

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Colletotrichum* spp. ISOLADO DE CEBOLINHA (*Allium fistulosum*), NONI (*Morinda citrifolia*) E HELICÔNIA (*Heliconia psittacorum*)

Camila Borges GARCIA¹; Rogério Eiji HANADA²; Nelcimar Reis SOUZA³; Gilvan Ferreira SILVA⁴.

¹Bolsista PAIC/FAPEAM; ²Orientador INPA; ³Colaboradora Embrapa Amazônia Ocidental CPAA; ⁴Co-orientador Embrapa Amazônia Ocidental

1. Introdução

O gênero *Colletotrichum* é um dos mais importantes entre os fungos fitopatogênicos do mundo, a antracnose causada pelas espécies deste gênero é uma doença de expressão econômica em leguminosas, cereais, hortaliças e culturas perenes, incluindo diversas frutíferas (Serra *et al.* 2008).

Espécies de fungos são tradicionalmente diferenciadas com base em caracteres morfológicos e culturais, porém, no caso do *Colletotrichum* esta identificação encontra dificuldades em função da grande diversidade fenotípica e instabilidade destes caracteres em função do ambiente (Andrade *et al.* 2007).

No Brasil ultimamente temos grandes cultivos em ascensão de *Morinda citrifolia* devido as suas propriedades medicinais (Bonaldo *et al.* 2011), *Heliconia psittacorum* por ser uma planta ornamental tropical de valor comercial (Loges *et al.* 2005) e de *Allium fistulosum* por ser de grande importância culinária (Kim *et al.* 2008). À medida que as plantas de noni, helicônia e cebolinha começaram a ser cultivadas, elas tornaram-se suscetíveis a diversos patógenos entre os quais podemos citar o *Colletotrichum* spp. (Rethinam e Sivaraman 2007; Kim *et al.* 2008; Barguil *et al.* 2009).

Várias técnicas que permitem revelar variabilidade em nível de DNA estão disponíveis, entre essas técnicas os marcadores moleculares têm sido mais recomendáveis, pois diferenciam características de DNA herdadas geneticamente de dois ou mais indivíduos.

Poucos trabalhos relativos a antracnose tem sido realizados em espécies como Cebolinha (*Allium fistulosum*), Noni (*Morinda citrifolia*) e *Heliconia psittacorum* (Kim *et al.* 2008; Barguil *et al.* 2009; Kumar *et al.* 2012). Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar a diversidade genética das espécies de *Colletotrichum* isolados de *Allium fistulosum*, *Morinda citrifolia* e *Heliconia psittacorum*.

2. Material e Métodos

Os folíolos com sintomas de antracnose de *A. fistulosum*, *H. Psittacorum* e *M. citrifolia* foram coletados no Instituto de Pesquisa da Amazônia (INPA). Para o isolamento os folíolos foram submetidos à câmara úmida por 24 horas. A desinfestação e o isolamento foi feita segundo Souza *et al.* (2003). As extrações de DNA foram feitas pelo método CTAB, a quantificação foi realizada por espectrofotometria (NanoDrop) e em gel de agarose 0,8%.

Para análise molecular com o marcador ERIC-PCR foram utilizados os *primers* ERIC1R 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTACAC-3' e ERIC2 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3' e as reações realizadas com: 1X de tampão Green Gotaq Flexi Buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.4, 1% de Triton X-100), 1,5mM de cloreto de magnésio Promega, 0,5 mM de dNTP, 50 ng de DNA, 0,2 uM de cada primer e 1 U da GoTaq Polimerase. As reações de PCR foram realizadas no termociclador *Veriti Applied Biosystems* com os seguintes ciclos: Desnaturação inicial 94°C por 1 minuto, 30 ciclos com desnaturação de 94 °C por 1 min, anelamento 48,0 °C por 1 min. Síntese 65 °C por 5 min. Síntese final: 65 °C, por 16 minutos.

Para ISSR foi utilizado o *primer* ISSR-885 - BHB GAGAGAGAGAGAGA e as reações realizadas com: 1X de tampão Green Gotaq Flexi Buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.4, 1% de Triton X-100), 1,5 mM de cloreto de magnésio Promega, 0,5 mM de dNTP, 50 ng de DNA, 0,2 uM de cada primer e 1 U da GoTaq Polimerase. As reações de PCR foram realizadas no termociclador *Veriti Applied Biosystems* com os seguintes ciclos: Desnaturação inicial 94 °C por 3 minutos, 40 ciclos com desnaturação de 94 °C por 0:30 min, anelamento 48,3 °C por 1 min. Síntese 72 °C por 2 min. Síntese final: 72 °C, por 7 minutos.

3. Resultados e Discussão

Foram obtidos onze isolados a partir dos diferentes hospedeiros, dois de *A. fistulosum*, oito de *M. citrifolia* e um de *H. psittacorum*. (Tabela I). A caracterização molecular realizada por meio das técnicas de ERIC-PCR e ISSR por meio da amplificação com o *primer* UBC 885 foi capaz de diferenciar os isolados dos *Colletotrichum* obtidos dos três hospedeiros.

Observou-se, então, que de onze isolados, sete demonstraram ser de espécies diferentes nos três hospedeiros: dois de cebolinha, quatro de noni, e um de helicônia.

Ambos os marcadores confirmam os mesmos resultados (Figura I, e II); O isolado 2621 mostrou um perfil de banda semelhante a outros quatro isolados: 1B, 2B, 3B, e 4B sendo que esses foram obtidos do mesmo hospedeiro, o Noni.

Tabela I- Lista de isolados de cebolinha, noni e helicônia utilizados neste estudo.

Código	Orgão vegetal	Hospedeiro	Local de origem	Nome comum
2615	Folha	<i>Allium fistulosum</i>	Manaus	cebolinha
1809	Folha	<i>Allium fistulosum</i>	Manaus	cebolinha
2616	Folha	<i>Morinda citrifolia</i>	Manaus	noni
2621	Folha	<i>Morinda citrifolia</i>	Manaus	noni
3A	Folha	<i>Morinda citrifolia</i>	Manaus	noni
4A	Folha	<i>Morinda citrifolia</i>	Manaus	noni
1B	Folha	<i>Morinda citrifolia</i>	Manaus	noni
2B	Folha	<i>Morinda citrifolia</i>	Manaus	noni
3B	Folha	<i>Morinda citrifolia</i>	Manaus	noni
4B	Folha	<i>Morinda citrifolia</i>	Manaus	noni
2626	Folha	<i>Heliconia psittacorum</i>	Manaus	helicônia

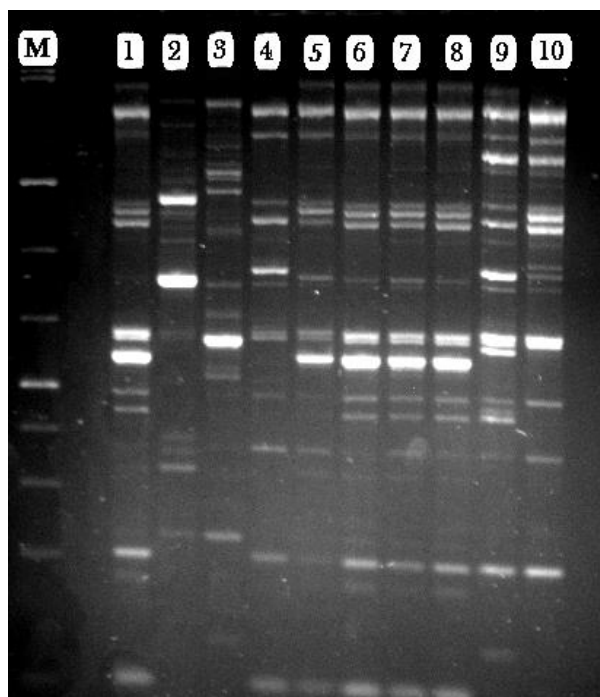


Figura I: Perfil de bandas obtidas com a técnica de ERIC-PCR em gel de agarose 1,5%. M representa o marcador molecular 1kb plus (Invitrogen), os numeros de 1 a 10 representam os isolados de cebolinha (2 -2615); do noni (1-2621, 3- 2616, 5- 1B, 6- 2B, 7- 3B, 8- 4B, 9- 3A,10- 4A) e de helicônia (4- 2626).

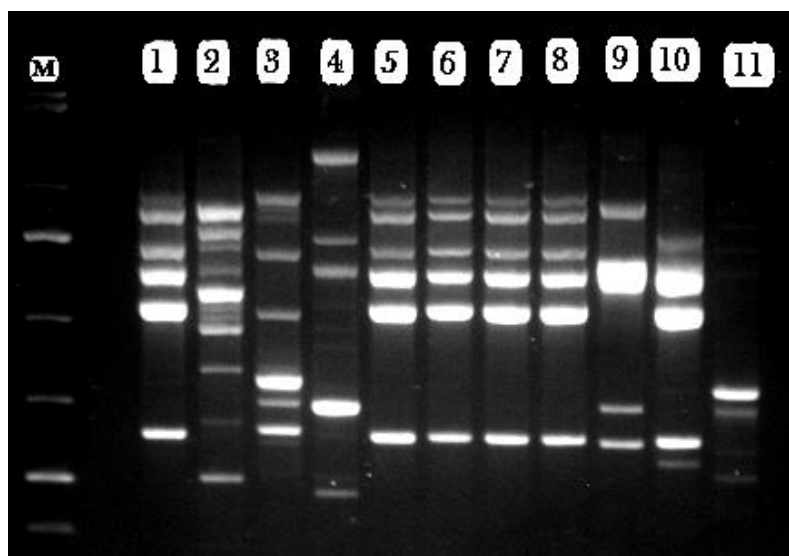


Figura II: Perfil de bandas obtidas com a técnica de ISSR-885 em gel de agarose 1,5%. M representa o marcador molecular 1kb plus (Invitrogen), os números de 1 a 11 representam os isolados de cebolinha (2 -2615, 11- 1809); do noni (1- 2621, 3- 2616, 5- 1B, 6- 2B, 7- 3B, 8- 4B, 9- 3A,10- 4A) e de helicônia (4- 2626).

4. Conclusão

A análise pela técnica ERIC-PCR e ISSR, indicou alta diversidade genética isolada de três hospedeiros. Podemos concluir a partir dos perfis de bandas obtidos que os onze isolados de *Colletotrichum* spp. correspondem a sete linhagens possivelmente diferentes.

5. Referências Bibliográficas

- Molina, A.L.; Tobo, P.R. Uso das Técnicas de Biologia Molecular para Diagnóstico. (<http://www.einstein.br/biblioteca/artigos/Vol2Num2/Serie%20Biologia%20parte%202.pdf>.) Acesso em 15/06/2013.
- Souza, C.S. *et al.* 2003. Mancha de Septoria da alface: isolamento, inoculação e avaliação de cultivares em condições de campo e casa de vegetação. *Fitopatol. Bras.*, 28(5) Oct. (http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582003000500016&lng=en&nrm=iso) Acesso em 19/06/2013.
- Serra, IMRSS; Coelho, R.S.B; Menezes, M.M. 2008. Caracterização fisiológica, patogênica e análise isoenzimática de isolados monospóricos e multiespóricos de *Colletotrichum*. Universidade Federal de Pernambuco. UFRPE. Departamento de Agronomia/Fitossanidade. *Summa Phytopatho*, 34. Botucatu Apr/June.
- Andrade, E.M.; Uesugi, C.H., Ueno, B.; Ferreira, M.A.S.V. 2007. Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 32: 021-031,
- Silva-Mann, R. *et al.* 2002. Variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro, por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas. *Fitopatol. bras.*, 27(1). (http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010041582002000100004&lng=en&nrm=iso) Acesso em :18/06/2013
- 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.
- Kim WG, Hong SK, Kim JH. 2008. Occurrence of Anthracnose on Welsh Onion Caused by *Colletotrichum circinans*. *Mycobiology*, 36(4): 274-276.
- Barguil, B.M.; Oliveira, S.A.; Coelho S.B.; Júnior J.E.A. 2009. Identificação e variabilidade genética de isolados de *Colletotrichum* causando antracnose em inflorescências de plantas ornamentais tropicais *Cienc. Rural*, 39(6).
- Kumar, K.; Singh, D.R., Amaesan N.; Madhuri, K. 2012. Isolation and pathogenicity of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose of Indian mulberry (*Morinda citrifolia*) in tropical islands of Andaman and Nicobar, India. *Phytoparasitica*. 40: 485–491.
- Bonaldo, S.M.; Santos, B.T.; Rondon, M.J.; Trento, R.A. 2011. Ocorrência de Antracnose em *Morinda citrifolia* L. (Rubiales: Rubiaceae) em SINOP/MT. *Revista de Ciências Agro-Ambientais*, 9(2): 301-305.
- Rethinam, P.; Sivaraman, K. 2007 Noni (*Morinda citrifolia* L.) - the miracle fruit - a holistic review. *International Journal of Noni Research*, 2(1-2): 4-37.
- Loges; V. *et al.* 2005. Colheita, pós-colheita e embalagem de flores tropicais em Pernambuco. *Horticultura Brasileira*, 23: 699-702 (<http://www.scielo.br/pdf/hb/v23n3/a01v23n3.pdf>) Acesso em: 23/06/2013.
- Kim, W.G; Hong, S.K.; Kim, J.H. 2008. Occurrence of Anthracnose on Welsh Onion Caused by *Colletotrichum circinans*. *Mycobiology*, 36(4): 274-276.