

ESTUDOS DAS CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS E GENTÉTICAS DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* SPP. COLETADOS EM LAVOURAS CAFEIRAS (*Coffea arabica*) DE MINAS GERAIS. 1-TESTES DE PATOGENICIDADE E ANÁLISE MOLECULAR.¹

Fernando César JULIATTI, ICIAG/INGEB – UFU, e-mail: juliatti@ufu.br; Cláudia Cristina Neto e SILVA; Luis Ricardo Goulart FILHO, ICIAG/INGEB – UFU.

RESUMO: Procedeu-se a análise molecular da diversidade genética dos diferentes isolados do fungo *Colletotrichum* sp., por meio da técnica RAPD-PCR com DNA genômico dos isolados coletados. Foram testados sete oligonucleotídeos e o padrão de amplificação gerado para cada primer foi analisado em gel de agarose a 1%. Foi realizada inoculação em plântulas de cafeeiro com um par de folhas, na concentração de 4×10^6 conídios/ml. Utilizou-se uma concentração de 10 ml de suspensão e as plantas foram acondicionadas em câmara de nevoeiro por 3 dias. Relacionou-se o padrão molecular dos isolados pela análise de cluster com o teste de patogenicidade em plântulas das variedades Mundo Novo e Catuaí e também em frutos. Dentre os oligonucleotídeos, cinco geraram 33 marcadores polimórficos, detectando-se pela análise de grupos a maior distância genética entre os isolados de 23,6 %. Os vinte e dois isolados foram separados em seis grupos distintos ao nível de 16% de divergência, sendo que o maior grupo consistiu de 17 isolados divididos em seis subgrupos (13 % de divergência). Resultados diferenciais da patogenicidade de oito isolados em plântulas, associados a análise molecular sugerem diferentes espécies e /ou patótipos(raças) de *Colletotrichum* gloesporioides patogênicos e não patogênicos, associados ao cafeeiro em Minas Gerais.

PALAVRAS-CHAVES: Cafeeiro, antracnose, RAPD, patogenicidade, plântulas, frutos.

ABSTRACT: This work was based in the molecular analysis of different *Colletotrichum* isolates by RAPD-PCR. Seven oligonucleotides were used. Coffee seedlings at two leaves stage were inoculated in concentration of 4×10^6 conides/ml. After the inoculation, the seedlings were kept in a growth chamber under high relative humid for three days. A relationship was found determined between characteristics and patogenicity in seedlings of the Mundo Novo and Catuaí cultivars. A total of 33 polymorphic makers was found with five oligonucleotides. The largest genetic distance was 23,6%. Twenty isolates were separated in six groups with 16% of divergence. The largest group included 17 isolates divided in thirteen new groups with 13% of divergence. The results suggested that there are different species of *Colletotrichum* or different patotypes/races of *Colletotrichum gloesporioides* associated with coffee plants in Minas Gerais State.

INTRODUÇÃO

A cultura do cafeeiro é de grande importância no país e prejudicada economicamente por uma série de doenças que limitam a produção. Dentre estas doenças a antracnose constitui, em alguns países, um grave problema trazendo sérios prejuízos à cultura. Em algumas regiões ocorre uma enorme variação de intensidade dos danos por ela provocados (DORIZZOTTO, 1993). Atualmente vários sintomas semelhantes aos provocados pela CBD, vem sendo constatados nos cafezais de Minas Gerais, em folhas, frutos e ramos. A fim de verificar possível quadro sintomatológico e de patogenicidade do fungo, foram conduzidos estudos sobre as características genéticas por RAPD e patogênicas de isolados de *Colletotrichum* sp. coletados em Minas Gerais.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Agronomia, no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Genética e em Casa de Vegetação da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) durante o ano de 1997 a 1999. Foram utilizados vinte e dois isolados de *Colletotrichum* provindos de diversas regiões de Minas Gerais para extração de DNA (Tabela 1) e oito isolados para a inoculação em plântulas (Tabela 2). Estes isolados foram obtidas de cafeeiros e materiais enviados à clínica de Fitopatologia da UFU, dos quais foram isolados de folhas, ramos e frutos com lesões típicas de antracnose.

As plantas adultas, infectadas com antracnose, obtidas para o trabalho vieram de cafeeiros das cultivares Mundo Novo, Catuaí Vermelho e Catuaí Amarelo.

Procedência dos Isolados	Parte da Planta Isolada
C 1-Carmo do Paranaíba	Fruto
C 2-Araguari-a	Fruto
C 3-Araguari-b	Fruto
C 4-Araguari-c	Fruto
C 5-Araguari-d	Fruto
C 6-Araguari-e	Fruto
C 7-Uberlândia-a	Fruto
C 8-Uberlândia-b	Fruto
C 9-Cajuri-a	Fruto
C 10-Cajuri-b	Fruto
C 11-Canãa-a	Fruto
C 12-Canãa-b	Fruto
C 13-Canãa-c	Fruto
C 14-Teixeiras	Fruto
C 15-Patrocínio-a	Fruto
C 16-Ibiá	Fruto
C 17-Patrocínio - b	
C 18-Lavras	Haste e Fruto
C 19-Patrocínio-c	Fruto
C 20-Patrocínio-d	Fruto
C 21-Lavras (jiló)	Folhas e Haste
C 22-Patrocínio (canela)	Folhas e Haste

Tabela 1. Procedência dos isolados utilizados na extração de DNA. Uberlândia, MG.

Procedência dos Isolados	Parte da Planta Isolada
C 1- Carmo do Paranaíba	Fruto
C 2-Araguari-a	Fruto
C 3-Araguari -b	Fruto
C 4-Uberlândia	Fruto
C 5-Cajuri-a	Fruto
C 6-Ibiá	Fruto
C 7-Patrocínio-a	Fruto
C 8-Patrocínio-b	Folhas e Haste

Tabela 2. Procedência dos isolados utilizados no teste de patogenicidade em plântulas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 7 oligonucleotídeos iniciadores experimentados 5 deles apresentaram padrão polimórfico entre si. Os primers OPG-18, OPO-16, OPG-05, GOU-04 e OPO-16 (Figura 1) foram mais eficientes para discriminar geneticamente o polimorfismo existente entre os isolados de *Colletotrichum* sp. Observou-se também uma homologia de 94 a 76% entre os diferentes isolados.

As reações de amplificação de DNA, por meio de 5 “primers” curtos entre os 22 isolados, resultaram em 33 marcadores moleculares.

A análise de agrupamento permitiu a separação de cinco grupos distintos, dentre estes a formação de sub-grupos, onde claramente observa a existência de uma gama de patótipos diferentes infectando lavouras cafeeiras no estado de Minas Gerais. O primeiro grupo com seis isolados, inclui Carmo do Paranaíba (C1), Patrocínio- a (C15), Araguari- c (C4), Araguari- d (C5), Araguari- e (C6) e Uberlândia (C8) apresentaram padrões de ampliações semelhantes, o que indica uma similaridade genética entre os isolados estudados. Os isolados Araguari -b (C3) e Canãa (C12) mostraram-se uma maior distância genética entre os outros grupos, podendo explicar a grande diversidade entre os isolados coletados em Minas Gerais.

O diagnóstico molecular representado pelo dendograma agrupou os isolados obtidos em Canela (C21) e Jiló (C22), que pertencem a espécie *Colletotrichum gloeosporioides*, em um mesmo grupo de vários isolados de café, o que pode indicar que pertencem a mesma espécie. Pode-se citar como exemplo os isolados de Patrocínio-b e Uberlândia-a que apresentaram uma homologia de 100% aos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Os resultados dos índices médios de doença calculados para os oito isolados aos 10 e 20 dias, para as variedades Mundo Novo e Catuaí Vermelho, após a inoculação encontram-se na Tabela 2.

Pelos resultados apresentados na Tabela 2 foi constatado efeito significativo para os tratamentos (isolados, variedades e, aos vinte dias, interação diferencial entre variedades e isolados)

O isolado de Araguari-b apresentaram índice de doença superior aos demais. Os isolados de Uberlândia, Patrocínio-b, Ibiá, Cajuri-a e Patrocínio-a não diferiram estatisticamente e induziram índice de doença superiores à testemunha. Os isolados de Carmo do Paranaíba, Araguari-a e testemunha não apresentaram índice de doença, sendo, portanto, não patogênicos.

Tabela 2. Índice médio de doença em ensaio sobre a patogenicidade de isolados em plântulas de cafeeiros em variedade Catuaí Vermelho e Mundo Novo aos 10 e 20 dias da inoculação.

TRATAMENTOS	ÍNDICE DE DOENÇA		
	10 DIAS	20 DIAS	30 DIAS
Araguari-b	22.970 a	30.393 a	31.250 a
Uberlândia	24.200 ab	27.564 a	30.456 a
Patrocínio-b	17.240 bc	24.626 ab	25.202 ab
Ibiá	13.477 c	18.778 abc	19.195 abc
Cajuri	13.229 c	13.724 bc	13.724 bcd
Patrocínio-a	11.402 c	12.098 bcd	12.120 bcd
Carmo do Paranaíba	0.000 d	6.347 cd	6.862 cd
Araguari -a	0.000 d	0.000 d	0.000 d
Testemunha	0.000 d	0.000 d	0.000 d
CV %	55,254	59.497	62.938
Catuaí Vermelho	6.019 a	10.628 a	11.003 a
Mundo Novo	2.893 b	3.413 b	3.865 b

As médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não apresentam diferenças significativas pelo Teste de Tukey a 5%.

Não foi verificado na avaliação aos 20 dias da inoculação sintomas da doença no isolado de Carmo do Paranaíba, que apresentou valores de índice médio de doença igual à testemunha.

A variedade Catuaí Vermelho continuou apresentando maior susceptibilidade em relação aos isolados patogênicos quando comparada com a variedade Mundo Novo.

Os isolados de Uberlândia (C7) e Patrocínio-b (C17), de acordo com a análise genética de agrupamento, estão no mesmo grupo dos isolados de canela (C21) e jiló (C22), ambos pertencentes a espécie *Colletotrichum gloeosporioides*, provavelmente podendo ser a mesma espécie. Esses mesmos isolados foram patogênicos às plântulas de cafeeiro.

O isolados de Araguari-b (C3), nas duas variedades testadas, apresentou um maior índice médio de doença, posicionando-se, de acordo com análise de agrupamento, em grupos distantes dos demais, o que pode indicar tratar-se de uma nova espécie ou patótipo.

O isolado de Ibiá (C16) e Cajuri (C9) estão dispostos no mesmo grupo, de acordo com a análise de agrupamento, apresentando semelhança genética, além de patogenicidade às variedades de cafeeiro testadas, porém não diferindo estatisticamente entre eles, com valores intermediários de infecção (I.D). Neste caso, constituíram novos patótipos dentro do complexo antracnose/cafeeiro.

Os isolados de Patrocínio-b (C15) e Carmo do Paranaíba (C2) dispõem-se em um mesmo grupo porém, o primeiro apresentou patogenicidade nas duas variedades testadas, ao contrário do isolado de Carmo do Paranaíba. Pode-se atribuir a confirmação de uma outra raça da espécie infectante.

CONCLUSÕES

1. Os marcadores moleculares desenvolvidos podem estar fortemente relacionados com o nível de agressividade apresentados pelos isolados quando inoculados em plântulas de café, podendo ser poderosas ferramentas na identificação de isolados que estejam causando prejuízos em cafezais do estado de Minas Gerais;
2. A variedade Catuaí mostra ser mais susceptível a *Colletotrichum* spp., que infectam ponteiros e frutos, quando comparada com a variedade Mundo Novo;
3. Dentro dos 22 isolados analisados por marcadores moleculares e patogenicidade em plântulas, existem diferentes espécies e/ou patótipos (raças) associados ao cafeeiro em Minas Gerais.

Distância genética

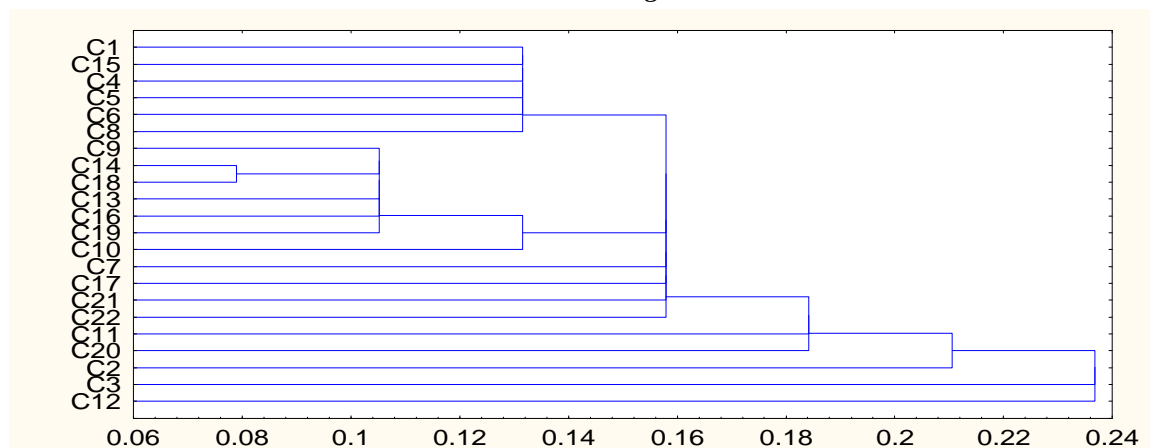


Figura 1. Análise de agrupamento para diferentes isolados de *Colletotrichum* spp. procedentes de diferentes municípios de Minas Gerais.

REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DORIZZOTTO, A. **Caracterização morfológica e patogenicidade de *Colletotrichum* sp. associados a cafeeiros (*Coffea arabica* L.) em dois municípios de Minas Gerais.** Lavras: ESAL, 1993. 67p. (Dissertação, Mestrado em Fitopatologia).
- SILVA, C.C.N **Caracterização genética e de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* spp. coletados em lavouras cafeeiras (*Coffea arabica* L.) de Minas Gerais.** UFU, 1999, 57 pag.(Monografia de graduação).

AVISO

ESTA PUBLICAÇÃO PODE SER ADQUIRIDA NOS
SEGUINTE ENDEREÇOS:

FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES

Edifício Sede, s/nº. - Campus Universitário da UFV
Viçosa - MG
Cep: 36571-000
Tels: (31) 3891-3204 / 3899-2485
Fax : (31) 3891-3911

EMBRAPA CAFÉ

Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W3 Norte (Final)
Edifício Sede da Embrapa - sala 321
Brasília - DF
Cep: 70770-901
Tel: (61) 448-4378
Fax: (61) 448-4425