

Identificação e variabilidade genética de isolados de *Colletotrichum* causando antracnose em inflorescências de plantas ornamentais tropicais

Identification and genetic variability of *Colletotrichum* isolates causing anthracnose in inflorescence of ornamental tropical plants

Beatriz Meireles Barguil^{1*} Sônia Maria Alves de Oliveira¹ Rildo Sartori Barbosa Coelho¹
José Evando Aguiar Beserra Júnior^{II}

RESUMO

A antracnose afeta a qualidade de inflorescências de plantas ornamentais tropicais, e a espécie fúngica *Colletotrichum gloeosporioides* tem sido relacionada a essa doença apenas por análises morfológicas. Por isso, o presente trabalho teve como objetivos identificar isolados de *Colletotrichum* coletados em plantas de antúrio (*Anthurium andraeanum*), bastão do imperador (*Etilingera elatior*) e helicônia (*Heliconia* spp.), por meio de caracteres morfológicos e reação em cadeia da polimerase (PCR), e avaliar a variabilidade genética por meio de oligonucleotídeos arbitrários (AP-PCR). Pelas características morfológicas de tamanho de conídio e de apressório, todos os isolados foram identificados como *C. gloeosporioides*. Um fragmento de 450pb específico para *C. gloeosporioides* foi amplificado em todos os isolados analisados, com exceção de C 23 e C 35. A caracterização molecular realizada com três oligonucleotídeos arbitrários ((GACAC)₃, (GACA)₄ e (CAG)₅) possibilitou a formação de três grupos de isolados, com padrões de bandas distintos. Portanto, conclui-se que as metodologias utilizadas foram eficientes na identificação de isolados de *C. gloeosporioides* provenientes das espécies ornamentais avaliadas e que, nos isolados analisados, não existe relação entre a similaridade observada no padrão de bandas obtido por AP-PCR e a área de coleta ou a planta hospedeira.

Palavras-chave: *Anthurium andraeanum*, AP-PCR, *Etilingera elatior*, *Heliconia* spp., ITS.

ABSTRACT

Anthracnose affects inflorescences quality of ornamentals tropical plants and the fungi specie *Colletotrichum gloeosporioides* has been related with this disease based only on morphology. Therefore, the objectives of this research was to identify *Colletotrichum* isolates collected on anthurium (*Anthurium andraeanum*), torch ginger (*Etilingera elatior*) and

heliconia (*Heliconia* spp.) plants by means of morphology and polymerase chain reaction (PCR) and also verify the genetic variability using arbitrary-primed PCR (AP-PCR). All isolates were identified as *C. gloeosporioides* by conidium and appressorium size. A fragment of 450bp specific for *C. gloeosporioides* was amplified for all isolates analyzed, except for C 23 and C 35 isolates. The molecular characterization yielded three groups of isolates with different band patterns by using (GACAC)₃, (GACA)₄ and (CAG)₅ AP-PCR. The employed methodologies were efficient to identify the *C. gloeosporioides* isolates collected on ornamental plants and there isn't relation between similarity of band patterns and geographic region or plant specie on the isolates analyzed.

Key words: *Anthurium andraeanum*, AP-PCR, *Etilingera elatior*, *Heliconia* spp., ITS.

INTRODUÇÃO

A floricultura tropical é uma atividade em ascensão no Brasil, uma vez que as flores tropicais apresentam características, tais como durabilidade, beleza e diversidade de cores e formatos, que propiciam grande aceitação pelo mercado consumidor e elevado potencial de crescimento no mercado nacional e internacional (LOGES et al., 2005).

As condições predominantes de temperatura e umidade relativa são bastante favoráveis para o cultivo das diversas espécies de plantas tropicais durante o ano todo na região Nordeste do Brasil (WARUMBY et al., 2004). Essas condições também propiciam a ocorrência de doenças fúngicas, as quais

¹Departamento de Agronomia, Setor de Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), 52171-900, Recife, PE, Brasil. E-mail: beatriz_barguil@hotmail.com. *Autor para correspondência.

^{II}Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil.

podem afetar inflorescências, flores, folhas, pseudocaules, rizomas e raízes, tornando-se mais severas sob condições de estresse hídrico ou nutricional do hospedeiro (WARUMBY et al., 2004). No Brasil, a antracnose destaca-se das demais doenças fúngicas em plantas ornamentais por afetar várias espécies de importância comercial, como *Anthurium andraeanum* (PITTA et al., 1990), *Etilingera elatior*, *Tapeinochilos ananassae*, *Heliconia stricta*, *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cultivar 'Golden Torch', *H. bihai* (LINS & COELHO, 2004), *H. chartacea* cultivar 'Sex Pink' (BARGUIL et al., 2005) e *Calathea burle-max* (ALMEIDA et al., 2006). Segundo esses autores, a espécie isolada foi *Colletotrichum gloeosporioides*, que foi identificada por meio de características morfológicas.

Marcadores moleculares, como AFLP e AP-PCR, vêm sendo utilizados para identificação e observação de variabilidade genética de isolados de *Colletotrichum* provenientes de diversas fruteiras (FREEMAN & SHABI, 1996; PERES et al., 2002; XIAO et al., 2004; TALHINHAS et al., 2005), de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) (SICARD et al., 1997) e lupino ornamental (*Lupinus* spp.) (TALHINHAS et al., 2002), dentre outras espécies. Embora a antracnose possa comprometer a qualidade na produção de plantas ornamentais tropicais na região Nordeste do Brasil, nenhum estudo sobre a variabilidade genética de isolados de *Colletotrichum* provenientes dessas culturas foi realizado.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivos identificar isolados de *Colletotrichum* coletados em antúrio (*A. andraeanum*), bastão do imperador (*E. elatior*) e em helicônia (*Heliconia* spp.), utilizando caracteres morfológicos e técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) com oligonucleotídeos específicos, e, estudar a variabilidade genética por meio de oligonucleotídeos arbitrários (AP-PCR).

MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados de *Colletotrichum* foram obtidos de lesões em brácteas de inflorescências de antúrio (*Anthurium* spp.), bastão do imperador (*E. elatior*) e helicônia (*Heliconia* spp.) provenientes de municípios dos Estados de Pernambuco, Ceará e Paraíba, entre os meses de fevereiro e outubro de 2005 (Tabela 1). O material coletado foi encaminhado ao laboratório, onde os fragmentos de tecido provenientes de lesões nas brácteas foram tratados com hipoclorito de sódio (1,5%). Em seguida, foram lavados duas vezes em água destilada esterilizada (ADE) e colocados em placas de Petri contendo meio de cultura batata-

dextrose-ágar (BDA). Para cada isolado, foram obtidas culturas puras por meio de cultivo monospórico, sendo a seguir repicados para tubo de ensaio contendo meio BDA e mantidos a 4°C. Os isolados foram depositados na Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

A avaliação morfológica foi realizada com base no tamanho dos conídios e apressórios, empregando-se a técnica da microcultura (MENEZES & ASSIS, 2004). As culturas foram mantidas sob alternância luminosa de 12 horas e temperatura de 25°C durante sete dias. Após esse período, as lamínulas foram removidas, coradas com azul de Amann e observadas em microscópio de luz. Cada isolado foi avaliado por meio da medição do comprimento e da largura de 50 conídios e apressórios.

Os 35 isolados de *Colletotrichum* obtidos de plantas ornamentais foram cultivados em meio BDA a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas. Também foi cultivado um isolado de *C. acutatum* coletado em cajueiro (*Anacardium occidentale*), proveniente do município de Pacajús, Estado do Ceará, e cedido pela Embrapa-CNPAT. Após sete dias, cerca de 50mg de micélio aéreo do fungo foram transferidos asépticamente para microtubos de 1,5mL e imediatamente congelados em N₂ líquido. O DNA genômico foi extraído pelo protocolo CTAB (*cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide*), segundo FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1998). A concentração de DNA nas amostras foi estimada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

Foram utilizados os oligonucleotídeos CaInt2 (5'-GGGGAAGCCTCTCGCGG-3'), específico para *C. acutatum* ou CgInt (5'-GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG-3'), específico para *C. gloeosporioides*, em conjunto com o oligonucleotídeo ITS4, para diagnóstico utilizando PCR, para amplificação da região ITS do DNA ribossômico dos isolados analisados. As PCRs foram realizadas em volume total de 25µL, contendo 2,5µL de tampão 10X (KCl 100mM; Tris-HCl 100mM pH 9,0; Triton-X 1%), 2,0µL de dNTPs 2,5mM, 2,0µL de MgCl₂ 25mM, 1µL de cada oligonucleotídeo 40µM, 1U da DNA Taq Polimerase, 1µL de DNA (10 a 100ng) e 16,5µL de água ultrapura, para as reações com CgInt ou com CaInt2. As condições de amplificação foram: um ciclo de desnaturação inicial por 2min a 94°C; 30 ciclos de desnaturação por 1min a 94°C; anelamento por 1min a 51°C e extensão por 1min a 72°C. Após a amplificação, os produtos foram analisados em gel de agarose a 1,2%, em tampão TBE (Tris-Borato, EDTA 0,5M pH 8,0) a 80V por 2h, corados com brometo de etídeo, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados.

Tabela 1 - Origem dos isolados de *Colletotrichum* coletados em brácteas de inflorescências de plantas ornamentais tropicais.

Isolado	-----Origem-----		
	Hospedeira	Município	Estado
Cg 1	<i>Heliconia dimítri</i>	Alhandra	Paraíba
Cg 2	<i>Heliconia chartacea</i>	Alhandra	Paraíba
Cg 3	<i>Heliconia psitacorum</i>	Alhandra	Paraíba
Cg 4	<i>Anthurium andraeanum</i>	Guaiuba	Ceará
Cg 5	<i>Heliconia bihai</i>	Guaiuba	Ceará
Cg 6	<i>Anthurium andraeanum</i>	Fortaleza	Ceará
Cg 7	<i>Etilingera elatior</i>	Fortaleza	Ceará
Cg 8	<i>Anthurium andraeanum</i>	Guaramiranga	Ceará
Cg 9	<i>Anthurium andraeanum</i>	Guaramiranga	Ceará
Cg 10	<i>Etilingera elatior</i>	Guaramiranga	Ceará
Cg 12	<i>Heliconia chartacea</i>	Primavera	Pernambuco
Cg 14	<i>Etilingera elatior</i>	Abreu e Lima	Pernambuco
Cg 15	<i>Etilingera elatior</i>	Ribeirão	Pernambuco
Cg 17	<i>Etilingera elatior</i>	Ribeirão	Pernambuco
Cg 18	<i>Heliconia bihai</i>	Ribeirão	Pernambuco
Cg 19	<i>Heliconia chartacea</i>	Ribeirão	Pernambuco
Cg 20	<i>Etilingera elatior</i>	Ribeirão	Pernambuco
Cg 21	<i>Etilingera elatior</i>	Ribeirão	Pernambuco
Cg 22	<i>Anthurium andraeanum</i>	Igarassu	Pernambuco
C 23	<i>Anthurium andraeanum</i>	Igarassu	Pernambuco
Cg 25	<i>Heliconia bihai</i>	Igarassu	Pernambuco
Cg 26	<i>Heliconia bihai</i>	Igarassu	Pernambuco
Cg 27	<i>Heliconia rostrata</i>	Aldeia	Pernambuco
Cg 28	<i>Heliconia rostrata</i>	Aldeia	Pernambuco
Cg 29	<i>Anthurium andraeanum</i>	Aldeia	Pernambuco
Cg 30	<i>Anthurium andraeanum</i>	Aldeia	Pernambuco
Cg 31	<i>Etilingera elatior</i>	Aldeia	Pernambuco
Cg 33	<i>Heliconia rostrata</i>	Paulista	Pernambuco
Cg 34	<i>Anthurium andraeanum</i>	Paulista	Pernambuco
C 35	<i>Anthurium andraeanum</i>	Paulista	Pernambuco
Cg 36	<i>Etilingera elatior</i>	Paulista	Pernambuco
Cg 37	<i>Etilingera elatior</i>	Paulista	Pernambuco
Cg 38	<i>Etilingera elatior</i>	São Lourenço	Pernambuco
Cg 39	<i>Heliconia bihai</i>	Paudalho	Pernambuco
Cg 40	<i>Etilingera elatior</i>	Paudalho	Pernambuco

Cinco isolados de *Colletotrichum* (Cg1, Cg15, Cg29, Cg31 e Cg32) e o isolado de *C. acutatum* utilizado como controle foram selecionados para o sequenciamento da região ITS2 do DNA ribossomal, com base nas diferenças de hospedeiro e/ou origem geográfica. A região ITS2 foi amplificada por PCR, utilizando o oligonucleotídeo ITS4, juntamente com CgInt (*C. gloeosporioides*) ou CaInt2 (*C. acutatum*), como previamente descrito. Os produtos de PCR foram purificados com o *kit DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) e diretamente sequenciados em sequenciador automático de DNA (Applied Biosystems). As seqüências de nucleotídeos foram analisadas por BLASTn, para confirmação da identidade dos isolados.

Para análise de PCR com oligonucleotídeos arbitrários (AP-PCR), foram utilizados três oligonucleotídeos derivados de marcadores microsatélites: (GACAC)₃, (GACA)₄ e (CAG)₅. As PCRs foram realizadas em volume total de 20µL, contendo 2µL de tampão 10X (KCl 100mM; Tris-HCl 100mM pH 9,0; Triton-X 1%), 1,5µL de MgCl₂ 25mM, 2,0µL de dNTPs 2,5mM, 2µL do oligonucleotídeo correspondente, 1U da DNA *Taq* Polimerase, 1µL de DNA (10 a 100ng) e 10,5µL de água ultrapura. As condições de amplificação foram as descritas por FREEMAN & SHABI (1996).

Os produtos das ampliações foram tratados como descrito anteriormente. Foi construída uma matriz binária com base na presença ou ausência de bandas. A matriz foi analisada para similaridade de bandas usando o método de agrupamento UPGMA (*unweighted pair-group method with arithmetic average*) e calculada com o coeficiente de NEI & LI, utilizando o programa Treecon v.1.3b (VAN DE PEER & DE WACHTER, 1994).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados produziram conídios hialinos, unicelulares, retos e cilíndricos. Os valores médios obtidos por meio da medida do comprimento dos conídios variaram de 10,4 a 17,6 μ m e da largura de 3,2 a 4,7 μ m (Tabela 2). A maioria dos isolados produziu apressórios de coloração marrom-escuro e formato variável, clavados ou irregulares. O comprimento médio dos apressórios variou de 6,6 a 14,3 μ m, e a largura, de

Tabela 2 - Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum* coletados em brácteas de inflorescências de plantas ornamentais tropicais.

Isolado	-----Morfologia-----			
	Conídio (μ m)		Apressório (μ m)	
	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura
Cg 1	14,5 (10-22,5)	3,2 (2,5-5,0)	12,7 (6,2-25,0)	3,2 (2,5-5,0)
Cg 2	10,4 (7,5-13,7)	3,5 (2,5-5,0)	11,0 (7,5-17,5)	5,7 (5,0-7,5)
Cg 3	13,7 (10-22,5)	3,8 (3,7-5,0)	7,0 (5,0-10,0)	6,2 (5,0-7,5)
Cg 4	16,7 (11-26,5)	3,6 (2,5-5,0)	10,2 (7,5-15,0)	6,5 (3,7-8,7)
Cg 5	11,8 (7,5-17,5)	3,4 (2,5-6,5)	10,9 (8,7-16,2)	6,9 (6,5-10)
Cg 6	17,0 (10-36,2)	4,2 (2,5-6,2)	11,1 (6,2-17,5)	7,2 (5,0-15)
Cg 7	11,7 (8,7-15,0)	4,3 (2,5-5,0)	9,1 (6,2-13,7)	5,8 (5,0-7,5)
Cg 8	11,3 (8,7-13,7)	3,8 (2,5-5,0)	- ¹	-
Cg 9	12,3 (6,2-21,2)	3,5 (2,5-6,2)	8,9 (6,2-12,5)	5,9 (3,7-8,7)
Cg 10	14,6 (11,2-18)	3,7 (2,5-5,0)	14,3 (7,5-18,7)	5,5 (5-6,2)
Cg 12	14,2 (7,5-25,0)	3,7 (2,5-5,0)	10,1 (7,5-13,7)	6,3 (5,0-8,7)
Cg 14	11,7 (8,7-18,7)	4,5 (2,5-5,0)	8,5 (6,2-13,7)	5,1 (3,7-6,2)
Cg 15	10,5 (7,5-15,0)	3,5 (2,5-5,0)	7,5 (6,2-11,2)	5,3 (3,7-6,2)
Cg 17	15,5 (11,2-31)	4,3 (2,5-6,2)	12,5 (6,2-18,7)	7,1 (5-11,2)
Cg 18	14,4 (8,7-22,5)	3,6 (2,5-5,0)	8,9 (6,2-13,7)	5,8 (5,0-7,5)
Cg 19	13,7 (8,7-23,7)	3,3 (2,5-5,0)	-	-
Cg 20	13,8 (10-24,0)	3,0 (2,5-3,7)	7,2 (5,0-10,0)	5,2 (3,7-7,5)
Cg 21	12,2 (7,5-16,5)	3,4 (2,5-5,0)	6,6 (5,0-10,0)	5,5 (3,7-7,5)
Cg 22	15,5 (7,5-23,7)	4,0 (2,5-5,0)	9,8 (6,2-12,5)	6,0 (3,7-8,7)
C 23	17,1 (13,7-32)	4,7 (3,7-5,0)	-	-
Cg 25	14,3 (10-23,7)	3,8 (2,5-5,0)	7,4 (5,0-11,2)	6,0 (5,0-7,5)
Cg 26	14,2 (8,7-25,0)	4,2 (3,7-6,2)	8,6 (6,2-13,7)	5,9 (3,7-7,5)
Cg 27	12,8 (8,7-21,2)	3,9 (2,5-5,0)	11,8 (8,7-17,5)	6,7 (6,2-8,7)
Cg 28	17,6 (8,7-33,7)	3,4 (2,5-5,0)	9,2 (6,2-13,7)	6,1 (3,7-8,7)
Cg 29	13,7 (8,7-22,5)	4,4 (2,5-6,2)	9,9 (7,5-13,7)	6,7 (5-11,2)
Cg 30	12,3 (7,5-18,7)	3,7 (2,5-5,0)	9,5 (7,5-12,5)	6,2 (5,0-8,7)
Cg 31	15,9 (12-23,7)	4,3 (3,7-5,0)	15,6 (12-22,5)	6,1 (5,0-7,1)
Cg 33	10,7 (7,5-16,2)	2,8 (2,5-3,7)	11,1 (7,5-16,2)	6,0 (5,0-7,5)
Cg 34	12,7 (7,5-20,0)	3,5 (2,5-6,2)	10,2 (6,2-17,5)	5,7 (5,0-6,2)
C 35	15,0 (11-31,2)	4,7 (3,7-6,2)	12,5 (6,2-21,2)	7,9 (3,7-15)
Cg 36	13,2 (8,7-18,7)	3,6 (2,5-3,7)	9,6 (7,5-16,2)	5,6 (5,0-7,5)
Cg 37	12 (7,5-17,5)	3,5 (2,5-6,2)	9,2 (6,2-12,5)	5,1 (3,7-6,2)
Cg 38	12,3 (7,5-18,6)	3,7 (2,5-5,0)	9,5 (7,5-12,5)	6,2 (5,0-8,7)
Cg 39	16,7 (10-32,5)	4,3 (3,7-6,2)	8,9 (5,0-12,5)	6,1 (5,0-7,5)
Cg 40	11,8 (3,7-17,5)	3,5 (2,5-6,2)	9,0 (6,2-15,0)	6,3 (5,0-8,7)

¹Não foi produzido.

3,2 a 7,9µm (Tabela 2). Os isolados Cg 8, Cg 19 e C 23 não produziram apressórios. A coloração das colônias, em meio de cultura BDA, variou de branco a cinza-escuro, com predominância de branco e branco-acinzentado. As medidas de tamanho de conídios e apressórios e a coloração de colônia de todos os isolados analisados estão de acordo com o descrito para *C. gloeosporioides* por SUTTON (1980). Esse resultado está de acordo com o observado em trabalhos de ocorrência da antracnose em algumas espécies ornamentais tropicais (PITTA et al., 1990; LINS & COELHO, 2004; BARGUIL et al., 2005; ALMEIDA et al., 2006).

Em nenhum isolado analisado houve a amplificação do fragmento de 490pb correspondente à *C. acutatum*, com a utilização de CaInt2 e ITS4, apenas para o isolado proveniente de *A. occidentale*. A utilização do oligonucleotídeo CgInt, específico para *C. gloeosporioides*, usado em conjunto com o oligonucleotídeo ITS4, resultou na produção de um fragmento de 450pb correspondente à espécie *C. gloeosporioides* (Figura 1). Não houve amplificação para o isolado controle identificado previamente como *C. acutatum*. Nas análises realizadas, a banda de 450pb gerada para o isolado Cg 6 apresentou fraca intensidade, enquanto que o DNA dos isolados C 23 e C 35 não foi amplificado por nenhum dos oligonucleotídeos específicos testados (resultados não mostrados).

A utilização de PCR com oligonucleotídeos espécie-específicos capazes de amplificar uma região do DNA nuclear ribossomal foi útil na identificação de *C. gloeosporioides* como o agente causal da antracnose observada em inflorescências de plantas ornamentais tropicais, sendo identificados por métodos moleculares pela primeira vez neste trabalho. Embora a banda de 450pb específica para *C. gloeosporioides* não tenha sido amplificada para os isolados C 23 e C 35, estes foram identificados por meio das

características morfológicas como pertencentes ao gênero *Colletotrichum*. A ausência de banda após a amplificação por PCR utilizando o oligonucleotídeo CgInt já foi relatada para isolados de *Colletotrichum* provenientes de maracujá (AFANADOR-KAFURI et al., 2003) e mangueira (SERRA, 2006). Entretanto, apesar desses isolados terem sido identificados pelas características morfológicas como *C. gloeosporioides*, AFANADOR-KAFURI et al. (2003) os consideraram pertencentes a uma espécie de *Colletotrichum* não identificada.

A análise de comparação de sequências da região ITS2 por BLASTn confirmou que os isolados Cg 1, Cg 15, Cg 29, Cg 31 e Cg 32 pertencem à espécie *C. gloeosporioides*, e o isolado controle pertence à espécie *C. acutatum*. Esse resultado corrobora aquele obtido pela amplificação específica da região ITS dos isolados e também pela morfologia. Os valores de *e* para os isolados Cg 1, Cg 15, Cg 29, Cg 31, Cg 32 e *C. acutatum* foram respectivamente: 1e-78, 2e-75, 1e-71, 1e-72, 2e-74 e 4e-78. As sequências de nucleotídeos foram depositadas no GenBank sob os números de acesso FJ465515, FJ465516, FJ465517, FJ465518, FJ465519 e FJ465520 para os isolados Cg 1, Cg 15, Cg 29, Cg 31, Cg 32 e *C. acutatum*, respectivamente.

A caracterização molecular dos isolados de *Colletotrichum* foi realizada com três oligonucleotídeos arbitrários. Trinta *loci* AP-PCR foram identificados nos isolados estudados, independentemente da intensidade, estando no intervalo de 400 a 1600pb. Excluindo-se as bandas de intensidade fraca, foram analisadas 24 bandas.

O oligonucleotídeo (GACAC)₃ foi aquele que gerou menor número de bandas polimórficas. O primeiro agrupamento compreendeu 54,28% dos isolados com o mesmo perfil de bandas [Cg 1, Cg 3, Cg 4, Cg 5, Cg 8, Cg 18, Cg 19, Cg 20, Cg 21, Cg 22, Cg 25, Cg 26, Cg 27, Cg 28, Cg 29, Cg 30, Cg 34, Cg 36 e Cg 40], o segundo padrão foi formado por 20% dos isolados

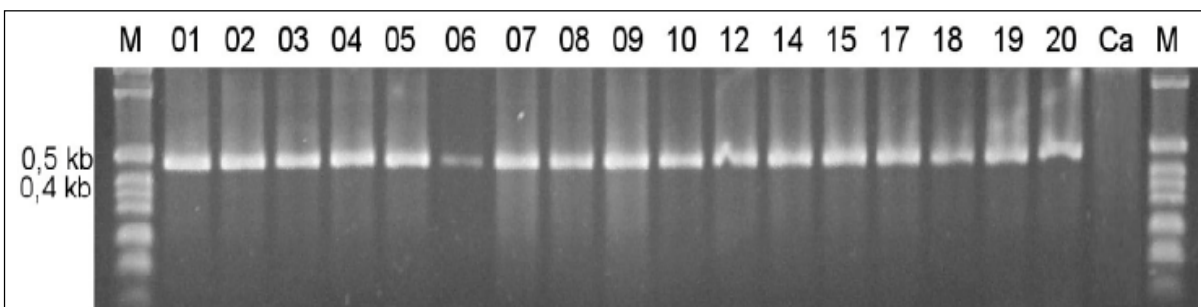


Figura 1 - Produtos da amplificação obtidos por PCR utilizando os oligonucleotídeos CgInt e ITS4 específicos para *Colletotrichum gloeosporioides*. Coluna M: 1Kb DNA Ladder Plus; colunas 01 a 20: alguns dos isolados analisados; Ca: isolado de *Colletotrichum acutatum*.

[Cg 2, Cg 9, Cg, 14, Cg 15, Cg 37, Cg 38 e Cg 39], enquanto que os isolados [Cg 6, C 23 e C 35] formaram um terceiro agrupamento e os quatro isolados restantes Cg 7, Cg 10, Cg 12 e Cg 17 apresentaram padrões distintos (Figura 2A). O oligonucleotídeo $(GACA)_4$ subdividiu os isolados em nove grupos distintos, sendo o primeiro formado por 25,71% dos isolados [Cg 2, Cg 7, Cg 9, Cg 14, Cg 15, Cg 33, Cg 34, Cg 37 e Cg 38] e o segundo, por 20% dos isolados [Cg 5, Cg 18, Cg 20, Cg 21, Cg 30, Cg 36 e Cg 40]. Os demais agrupamentos foram [Cg 1, Cg 22, Cg 26 e Cg 27], [Cg 12, Cg 25, Cg 39], [Cg 6, C 23 e Cg 35], [Cg 10, Cg 17 e Cg 31], [Cg 8, Cg 28 e Cg 29], [Cg 3 e Cg 19] e [Cg 4] (Figura 2B). Já o oligonucleotídeo $(CAG)_5$ propiciou o maior número de bandas polimórficas, em que quase metade dos isolados apresentou perfis únicos de banda (Figura 2C e 2D).

Análises de AP-PCR foram utilizadas na diferenciação de isolados de *Colletotrichum* de abacate e amêndoas (FREEMAN et al., 1996) e em oliveira (TALHINHAS et al., 2005), dentre outras hospedeiras. Entretanto, não se tem conhecimento do uso do marcador AP-PCR no estudo da variabilidade de *Colletotrichum* sp. provenientes de plantas ornamentais.

A análise de agrupamento revelou a existência de três grupos (I, II e III), os quais se repetiram quando todos os *loci* em conjunto foram analisados, correspondendo aos agrupamentos obtidos com cada oligonucleotídeo em separado (dados não mostrados). Independentemente de suas origens geográficas ou de hospedeiro, os isolados Cg 14, Cg 37 e Cg 38 e os isolados Cg 36 e Cg 40 apresentaram o mesmo perfil de bandas para os três

oligonucleotídeos testados (Figura 2), sendo arranjados no grupo I (Figura 3). No grupo II, os isolados Cg 26 e Cg 27 apresentaram perfil similar de bandas, sendo o mesmo comportamento observado para os isolados Cg 6, C 23 e C 35, que compõem o grupo III (Figura 3).

Poderia se esperar que houvesse algum tipo de separação entre os isolados amostrados no presente estudo, ou por origem geográfica ou por hospedeiro de origem. Isolados coletados em diferentes hospedeiros apresentaram perfis de bandas semelhantes, sendo distribuídos em um mesmo grupo (Figura 3). Da mesma forma, isolados de origens geográficas distintas também apresentaram o mesmo padrão de bandas na AP-PCR. Isolados provenientes dos Municípios de Aldeia e Paulista, no Estado de Pernambuco, apresentaram perfis de bandas similares a isolados coletados nos Municípios de Fortaleza e Guarimiranga, no Estado do Ceará, distantes cerca de 800km. A variabilidade aqui observada pode estar relacionada com a inespecificidade dos isolados, que também foi encontrada em isolados coletados em maracujás cultivados na Colômbia (AFANADOR-KAFURI et al., 2003). É possível também que isolados com padrões similares de bandas se comportem de forma diferente na patogenicidade (XIAO et al., 2004).

A análise genética da população pode contribuir para o entendimento do potencial evolutivo de *C. gloeosporioides*, possibilitando o desenvolvimento de estratégias de manejo de controle apropriadas. É sabido que *C. gloeosporioides* é um fungo de limitada dispersão a longas distâncias e que o material vegetal infectado é a principal via de dispersão. Portanto, infere-se que a troca de material

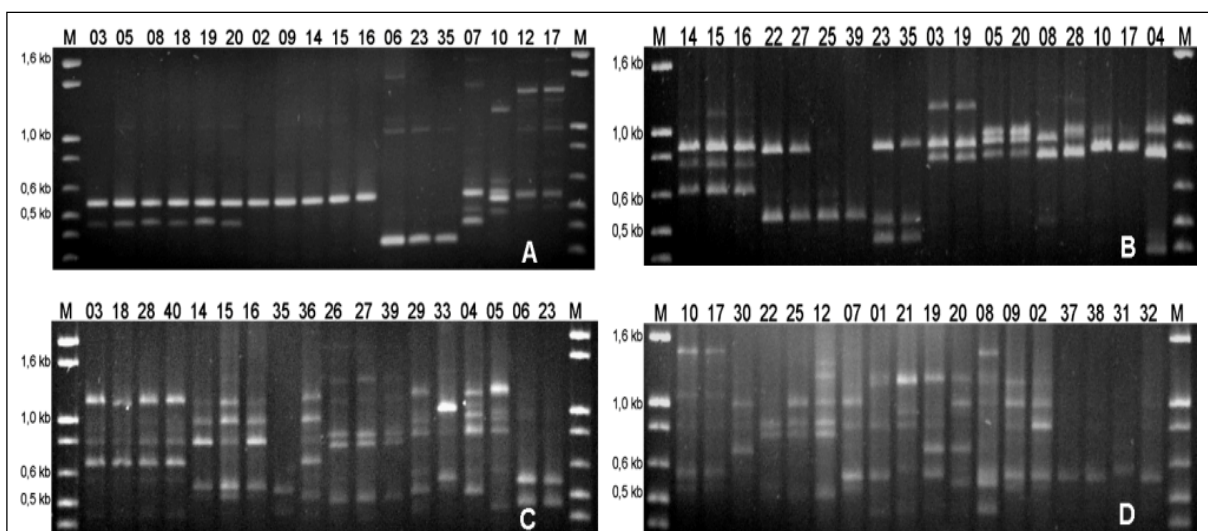
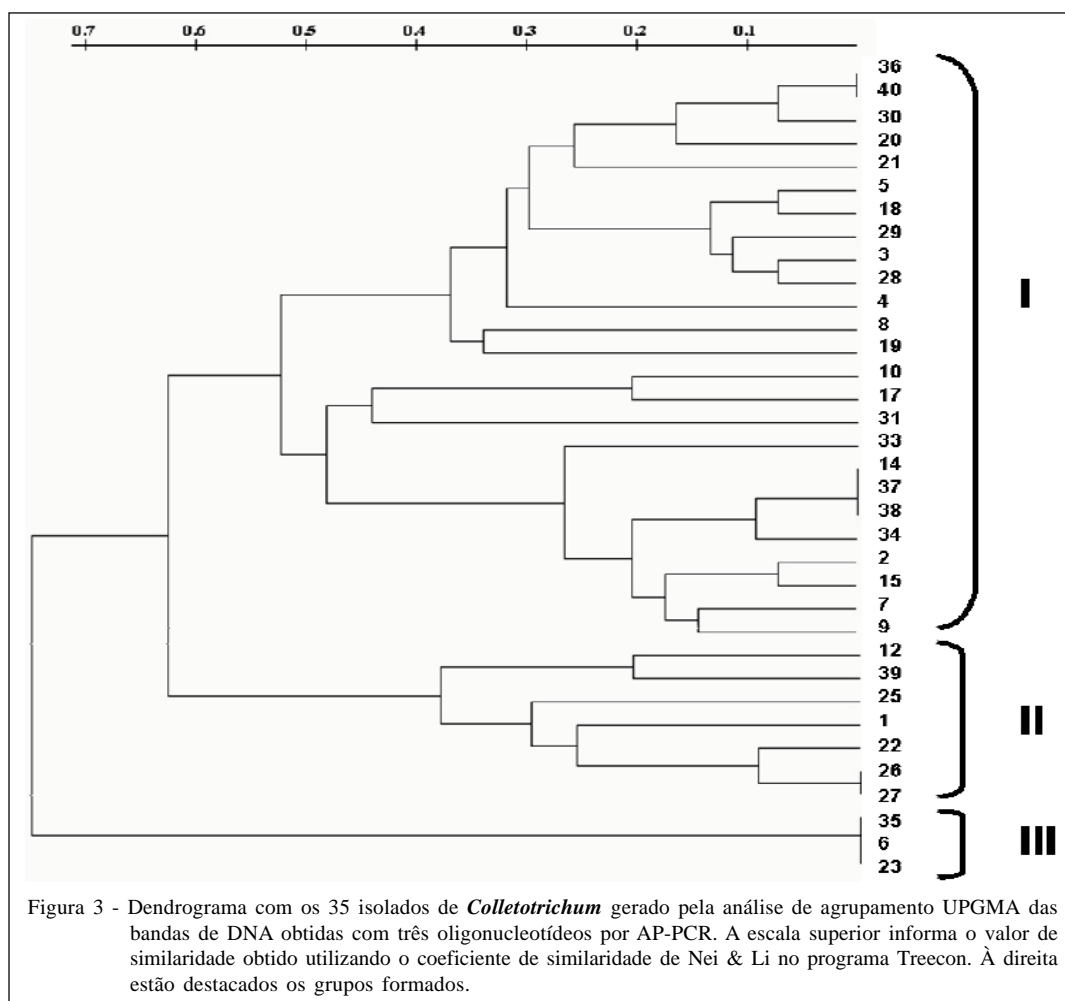


Figura 2 - Produtos da amplificação obtidos por análise de AP-PCR utilizando os oligonucleotídeos arbitrários $(GACAC)_3$ (A), $(GACA)_4$ (B) e $(CAG)_5$ (C e D). Linha M: marcador de tamanho molecular (1Kb DNA Ladder Plus).



vegetal infectado dentre e entre Estados possa ser responsável pela disseminação de isolados desse patógeno. O provável movimento de indivíduos entre regiões contribui para a não correlação entre distância genética e geográfica, reforçando a probabilidade de fluxo do patógeno via material vegetal infectado, em que o mesmo padrão de formação de bandas pôde ser encontrado em isolados provenientes de municípios distantes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas bolsas concedidas aos estudantes de doutorado. Os autores também agradecem ao professor Dr. Francisco Murilo Zerbini, da Universidade Federal de Viçosa, por ter cedido o laboratório para a caracterização molecular dos isolados.

REFERÊNCIAS

- 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**, St. Paul, v. 93, p. 579-587, 2003. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PHTO.2003.93.5.579>>. Acesso em: 10 jul. 2008. Doi: 10.1094/PHTO.2003.93.5.579.
- ALMEIDA, GT. et al. Antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides* em inflorescências de *Calathea burlemax* cv. Green no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, S326, 2006.
- BARGUIL, B.M. et al. Ocorrência de *Colletotrichum gloeosporioides* em *Heliconia chartacea* cv. Sex Pink. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, p.S136, 2005.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília, BR: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1998. 220p.

- FREEMAN, S. et al. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity tests. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.1014-1020, 1996.
- FREEMAN, S.; SHABI, E. Cross-infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum* species from various hosts. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Amsterdam, v.49, p.395-404, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science?ob=ArticleURL&udi=B6WPC-45N43VB-5&user=686348&rdoc=1&fmt=&orig=search&sort=d&view=c&acct=C000037259&version=1&urlVersion=0&userid=686348&md5=92d25elfc7e3f96680008ce49fe93e78>>. Acesso em: 25 mar. 2008. Doi: 10.1006/pmpp.1996.0062.
- LINS, S.R.O.; COELHO, R.S.B. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.332-335, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/fb/v29n3/20374.pdf>>. Acesso em: 28 nov. 2007. Doi: 10.1590/S0100-41582004000300019.
- LOGES, V. et al. Colheita, pós-colheita e embalagem de flores tropicais em Pernambuco. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, p.699-702, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/hb/v23n3/a01v23n3.pdf>>. Acesso em: 22 fev. 2008. Doi: 10.1590/S0102-05362005000300001.
- MENEZES, M.; ASSIS, S.M.P. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2004. 183 p.
- PERES, N.A.R. et al. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.150, p.128-134, 2002. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/120844717/HTMLSTART>>. Acesso em: 25 mar. 2008. Doi: 10.1046/j.1439-0434.2002.00732.x.
- PITTA, G.P.B. et al. **Doenças das plantas ornamentais**. São Paulo, BR: Instituto Brasileiro do Livro Científico, 1990. 174p.
- SERRA, I.M.R.S. *Colletotrichum gloeosporioides* agente de antracnose em cajueiro e mangueira: eficiência de métodos morfofisiológicos e moleculares na diferenciação e identificação específica dos isolados. 2006. 183f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Curso de pós-graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- SICARD, D. et al. Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in the three centers of diversity of its host, *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, St. Paul, v.87, p.807-813, 1997. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PHYTO.1997.87.8.807>>. Acesso em: 10 jun.2008. Doi: 10.1094/PHYTO.1997.87.8.807.
- SUTTON, B.C. **The Coelomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696p.
- TALHINHAS, P. et al. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of Lupins. **Phytopathology**, St. Paul, v.92, p.986-966, 2002. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PHYTO.2002.92.9.986>> Acesso em: 25 abr. 2008. Doi: 10.1094/PHYTO.2002.92.9.986.
- TALHINHAS, P. et al. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, p.2987-2998, 2005. Disponível em: <<http://aem.asm.org/cgi/reprint/71/6/2987?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFO RMAT=&author1=talhinhas&searchid=1&FIRSTINDEX=0&fdate=1/1/2004&tdate=3/31/2006&resourcetype=HWCIT>>. Acesso em: 30 abr. 2008. Doi: 10.1128/AEM.71.6.2987-2998.2005.
- VAN DE PEER, Y.; De WACHTER, R. TREECON for windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. **Computer Applications in the Biosciences**, v.10, p.569-570, 1994.
- WARUMBY, J.F. et al. **Principais doenças e pragas em flores tropicais no Estado de Pernambuco**. Recife: Sebrae, 2004. 98p.
- XIAO, C.L. et al. Genetic and pathogenic analyses of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from strawberry and noncultivated hosts. **Phytopathology**, St. Paul, v.94, p.446-453, 2004. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PHYTO.2004.94.5.446>>. Acesso em: 26 jan. 2008. Doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.5.446.