

## DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum gloeosporioides* ASSOCIADOS À ANTRACNOSE EM GOIABA

Beatriz de Almeida e Silva<sup>1</sup>; Angélica Sanchez Melo<sup>1</sup>; Ingrid Mírian Braz Barreto<sup>1</sup>; Gustavo Fernandes Martins<sup>1</sup>; Fernanda Dias Pereira<sup>2</sup> e Juliana Stracieri<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Maringá/ Departamento de Ciências Agronômicas/ Umuarama, PR. E-mail: juliana.uem@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”/ Departamento de Fitossanidade/ Jaboticabal, SP. E-mail: fe.eng.agronomica@gmail.com

**RESUMO:** O cultivo de goiaba (*Psidium guajava* L.) tem grande importância econômica nos países tropicais e subtropicais. O Brasil destaca-se como o terceiro maior produtor mundial, porém resente-se de sérios problemas de ordem fitossanitária, especialmente devido infecções causadas pelo fungo *Colletotrichum* spp., causador da antracnose. O presente trabalho teve como objetivo iniciar a identificação da diversidade genética do patógeno causador da antracnose em goiaba. Foram selecionados 13 isolados do patógenos provenientes das variedades Paluma e Pedro Sato isolados da mesma propriedade. Para o estudo de diversidade genética foi realizado a extração de DNA e foram utilizados dois marcadores moleculares Inter simple sequence repeat (ISSR), os resultados foram analisados manualmente, a partir dos quais se obteve uma matriz binária; essa matriz binária foi convertida em uma matriz de distância, e o dendrograma foi construído pelo método de distância UPGMA. Os isolados da variedade Pedro Sato apresentaram menos similaridade genética quando comparados com os demais isolados de Paluma. Um isolado de Pedro Sato em especial o GIta13 se destaca por apresentar a menor similaridade genética (>0,5) em relação a todos os outros em estudo. Concluiu-se que isolados de antracnose, oriundos de goiaba, da mesma propriedade e da mesma espécie apresentam uma alta variabilidade genética.

**PALAVRAS-CHAVE:** Antracnose; *Psidium guajava*; marcador ISSR.

## GENETIC DIVERSITY OF ISOLATES OF *Colletotrichum gloeosporioides* ASSOCIATES TO ANTHRACNOSIS IN GUAVA

**ABSTRACT:** Guava (*Psidium guajava* L.) cultivation has great economic importance in tropical and subtropical countries. Although Brazil stands out as the third largest producer in the world, this culture has serious phytosanitary problems, especially due to infections caused by the fungus *Colletotrichum* spp., the causative agent of anthracnose. The present work aimed at identifying/investigating the genetic diversity of the pathogen causing anthracnose in guava. To this end, seventeen isolates of the pathogens from the Paluma and Pedro Sato varieties were selected from the same rural property, followed by DNA extraction using two molecular markers of the inter simple sequence repeat (ISSR) type. The results were analyzed manually, obtaining a binary matrix that was converted into a distance matrix, and the UPGMA distance method was used to obtain the dendrogram. The isolates of the Pedro Sato variety had less genetic similarity than the Paluma isolates. An isolate of Pedro Sato, especially the GIta13 stands out for having the lowest genetic similarity (> 0.5) compared to the others. It was concluded that anthracnose isolates from guava of the same property and species have high genetic diversity.

**KEY WORDS:** Anthracnose; *Psidium guajava*; ISSR marker.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de goiaba (*Psidium guajava* L.), os estados de São Paulo e Pernambuco correspondem, em conjunto, por mais de 80% da produção nacional, em 2014 dos 359.349 toneladas da fruta produzida no país, aproximadamente 133.000 eram do estado de São Paulo (IBGE, 2014). A fruta tem como destino não somente comercialização interna, como também grande foco de exportação, principalmente para os Estado Unidos para a produção de pastas, purês e geleias.

Um dos principais fatores que prejudica a exportação e comercialização das frutas são as doenças pós-colheita, com destaque para a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum* spp. Essa é considerada a mais importante doença de pós-colheita das frutíferas tropicais, causando prejuízos que variam em função do grau de suscetibilidade da planta hospedeira e das condições ambientais, sendo temperaturas amenas e alta umidade, os fatores mais favoráveis ao patógeno (Serra et al, 2011)

Segundo o Ministério da Agricultura (BRASIL, 2015), a antracnose é uma doença cosmopolita, ocorrendo em áreas produtoras de abacate, banana, manga, mamão, goiaba e outros cultivos, sendo mais importante em regiões com alta umidade e regime chuvoso prolongado, comum em frutíferas em toda a América do Sul, América Central e sul dos Estados Unidos da América, Austrália, Filipinas e Índia. Há, também, registros da doença na África do Sul e Taiwan. No Brasil, está disseminada por todo o seu território.

O uso de técnicas moleculares e marcadores bioquímicos, de proteínas e isoenzimas tem possibilitado o desenvolvimento de métodos rápidos e específicos no diagnóstico de patógenos de plantas (Drew, 1997; Sunil,1999). Com isso, os estudos de diversidade genética são fundamentais para identificar a evolução e visualizar o relacionamento entre esses indivíduos, que geralmente são ocasionadas por mutações. O que explica a resistência adquirida por esses patógenos a determinadas substâncias químicas.

O presente trabalho tem como objetivo iniciar a identificação da diversidade genética do patógeno causador da antracnose em goiaba, visando futuramente realizar uma correlação da dificuldade de controle do patógeno com a variabilidade genética.

## MATERIAL E MÉTODOS

Frutos de goiaba com sintomas típicos de antracnose foram coletados no município de Itápolis, São Paulo – SP (Stracieri et al., 2016). Para o isolamento, foram obtidos fragmentos de aproximadamente 5 mm<sup>2</sup> de casca das frutas, os quais, após desinfestação superficial, foram depositados em meio BDA (batata-dextrose-ágar) contidos em placas de Petri. Posteriormente, as placas de Petri foram armazenadas em estufas do tipo BOD, a 25 ° C, e fotoperíodo de 12 horas. Após sete dias, foram selecionadas 13 colônias típicas de *Colletotrichum* spp., seguido de repicagem e, posteriormente, a partir de culturas puras, obtidas culturas monospóricas. (Tabela 1).

**Tabela 1** – Locais de coletas das amostras dos frutos, identificação dos isolados de *Colletotrichum* spp., e variedades amostradas

Identificação	Origem	Variedade
GIta01	Itápolis SP	Paluma
GIta02	Itápolis SP	Paluma
GIta03	Itápolis SP	Paluma
GIta04	Itápolis SP	Paluma
GIta05	Itápolis SP	Paluma
GIta06	Itápolis SP	Paluma
GIta07	Itápolis SP	Paluma
GIta08	Itápolis SP	Paluma
GIta09	Itápolis SP	Pedro Sato
GIta10	Itápolis SP	Pedro Sato
GIta11	Itápolis SP	Paluma
GIta12	Itápolis SP	Paluma
GIta13	Itápolis SP	Pedro Sato

A extração de DNA dos isolados foi baseada no protocolo de Kuramae-Izioka (1997) e, posteriormente, para a avaliação da quantidade e da qualidade do DNA, foi utilizado espectrofotômetro NanoDrop. Os DNAs dos isolados monospóricos foram identificados por meio de marcadores específicos (STRACIERI et al., 2016). Para as reações de PCR, para os ISSR, foram utilizados tampão 1X (KCl 50 mM, Tris-HCl 200 mM, pH 8,4); dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP, 2,5 mM de cada) 0,2 mM, 2,0 U de Taq DNA polimerase, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, iniciador 5 pmol, 60 ng de DNA e água pura estéril q.s.p. 20 µL. Para a amplificação dos iniciadores ISSR (Tabela 2), as reações foram realizadas em termociclador (Eppendorf), sendo utilizado um ciclo a 95 °C por 3 minutos, 35 ciclos a 94 °C por 40 segundos, T° variável de acordo com o iniciador por 1 minuto, e extensão final a 72 °C por 10 minutos. O produto da PCR foi revelado por eletroforese

em tampão TEB 1X, utilizando gel de agarose a 2%, contendo brometo de etídio ( $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

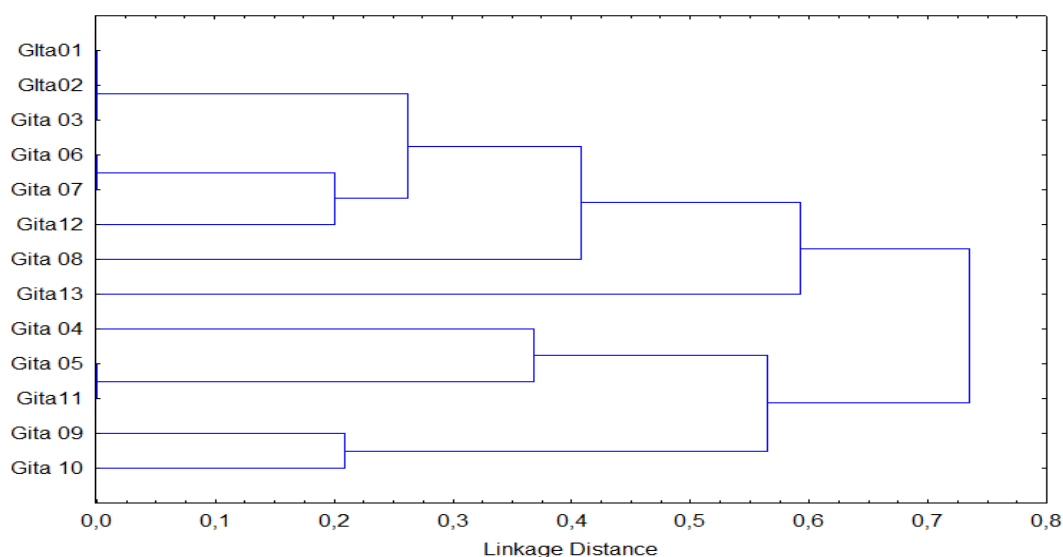
**Tabela 2** – Primers utilizados, suas respectivas seqüências e temperaturas de amplificação

Primer	Sequências (5'– 3')	Temperatura de amplificação
ISSR - P7	ACAACAACAACAACA	48 °C
ISSR - P22	GAGCAACAACAACAACA	53,8 °C

Os géis contendo o produto das reações PCR-ISSR foram analisados manualmente, a partir dos quais se obteve uma matriz binária, com o número 1, significando presença de banda, e o número 0 (zero), ausência. Essa matriz binária foi convertida em uma matriz de distância, e o dendrograma foi construído pelo método de distância e algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average) pelo software *Statistica 7.0* (STATSOFT, 2007).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dois primers ISSR usados permitiram a codificação de 9 locos. O dendrograma (Figura 1) obtido possibilita a identificação de indivíduos com alta similaridade genética (GIta01, GIta02 e GIta03; GIta06 e GIta07 e GIta05 e GIta11).



**Figura 1** – Dendrograma obtido pela análise das variações nas regiões ISSR dos 13 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, por meio do coeficiente de Jaccard e do método de agrupamento UPGMA

Os três isolados da variedade Pedro Sato (GIIta09, GIIta10 e GIIta13) apresentaram menos similaridade genética quando comparados com os demais isolados de Paluma.

O Isolado GIIta13 se destaca por apresentar a menor similaridade genética (>0,5) em relação a todos os outros avaliados, estudos morfológicos e controle desse patógeno serão explorados futuramente, buscando assim uma correlação da alta diversidade genética e as dificuldades de controle.

Aferir a diversidade genética de populações desse patógeno é essencial para o entendimento da dinâmica de alterações nos padrões de virulência, na medida em que estas alterações influenciam a resistência (Casella et al.,1998).

### CONCLUSÕES

Isolados de antracnose, oriundos de goiaba, da mesma propriedade e da mesma espécie apresentam uma alta variabilidade genética.

### REFERÊNCIAS

CASELA, C.R.; FERREIRA, A.S.; SANTOS, F.G. Associação de virulência de *Colletotrichum graminicola* à resistência genética em sorgo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.23, n.2, p.143-146, 1998

DREW, R. A. The application of biotechnology to the conversion and improvement of tropical and subtropical fruit species. *Caryologian*, Firenze, v. 1, n. 21, p.77-80, 1997;

KURAMAE-IZIOKA, E. E. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloesporioides* and *Fusarium oxysporum*. *Revista Unimar*, 19:683-689, 1997.

STRACIERI, J.; PEREIRA, F. D.; AMANDA LETÍCIA DA SILVEIRA;MAGALHÃES, H. M. GOES, A. Morphocultural and molecular characterization of papaya tree *Colletotrichum* spp. *Afr. J. Agric. Res.*, v. 11, n. 19, p. 1755-1764, 2016.

STATSOFT, INC. Statistica (data analysis software system), version 7. 2007. <[www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)>

SUNIL, K. L. DNA markes in plant improvement: na overview. *Biotechnology Advances*, New York, v. 17, n. 14, p. 143-182, 1999;