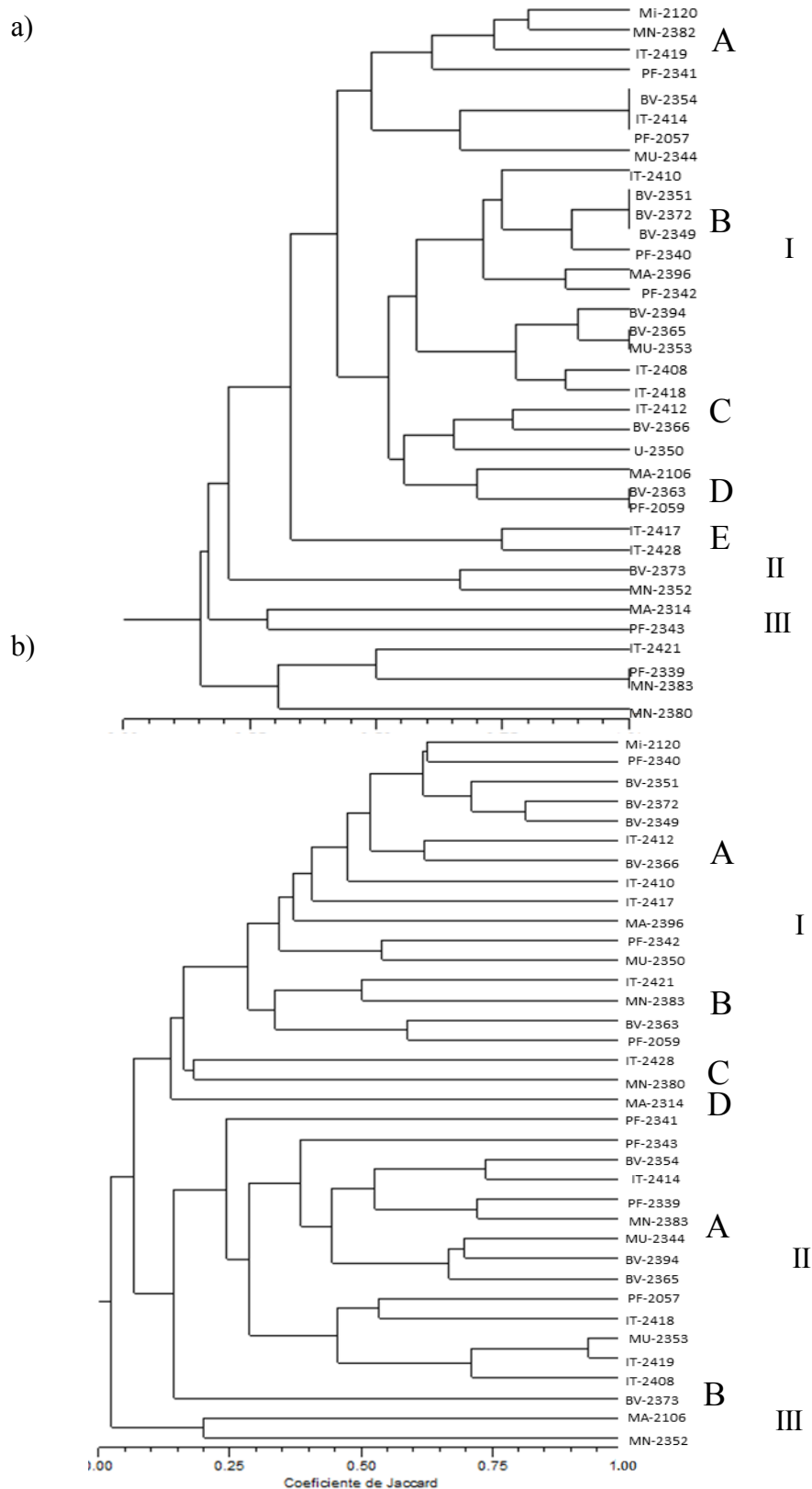


Figura 1 – Gel de agarose 1,5%, mostrando fragmentos de DNA de diferentes isolados amplificados. a) ISSR, com *primer* UBC 842, onde o número 1 equivale ao isolado 2412, o 2 ao isolado 2366, o 3 ao isolado 2396, o 4 ao isolado 2342, e o 5 ao isolado 2350. b) IRAP, onde o número 1 equivale ao isolado 2351, o 2 ao isolado 2120, o 3 ao isolado 2410, o 4 ao isolado 2372, e o 5 ao isolado 2340.

O índice de similaridade genética estimado pelo coeficiente de Jaccard variou de 0,15 a 0,96 e foi capaz de diferenciar 100% da população, mostrando a eficácia do marcador ISSR em detectar diferenças na população de *C. guaranicola*. O dendrograma obtido pelo método UPGMA mostra a formação de 3 grupos principais, denominados respectivamente de 1, 2 e 3 (Figura 2 a). O grupo I apresentou quatro subgrupos, A, B, C e D. O grupo II apresentou 2 subgrupos: A e B.

Em se tratando das análises realizadas pelo marcador IRAP, os *primers* desenvolvidos para o gênero *Colletotrichum* amplificaram em média 15 bandas (Figura 1 b), em cada isolado *C. guaranicola*. O número total de marcadores obtidos foi 18 das quais todas foram polimórficas (100%). O índice de similaridade genética estimado pelo coeficiente de Jaccard variou de 0,30 a 1,00 e capaz de diferenciar 66,6% da população, considerando alguns isolados de *C. guaranicola* como idênticos. O dendrograma obtido mostra a formação de 3 grupos principais, denominados respectivamente de 1, 2 e 3 (Figura 2 b). O grupo I apresentou 5 subgrupos: A, B, C, D e E.



*Onde: MA – Manaus; MU – Maués; MN – Manacapuru; IT – Itacoatiara; PF – Presidente Figueiredo; BV – Boa Vista do Ramos

Figura 2 – Dendrograma gerado pelo método UPGMA, no *software* NTSYS. a) IRAP, grupos I, II e III representados por chaves. São presentes cinco subgrupos no grupo I: A, B, C, D e E, representados em colchetes. b) ISSR, grupos I, II e III representados por chaves. Inseridos no grupo I, estão os subgrupos: A, B, C e D, assim como 2 subgrupos em II: A e B, ambos representados por colchetes.

Não houve correlação entre similaridade genética e local de coleta do isolado, uma vez que isolados de mesma procedência foram distribuídos em diferentes grupos e subgrupos, evidenciando a variabilidade

genética existente entre isolados provenientes da mesma localidade, tanto em IRAP quanto para ISSR. O mesmo foi observado por Bentes e Costa-Neto (2011).

A diferenciação genética entre populações pode ser atribuída às barreiras topográficas e de vegetação, às diferenças climáticas existentes entre países, às barreiras genéticas seguidas de eventos de colonização do fungo ou a combinação destes fatores, influenciando no fluxo gênico (McDonald e McDermott, 1993). 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. Dessa maneira, baixa estrutura genética foi observada.

O estudo da diversidade genética é considerado como crucial para o conhecimento da estrutura genética populacional de fitopatógenos e por consequência para direcionar estratégias de melhoramento. 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.

4. Conclusão

Diante do exposto, a análise dos isolados de *C. guaranicola* mostraram a presença de variabilidade intra-específica em *C. guaranicola* com base nos marcadores ISSR e IRAP.

5. Referências Bibliográficas

- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press. Burlington, Estados Unidos da América. 922 pp.
- Araújo, J.C.A.; Pereira, J.C. R.; Gasparotto, L.; Arruda, M.R. 2007. Caracterização dos sintomas da antracnose do guaranazeiro. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, Brasil. 94 pp.
- Azevedo, J.L. 2009. *Microorganisms Genetics*. Editora UFG, Goiânia, GO, Brasil. 536 pp.
- Bentes, J.L.S. e Costa-Neto, P.Q. 2011. Variabilidade genética de *Colletotrichum guaranicola* usando marcadores AFLP. *Acta Amazônica*, 41(2): 251-256.
- Daboussi, M.J.; Capy P. 2003. Transposable elements in filamentous fungi. *Annu. Rev. Microbiol.*, 57: 275-299.
- IBGE. 2010. *Prod. Agric. Munic.* Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 37: 1-91.
- 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.
- Kuramae-Izioka, E. E. 1997. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. *Unimar*, 19(3): 683-689.
- McDonald, B. A. e McDermott, J. M. 1993. The population genetics of plant pathogenic fungi. *BioScience*, 43: 311-319.
- Pereira, J.C.R.; Arruda, M.R. 2007. (Org.). *Pesquisa com guaranazeiro na Embrapa Amazônia Ocidental: status atual e perspectivas*. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, Brasil. 91-94 pp.
- Reddy, M.P.; Sarla, N.; Siddiq, E. A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128: 9-17.
- Santos, L. V.; Queiróz, M. V.; Santana, M. F.; Soares, M. A.; Barros, E. G.; Araújo, E. F. Langin, T. 2011. Development of new molecular markers for the *Colletotrichum* genus using *RetroCl1* sequences. *World J Microbiol Biotechnol.* 28(6): 1087.
- Sneath, P. H.; Sokal, R. R. 1973. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. San Francisco: W.H. Freeman. 573-574.
- Specht, C. A.; DiRusso, C. C.; Novotny, C. P.; Ullrich, R. C. 1982. A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Anal Biochem.*, 119(1): 158-163.
- Zietkiewicz, E.; Rafalki, A.; Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183.