

Diferenciação molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de frutos de mangueira por meio de marcadores RAPD

Molecular differentiation of Colletotrichum gloeosporioides isolates from mango fruits using RAPD markers

Tereza Cristina de Assis^{1*}, Domingos Eduardo Guimarães Tavares de Andrade¹, Regina Ceres Torres da Rosa¹, André Menezes Machado², Maria Menezes², Rildo Sartori Barbosa Coelho¹, Luciana Melo Sartori Gurgel¹

¹Laboratório de Fitopatologia, Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Av. General San Martin, 1371, Bongi, CEP 50761-000, Recife, PE, Brasil

²Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Recife, PE, Brasil

*autor correspondente

✉ cristina.assis@ipa.br

RESUMO: Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* (ISO-1, ISO-2, ISO-3, ISO-4, ISO-5 e ISO-6), obtidos de frutos de mangueira var. Rosa e Espada, foram avaliados por meio de marcadores RAPD quanto à variação genética. Dos cinco *primers* utilizados, apenas OPP-03 e OPP-09 apresentaram bandas que possibilitaram a caracterização dos isolados. A análise de agrupamento, com base nas distâncias genéticas, proporcionou a classificação dos isolados em três grupos: grupo I, constituído pelos isolados ISO-2, ISO-4 e ISO-5; grupo II, formado apenas pelo isolado ISO-3; e, grupo III, pelos isolados ISO-1 e ISO-6.

PALAVRAS-CHAVE: *Mangifera indica*, variabilidade genética.

ABSTRACT: *Colletotrichum gloeosporioides* isolates (ISO-1, ISO-2, ISO-3, ISO-4, ISO-5, and ISO-6) obtained from mango fruits (cv. Rosa and Espada) were appraised for genetic variation using Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) markers. Of the five primers used, only OPP-03 and OPP-09 presented bands that facilitated isolate characterization. Grouping analysis, based on genetic distances, provided three isolate groups: group I, constituted by ISO-2, ISO-4 and ISO-5 isolates; group II, ISO-3 isolate; and, group III, ISO-1 and ISO-6 isolates.

KEYWORDS: *Mangifera indica*, genetic variability.

A antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (Teleomorfo: *Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld. & Schrenk) é uma das doenças mais comuns e importantes da mangueira (*Mangifera indica* L.), amplamente disseminada nas regiões produtoras de manga do Brasil e do mundo (SANTOS FILHO et al., 2002; RIBEIRO, 2005). O patógeno ocorre em todas as fases de desenvolvimento da planta, porém é na inflorescência e formação dos frutos que os prejuízos são maiores devido à queima e queda de flores e aparecimento de lesões negras e deprimidas nos frutos, culminando com a podridão de pós-colheita durante o armazenamento e comercialização (SANTOS FILHO et al., 2002; ÁNGEL et al., 2006). O patógeno tem capacidade de atacar diferentes variedades de manga, variando, no entanto, quanto ao grau de sintomas induzidos nos frutos.

Tradicionalmente, a identificação e caracterização de espécies de *Colletotrichum* tem se baseado principalmente nas diferenças das características morfológicas, tais como cor das colônias, tamanho e forma dos conídios e apressórios, temperatura ideal para o crescimento, taxa de crescimento, presença ou ausência de cerdas e existência do teleomorfo *Glomerella* (SUTTON, 1992). Devido à alta plasticidade genética e grande dependência de fatores ambientais, os agentes patogênicos estão sujeitos a constantes mudanças físico-morfológicas e no comportamento patogênico (MICHEREFF, 2000). Além disso, o uso da especificidade hospedeira para propósito de identificação pode levar o pesquisador a negligenciar a diferença genética, altamente relevante, especialmente em relação a isolados do agente da antracnose, uma vez que táxons, como *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. graminicola* e outros, podem infectar uma ampla variedade de plantas hospedeiras (SUTTON, 1992). Devido à taxonomia de *Colletotrichum* ser confusa, tanto para as espécies anamórficas quanto para as teleomórficas (*Glomerella*), o uso combinado de ferramentas moleculares com as técnicas morfológicas tradicionais é, atualmente, uma abordagem adequada para o estudo de complexos de espécies de *Colletotrichum* (PILEGGI et al., 2009). O uso de marcadores moleculares tem facilitado a caracterização e diferenciação genética entre indivíduos e populações de *Colletotrichum* (ROJAS-MARTÍNEZ et al., 2008; BARGUIL et al., 2009; NGUYEN et al., 2009; GUPTA et al., 2010; TORRES-CALZADA et al., 2011; FIGUEIREDO et al., 2012; LIMA et al., 2012). Contudo alguns estudos demonstram incongruências entre critérios morfológicos e moleculares para identificação de espécies de *Colletotrichum* (SERRA et al., 2011; AFANADOR-KAFURI et al., 2003), assim, são necessários mais estudos para aperfeiçoar a identificação pelo uso combinado das técnicas moleculares com as morfológicas tradicionais. Segundo Gupta et al. (2010), o RAPD pode ser de grande valor em virtude da sua eficiência, rapidez e reprodutibilidade para gerar impressões digitais genéticas de isolados de *C. gloeosporioides*. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo verificar diferenças genéticas entre isolados de *Colletotrichum* obtidos de frutos de mangueira var. Rosa e Espada, por meio de marcadores RAPD.

No presente estudo, foram selecionados seis isolados, obtidos de frutos coletados em supermercados da cidade do Recife, sendo quatro de manga-espada (ISO-1, ISO-2, ISO-3 e ISO-4) e dois de manga-rosa (ISO-5 e ISO-6), os quais, em estudos prévios, foram identificados pelas características morfológicas como *C. gloeosporioides* e apresentaram variação na patogenicidade (ASSIS et al., 2001).

Para extração de DNA, foi utilizado o protocolo descrito por Reader e Broda (1985). Os isolados de *C. gloeosporioides* foram cultivados em meio de BDA por um período de cinco dias. Logo após, foram retirados discos de micélio (5 mm de diâmetro) da extremidade da colônia e transferidos para Erlenmeyers (150 mL), contendo 50 mL de meio líquido BD (batata-dextrose). Depois de cinco dias de incubação, à temperatura de 25±2 °C e luminosidade contínua, a massa micelial foi coletada em papel de filtro e lavada com água

destilada esterilizada. Depois da lavagem, o micélio foi macerado (200 mg) em almofariz de porcelana, na presença de nitrogênio líquido. Em seguida, o material foi transferido para microtubos de 1,5 mL e foram adicionados a cada amostra 700 µL de tampão de extração (Tris HCl-1M, pH 8,0; EDTA-0,5M, pH 8,0 e SDS-10%). Os microtubos foram mantidos em banho-maria (65 °C) por 30 minutos, sob agitação suave, a cada 10 minutos. Em seguida, procedeu-se à primeira extração adicionando-se 700 µL de clorofane (fenol balanceado com tris: clorofórmio: álcool isoamílico, 25: 24: 1 v/v) e agitando-se os microtubos manualmente. Em seguida, estes foram centrifugados a 12.000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi transferido para microtubos limpos (200µL), novamente, foi adicionado um volume de fenol, agitando-se manualmente e foram centrifugados a 12.000 rpm por cinco minutos. O processo foi repetido mais uma vez. Na terceira centrifugação, o sobrenadante de cada amostra foi transferido para microtubos limpos, adicionando-se dois volumes de etanol (-20 °C) e NaCl 0,3M (3M, pH 5,2). Depois de agitação suave, os microtubos foram centrifugados por cinco minutos a 12.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado uma vez com 500µL de etanol a 70% e seco em temperatura ambiente. Posteriormente, o precipitado foi ressuspenso com 200µL de TE e incubado a 37 °C por 30 minutos. A concentração de DNA foi determinada por fluorometria (Hoeffer Dyna Quanti™200). Depois da quantificação, as amostras de DNA foram diluídas para a concentração de uso, 10ng/mL.

As amostras de DNA de cada isolado foram amplificadas pelo método RAPD, sendo cada reação de amplificação realizada com um volume total de 25µL, contendo 10ng de DNA, 100GM de cada oligonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,5 mM MgCl₂; 10mM de Tris-HCl (pH 8,3); 50mM de KCl; 25 pmol/µL do *primer* com 10 bases de sequência aleatória, e 0,5µL de enzima Taq DNA polimerase (UDDIN; STEVENSON; PARDO-SCHULTHEISS, 1997). As amplificações foram efetuadas em termociclador (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400) programado para 40 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, nas seguintes sequências: um minuto a 92 °C, um minuto a 35 °C e dois minutos a 72 °C. Para cada amplificação, foram utilizados cinco *primers* de 10 bases da série OPP (Operon Technologies): OPP-03: 5'-CTGATACGCC-3'; OPP-06: 5'-GTGGGCTGAC-3'; OPP-07: 5'-GTCCATGCCA-3'; OPP-09: 5'-GTGGTCCGCA-3'; OPP-11: 5'-AACGCGTCGG-3'. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,2%, contendo 0,5µL de brometo de etídio (10µL/mL) e submerso em tampão TAE (tris-acetato, EDTA). Ao final da corrida eletroforética, os produtos de RAPD foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta.

A determinação das distâncias genéticas entre os isolados foi realizada a partir dos produtos de amplificação do DNA. Na análise dos dados, foi considerada a similaridade genética, para as bandas de DNA em comum entre os isolados, e a diferença genética para bandas não comuns (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1995). Os dados obtidos foram utilizados para a construção da matriz binária, com base na presença e

ausência de bandas. As distâncias genéticas foram calculadas pelo coeficiente de Concordância Simples (*Simple Matching*), de acordo com a fórmula de Dunn e Everitt (1982): $S_{ij} = a+d/p$, onde a e d são, respectivamente, o número de bandas presentes e ausentes, em comum entre os isolados; e p o número total de caracteres binários estudados. A análise do agrupamento dos dados obtidos pelo coeficiente de similaridade foi realizada pelo método de UPGMA, utilizando o programa estatístico MEGA 1.01, do *software* versão 1.80.

Na diferenciação genética de *C. gloeosporioides*, dos cinco *primers* utilizados somente OPP-03 e OPP-09 produziram perfis específicos, gerando de uma a cinco bandas de DNA por isolado (Figura 1). No primer OPP-03, ficou constatado alto grau de homogeneidade entre os isolados ISO-1, ISO-3, ISO-4 e ISO-6, pela presença de bandas de DNA em comum; apresentando este último polimorfismo em relação aos demais. Não houve amplificação, todavia, para o DNA dos isolados ISO-2 e ISO-5. O *primer* OPP-09 não revelou a presença de bandas para o ISO-2 e ISO-6, no entanto produziu maior número de bandas para os isolados ISO-4 e ISO-5, indicando que são geneticamente próximos, apesar de terem sido obtidos de variedades de mangas diferentes. De modo geral, os dois *primers* citados, embora não tenham mostrado resolução

adequada para os seis isolados de *C. gloeosporioides*, revelaram, no entanto, praticamente o mesmo padrão de uniformidade das bandas de DNA. Talvez o uso de maior número de *primers* e isolados do patógeno permitisse a seleção de um que revelasse eficientemente bandas de DNA para todos os isolados de *C. gloeosporioides*. Gupta et al. (2010) caracterizaram geneticamente, pela técnica de RAPD, 25 amostras *C. gloeosporioides*, provenientes de folhas e frutas de mangueira, utilizando oito *primers*, constataram que apenas OPA-1 (5'CAGGCCCTTC 3'), 3 (5'AGTCAGCCAC 3') e 18(5'AGGTGACCGT 3') foram capazes de produzir padrão de bandas reprodutíveis. Além destes resultados, verificaram, pelo dendrograma, mais de 75% do nível de similaridade e polimorfismo de 4,36% em isolados individuais que não foram estatisticamente significativos entre a amostra, indicando que todos os isolados testados tinham aproximadamente a mesma identidade genética. A Figura 2 apresenta o dendrograma obtido da análise de agrupamento com base nas distâncias genéticas, demonstrando que os isolados ISO-2, ISO-4 e ISO-5 estão mais próximos geneticamente (20-30%) em relação aos demais. O isolado ISO-3, apesar de se aproximar do ISO-4, está distante dos demais, bem como entre si (60%). Assim, os resultados sugerem a distribuição dos isolados em 3 grupos:

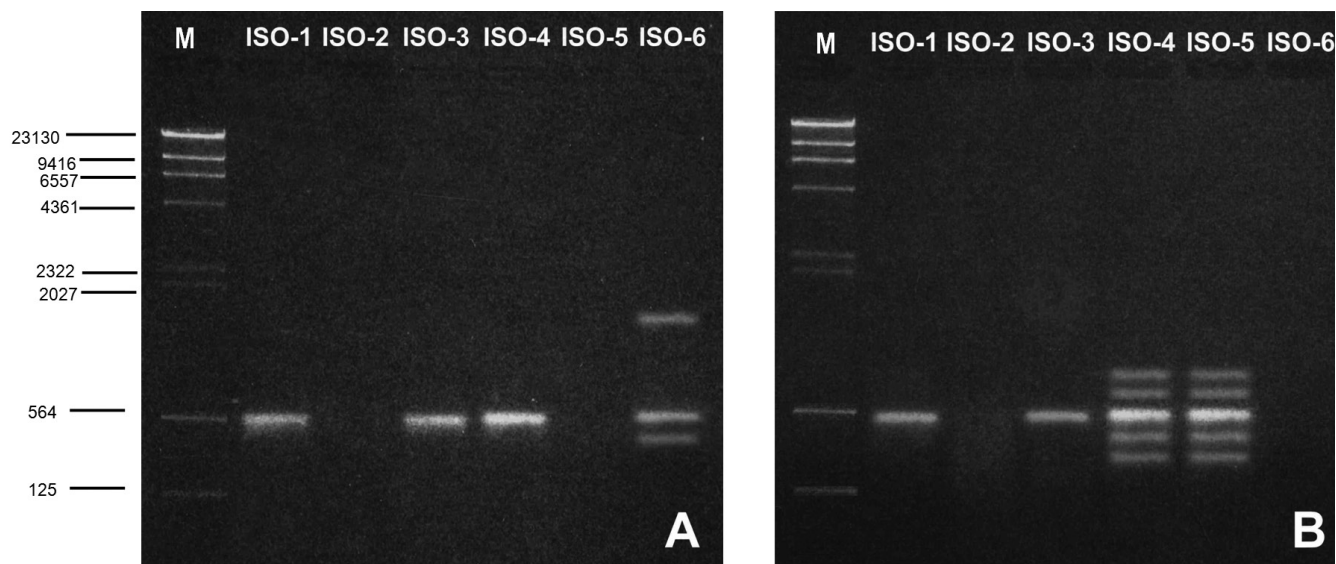


Figura 1. Padrões de bandas do produto de amplificação do DNA genômico de seis isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* (ISO-1, ISO-2, ISO-3, ISO-4, ISO-5, ISO-6) usando dois diferentes *primers*: OPP-03 (A) e OPP-09 (B).

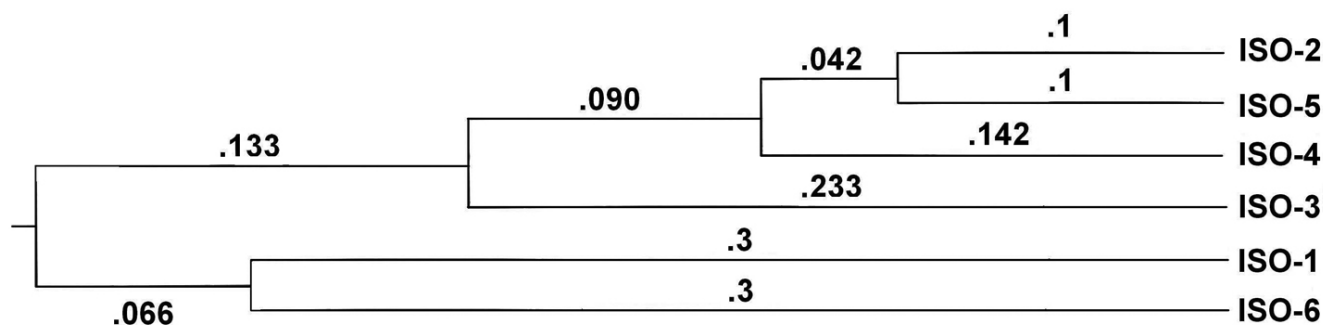


Figura 2. Análise de agrupamento de seis isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* (ISO-1, ISO-2, ISO-3, ISO-4, ISO-5, ISO-6), obtida por meio do programa MEGA 1.01, método UPGMA, utilizando o coeficiente de concordância simples.

grupo I (ISO-2, ISO-4 e ISO-5), grupo II (ISO-3) e grupo III (ISO-1 e ISO-6). Como se tratam de isolados oriundos da mesma espécie botânica acredita-se que a separação dos isolados em três grupos seja indicativa da presença do somatório de outras características, tais como patogênica, fisiológica, morfológica ou possivelmente ocorrência de raças de *C. gloeosporioides*. Serra et al. (2011) observaram que alguns isolados de *Colletotrichum*, obtidos de mangueira, após terem sido classificados como *C. gloeosporioides*, com base nas características morfológicas, fisiológicas e patogênicas, quando analisados por meio molecular utilizando oligonucleotídeos específicos (CgInt e CaInt2 para *C. gloeosporioides* e *C. acuntatum*, respectivamente), não foram identificados como tal. Concordando com Afanador-Kafuri et al. (2003), que constataram incongruências entre critérios morfológicos e moleculares para identificação de espécies de *Colletotrichum* de tamarameira, mangueira e maracujazeiro. Nova et al. (2011), utilizando a técnica de RAPD e usando *primers* OPA, OPX e OPW, observaram a separação dos isolados em três grupos e que os produtos de amplificação gerados com os *primers* ITS1 e ITS4 também demonstraram polimorfismos quando digeridos com três enzimas *DraI*, *HaeIII* e *MspI*. Porém não observaram relação entre os isolados e o grau de patogênicidade de *C. gloeosporioides* em folhas e bulbos de cebola. No entanto, em trabalhos anteriores com os mesmos isolados de *C. gloeosporioides*, Assis et al. (2010) verificaram relação entre o potencial patogênico e a expresividade isoesterásica do ISO 04, como o mais agressivo e o que apresentou maior número de bandas respectivamente, quando comparado aos demais isolados. Esse destaque na expressão sintomatológica e produção de isoenzimas pode ser atribuído à carga genética do fungo. Segundo Vilarinhos et al. (1995), a utilização de marcadores moleculares é de grande utilidade na identificação de raças de *C. gloeosporioides*, pois os resultados obtidos por eles permitiram alocar as raças deste patógeno em grupos que diferiram daqueles definidos pelo uso de variedades diferenciadoras, facilitando, desta forma, a obtenção de resultados rápidos e precisos para o estudo de variedades resistentes a este organismo. Já Johnson, Carris e Rogers (1997) concordam que, para uma caracterização adequada da variabilidade de *C. gloeosporioides*, deve-se fazer a associação de estudos moleculares morfológicos e fisiológicos, os quais podem esclarecer os limites taxonômicos de uma espécie e/ou raça.

Os dados obtidos na presente pesquisa fornecem subsídios para outros estudos referentes à caracterização de variabilidade de *C. gloeosporioides* associando diferentes técnicas, cujo intuito é, futuramente, esclarecer ou estabelecer os limites taxonômicos desta espécie e/ou raça.

Referências

ÁNGEL, D. N. et al. Enfermedades del mango. In: OLIVEIRA, S. M. A. et al. (Eds.). **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2006. p. 731-774.

- AFANADOR-KAFURI, L. et al. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. **Phytopathology**, v. 93, n. 5, p. 579-587, 2003. PMID:18942980. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.5.579>
- ASSIS, T. C. et al. Estudo comparativo de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* quanto ao efeito da nutrição de carboidratos no crescimento, esporulação e patogenicidade em frutos de três variedades de mangueira. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 208-212, 2001.
- ASSIS, T. C. et al. Diferenciação de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* por meio de padrões eletroforéticos de proteínas totais e isoesterase, e produção de enzimas extracelulares. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 36, n. 2, p. 140-144, 2010.
- BARGUIL, B. M. et al. Identificação e variabilidade de isolados de *Colletotrichum* causando antracnose em inflorescências de plantas ornamentais tropicais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 6, p. 1639-1646, 2009.
- DUNN, G.; EVERITT, B. S. **An Introduction to Mathematical Taxonomy**. Cambridge: Cambridge University Press, 1982. 152 p.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1995. 220 p.
- FIGUEIREDO, L. C. et al. Genetic and pathogenic diversity of *Colletotrichum gloeosporioides*, the causal agent of cashew anthracnose. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences**, Jaipur, v. 2, n. 1, p. 250-259, 2012.
- JOHNSON, D. A.; CARRIS, L.; ROGERS, J. D. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum nymphaeae* and *C. nupharicola* sp. nov. on water-lilies (*Nymphaeae* and *uphar*). **Mycological Research**, Cambridge, v. 101, n. 6, p. 641-649, 1997. <http://dx.doi.org/10.1017/S0953756296003115>
- LIMA, J. S. et al. Genetic Diversity of *Colletotrichum* spp. an Endophytic Fungi in a Medicinal Plant, Brazilian Pepper Tree. **ISRN Microbiology**, p. 1-7, 2012.
- GUPTA, V. K. et al. Genetic characterization of mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. by random amplified polymorphic DNA analysis. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 26, p. 4009-4013, 2010.
- MICHEREFF, S. J. Quantificação de Doenças de Plantas. In: DESAFIO do Manejo Integrado de Pragas e Doenças. Livro de palestras e mini-cursos "Semana de Fitossanidade". Recife: Editora Universitária da UFPE, 2000. p. 63-77.
- NGUYEN, T. H. P. et al. Variation among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from infected coffee berries at different locations in Vietnam. **Plant Pathology**, Oxford, v. 58, p. 898-909, 2009. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02085.x>
- NOVA, M. X. et al. Pathogenicity for onion and genetic diversity of isolates of the pathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* (Phyllachoraceae) from the state of Pernambuco, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 1, p. 311-320, 2011. PMID:21365546. <http://dx.doi.org/10.4238/vol10-1gmr1014>
- PILEGGI, S. A. V. et al. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum boninense* isolated from *Maytenus ilicifolia*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 55, p. 1076-1088, 2009. PMID:19898550. <http://dx.doi.org/10.1139/W09-059>
- READER, U. E.; BRODA, P. RAPD preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, Cambridge, v. 1, p. 17-20, 1985. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.1985.tb01479.x>

- RIBEIRO, I. J. A. Doenças da mangueira (*Mangifera indica*). In: KIMATI, H. et al. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**, v. 2. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005. p. 457-467.
- ROJAS-MARTÍNEZ, R. I. et al. Virulence and Genetic Variation of Isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. on Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Haden. **Revista Mexicana de Fitopatologia**, Ciudad Obregón, v. 26, n. 1, p. 21-26. 2008.
- SANTOS FILHO, H. P. et al. Doenças, monitoramento e controle. In: GENÚ, P. J. C.; PINTO, A. C. Q. (Eds.). **A cultura da mangueira**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p. 299-352.
- SERRA, I. M. R. S. et al. Diversidade fenotípica e patogênica de *Colletotrichum*, agente causal de antracnose em mangueira, e identificação de espécie. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 37, n. 1, p. 42-51, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052011000100007>
- SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. **Colletotrichum Biology, Pathology and Control**. CAB International, 1992. p. 1-26. Pmid:21551648.
- TORRES-CALZADA, C. et al. A species-specific polymerase chain reaction assay for rapid and sensitive detection of *Colletotrichum capsici*. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 49, n. 1, p. 48-55, 2011. Pmid:21253896. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-011-9377-7>
- UDDIN, W.; STEVENSON, K. L.; PARDO-SCHULTHEISS, R. A. Pathogenicity of a species of *Phomopsis* causing a shoot blight on peach in Georgia and evaluation of possible infection courts. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n.10, p. 983-989, 1997.
- VILARINHOS, D.V. et al. Characterization of races of *Colletotrichum lindemuthianum* by the random amplified polymorphic DNA technique. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p.194-198, 1995.

Recebido: 26/11/2011
Aprovado: 11/12/2012