

PATRÍCIA GONÇALVES CASTRO CABRAL

**DIVERSIDADE, ESTRUTURA POPULACIONAL E
CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE RAÇAS DE *Hemileia*
*vastatrix***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C117d
2013

Cabral, Patrícia Gonçalves Castro, 1986-
Diversidade, estrutura populacional e caracterização
fisiológica de raças de *Hemileia vastatrix* / Patrícia Gonçalves
Castro Cabral. – Viçosa, MG, 2013.
viii, 48f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Orientador: Laércio Zambolim
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 43-48

1. Café - Doenças e pragas. 2. *Hemileia vastatrix*.
3. Genética de populações. 4. Genética molecular. 5. Ferrugem-
do-cafeeiro. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em
Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 633.7394

PATRÍCIA GONÇALVES CASTRO CABRAL

**DIVERSIDADE, ESTRUTURA POPULACIONAL E
CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE RAÇAS DE *Hemileia
vastatrix***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Fabício de Ávila Rodrigues

Eveline Teixeira Caixeta

Alexandre Sandri Capucho

Prof. Laércio Zambolim
(Orientador)

Aos meus pais, Joaquim Dimas e Isabel
Aos meus irmãos, Frederico e Vinícius
Ao meu namorado, Alexandre
Aos meus amigos, familiares e a Eunize,
que sempre acreditaram em mim, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me concedido tantas oportunidades e sempre ter me dado forças e sabedoria.

Aos meus pais, pelo incentivo e apoio diários, sem os quais eu não chegaria até aqui.

Ao meu namorado Alexandre Capucho pelo grande apoio, pela atenção constante, pelos inúmeros conselhos e pela imensa paciência e carinho.

À Dra. Eunize Maciel Zambolim por toda a confiança depositada em mim, pelos ensinamentos e orientação durante os seis anos de convivência.

À grande amiga Rejane Freitas pelos muitos ensinamentos e pela ajuda constante.

À amiga Daniela Lelis pela grande ajuda na realização deste trabalho.

Aos meus irmãos, Frederico, pelas incansáveis ajudas na área de informática e ao Vinícius pelo incentivo.

Ao meu avô Algemiro Gonçalves pelo apoio aos meus estudos e pelo incentivo sempre.

Aos amigos do laboratório BioCafé, a todos aqueles que ainda continuam presentes e também a aqueles que foram seguir a caminhada em outros lugares, pelos inúmeros ensinamentos e pela convivência.

Aos amigos da graduação e da pós graduação, pelas conversas e apoio.

Ao Departamento de Fitopatologia, em especial ao Laboratório BioCafé pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

PATRÍCIA GONÇALVES CASTRO CABRAL, filha de Joaquim Dimas de Castro Cabral e Isabel Gonçalves Castro, nascida em Ponte Nova, Minas Gerais, em 26 de dezembro de 1986.

Em maio de 2006 ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em 28 de janeiro de 2011.

No período de 03/2007 a 01/2011 foi estagiária e, posteriormente, bolsista de iniciação científica no Departamento de Fitopatologia da UFV, onde desenvolveu atividades de pesquisa nas áreas de diversidade genética e caracterização fisiológica de raças de *Hemileia vastatrix*.

Em março de 2011 iniciou no Programa de Pós-graduação, em nível de Mestrado, em Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 13 de fevereiro de 2013.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| RESUMO..... | vi |
| ABSTRACT | viii |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 7 |
| 2.1 Obtenção e multiplicação de isolados de <i>Hemileia vastatrix</i> | 7 |
| 2.2 Caracterização das raças fisiológicas dos isolados de <i>Hemileia vastatrix</i> . | 11 |
| 2.3 Extração do DNA | 12 |
| 2.4 Marcadores AFLP | 13 |
| 2.5 Análise dos dados..... | 14 |
| 3. RESULTADOS | 16 |
| 3.1 Caracterização das raças fisiológicas dos isolados de <i>Hemileia vastatrix</i> . | 16 |
| 3.2 Diversidade genética e estrutura das populações de <i>Hemileia vastatrix</i> | 20 |
| 4. DISCUSSÃO | 35 |
| 4.1 Caracterização das raças fisiológicas dos isolados de <i>Hemileia vastatrix</i> . | 35 |
| 4.2 Diversidade genética e estrutura das populações de <i>Hemileia vastatrix</i> | 36 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 42 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 43 |

RESUMO

CABRAL, Patrícia Gonçalves Castro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013. **Diversidade, estrutura populacional e caracterização fisiológica de raças de *Hemileia vastatrix***. Orientador: Laércio Zambolim.

O fungo *Hemileia vastatrix* possui várias raças fisiológicas que refletem consideravelmente na sua diversidade genética. Nesse estudo, trinta e oito isolados monopustulares de *H. vastatrix* foram caracterizados em dezenove raças fisiológicas, dentre elas, as raças XXIX e XXX, relatadas pela primeira vez no Brasil. Onze novas raças, com diferentes combinações de genes de virulência, denominadas de UFV-Hv-01, UFV-Hv-02, UFV-Hv-03, UFV-Hv-04, UFV-Hv-05, UFV-Hv-06, UFV-Hv-07, UFV-Hv-08, UFV-Hv-09, UFV-Hv-10 e UFV-Hv-11 foram identificadas. Essas raças não possuem correspondência com outras raças de *H. vastatrix* descritas na literatura. A diversidade e estrutura genética de *H. vastatrix* foram analisadas em 115 isolados monopustulares, utilizando sete combinações de oligonucleotídeos AFLP, com o objetivo de verificar a influência do hospedeiro e da origem geográfica na estrutura genética da população do patógeno. Os isolados analisados, provenientes de *Coffea arabica*, *C. canephora*, derivados de Híbrido de Timor e Icatú (HDTI), foram coletados nos cinco principais Estados produtores de café do Brasil. A população de *H. vastatrix* apresentou baixo nível de diversidade genotípica, sendo obtidos 68 padrões AFLP. A diversidade gênica (h) na população de *H. vastatrix* foi de 0,027 e a hipótese de acasalamento ao acaso foi rejeitada na população total. Os isolados não apresentaram correlação entre distância geográfica e similaridade genética ($r = -0,024$, $P = 0,74$), indicando a ocorrência de dispersão dos uredíniosporos à longas distâncias. A diferenciação genética (G_{ST}) entre as populações de *H. vastatrix* definidas por hospedeiro foi de 0,15 e nas populações definidas por Estado foi de 0,12. A análise de agrupamento dos dados AFLP não revelou a formação de grupos entre os isolados da mesma origem geográfica e hospedeiro, nem entre isolados de uma mesma raça fisiológica, embora a similaridade genética tenha sido superior a 90%. A AMOVA revelou que 90% da distribuição genética do patógeno ocorre entre os isolados dentro da subpopulação. O baixo grau de diferenciação nas populações de *H. vastatrix* no Brasil é consistente com a sua introdução, relativamente recente, e com a suscetibilidade à ferrugem apresentada pelos cultivares resistentes e derivados de HDTI. A elevada

variação dentro das subpopulações sugere uma alta taxa evolutiva do patógeno e pode explicar a suplantação da resistência nos derivados de HDTI.

ABSTRACT

CABRAL, Patrícia Gonçalves Castro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2013. **Diversity, population structure and physiological characterization of races of *Hemileia vastatrix***. Adviser: Laércio Zambolim.

The fungus *Hemileia vastatrix* has many physiological races, reflecting in its great genetic diversity. Thirty eight single-pustule isolates of *H. vastatrix* were characterized in nineteen physiological races. Among them, the races XXIX and XXX were detected for the first time in Brazil. Eleven new physiological races with different combinations of virulence genes, denominated of UFV-Hv-01, UFV-Hv-02, UFV-Hv-03, UFV-Hv-04, UFV-Hv-05, UFV-Hv-06, UFV-Hv-07, UFV-Hv-08, UFV-Hv-09, UFV-Hv-10 and UFV-Hv-11 were also identified. These races do not possess any correspondence with other races of *H. vastatrix* described in the literature. The genetic structure and diversity of *H. vastatrix* were analyzed in 115 single-pustule isolates using seven AFLP primers combinations aiming to infer the importance of the host and geographic origin in the genetic structure of the pathogen population. The isolates collected from *Coffea arabica*, *C. canephora*, Híbrido de Timor and Icatú derivatives (HDTI) were sampled from five main coffee production Brazilian States. Genotypic diversity in the population of *H. vastatrix* was low, with 68 patterns AFLP. Genic diversity (h) in the population of *H. vastatrix* was 0.027 and the random mating possibility was rejected in total population. The lack of correlation between the geographical distance and the genetic similarity ($r = -0.024$, $P = 0.74$) suggests the occurrence of urediniospores dispersion to long distances. The genetic differentiation (G_{ST}) between *H. vastatrix* populations defined by host was 0.15 and in the populations defined by States was 0.12. Cluster analysis of AFLP data did not divide the isolates from the same geographical origin and host, neither the same physiological race, although the genetic similarity was above 90%. The molecular analysis of variance revealed that 90% of the genetic distribution occurred between the isolates within the subpopulation. The low level of genetic differentiation in the populations was consistent with the recent introduction of the *H. vastatrix* in Brazil and the susceptibility of the coffee resistant varieties and derivatives of HDTI to coffee leaf rust. The high level of variation within subpopulations suggests a high evolutionary rate of the pathogen and it may explain the overcoming of resistance of the HDTI derivatives.

1. INTRODUÇÃO

Historicamente, o Brasil ocupa a posição de maior produtor e exportador de café, além de se destacar como segundo maior consumidor (ICO, 2013). Entretanto, a produção tem sido limitada por vários fatores, dentre eles, as doenças (Zambolim *et al.*, 1999).

Dentre as doenças que infectam o cafeeiro, a ferrugem causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. é a mais importante. A importância da ferrugem se deve ao surgimento de novas raças de *H. vastatrix*, assim como a ocorrência de raças com genes de virulência complexos que mostram um grande potencial evolutivo das populações do fungo (Várzea & Marques, 2005). Como consequência, o desenvolvimento de cultivares de cafeeiros com resistência durável à ferrugem representa um desafio aos programas de melhoramento.

De um modo geral, e em particular nos fungos, raças fisiológicas ou patótipos são comuns, ou seja, variantes do patógeno com diferentes combinações de genes de virulência e, conseqüentemente, diferentes capacidades para infectar distintos genótipos de uma dada espécie hospedeira (Rodrigues Jr., 2002).

Tradicionalmente, a variabilidade fisiológica de *H. vastatrix* é determinada pelo padrão de infecção em clones de cafeeiros diferenciadores de raças. Entretanto, a série diferenciadora é restrita, o que impossibilita a caracterização de alguns patótipos com amplo espectro de virulência.

O primeiro estudo sobre a diversidade fisiológica de *H. vastatrix* foi realizado por Mayne (1932), na Índia, onde foram identificadas quatro raças fisiológicas do fungo. O CIFC (Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro) em Oeiras, Portugal, caracterizou, até o momento, 49 raças de *H. vastatrix* (Gichuru *et al.*, 2012; Várzea & Marques, 2005). No Brasil, 16 raças fisiológicas do fungo (I, II, III, VII, X, XIII, XV, XVI, XVII, XXI, XXII, XXIII, XXIV, XXV ou XXXI, XXXIII, XXXVII) foram identificadas (Capucho *et al.*, 2012a; Cabral *et al.*, 2009; Zambolim *et al.*, 2005), sendo a raça II a de maior frequência (Zambolim *et al.*, 2005).

Os mecanismos que conduzem à criação de raças de *H. vastatrix* ainda não são bem compreendidos. Como a fase sexual do fungo ainda não foi encontrada (Várzea & Marques, 2005; Gopalkrishnan, 1951), considera-se a mutação como o principal mecanismo responsável pela criação de variabilidade

no fungo e a pressão de seleção exercida pelos genes de resistência do hospedeiro responsável pelo aumento de mutantes virulentos na população (Várzea & Marques, 2005; Várzea *et al.*, 2002).

Apesar de evidências citológicas mostrarem a ocorrência da cariogamia e meiose em esporos assexuados (Rajendren 1967a; 1967b), a maioria dos pesquisadores ignoram a hipótese da recombinação genética (Chinnappa & Sreenivasan, 1965). Entretanto, um estudo recente de citometria de imagem do conteúdo de DNA revelou a presença de um tipo inédito de reprodução sexual oculta dentro dos esporos assexuais de *H. vastatrix*, denominada de criptossexualidade (Carvalho *et al.*, 2011). Segundo os autores, esse tipo de reprodução poderia explicar o surgimento frequente e rápido de novas raças fisiológicas de *H. vastatrix*.

A descoberta de que toda a informação genética está contida no DNA possibilitou estudar a variabilidade genética de fitopatógenos e outros organismos, e conseqüentemente, verificar a relação evolutiva entre e dentre os organismos. Esta estratégia apresenta várias vantagens, dentre elas, a insensibilidade aos fatores ambientais, a abundância de marcadores no genoma e o fato de o DNA estar presente em todas as células do organismo. Por outro lado, os métodos clássicos para o estudo da variabilidade consideram apenas as características morfológicas e fisiológicas dos organismos e podem ser influenciadas por fatores ambientais (Nei & Kumar, 2000).

O uso de marcadores de DNA permite a análise genética direta pela variação na sequência de DNA do organismo. Essa característica torna esses marcadores mais confiáveis para a detecção da variação entre organismos, especialmente àqueles com caracteres morfológicos limitados ou de variabilidade genética pouco conhecida como *H. vastatrix* (Gouveia *et al.*, 2005).

O conhecimento da estrutura genética de uma população de organismos permite presumir quais são os fenômenos ecológicos e genéticos atuantes. Isto reflete o número de alelos intercambiados entre as populações tornando, por meio do fluxo gênico, homogêneas as frequências de alelos entre essas populações. Assim, os efeitos relativos da seleção e da deriva genética e, conseqüentemente, a composição genética dos indivíduos também poderá ser determinada (Cruz *et al.*, 2011).

A estrutura genética de uma população é definida como a quantidade e distribuição da variação existente entre e dentro das populações de um organismo, sendo consequência da interação entre as cinco forças evolutivas: mutação, migração, seleção, deriva e recombinação (McDonald & Linde, 2002). Assim, o conhecimento da estrutura genética permite mensurar o potencial evolutivo de uma população. Fitopatógenos com grande potencial evolutivo tem maior probabilidade de suplantar a resistência em alguns cultivares, ou mesmo, a adquirir resistência a fungicidas ou antibióticos.

A diversidade é composta por duas variáveis, a riqueza e a equitabilidade. A riqueza é definida como o número de genótipos presentes em uma população e a equitabilidade diz respeito ao modo como estes genótipos estão distribuídos na população. Em populações de microrganismos, os índices de diversidade gênica e genotípica são necessários para estimar a diversidade genética (Grünwald *et al.*, 2003). A diversidade gênica é função do número e da frequência dos alelos em cada loco. Embora múltiplos locos têm sido utilizados, a diversidade é estimada para cada loco separadamente. A diversidade genotípica, entretanto, é função do número e da frequência de combinações alélicas e pode ser feita entre locos diferentes (Milgroom, 1996).

Os índices de diversidade genotípica mais utilizados são N_1 (Hill), H' (Shannon-Wiener) e principalmente o G (Stoddart & Taylor) (Grünwald *et al.*, 2003). O índice G fornece maior peso aos genótipos mais frequentes enquanto o N_1 aos genótipos mais raros. O índice ideal de diversidade deve levar em consideração tanto a riqueza quanto a equitabilidade de uma população. O índice tende a ser maior quando cada indivíduo amostrado tem um genótipo único. Além disso, dado uma mesma riqueza, este índice será maior caso os genótipos sejam distribuídos mais uniformemente no interior da amostra. Os índices N_1 e G aumentam linearmente com o aumento do número de genótipos na amostra, enquanto que H' aumenta não linearmente. Com o aumento da equitabilidade, mas mantendo a riqueza constante, N_1 e G aumentam, enquanto que H' aumenta quase linearmente. Assim, com uma uniforme distribuição dos genótipos, os índices de diversidade N_1 e G resultam no número de genótipos observados. O comportamento linear em relação a riqueza e a interpretação intuitiva quando a equitabilidade é máxima tornam N_1 e G os índices mais convenientes para o cálculo da diversidade (Grünwald *et al.*, 2003).

Para estimar a diversidade genética, os marcadores de DNA do tipo RAPD, AFLP, RFLP e SSR têm fornecido conhecimentos importantes sobre a estrutura populacional de patógenos causadores de ferrugens como *Puccinia recondita* (Kolmer *et al.*, 1995), *P. striiformis* (Steele *et al.*, 2001; Justesen *et al.*, 2002), *P. graminis* f.sp. *tritici* (McCallum *et al.*, 1999), *P. graminis* f.sp. *avenae* (Keiper *et al.*, 2006), *P. triticina* (Kolmer & Ordonez, 2007), *Melampsora epilea* (Samils *et al.*, 2001; Pei *et al.*, 1997), *H. vastatrix* (Nunes *et al.*, 2009; Gouveia *et al.*, 2005), *Cronartium ribicola* (Hamelin *et al.*, 1998), *C. flaccidum* (Moricca & Ragazzi, 1998) *C. quercuum* f.sp. *fusiforme* (Kubisiak *et al.*, 2004), *Uromyces appendiculatus* (Sandlin *et al.*, 1999) e *Peridermium pini* (Hantula *et al.*, 1998; Moricca & Ragazzi, 1998).

Pouca atenção tem sido dada aos estudos genético-moleculares de *H. vastatrix*, apesar da sua importância para a cafeicultura mundial. Ainda mais escassos são os estudos moleculares relacionados à diversidade genética do patógeno. No entanto, este conhecimento é extremamente útil para a elaboração de estratégias de controle da ferrugem, como o desenvolvimento de cultivares resistentes, estudos epidemiológicos da doença e na determinação do comportamento evolutivo das populações predominantes do fungo nas regiões de desenvolvimento dos programas de melhoramento e naqueles onde se pretende introduzir o material resistente (Nunes *et al.*, 2009).

O primeiro estudo molecular de variabilidade genética em *H. vastatrix* foi realizado com marcadores RAPD e 45 isolados do fungo (Gouveia *et al.*, 2005). Os resultados mostraram que os isolados pertencentes à mesma raça fisiológica diferiam substancialmente em nível molecular. Os autores concluíram que a variabilidade do fungo poderia estar relacionada a mudanças genéticas independentes da virulência, e que a estrutura genética populacional do fungo era consistente com uma reprodução clonal e desestruturada em relação a raças, origem geográfica e a espécie hospedeira. A variabilidade foi atribuída a processos de diferenciação do patógeno tais como a mutação, recombinação assexuada ou outras fontes de variação genética, como mecanismos de reprodução assexuada que ocorrem na população e favorecem a troca genética. A ocorrência da criptossexualidade nos uredíniosporos do fungo, recentemente demonstrada (Carvalho *et al.*, 2011), pode explicar parte da variabilidade encontrada neste patógeno.

Os marcadores SSR e RAPD foram utilizados para determinar a variabilidade genética de populações de *H. vastatrix* obtidas de cultivos de cafeeiro orgânicos e convencionais (Nunes *et al.*, 2009). Neste estudo, os marcadores SSR utilizados não foram suficientes para mostrar a variabilidade entre os isolados dos dois sistemas de cultivo. Entretanto, o marcador RAPD mostrou maior diversidade gênica para os isolados do fungo provenientes do cultivo orgânico. Esta maior diversidade foi atribuída à menor pressão de seleção exercida sobre os indivíduos do patógeno nesse sistema de cultivo.

Em outro estudo, com o marcador AFLP, foi verificada a influência da espécie hospedeira na estrutura genética populacional de *H. vastatrix* (Maia, 2009). Uma alta diversidade genética entre os isolados foi observada, sendo esta maior nas populações de *C. arabica* do que em *C. canephora* e os derivados de Híbrido de Timor e Icatú (HDTI). A alta diversidade encontrada foi explicada pelo método de amostragem dos isolados utilizado, onde um isolado foi obtido a partir de 100 folhas de um conjunto de cafeeiros de cada genótipo amostrado. Assim, inevitavelmente, houve uma superestimativa da variação genética do patógeno. Este problema seria evitado com o uso de isolados monopustulares do patógeno.

Em um trabalho preliminar, Batista *et al.* (2010) estudaram a diversidade genética e os padrões de dispersão e fluxo gênico de isolados de *H. vastatrix* com o auxílio de marcadores AFLP e da sequência dos genes da β -tubulina 1, fator de alongação da tradução (TEF1), transportador de hexose (HXTp1) e da região ITS (ITS1 e ITS 2) do rDNA. Os 31 isolados de *H. vastatrix* da coleção do CIFC utilizados neste estudo foram originados de diferentes regiões geográficas e coletados em diferentes épocas do ano, buscando com isso um entendimento espacial e temporal das populações do fungo. Não houve variação significativa entre os isolados com base nas análises de sequenciamento dos genes em estudo, além disso, não se obteve um padrão de agrupamento dos isolados quanto à origem geográfica e virulência. Entretanto, com o uso do marcador AFLP identificou-se alta variabilidade entre os isolados o que permitiu inferir que os isolados estavam estruturados de acordo com a origem geográfica.

Um estudo recente realizado na Colômbia avaliou a diversidade genética e a agressividade de isolados *H. vastatrix* em diferentes altitudes de plantio e fases fenológicas das plantas para comprovar se estes fatos estavam

relacionados com um novo isolado do patógeno (Rozo *et al.*, 2012). A conclusão foi que os isolados eram bastante semelhantes, tanto geneticamente, quanto à sua agressividade. Os autores atribuíram a epidemia ao clima favorável para o desenvolvimento da doença, e não ao surgimento de um novo isolado do patógeno ou mudanças em sua virulência.

Portanto, para estudar a variabilidade genética de *H. vastatrix* é necessário à utilização de uma metodologia criteriosa que permita assegurar a acurácia dos resultados. Assim, os objetivos dessa dissertação foram caracterizar as raças fisiológicas dos isolados de *H. vastatrix* e investigar a diversidade genética e a estrutura da população de *H. vastatrix*. Para a realização desse estudo, foi utilizado o marcador AFLP e isolados monopustulares do fungo obtidos a partir de um *bulk* de uredíniosporos coletados nas principais regiões cafeeiras do Brasil. Também foi determinado se a espécie hospedeira e a origem geográfica do isolado interferem na estrutura populacional de *H. vastatrix*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção e multiplicação de isolados de *Hemileia vastatrix*

Um total de 115 isolados de *H. vastatrix* foram utilizados no estudo. Desse total, 90 foram coletados em diferentes genótipos cafeeiro, em municípios dos cinco principais Estados brasileiros produtores de café: Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Paraná e Bahia. O isolado Na01, apesar de não ter sua origem geográfica e nem o seu hospedeiro identificados, foi incluído por ser amplamente utilizado nos trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (BioCafé/UFV). Vinte e três isolados monopustulares, provenientes de Minas Gerais e Espírito Santo, foram cedidos, na forma de DNA, pelo Laboratório de Biologia de Populações de Fitopatógenos/UFV. Os dois isolados monopustulares restantes foram provenientes da coleção do BioCafé/UFV, sendo um deles originário da Costa Rica (NA03) e o outro da raça II de *H. vastatrix* (NA02) coletada por Cardoso (1986) (Tabela 1).

A amostragem consistiu de aproximadamente 100 folhas, apresentando sinais do patógeno, coletadas ao acaso em dez plantas de uma mesma espécie de cafeeiro em cada propriedade visitada. As folhas foram acondicionadas em sacos individuais e transportadas para o laboratório BioCafé em caixas de isopor. No laboratório, os uredíniosporos foram coletados com o auxílio de uma cápsula de gelatina. Os uredíniosporos coletados em folhas de uma mesma espécie de cafeeiro dentro de uma mesma lavoura de uma mesma propriedade foram considerados como um isolado. O local de coleta de cada isolado foi georeferenciado e os dados necessários para a identificação da amostra foram anotados em um caderno de campo.

Os uredíniosporos contidos em cápsulas de gelatina foram armazenados dentro de um dessecador com 50% de umidade relativa do ar, a 4°C, visando preservar a sua infectividade até a inoculação para multiplicação (Zambolim & Chaves, 1974).

Tabela 1 - Isolados de *Hemileia vastatrix*, Estado de origem, coordenadas geográficas e hospedeiro de coleta.

| Isolados | Origens geográficas | Latitudes | Longitudes | Hospedeiros |
|-----------------|----------------------------|------------------|-------------------|---------------------|
| PR01 | Paraná | -23,1789 | -49,9919 | <i>C.arabica</i> |
| PR02 | Paraná | -23,1537 | -50,0003 | <i>C.arabica</i> |
| PR03 | Paraná | -23,1458 | -50,5650 | <i>C.arabica</i> |
| PR04 | Paraná | -23,2075 | -50,6613 | Derivado H. Timor |
| PR05 | Paraná | -23,2531 | -50,7665 | <i>C. arabica</i> |
| PR06 | Paraná | -23,2614 | -50,7747 | Derivado H. Timor |
| PR07 | Paraná | -23,2596 | -50,7774 | Derivado H. Timor |
| PR08 | Paraná | -23,0430 | -50,1056 | <i>C. arabica</i> |
| PR09 | Paraná | -23,0076 | -50,0052 | <i>C. arabica</i> |
| PR10 | Paraná | -23,0076 | -50,0056 | <i>C. arabica</i> |
| SP01 | São Paulo | -22,2244 | -49,8864 | <i>C. arabica</i> |
| SP02 | São Paulo | -22,2179 | -49,8609 | <i>C. arabica</i> |
| SP03 | São Paulo | -22,2168 | -49,8374 | <i>C. arabica</i> |
| SP04 | São Paulo | -22,0725 | -50,2962 | <i>C. arabica</i> |
| SP05 | São Paulo | -20,9062 | -47,6418 | Derivado Icatú |
| SP06 | São Paulo | -20,8924 | -47,6730 | <i>C. arabica</i> |
| SP07 | São Paulo | -20,8878 | -47,6893 | <i>C. arabica</i> |
| SP08 | São Paulo | -20,8894 | -47,6950 | <i>C. arabica</i> |
| SP09 | São Paulo | -20,8881 | -47,7033 | <i>C. arabica</i> |
| SP10 | São Paulo | -20,8875 | -47,6994 | <i>C. arabica</i> |
| SP11 | São Paulo | -20,8738 | -47,7191 | <i>C. arabica</i> |
| SP12 | São Paulo | -20,8749 | -47,7119 | <i>C. arabica</i> |
| SP13 | São Paulo | -20,8786 | -47,6764 | <i>C. arabica</i> |
| SP14 | São Paulo | -20,8750 | -47,6778 | <i>C. arabica</i> |
| SP15 | São Paulo | -20,8767 | -47,6602 | <i>C. arabica</i> |
| SP16 | São Paulo | -20,8567 | -47,6284 | <i>C. arabica</i> |
| SP17 | São Paulo | -20,8370 | -47,6275 | <i>C. arabica</i> |
| SP18 | São Paulo | -20,8039 | -47,6213 | <i>C. arabica</i> |
| SP19 | São Paulo | -20,7969 | -47,6200 | Derivado Icatú |
| SP20 | São Paulo | -22,8825 | -47,0574 | Derivado Icatú |
| BA01 | Bahia | -14,9257 | -40,8420 | <i>C. arabica</i> |
| BA02 | Bahia | -14,9781 | -40,8131 | <i>C. arabica</i> |
| BA03 | Bahia | -15,0220 | -40,7620 | <i>C. arabica</i> |
| BA04 | Bahia | -14,9640 | -40,7678 | <i>C. arabica</i> |
| BA05 | Bahia | -14,9771 | -40,7544 | <i>C. arabica</i> |
| BA06 | Bahia | -14,9716 | -40,7874 | <i>C. arabica</i> |
| BA07 | Bahia | -14,7111 | -40,7078 | <i>C. arabica</i> |
| BA08 | Bahia | -14,8664 | -40,6723 | <i>C. arabica</i> |
| BA09 | Bahia | -14,8891 | -40,6505 | <i>C. arabica</i> |
| BA10 | Bahia | -14,9135 | -40,6108 | <i>C. arabica</i> |
| BA11 | Bahia | -14,9445 | -40,5719 | <i>C. arabica</i> |
| BA12 | Bahia | -14,9433 | -40,5727 | <i>C. arabica</i> |
| BA13 | Bahia | -17,2585 | -39,4073 | <i>C. canephora</i> |
| BA14 | Bahia | -17,1943 | -39,4362 | <i>C. canephora</i> |

Tabela 1 - Continuação...

| Isolados | Origens geográficas | Latitudes | Longitudes | Hospedeiros |
|-----------------|----------------------------|------------------|-------------------|---------------------|
| BA15 | Bahia | -17,2361 | -39,4013 | <i>C. canephora</i> |
| BA16 | Bahia | -17,3133 | -40,0504 | <i>C. canephora</i> |
| BA17 | Bahia | -16,4396 | -39,2734 | <i>C. canephora</i> |
| BA18 | Bahia | -16,1830 | -39,3633 | <i>C. canephora</i> |
| BA19 | Bahia | -16,1749 | -39,3523 | <i>C. canephora</i> |
| BA20 | Bahia | -16,1749 | -39,3523 | <i>C. canephora</i> |
| BA21 | Bahia | -16,2204 | -39,3051 | <i>C. canephora</i> |
| BA22 | Bahia | -16,2374 | -39,2507 | <i>C. canephora</i> |
| BA23 | Bahia | -17,0393 | -39,3328 | <i>C. canephora</i> |
| BA24 | Bahia | -14,8607 | -40,5597 | <i>C. arabica</i> |
| ES01 | Espírito santo | -18,6879 | -40,1129 | <i>C. canephora</i> |
| ES02 | Espírito santo | -19,2426 | -40,3238 | <i>C. canephora</i> |
| ES03 | Espírito santo | -19,2433 | -40,3234 | <i>C. canephora</i> |
| ES04 | Espírito santo | -19,2430 | -40,3232 | <i>C. canephora</i> |
| ES05 | Espírito santo | -19,2426 | -40,3221 | <i>C. canephora</i> |
| ES06 | Espírito santo | -18,5441 | -40,0514 | <i>C. canephora</i> |
| ES07 | Espírito santo | -18,5438 | -40,0512 | <i>C. canephora</i> |
| ES08 | Espírito santo | -18,5439 | -40,0314 | <i>C. canephora</i> |
| ES09 | Espírito santo | -18,5438 | -40,0305 | <i>C. canephora</i> |
| ES10 | Espírito santo | -18,5459 | -40,0512 | <i>C. canephora</i> |
| ES11 | Espírito santo | -18,5404 | -40,0321 | <i>C. canephora</i> |
| ES12 | Espírito santo | -19,0308 | -40,0178 | <i>C. canephora</i> |
| ES13 | Espírito santo | -19,0311 | -40,0182 | <i>C. canephora</i> |
| ES14 | Espírito santo | -19,0311 | -40,0178 | <i>C. canephora</i> |
| ES15 | Espírito santo | -19,0975 | -40,0509 | <i>C. canephora</i> |
| ES16 | Espírito santo | -19,3207 | -40,0982 | <i>C. canephora</i> |
| ES17 | Espírito santo | -19,3203 | -40,0970 | <i>C. canephora</i> |
| ES18 | Espírito santo | -20,7846 | -40,7540 | <i>C. canephora</i> |
| ES19 | Espírito santo | -20,8657 | -40,9195 | <i>C. canephora</i> |
| ES20 | Espírito santo | -20,9668 | -41,1085 | <i>C. canephora</i> |
| ES21 | Espírito santo | -19,0024 | -41,5328 | <i>C. canephora</i> |
| ES22 | Espírito santo | -19,2342 | -40,2423 | <i>C. canephora</i> |
| ES23 | Espírito santo | -18,9169 | -40,0313 | <i>C. canephora</i> |
| ES24 | Espírito santo | -18,8778 | -40,0907 | <i>C. canephora</i> |
| ES25 | Espírito santo | -19,1379 | -40,6204 | <i>C. canephora</i> |
| ES26 | Espírito santo | -19,1789 | -40,0103 | <i>C. canephora</i> |
| ES27* | Espírito Santo | -18,8907 | -40,3647 | <i>C. arabica</i> |
| ES28* | Espírito Santo | -20,7625 | -41,3981 | <i>C. arabica</i> |
| ES29* | Espírito Santo | -20,1333 | -41,5292 | <i>C. arabica</i> |
| ES30* | Espírito Santo | -20,5216 | -41,6609 | <i>C. arabica</i> |
| ES31* | Espírito Santo | -20,5216 | -41,6609 | <i>C. arabica</i> |
| MG01 | Minas Gerais | -** | - | <i>C. arabica</i> |
| MG02 | Minas Gerais | -20,6225 | -45,8806 | - |
| MG03 | Minas Gerais | -20,8742 | -42,9803 | <i>C. arabica</i> |
| MG04 | Minas Gerais | -19,6961 | -46,1714 | <i>C. arabica</i> |
| MG05 | Minas Gerais | -19,6836 | -46,1808 | <i>C. arabica</i> |

Tabela 1 - Continuação...

| Isolados | Origens geográficas | Latitudes | Longitudes | Hospedeiros |
|-----------------|----------------------------|------------------|-------------------|--------------------|
| MG06 | Minas Gerais | -18,9439 | -46,9925 | <i>C. arabica</i> |
| MG07 | Minas Gerais | -21,5323 | -45,4299 | <i>C. arabica</i> |
| MG08 | Minas Gerais | -20,7253 | -42,8832 | <i>C. arabica</i> |
| MG09 | Minas Gerais | -20,6137 | -42,5334 | <i>C. arabica</i> |
| MG10* | Minas Gerais | -21,4786 | -45,5448 | <i>C. arabica</i> |
| MG11* | Minas Gerais | -20,9614 | -45,6628 | <i>C. arabica</i> |
| MG12* | Minas Gerais | -21,5987 | -45,9316 | <i>C. arabica</i> |
| MG13* | Minas Gerais | -21,4192 | -45,9449 | <i>C. arabica</i> |
| MG14* | Minas Gerais | -21,7238 | -45,7541 | <i>C. arabica</i> |
| MG15* | Minas Gerais | -21,3552 | -45,5110 | <i>C. arabica</i> |
| MG16* | Minas Gerais | -21,3553 | -45,4464 | <i>C. arabica</i> |
| MG17* | Minas Gerais | -21,8533 | -45,3032 | <i>C. arabica</i> |
| MG18* | Minas Gerais | -21,5739 | -45,5203 | <i>C. arabica</i> |
| MG19* | Minas Gerais | -20,8023 | -42,8032 | <i>C. arabica</i> |
| MG20* | Minas Gerais | -19,0252 | -46,0666 | <i>C. arabica</i> |
| MG21* | Minas Gerais | -19,1698 | -46,1336 | <i>C. arabica</i> |
| MG22* | Minas Gerais | -18,5239 | -46,5193 | <i>C. arabica</i> |
| MG23* | Minas Gerais | -18,6701 | -46,6590 | <i>C. arabica</i> |
| MG24* | Minas Gerais | -18,6701 | -46,3216 | <i>C. arabica</i> |
| MG25* | Minas Gerais | -19,4278 | -46,5524 | <i>C. arabica</i> |
| MG26* | Minas Gerais | -19,5003 | -46,6366 | <i>C. arabica</i> |
| MG27* | Minas Gerais | -21,1895 | -45,5196 | <i>C. arabica</i> |
| NA01 | - | - | - | - |
| NA02* | - | - | - | - |
| NA03* | Costa Rica | - | - | - |

* - isolados monopustulares cedidos na forma de DNA pelo Laboratório de Biologia de Populações de Fitopatógenos/UFV e da coleção do BioCafé/UFV.

** - sem informação.

A inoculação das plantas com os isolados foi realizada com o auxílio de um pincel de pêlo de camelo, depositando-se os uredíniosporos de *H. vastatrix* na face abaxial de folhas jovens e completamente desenvolvidas do cultivar 'Catuaí Vermelho IAC 44' (hospedeiro de multiplicação). Em seguida, água destilada foi aspergida sobre as folhas com um borrifador até atingir um leve molhamento foliar. Após esse procedimento, as plantas foram cobertas com saco plástico e transferidas para uma câmara de nevoeiro a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro por 48 horas e umidade relativa próxima a 100%. Após este período, foi realizada a limpeza das folhas com algodão para remover os uredíniosporos que permaneceram na face abaxial das folhas, a fim de evitar a futura colonização de fungos hiperparasitas, como *Lecanicillium lecanii*. As plantas foram mantidas em câmaras de crescimento com repartições individualizadas,

a 22 ±2°C e fotoperíodo de 12 horas, até a manifestação dos sinais do patógeno.

Para a obtenção de isolados monopustulares, a metodologia utilizada foi a mesma descrita por Capucho *et al.* (2009) e semelhante à descrita para outros patógenos causadores de ferrugem, como *Puccinia coronata* (Leonard *et al.*, 2005), *P. recondita* (Elyasi-Gomari & Panteleev, 2006) e *P. tritici* (Kolmer & Ordonez, 2007). Os isolados monopustulares foram multiplicados até a obtenção de quantidade suficiente de uredíniosporos para a extração de DNA.

O fungo hiperparasita *L. lecanii* que poderia estar presente como contaminante das amostras foi isolado em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) para a extração do seu DNA.

2.2 Caracterização das raças fisiológicas dos isolados de *Hemileia vastatrix*

A metodologia de disco de folhas foi utilizada para a caracterização de raças dos isolados de *H. vastatrix* (Eskes, 1982), sendo utilizados 16 discos de folhas (1,5 cm de diâmetro) de cada um dos 21 clones diferenciadores de raças de *H. vastatrix* mantidos pelo BioCafé/UFV. Cada disco de folha foi inoculado na face abaxial com uredíniosporos do patógeno com o auxílio de pincel de pêlo de camelo. Após a inoculação, os discos foram colocados sobre uma tela de nylon e espuma, saturada com água, no interior de um gerbox, e então atomizados com água destilada. Os gerbox contendo os discos de folhas foram fechados e mantidos na ausência de luz durante 48 horas a 22 ±2°C. Em seguida, os gerbox foram transferidos para uma câmara com condições controladas de temperatura e luminosidade (22 ±2°C, 12 horas de luz). Os discos de folhas inoculados foram limpos com o auxílio de algodão, 48 horas após a inoculação. A caracterização fisiológica de raças foi determinada de acordo com a reação de resistência (ausência de uredíniosporos) ou suscetibilidade (presença de uredíniosporos), manifestada em cada clone diferenciador de raças. Oito avaliações foram realizadas em intervalos de sete dias e os resultados foram consultados na literatura para determinar a qual raça pertencia cada isolado (Várzea & Marques, 2005). Para a confirmação dos resultados, este procedimento foi repetido com os uredíniosporos de cada

isolado caracterizado, porém com os uredíniosporos coletados dos discos de folhas dos diferenciadores de raças.

2.3 Extração do DNA

O DNA genômico dos isolados de *H. vastatrix* e do hiperparasita *L. lecanii* foi extraído a partir de 30 e 50 mg de uredíniosporos e micélio, respectivamente (Raeder & Broda, 1985). O material foi triturado em nitrogênio líquido em um microtubo de 1,5 mL, com auxílio de um pistilo plástico. Após a trituração, foi adicionado tampão de extração (Tris-HCl 200 mM pH 8, NaCl 250 mM, EDTA 50 mM e SDS 2%). Em seguida, os tubos foram incubados a 65°C por 30 minutos e, posteriormente, foi adicionado clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1. Após agitação vigorosa e incubação em gelo por 30 minutos, as amostras foram centrifugadas a 13.500 g por 30 minutos e os sobrenadantes cuidadosamente transferidos para tubos novos, onde foi adicionado igual volume de isopropanol. Os tubos foram novamente centrifugados e os sobrenadantes descartados. Os precipitados (*pellets*) foram ressuspensos em água destilada autoclavada e tratados com fenol, clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 25:24:1. As amostras foram incubadas em gelo por 10 minutos e centrifugadas a 13.500 g por 30 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos, onde se adicionou 60% do volume de acetato de amônio 7 M, incubando-se em gelo por 1 hora. As amostras foram centrifugadas a 13.500 g por 30 minutos e os sobrenadantes transferidos para tubos novos. O DNA genômico foi precipitado com isopropanol, lavado com etanol 70% e ressuspense em tampão TE (Tris-HCl 10mM pH 8 e EDTA 1 mM). Em seguida, foi adicionada RNase na concentração de 10 ng/μl, mantendo-se os tubos a 37°C por 15 minutos.

A quantificação do DNA de cada isolado foi realizada em espectrofotômetro Nanodrop 2000 e a sua qualidade confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1%. Os DNAs foram diluídos para a concentração final de 100 ng/μl e armazenados a - 20°C até o uso.

O DNA genômico do hospedeiro de multiplicação do patógeno, 'Catuaí Vermelho IAC 44', foi extraído segundo o protocolo de Diniz *et al.* (2005).

2.4 Marcadores AFLP

As reações de amplificação do DNA de cada isolado de *H. vastatrix* foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Brito *et al.* (2010), com modificações. O DNA de *H. vastatrix* foi clivado com as enzimas de restrição *EcoRI* e *MseI*, para a obtenção de fragmentos que foram ligados a adaptadores específicos pela enzima T4 DNA ligase. As amostras foram amplificadas por PCR utilizando o DNA ligado aos adaptadores.

Na amplificação pré-seletiva, foram utilizados oligonucleotídeos complementares aos adaptadores e aos sítios das enzimas de restrição. Os nucleotídeos seletivos na extremidade 3' foram adenina (ligada ao oligonucleotídeo complementar ao sítio da enzima *EcoRI*) e citosina (ligada ao oligonucleotídeo complementar ao sítio da enzima *MseI*). O programa de amplificação pré-seletiva foi de 23 ciclos constituídos da desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 56°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos.

Na amplificação seletiva foram utilizadas sete combinações de oligonucleotídeos iniciadores com três nucleotídeos adicionais na extremidade 3', sendo o primeiro nucleotídeo correspondente ao utilizado na amplificação pré-seletiva. Os oligonucleotídeos *Eco* foram marcados com fluorescência na extremidade 5'. Os oligonucleotídeos e o respectivo fluoróforo utilizados foram: E-ACC/M-CTA (NED), E-ACC/M-CAC (NED), E-ACC/M-CAT (NED), E-ACC/M-CTG (NED), E-ACT/M-CTA (6-FAM), E-ACT/M-CAC (6-FAM), E-ACT/M-CAT (6-FAM). O programa de amplificação seletiva foi de 13 ciclos constituídos da desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 65°C por 30 segundos (com diminuição de 0,7°C a cada ciclo) e extensão a 72°C por 60 segundos. O programa de amplificação ainda constou de 32 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 56°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos, e um ciclo de extensão final a 72°C por 20 minutos.

Posteriormente, foi adicionado 6,75 µl de formamida deionizada Hi-DiTM (*Applied Biosystems*) e 0,25 µl do marcador de 600 pb marcado com um fluoróforo (ROX) a 3 µl do produto da PCR da amplificação seletiva. As amostras foram submetidas a um sistema de eletroforese capilar utilizando o sequenciador automático ABI 3130XL (*Applied Biosystems*) do Laboratório BioCafé/UFV.

2.5 Análise dos dados

As diferenças nos padrões de eletroforese entre os isolados foram avaliadas utilizando o programa computacional GeneMapper 4.1 (*Applied Biosystems*). Os fragmentos AFLP foram codificados em caracteres binários, sendo o número “1” o código para a presença de fragmento e “0” para a ausência. Para aumentar a consistência dos dados, apenas picos com emissão de fluorescência acima de 100 rfu entre 50 a 500 pb foram analisados. A confiabilidade dos dados foi assegurada pela amplificação de 10% dos isolados em duplicata e repetidos aqueles padrões que apresentaram muitos picos polimórficos.

A diversidade genotípica foi estimada pelas medidas de riqueza, diversidade e equitabilidade. Visando reduzir o erro devido aos diferentes tamanhos das amostras da população em estudo, foram estimados a riqueza genotípica $E(g_n)$, utilizando curvas de rarefação (Grünwald *et al.*, 2003), e o número de genótipos na menor população observada.

Para medir a diversidade genotípica os índices N_1 (Hill, 1973) e G (Stoddart & Taylor, 1988) foram calculados, assim como os respectivos intervalos de confiança a partir de 1000 permutações, reamostrando a frequência original dos genótipos multilocus identificados pelo programa estatístico R (R Development Core Team, 2008).

Similarmente, a equitabilidade genotípica foi avaliada utilizando o índice E_5 (Grünwald *et al.*, 2003). Após estimar a frequência alélica para cada loco, a análise da diversidade gênica de Nei (1973) também foi realizada pelo programa Popgene 3.2 (Yeh *et al.*, 1999).

Para avaliar a relação genética entre os isolados e as raças de *H. vastatrix*, o coeficiente de similaridade genética de Jaccard (Jaccard, 1908) foi calculado e um dendrograma foi construído pelo método UPGMA no aplicativo computacional NTSYS-pc 2.10 (Rohlf, 2005).

A correlação entre similaridade genética e distância geográfica entre os isolados de *H. vastatrix* foi analisada pelo teste de Mantel (Mantel, 1967) no programa R (R Development Core Team, 2008). Para isso, uma matriz de distância geográfica foi gerada calculando-se a distância entre os isolados utilizando as coordenadas geográficas, a qual foi então comparada com uma matriz de distância genética.

Para investigar a estrutura da população de *H. vastatrix*, uma abordagem bayesiana de agrupamento foi realizada utilizando o programa Structure 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000). O conjunto de dados foi analisado utilizando o modelo de mistura genética. O parâmetro Monte-Carlo em cadeias de Markov (MCMC) foi editado para 250.000 replicatas com período de aquecimento (*burn-in*) de 50.000, enquanto os outros parâmetros foram definidos com os valores padrões do programa Structure. O número de grupos (k) variou de 1 a 36 e a análise foi conduzida de forma independente por 15 vezes. A probabilidade posterior de verossimilhança (Δk) foi utilizada para escolher o número de grupos (k) para o conjunto de dados utilizando o aplicativo Structure Harvester (Earl & Vonholdt, 2012). Adicionalmente, a diferenciação genética (G_{ST}) e o número de migrantes (Nm) foram calculados par-a-par entre as populações de *H. vastatrix* no programa Popgene 1.3.2 (Yeh *et al.*, 1999).

A análise da distribuição da variabilidade genética foi realizada pela análise de variância molecular (AMOVA), como sugerido por Excoffier *et al.* (1992), usando o programa Arlequin 3.5 (Excoffier *et al.*, 2006). Para isto, as populações de *H. vastatrix* classificadas por Estado foram subdivididas em subpopulações, as quais foram definidas por regiões produtoras dentro de cada Estado. Aquelas agrupadas por hospedeiro foram subdivididas em subpopulações definidas pelo Estado de origem e a distribuição da variabilidade genética entre populações, dentro e entre as subpopulações, foi calculada.

A evidência de recombinação sexual na população total de *H. vastatrix* foi avaliada pelo índice de associação (I_A) e pela estatística r_d (Maynard Smith *et al.*, 1993), por comparação entre os valores observados e esperados em 1000 replicações por aleatorização dos índices, utilizando o programa Multilocus 1.3 (Agapow & Burt, 2001). Os valores esperados para as 1000 replicações foram utilizados para a construção de histogramas para posterior análise gráfica dos valores de I_A e r_d .

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização das raças fisiológicas dos isolados de *Hemileia vastatrix*

As raças I, II, III, VII, XIII, XXIX, XXX e XXXIII de *H. vastatrix* foram identificadas em 23 dos 38 isolados analisados (Tabela 2). A raça II foi a predominante, encontrada em 13 dos isolados originários de *C. arabica*, *C. canephora* e derivados de HDTI coletados nos cinco Estados. A raça XIII foi identificada em três isolados sendo dois deles coletados em *C. canephora* no Espírito Santo e na Bahia e um em Minas Gerais em um hospedeiro desconhecido, a I foi encontrada em dois isolados, sendo um de *C. canephora* do Espírito Santo e o outro em *C. arabica* de Minas Gerais. As raças III, VII, XXIX, XXX, XXXIII foram identificadas em um isolado cada, sendo as raças III e XXX coletadas de *C. canephora* e as demais de *C. arabica* (Tabela 3).

Além das raças acima mencionadas, em 15 dos isolados de *H. vastatrix* avaliados foram identificadas 11 novas raças (Tabelas 2 e 3). Estas novas raças de *H. vastatrix* foram nomeadas de raças UFV-Hv-01, UFV-Hv-02, UFV-Hv-03, UFV-Hv-04, UFV-Hv-05, UFV-Hv-06, UFV-Hv-07, UFV-Hv-08, UFV-Hv-09, UFV-Hv-10 e UFV-Hv-11. A raça UFV-Hv-08 foi caracterizada em três isolados do fungo originários de *C. arabica* coletados nos Estados do Paraná e São Paulo. As raças UFV-Hv-03 e UFV-Hv-06 foram encontradas em dois isolados cada, originários de *C. canephora* coletados no Espírito Santo. As raças UFV-Hv-01, UFV-Hv-05, UFV-Hv-09 e UFV-Hv-10 foram encontradas em um isolado cada, vindos de *C. arabica*, sendo os dois primeiros originários de São Paulo e os dois últimos do Paraná. As raças UFV-Hv-02, UFV-Hv-04 e UFV-Hv-11 foram identificadas em um único isolado de *C. canephora* cada, sendo os dois primeiros originários da Bahia e o último do Espírito Santo e a raça UFV-Hv-07 de um genótipo de cafeeiro e Estado desconhecidos (Tabela 3).

Tabela 2 - Reação dos isolados de *Hemileia vastatrix* nos clones diferenciadores de raças com os respectivos genes de virulência do patógeno e de resistência do hospedeiro e a frequência encontrada de cada uma das raças.

| Genes de virulência deduzidos | Raças fisiológicas de <i>H. vastatrix</i> | Genes de resistência | | | | | | | | | | | | | | | | | Frequência (%) | | | | |
|---------------------------------------|---|---|------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|------------------|----------------------|--------------------|------------------------|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------------------------|------------------------|----------------|--------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------------|
| | | S _H 1 | S _H 4 | S _H 5 | S _H 6 | S _H 2,5 | S _H 3,5 | S _H ? | S _H 5,6,9 | S _H 5,8 | S _H 5,6,7,9 | S _H 4,5 | S _H 1,2,5 | S _H 1,3,5 | S _H 1,4,5 | S _H 3,4,5 | S _H 1,2,4,5 | S _H 2,3,4,5 | | S _H 6,7,8,9,? | S _H 1,4 | S _H 1,5 | S _H 5,7 ou 5,7,9 |
| | | Coffea spp. e Híbridos interespecíficos | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 128/2 | 635/2 | 63/1 | 1343/269 | 32/1 | 33/1 | 644/18 | H 419/20 | H 420/2 | H 420/10 | 110/5 | 1006/10 | H 153/2 | 635/3 | H 151/1 | HW 17/12 | H 147/1 | 832/1 | 134/4 | 87/1 | 7963/117 | | | |
| α | γ | ε | R | D | G | M | 3 | 2 | 1 | J | L | Z | W | X | O | T | A | I | C | - | | | |
| V _{2,5} | I | | | S | | S | | | | | | | | | | | | | | | | 5,3 | |
| V ₅ | II | | | S | | S | | | | | | | | | | | | | | | | 34,2 | |
| V _{1,5} | III | S | | S | | | | | | | | | | | | | | | | | S | 2,6 | |
| V _{3,5} | VII | | | S | | | S | | | | | | | | | | | | | | | 2,6 | |
| V _{5,?} | XIII | | | S | | | S | | | | | | | | | | | | | | | 7,9 | |
| V _{5,6,7,8,9} | XXIX | | | S | S | | | S | S | S | | | | | | | | | | | | 2,6 | |
| V _{5,8} | XXX | | | S | | | | | S | | | | | | | | | | | | | 2,6 | |
| V _{5,7 ou V_{5,7,9}} | XXXIII | | | S | | | | | | | | | | | | | | | | | S | 2,6 | |
| V _{1,5,8} | UFV-Hv-01 | S | | S | | | | | S | | | | | | | | | | | | S | 2,6 | |
| V _{5,6,?} | UFV-Hv-02 | | | S | S | | | S | | | | | | | | | | | | | | 2,6 | |
| V _{5,6,7,9} | UFV-Hv-03 | | | S | S | | | S | | S | | | | | | | | | | | | 5,3 | |
| V _{1,3,5,8,?} | UFV-Hv-04 | S | | S | | | S | S | | S | | | | S | | | | | | | S | 2,6 | |
| V _{3,5,6,7,9} | UFV-Hv-05 | | | S | S | | S | | S | | | | | | | | | | | | | 2,6 | |
| V _{1,3,5,6,7,9} | UFV-Hv-06 | S | | S | S | | S | | S | | | | | S | | | | | | | S | 5,3 | |
| V _{1,5,6,7,8,9} | UFV-Hv-07 | S | | S | S | | | S | S | S | | | | | | | | | | | S | 2,6 | |
| V _{5,6,7,8,9,?} | UFV-Hv-08 | | | S | S | | | S | S | S | | | | | | | | | | | | 7,9 | |
| V _{1,5,6,7,8,9,?} | UFV-Hv-09 | S | | S | S | | | S | S | S | | | | | | | | | | | S | 2,6 | |
| V _{3,4,5,6,7,8,9} | UFV-Hv-10 | | S | S | S | | S | | S | S | S | S | S | | S | | | | | | | 2,6 | |
| V _{3,5,6,7,8,9,?} | UFV-Hv-11 | | | S | S | | S | S | S | S | | | | | | | | | | | | 2,6 | |

Tabela 3 - Isolados de *Hemileia vastatrix* caracterizados em raças fisiológicas com seus respectivos locais de coleta, hospedeiro e genes de virulência.

| N ^{os} das amostras | Cidades | Estados | Hospedeiros | Genes de virulência | Raças |
|------------------------------|----------------------|----------------|---------------------|---------------------------------|-----------|
| PR01 | Jacarezinho | Paraná | <i>C. arabica</i> | V ₅ | II |
| PR02 | Jacarezinho | Paraná | <i>C. arabica</i> | V _{1,5, 6, 7, 8, 9, ?} | UFV-Hv-09 |
| PR07 | Uraí | Paraná | Derivado H. Timor | V ₅ | II |
| PR08 | Cambará | Paraná | <i>C. arabica</i> | V _{5, 6, 7, 8, 9, ?} | UFV-Hv-08 |
| PR09 | Cambará | Paraná | <i>C. arabica</i> | V _{3, 4,5, 6, 7, 8, 9} | UFV-Hv-10 |
| PR10 | Cambará | Paraná | <i>C. arabica</i> | V _{5, 6, 7, 8, 9, ?} | UFV-Hv-08 |
| SP02 | Marília/ Garça | São Paulo | <i>C. arabica</i> | V _{5, 6, 7, 8, 9, ?} | UFV-Hv-08 |
| SP03 | Vera Cruz | São Paulo | <i>C. arabica</i> | V _{1,5, 8} | UFV-Hv-01 |
| SP04 | Quintana | São Paulo | <i>C. arabica</i> | V _{5, 6, 7, 8, 9} | XXIX |
| SP05 | Batatais | São Paulo | Derivado Icatú | V _{2,3, 5} | VII |
| SP10 | Batatais | São Paulo | <i>C. arabica</i> | V ₅ | II |
| SP14 | Batatais | São Paulo | <i>C. arabica</i> | V ₅ | II |
| SP18 | Batatais/ Franca | São Paulo | <i>C. arabica</i> | V _{3,5, 6, 7, 9} | UFV-Hv-05 |
| BA01 | Vitória da Conquista | Bahia | <i>C. arabica</i> | V ₅ | II |
| BA13 | Teixeira de Freitas | Bahia | <i>C. canephora</i> | V _{1,3, 5, 8, ?} | UFV-Hv-04 |
| BA15 | Teixeira de Freitas | Bahia | <i>C. canephora</i> | V _{5, ?} | XIII |
| BA20 | Eunápolis | Bahia | <i>C. canephora</i> | V _{5, 8} | XXX |
| BA22 | Eunápolis | Bahia | <i>C. canephora</i> | V ₅ | II |
| BA23 | Itamarajú | Bahia | <i>C. canephora</i> | V _{5, 6, ?} | UFV-Hv-02 |
| ES02 | Marilândia | Espírito Santo | <i>C. canephora</i> | V _{1,3, 5,6, 7, 9} | UFV-Hv-06 |
| ES04 | Marilândia | Espírito Santo | <i>C. canephora</i> | V ₅ | II |
| ES07 | Jaguare | Espírito Santo | <i>C. canephora</i> | V _{1,3,5, 6, 7, 9} | UFV-Hv-06 |
| ES09 | Jaguare | Espírito Santo | <i>C. canephora</i> | V ₅ | II |
| ES13 | Sooretama | Espírito Santo | <i>C. canephora</i> | V _{1,5} | III |
| ES14 | Sooretama | Espírito Santo | <i>C. canephora</i> | V _{5, 6, 7, 9} | UFV-Hv-03 |
| ES15 | Sooretama | Espírito Santo | <i>C. canephora</i> | V ₅ | II |

Tabela 3 - Continuação...

| N^{os} das amostras | Cidades | Estados | Hospedeiros | Genes de virulência | Raças |
|------------------------------------|----------------------|----------------|---------------------|------------------------------|--------------|
| ES17 | Linhares | Espírito Santo | <i>C. canephora</i> | V 5, 6, 7, 9 | UFV-Hv-03 |
| ES18 | Piúma | Espírito Santo | <i>C. canephora</i> | V 3, 5, 6, 7, 8, 9, ? | UFV-Hv-11 |
| ES19 | Rio Novo | Espírito Santo | <i>C. canephora</i> | V ₅ , ? | XIII |
| ES21 | São Gabriel da Palha | Espírito Santo | <i>C. canephora</i> | V 2,5 | I |
| ES22 | Rio Bananal | Espírito Santo | <i>C. canephora</i> | V ₅ | II |
| ES23 | Jaguaré | Espírito Santo | <i>C. canephora</i> | V ₅ | II |
| MG01 | -* | Minas Gerais | <i>C. arabica</i> | V 5,7 ou V 5,7, 9 | XXXIII |
| MG02 | Viçosa | Minas Gerais | - | V ₅ , ? | XIII |
| MG03 | Paula Cândido | Minas Gerais | <i>C. arabica</i> | V ₅ | II |
| MG04 | Campos Altos | Minas Gerais | <i>C. arabica</i> | V 2,5 | I |
| NA01 | - | - | - | V _{1,5, 6, 7, 8, 9} | UFV-Hv-07 |
| NA02 | - | - | - | V ₅ | II |

* - sem informação.

3.2 Diversidade genética e estrutura das populações de *Hemileia vastatrix*

Pela análise das sete combinações de oligonucleotídeos avaliadas foi possível detectar 184 locos, sendo 86 (46,7%) polimórficos. O número de fragmentos polimórficos por combinação de oligonucleotídeo variou de cinco a 22, com o tamanho entre 54 e 480 pb (Tabela 4). Entre os 115 isolados analisados foram encontrados 68 genótipos, ou seja, padrões AFLP, dos quais 58 (85,3%) foram representados por um único isolado.

A confiabilidade dos dados foi comprovada pelo mesmo padrão apresentado para os isolados amplificados em replicatas e pelo padrão diferenciado dos controles (*L. lecanii* e 'Catuaí Vermelho IAC 44').

A riqueza estimada pela curva de rarefação para o menor valor de n das populações de hospedeiros ($E_{(g6)}$) variou de 5 (*C. arabica*) a 6 (Derivados de HDTI) (Tabela 5). Considerando as populações agrupadas de acordo com o Estado de origem, a riqueza ($E_{(g10)}$) variou de 5,8 (Bahia) a 9,3 (São Paulo) (Tabela 6).

A diversidade genotípica foi avaliada de acordo com os índices N_1 e G . A análise das populações em relação aos hospedeiros mostrou que a população oriunda de derivados de HDTI apresentou maior diversidade genotípica em relação às populações de *C. arabica* e *C. canephora* (Tabela 5). A população oriunda da Bahia apresentou menor diversidade genotípica em relação às demais populações (Tabela 6). A diversidade gênica de Nei (h) foi de 0,027 com desvio padrão de 0,064.

O maior valor para o índice de equitabilidade (E_5) na população de derivados de HDTI indica que nesta população os genótipos estão mais uniformemente distribuídos em relação às demais populações (Tabela 5). Em relação ao Estado de origem, as populações de São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Espírito Santo apresentaram maiores valores de equitabilidade em relação à população da Bahia (Tabela 6).

Tabela 4 - Fragmentos obtidos pelas sete combinações de pares de iniciadores em 115 isolados de *Hemileia vastatrix*.

| Oligonucleotídeos | N^a | Np^b | Tamanhos dos fragmentos^c |
|-------------------------------|----------------------|-----------------------|---|
| <i>E</i> -ACT / <i>M</i> -CTA | 26 | 6 | 66, 166, 168, 209, 274, 473 |
| <i>E</i> -ACT / <i>M</i> -CAT | 24 | 5 | 183, 115, 118, 312, 334 |
| <i>E</i> -ACT / <i>M</i> -CAC | 24 | 12 | 54, 96, 221, 256, 260, 262, 284, 291, 406, 413, 448, 453 |
| <i>E</i> -ACC / <i>M</i> -CTG | 22 | 13 | 55, 63, 82, 85, 153, 156, 166, 169, 171, 191, 200, 262, 267 |
| <i>E</i> -ACC / <i>M</i> -CTA | 26 | 12 | 61, 64, 103, 131, 143, 234, 241, 244, 263, 267, 478, 480 |
| <i>E</i> -ACC / <i>M</i> -CAT | 32 | 22 | 62, 78, 95, 115, 129, 140, 149, 202, 205, 215, 225, 227, 231, 232, 243, 253, 265, 274, 284, 307, 333, 359 |
| <i>E</i> -ACC / <i>M</i> -CAC | 30 | 16 | 62, 107, 114, 129, 132, 167, 177, 180, 182, 202, 207, 227, 274, 307, 332, 358 |
| Total | 184 | 86^d | - |

Legenda: ^a N = número total de locos analisados; ^b Np = número de locos polimórficos; ^c Tamanho dos fragmentos polimórficos em pares de base; ^d Percentual de locos polimórficos = 46,7%.

Tabela 5 - Índices de riqueza, diversidade e equitabilidade para as populações de *Hemileia vastatrix* subdivididas de acordo com a espécie hospedeira.

| Estatística | Populações definidas por hospedeiro | | | |
|---|--|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| | <i>Coffea arabica</i> | <i>Coffea canephora</i> | Derivados de Híbrido de Timor e Icatú | Geral |
| Tamanho da amostra | | | | |
| n ^a | 68 | 38 | 6 | 115 |
| Índices de Riqueza | | | | |
| pobs ^b | 45 | 24 | 6 | 68 |
| E(gn) para a menor população (n=6) ^c | 5,6 | 5 | 6 | 5,4 |
| Índices de Diversidade | | | | |
| N ₁ ^d | 33,986 (28,76 - 39,21) ^g | 15,816 (11,85 - 19,79) | 6,000 (4,40 - 7,60) | 39,853 (33,30 - 46,41) |
| G ^e | 22,891 (16,84 - 28,95) | 8,914 (4,86 - 12,97) | 6,000 (4,44 - 7,56) | 18,445 (11,97 - 24,92) |
| Índices de Equitabilidade | | | | |
| E ₅ ^f | 0,664 | 0,534 | 1,000 | 0,449 |

Legenda: ^a número de indivíduos amostrados; ^b número observado de genótipos; ^c número esperado de genótipos baseado na curva de rarefação para uma amostra com 6 indivíduos; ^d índice de Hill; ^e índice de Stoddart & Taylor; ^f E₅ índice de equitabilidade calculado por $(G-1) / (N_1 - 1)$; ^g números entre parênteses indicam o intervalo de confiança calculado a partir da abordagem de *bootstrapping* com 1000 replicatas.

Tabela 6 - Índices de riqueza, diversidade e equitabilidade para as populações de *Hemileia vastatrix* subdivididas de acordo com o Estado de origem.

| Estatística | Populações definidas por Estado | | | | |
|--|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------|
| | Bahia | Espírito Santo | Minas Gerais | São Paulo | Paraná |
| Tamanho da amostra | | | | | |
| n ^a | 24 | 31 | 27 | 20 | 10 |
| Índices de Riqueza | | | | | |
| pobs ^b | 12 | 24 | 22 | 17 | 8 |
| E(gn) para a menor população (n=10) ^c | 5,8 | 8,7 | 8,9 | 9,3 | 8 |
| Índices de Diversidade | | | | | |
| N ₁ ^d | 6,539 (4,03 - 9,05) ^g | 19,705 (15,92 - 23,49) | 19,038 (15,34 - 22,74) | 16,245 (13,52 - 18,97) | 7,192 (5,24 - 9,15) |
| G ^e | 3,646 (1,60 - 5,69) | 14,343 (9,92 - 18,77) | 14,878 (10,71 - 19,05) | 15,385 (12,41 - 18,36) | 6,250 (4,23 - 8,27) |
| Índices de Equitabilidade | | | | | |
| E ₅ ^f | 0,478 | 0,713 | 0,769 | 0,944 | 0,848 |

Legenda: ^a número de indivíduos amostrados; ^b número observado de genótipos; ^c número esperado de genótipos baseado na curva de rarefação para uma amostra com 10 indivíduos; ^d índice de Hill; ^e índice de Stoddart & Taylor; ^f E₅ índice de equitabilidade calculado por (G-1) / (N₁ - 1); ^g números entre parênteses indicam o intervalo de confiança calculado a partir da abordagem de *bootstrapping* com 1000 replicatas.

A análise de agrupamento pelo método UPGMA não revelou a formação de grupos entre os isolados da mesma origem geográfica e hospedeiros (Figura 1), nem entre isolados de uma mesma raça fisiológica (Figura 2). A similaridade genética encontrada variou de 90 a 100%. Um grande grupo foi formado com 12 dos 24 isolados pertencentes ao Estado da Bahia, juntamente com isolados do Paraná, Espírito Santo e São Paulo. Neste grupo havia isolados coletados tanto em *C. arabica* quanto em *C. canephora* e derivados de HDTI (Figura 2). Pelo teste de Mantel não houve correlação entre a distância genética e geográfica ($r = -0,024$, $P = 0,74$).

A abordagem bayesiana foi realizada utilizando dois conjuntos de dados, o primeiro agrupando os dados de acordo com o Estado de origem e o segundo com os tipos de hospedeiros. O primeiro originou seis populações: Paraná, São Paulo, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais e Estado desconhecido, o segundo às populações: *C. arabica*, *C. canephora*, derivados de HDTI (híbridos originados do cruzamento entre *C. arabica* e *C. canephora*) e hospedeiro desconhecido.

Ao analisarmos as populações com maior valor Δk para o agrupamento por Estado, dezessete populações foram identificadas ($k = 17$) (Figuras 3A e 4). Considerando o agrupamento por hospedeiro, o maior valor de Δk foi encontrado para $k = 3$ (Figura 3B), agrupando, portanto, os isolados em três populações (Figura 5).

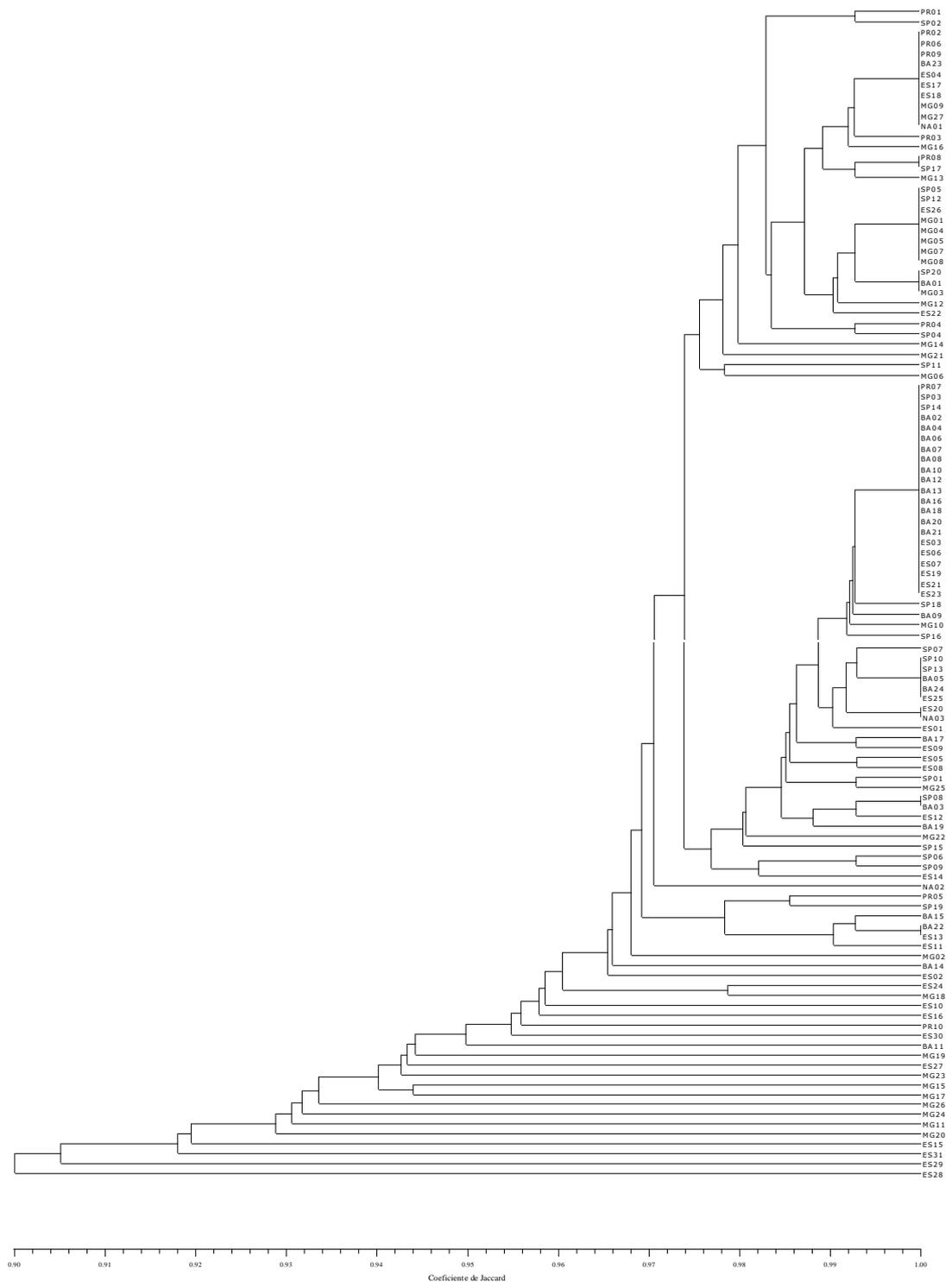


Figura 1 - Representação gráfica da similaridade genética entre os 115 isolados de *Hemileia vastatrix* obtido pelo método UPGMA com base no coeficiente de similaridade de Jaccard. Nomeou-se os isolados com uma sigla, as duas primeiras letras referem-se ao Estado de origem: Minas Gerais (MG), Espírito Santo (ES), Paraná (PR), Bahia (BA), São Paulo (SP) e sem informação (NA). O número corresponde a identificação do isolado.

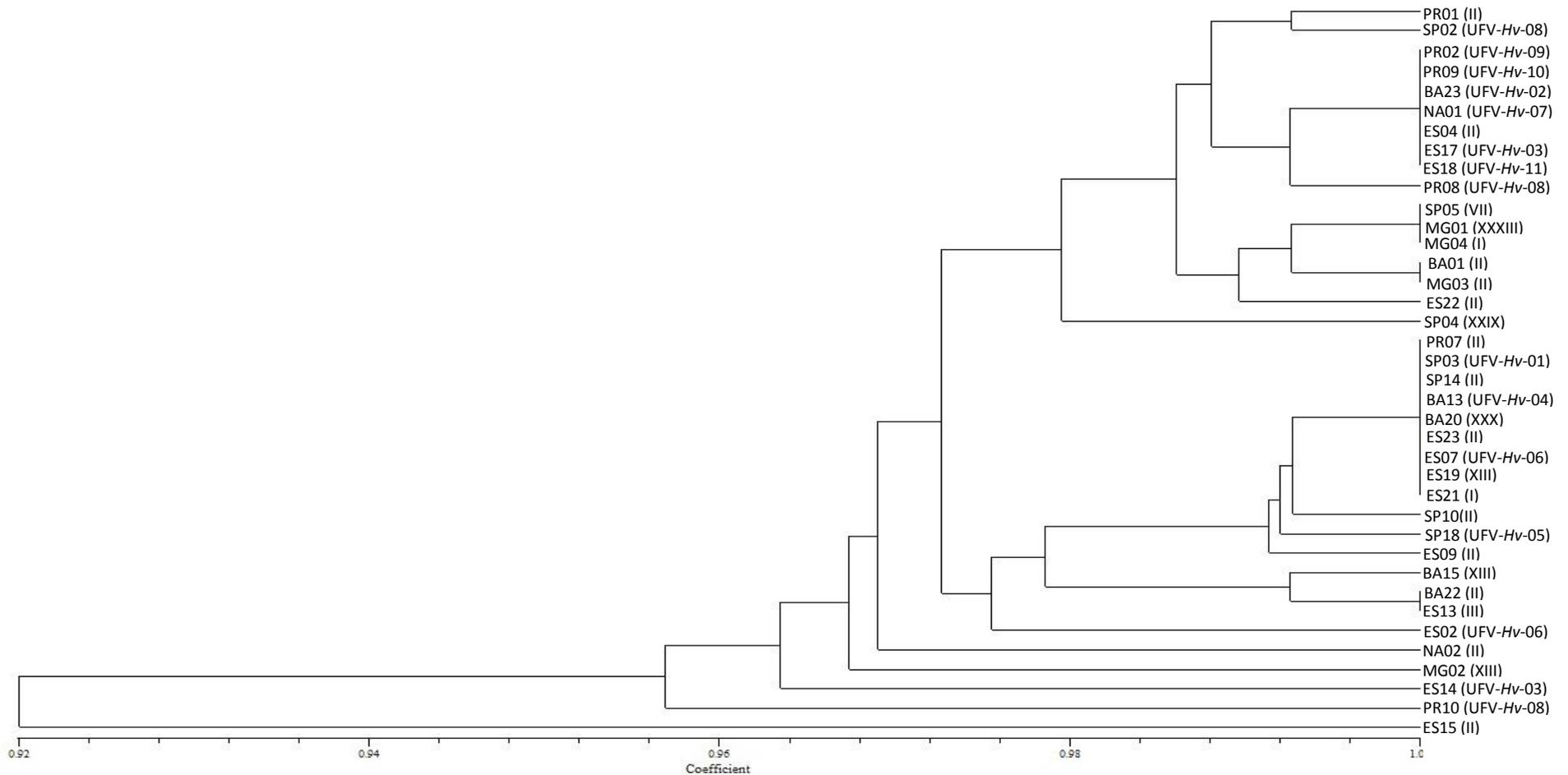


Figura 2 - Representação gráfica da similaridade genética entre os 38 isolados de *Hemileia vastatrix* caracterizados em raças fisiológicas obtido pelo método UPGMA com base no coeficiente de similaridade de Jaccard. Nomeou-se os isolados com uma sigla, as duas primeiras letras referem-se ao Estado de origem: Minas Gerais (MG), Espírito Santo (ES), Paraná (PR), Bahia (BA), São Paulo (SP) e sem informação (NA). O número corresponde a identificação do isolado. A raça fisiológica correspondente a cada um dos isolados encontra-se entre parênteses.

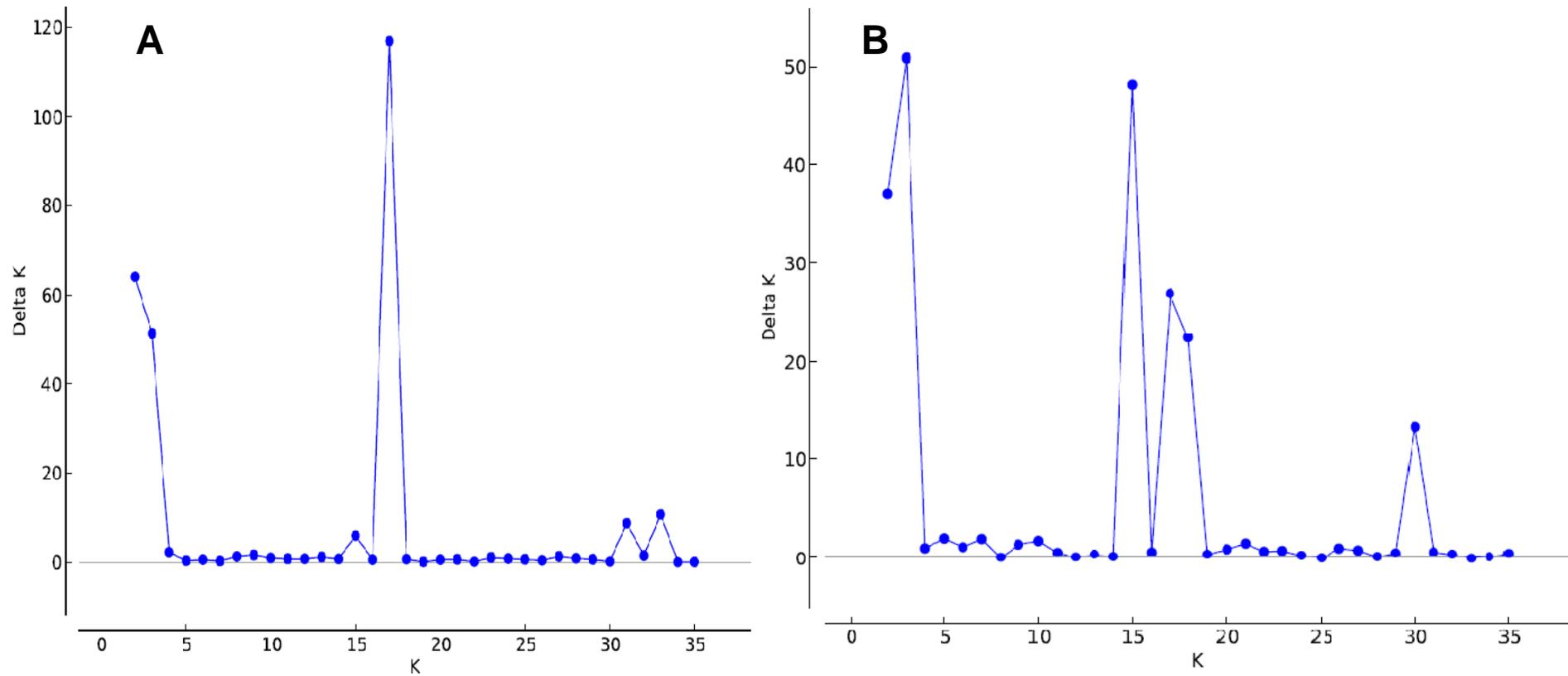


Figura 3 - Número de K grupos que melhor se adéqua ao conjunto de dados pelo método proposto por Evanno *et al.* (2005). O gráfico A representa os isolados agrupados por Estado e o B por hospedeiro.

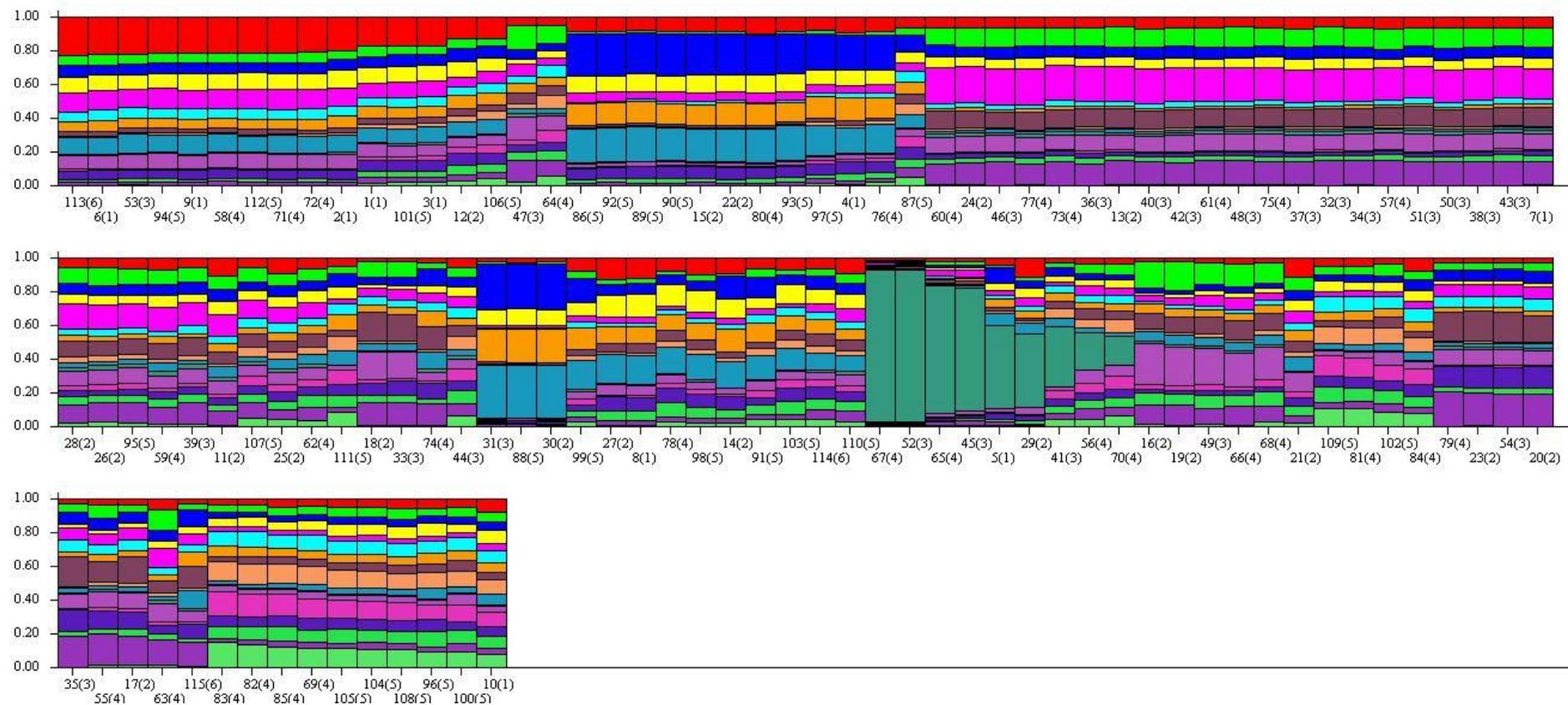


Figura 4 - Análise bayesiana de agrupamento. As populações estão representadas pelas diferentes cores nas barras verticais. A distribuição dos isolados (barras verticais) dentro dos dezessete grupos pode ser verificada pelos valores do eixo y que indicam o percentual de alelos de cada uma das dezessete populações presente em cada um dos isolados. Números entre parênteses representam a possível população com base no Estado de origem, sendo Paraná (1), São Paulo (2), Bahia (3), Espírito Santo (4), Minas Gerais (5) e Estado desconhecido (6).

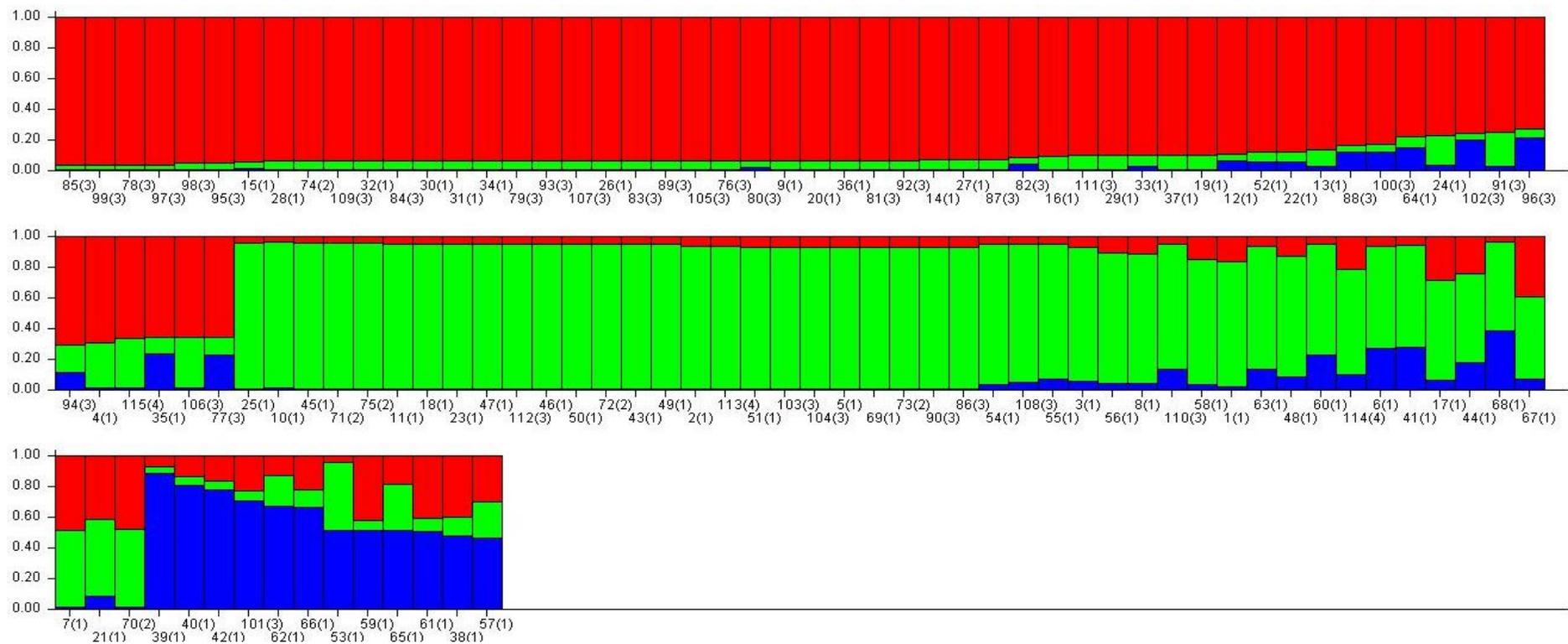


Figura 5 - Análise bayesiana de agrupamento. As populações estão representadas pelas diferentes cores nas barras verticais. A distribuição dos isolados (barras verticais) dentro dos três grupos pode ser verificada pelos valores do eixo y que indicam o percentual de alelos de cada uma das três populações presente em cada um dos isolados. Números entre parênteses representam a possível população com base no hospedeiro de origem, sendo *Coffea arabica* (1), Derivados de Híbrido de Timor e Icatú (2), *Coffea canephora* (3) e hospedeiro desconhecido (4).

Foi observada baixa diferenciação genética ($G_{ST} = 0,02$) entre as populações do Espírito Santo e Bahia, e conseqüentemente, maior número de migrantes par-a-par entre essas populações ($Nm = 22,14$) (Tabela 7). Analisando o agrupamento por espécie hospedeira, a menor diferenciação genética foi observada entre as populações *C. canephora* e *C. arabica* ($G_{ST} = 0,02$), sendo o valor de Nm entre elas de 19,61 (Tabela 8).

As populações originárias do Espírito Santo e do hospedeiro *C. arabica* apresentaram maior número de locos polimórficos, 34 e 39%, respectivamente. As menores porcentagens de locos polimórficos foram encontradas nas populações do Paraná e dos Derivados de HDTI (3,8 e 6,5%, respectivamente) (Tabela 9). A diversidade gênica total (H_T) na população do patógeno variou de 0,0118 a 0,0352 (Tabela 9).

Pela análise de variância molecular, estimou-se a porcentagem de variação total entre hospedeiros, entre Estados dentro de hospedeiros e dentro de Estados, com 90,39% da variação total devido a variações dentro do Estado de origem (Tabela 10). O agrupamento dos dados de acordo com o Estado de origem dos isolados mostrou que 90,16% da variação total foi devida a variações dentro de regiões produtoras pertencentes a um mesmo Estado (Tabela 11).

A hipótese de recombinação sexual na população total ($n = 115$) de *H. vastatrix* foi rejeitada (Figuras 6).

Tabela 7 - Estimativas da diferenciação da população (diagonal superior) e número de migrantes (diagonal inferior) entre populações de *Hemileia vastatrix* definidas por Estado.

| Populações | Bahia | Espírito Santo | Minas Gerais | São Paulo | Paraná | ENA |
|-----------------------|-------|----------------|--------------|-----------|--------|------|
| Bahia | - | 0,02 | 0,11 | 0,06 | 0,17 | 0,17 |
| Espírito Santo | 22,14 | - | 0,06 | 0,03 | 0,08 | 0,08 |
| Minas Gerais | 3,94 | 8,04 | - | 0,05 | 0,04 | 0,07 |
| São Paulo | 8,30 | 16,24 | 10,42 | - | 0,07 | 0,08 |
| Paraná | 2,43 | 5,81 | 13,59 | 7,12 | - | 0,12 |
| ENA | 2,53 | 5,40 | 6,85 | 5,56 | 3,68 | - |

GST total = 0,12

Legenda: ENA – Sem informação.

Tabela 8 - Estimativas da diferenciação da população (diagonal superior) e número de migrantes (diagonal inferior) entre populações de *Hemileia vastatrix* definidas por hospedeiro.

| Populações | <i>C. arabica</i> | <i>C. canephora</i> | Derivados de Híbrido de Timor e Icatú | HNA |
|---|-------------------|---------------------|---------------------------------------|------|
| <i>C. arabica</i> | - | 0,02 | 0,10 | 0,06 |
| <i>C. canephora</i> | 19,61 | - | 0,21 | 0,11 |
| Derivados de Híbrido Timor e Icatú | 4,67 | 1,92 | - | 0,19 |
| HNA | 7,88 | 4,20 | 2,17 | - |

GST total = 0,15

Legenda: HNA – Sem informação.

Tabela 9 - Estimativas da porcentagem de locos polimórficos e diversidade gênica total em populações de *Hemileia vastatrix* com base nas 184 marcas AFLP.

| População | P^a | H_T^b |
|-------------------------|----------------------|----------------------------------|
| Espírito Santo | 34,24 | 0,0326 ± 0,0036 |
| Minas Gerais | 23,91 | 0,0352 ± 0,0063 |
| São Paulo | 8,15 | 0,0170 ± 0,0052 |
| Bahia | 8,70 | 0,0118 ± 0,0019 |
| Paraná | 6,52 | 0,0146 ± 0,0035 |
| ENA | 3,26 | 0,0145 ± 0,0063 |
| <i>Coffea arabica</i> | 39,13 | 0,0297 ± 0,0046 |
| <i>Coffea canephora</i> | 20,11 | 0,0204 ± 0,0029 |
| HDT / Icatú | 3,80 | 0,0124 ± 0,0041 |
| HNA | 3,26 | 0,0145 ± 0,0063 |

Legenda: HDT / Icatú: genótipos derivados de Híbrido de Timor e Icatú; ^a Porcentagem de locos polimórficos; ^b Diversidade gênica total com o respectivo desvio padrão; ENA grupo de isolados sem informação sobre o Estado; HNA grupo de isolados sem informação sobre o hospedeiro.

Tabela 10 - Análise da variância molecular (AMOVA) de isolados de *Hemileia vastatrix* agrupados com base no hospedeiro de origem.

| F.V. | G.L. | S.Q. | C.V. | % V. | I.F. | P valor |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------|
| Entre hospedeiros | 2 | 11,27 | 0,024 | 0,94 | 0,009 | 0,285 |
| Entre Estados dentro de hospedeiros | 6 | 28,38 | 0,218 | 8,66 | 0,087 | 0,000 |
| Dentro de Estado | 102 | 231,74 | 2,272 | 90,39 | 0,096 | 0,000 |
| Total | 110 | 271,39 | 2,514 | 100,00 | - | - |

Legenda: F.V. = Fator de variação; G.L. = Graus de liberdade; S.Q. = Soma dos quadrados; C.V. = Coeficiente de variância; %V. = Porcentagem de variação; I.F. = Índices de fixação.

Tabela 11 - Análise da variância molecular (AMOVA) de isolados de *Hemileia vastatrix* agrupados com base no Estado de origem.

| F.V. | G.L. | S.Q. | C.V. | % V. | I.F. | P valor |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------|
| Entre Estados | 4 | 22,46 | 0,008 | 0,31 | 0,003 | 0,283 |
| Entre regiões dentro de Estados | 6 | 23,98 | 0,240 | 9,53 | 0,096 | 0,000 |
| Dentro de regiões | 100 | 226,73 | 2,267 | 90,16 | 0,098 | 0,000 |
| Total | 110 | 273,17 | 2,515 | 100,00 | - | - |

Legenda: F.V. = Fator de variação; G.L. = Graus de liberdade; S.Q. = Soma dos quadrados; C.V. = Coeficiente de variância; %V. = Porcentagem de variação; I.F. = Índices de fixação.

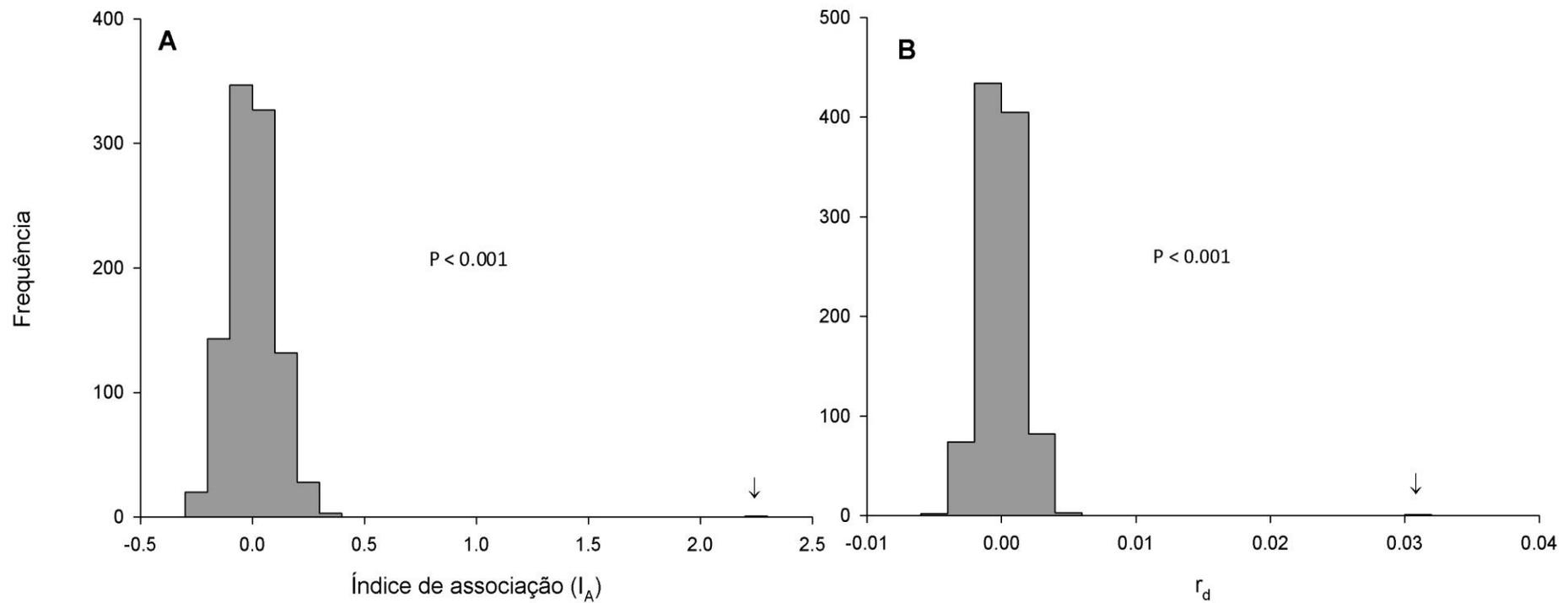


Figura 6 - Distribuição esperada para a população total (n=115) de *Hemileia vastatrix* em equilíbrio de ligação com base no índice de associação (I_A) (A) e análise de r_d (B). Os valores observados para I_A e r_d são indicados pelas setas. O P valor para cada estimativa é descrito no gráfico.

4. DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das raças fisiológicas dos isolados de *Hemileia vastatrix*

Os 38 isolados de *H. vastatrix* utilizados neste estudo foram caracterizados em 19 raças fisiológicas (I, II, III, VII, XIII, XXIX, XXX, XXXIII, UFV-Hv-01, UFV-Hv-02, UFV-Hv-03, UFV-Hv-04, UFV-Hv-05, UFV-Hv-06, UFV-Hv-07, UFV-Hv-08, UFV-Hv-09, UFV-Hv-10 e UFV-Hv-11).

No mundo foram identificadas 49 raças de *H. vastatrix* (Gichuru *et al.*, 2012), sendo que no Brasil apenas 16 haviam sido relatadas (Capucho *et al.*, 2012a; Cabral *et al.*, 2009; Zambolim *et al.*, 2005). A partir destes resultados, o número de raças de *H. vastatrix* em *Coffea* spp., no Brasil, passou para 29, sendo 18 raças previamente identificadas em outras partes do mundo (I, II, III, VII, X, XIII, XV, XVI, XVII, XXI, XXII, XXIII, XXIV, XXV ou XXXI, XXIX, XXX, XXXIII, XXXVII) e 11 exclusivamente do Brasil (UFV-Hv-01, UFV-Hv-02, UFV-Hv-03, UFV-Hv-04, UFV-Hv-05, UFV-Hv-06, UFV-Hv-07, UFV-Hv-08, UFV-Hv-09, UFV-Hv-10 e UFV-Hv-11).

Até então apenas as raças I, II e XV de *H. vastatrix* tinham sido relatadas em *C. canephora* no Brasil (Capucho *et al.*, 2012b; Silva, 2000; Chaves & Pereira, 1980). Este número aumentou em 266% uma vez que, neste estudo, outras oito raças foram identificadas nessa espécie (III, XIII, XXX, UFV-Hv-02, UFV-Hv-03, UFV-Hv-04, UFV-Hv-06 e UFV-Hv-11).

As raças identificadas em *C. arabica* no Brasil aumentaram em 37,5%, passando para 22 raças de *H. vastatrix* para este cafeeiro, sendo elas as raças I, II, III, VII, X, XIII, XV, XVI, XVII, XXI, XXII, XXIII, XXIV, XXV ou XXXI, XXIX, XXXIII, XXXVII, UFV-Hv-01, UFV-Hv-05, UFV-Hv-08, UFV-Hv-09 e UFV-Hv-10.

Em trabalhos recentes, Cabral *et al.* (2009) e Capucho *et al.* (2012a) avaliaram 34 e 64 isolados de *H. vastatrix*, respectivamente, onde foram identificados seis diferentes combinações de genes de virulência de *H. vastatrix* em cada um deles. Estes resultados confirmam a grande variabilidade fisiológica do patógeno. Entretanto, há uma grande predominância da raça II de *H. vastatrix*. Neste estudo, 34% dos isolados analisados pertenciam à raça II de *H. vastatrix*, fato este também observado em outros trabalhos no Brasil e no

mundo (Capucho *et al.*, 2012a; Cabral *et al.*, 2009; Várzea & Marques, 2005; Silva, 2000; Cardoso, 1986).

A ocorrência dessas novas raças de *H. vastatrix* comprova que os nove genes de virulência ($v_1, v_2, v_3, v_4, v_5, v_6, v_7, v_8$ e v_9) de *H. vastatrix* descritos no mundo também ocorrem no Brasil. Esse fato é preocupante, uma vez que, as raças contendo os genes v_6, v_7, v_8 e v_9 são capazes de infectar derivados de Híbrido de Timor (HDT), a principal fonte de resistência à ferrugem utilizada pelos programas de melhoramento do cafeeiro arábica (Várzea & Marques, 2005).

Outro aspecto que deve ser considerado é que isolados do fungo pertencentes às raças que infectam o *C. canephora* possuem genes de virulência capazes de suplantar a resistência do HDT ($S_H 5, 6, 7, 8, 9$). Assim, *C. canephora* poderia servir de hospedeiro de multiplicação de raças complexas de *H. vastatrix* com a capacidade de suplantar a resistência das cultivares de arábica.

4.2 Diversidade genética e estrutura das populações de *Hemileia vastatrix*

Neste estudo, foram utilizadas sete combinações de marcadores AFLP para estimar a diversidade e a estrutura genética nas populações de *H. vastatrix*. Até o momento, dois trabalhos com marcadores AFLP (Rozo *et al.*, 2012; Maia, 2009) e dois com RAPD (Nunes *et al.*, 2009; Gouveia *et al.*, 2005) foram realizados para o patossistema *Coffea* spp.-*Hemileia vastatrix*. Entretanto, para outros agentes causadores de ferrugens, como *Melampsora larici-populina*, *M. larici-epitea*, *Phragmidium violaceum*, *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*, *P. graminis* f.sp. *tritici*, *P. triticina*, *P. graminis* f.sp. *avenae* e *Cronartium ribicola* existe uma maior quantidade de trabalhos envolvendo essas e outras técnicas (Pei *et al.*, 2007; Gomez *et al.*, 2006; Enjalbert *et al.*, 2005; Hamelin *et al.*, 2005; Keiper *et al.*, 2003; Samils *et al.*, 2001).

A técnica de AFLP permite a avaliação simultânea de vários fragmentos de DNA (Ridout & Donini, 1999) e revela polimorfismos em organismos com baixos níveis de variação genética. Neste trabalho, 184 locos foram avaliados utilizando sete combinações de oligonucleotídeos AFLP e o percentual de polimorfismo encontrado foi de 46,7%. Um total de 68 genótipos foram encontrados dos quais 58 foram representados por isolados únicos.

Em trabalhos anteriores, seis combinações de oligonucleotídeos AFLP foram avaliadas, sendo encontrados 349 fragmentos, dos quais apenas 13,2% foram polimórficos (Rozo *et al.*, 2012). Com o marcador RAPD, foram encontrados 77% de genótipos únicos em 120 isolados de *H. vastatrix* (Nunes *et al.*, 2009).

Em *M. larici-populina*, uma ferrugem que apresenta ciclo sexuado, foi detectado 66% de polimorfismo, com apenas duas combinações de oligonucleotídeos AFLP, sendo que 83% dos genótipos foram únicos (Pei *et al.*, 2007). Em *M. larici-epitea* (ferrugem do Salgueiro), que também apresenta ciclo sexuado, com duas combinações de oligonucleotídeos AFLP, foram encontrados 86% de fragmentos polimórficos em 217 genótipos do patógeno, sendo que 79% de genótipos eram únicos (Samils *et al.*, 2001). Apesar de *H. vastatrix* não apresentar ciclo sexual, como outras ferrugens, uma quantidade suficiente de locos polimórficos foi encontrada permitindo que as estimativas de diversidade e estrutura populacional fossem realizadas com confiabilidade.

Nesse estudo, os maiores valores estimados para as variáveis riqueza e equitabilidade, foram encontrados na população de derivados de HDTI, quando se avaliou o hospedeiro, e na população oriunda de genótipos de São Paulo quando se avaliou o Estado de origem. Este fato indica a presença de um maior número de genótipos únicos nestas populações, e que estes genótipos estão distribuídos mais uniformemente em relação às demais populações (Grünwald *et al.*, 2003).

Uma baixa diversidade genotípica foi encontrada na população total estudada ($G = 18,445$ e $N_1 = 39,853$), diferente do relatado por Maia (2009) e Nunes *et al.* (2009). Esse resultado pode ser explicado pela metodologia de coleta dos isolados utilizada nestes estudos, onde cada isolado foi constituído por uma mistura de pústulas de *H. vastatrix*, conseqüentemente, o padrão de bandas analisado foi constituído por fragmentos de DNA de vários indivíduos. Entretanto, nesse estudo, todos os isolados avaliados foram provenientes de lesões monopustulares de *H. vastatrix*, e não pela mistura de isolados. Para estudos de populações é importante o uso de isolados monopustulares, pois o uso de “bulks” pode mascarar a verdadeira variabilidade genética devido a uma população homogeneizada artificialmente (Hamelin, 1996).

Uma baixa diversidade gênica de Nei foi encontrada na população estudada ($h = 0,027 \pm 0,064$). Maia (2009) e Nunes *et al.* (2009), estudando *H.*

vastatrix obtiveram um índice de diversidade gênica sete ($h = 0,194 \pm 0,130$) e dez vezes maiores ($h = 0,280 \pm 0,150$), respectivamente. O uso de isolados monopustulares, preconizado neste trabalho e para outras ferrugens como *P. violaceum* também repercutiu em baixa diversidade gênica de Nei utilizando o marcador AFLP (Gomez *et al.*, 2006).

A análise de agrupamento reforça a baixa diversidade gênica e genotípica, encontrada nas outras análises, o que sugere a ocorrência generalizada de isolados homogêneos de *H. vastatrix*. Este fato é verificado pelo alto grau de similaridade entre os isolados (> 90%), provavelmente resultante da introdução de isolados entre os Estados como consequência de troca de germoplasma dos hospedeiros ou da dispersão do patógeno a longas distâncias. Estes resultados estão de acordo com os observados por Gouveia *et al.* (2005) e Maia (2009), confirmando que as populações de *H. vastatrix* estão desestruturadas em relação ao tipo de hospedeiro e a origem geográfica.

A ausência da formação de grupo espacial, comprovada pela não correlação entre distância genética e geográfica com o Teste de Mantel ($r = -0,024$, $P = 0,74$) é um indicativo da ocorrência da dispersão dos uredíniosporos de *H. vastatrix* à longas distâncias. A importância do vento na dispersão de *H. vastatrix* foi comprovada pela presença de uredíniosporos a 1000 metros de altura com boa viabilidade e germinação (Martinez *et al.*, 1975). A dispersão pelo vento foi sugerida como a causa da introdução e a rápida disseminação da ferrugem do cafeeiro na América do Sul (Bowden *et al.*, 1971), notadamente no Brasil (Schieber & Zentmyer, 1984; Schieber, 1972; Chaves *et al.*, 1970). Para outros fungos causadores de ferrugem como *C. ribicola*, *M. epitea*, *P. triticina* e *M. larici-populina*, também foi relatada a não correlação entre distância geográfica e distância genética e, assim, ficou comprovado que eles também apresentam um mecanismo eficiente de disseminação a longas distâncias (Pei *et al.*, 2007; Mebrate *et al.*, 2006; Hamelin *et al.*, 2005; Hurtado & Ramstedt, 2002).

Pela abordagem bayesiana não foi encontrada nenhuma estruturação das populações, nem quanto ao hospedeiro nem quanto ao Estado de origem dos isolados. Para ambos os casos, uma população mista foi encontrada, onde todas as populações dividem os mesmos alelos em diferentes níveis, não havendo uma exclusividade de locos que pertencem somente a um grupo.

Assim, podemos inferir que está ocorrendo fluxo gênico entre as populações de *H. vastatrix* no Brasil.

Os baixos valores da diferenciação genética (G_{st}) encontrados nas populações de *H. vastatrix*, subdivididas pela região geográfica, indicam que há uma baixa diferença entre os isolados presentes nos Estados, o mesmo acontece quando comparamos à espécie hospedeira. Maia (2009) também encontrou uma baixa diferenciação genética entre os isolados agrupados por espécie hospedeira ($G_{st} = 0,026$). Diferentemente, Gouveia *et al.* (2005) relatou uma alta diferenciação genética nas populações provenientes de *C. arabica* ($G_{st} = 0,788$) e HDT ($G_{st} = 0,783$). No entanto, o alto valor de G_{st} relatado neste estudo é explicado pelas origens dos isolados de *H. vastatrix*, os quais foram provenientes de três continentes: África, Ásia e América do Sul.

Outro estudo, porém com isolados somente de Minas Gerais em dois sistemas de cultivo (orgânico e convencional) encontrou uma alta diferenciação genética média ($G_{st} = 0,220$; Nunes *et al.*, 2009), similar à encontrada por Gouveia *et al.* (2005) ($G_{st} = 0,260$) para isolados provenientes da América do Sul, porém este valor foi baixo quando comparado aos isolados da África ($G_{st} = 0,865$) e Ásia ($G_{st} = 0,768$).

O fluxo gênico entre as populações de patógenos contribui para evitar a diferenciação genética. O fato de o inóculo ser facilmente disperso pelo vento a longas distâncias permite tanto a dispersão do patógeno quanto a propagação da doença (Bowden *et al.*, 1971). Assim, o movimento fácil de propágulos pode ter contribuído para o fluxo gênico de *H. vastatrix* no Brasil.

Outro fato que ocorre no Brasil e facilita o fluxo de genes em *H. vastatrix* é a presença de grandes áreas contínuas de plantações de café, isto pode ser comprovado pelo maior valor do número de migrantes ($N_m = 22,14$) encontrado entre os Estados da Bahia e do Espírito Santo. Para outras ferrugens foram observadas duas situações, alto e baixo fluxo gênico, dependendo da presença ou ausência de grandes áreas contínuas dos hospedeiros (Keiper *et al.*, 2006; Hamelin *et al.*, 2000). Por exemplo, Hamelin *et al.* (2000) observaram um baixo fluxo gênico entre isolados de *C. ribicola* (ferrugem do pinheiro branco), na qual a ausência de hospedeiros entre o leste e o oeste dos EUA impediu a migração deste fungo. No presente trabalho também foi possível observar uma associação entre a diferenciação genética e a origem geográfica das populações do patógeno. A presença de várias

linhagens clonais e subpopulações na população do patógeno, e grande dispersão de raças e de genótipos idênticos foram encontrados para *P. graminis* f.sp. *avenae* em todas as regiões produtoras de cereais da Austrália, comprovando a alta taxa de fluxo gênico do patógeno (Keiper *et al.*, 2006).

Assim, áreas contínuas com plantações de café permitem um movimento gradual de epidemias de ferrugem e distribuição de genótipos. Se qualquer diferenciação genética é detectada nas populações de *H. vastatrix* é altamente provável que seja causada pelas práticas culturais utilizadas (Nunes *et al.*, 2009).

Por meio da AMOVA verificou-se que não houve diferença significativa entre as populações do patógeno definidas com base no hospedeiro e Estado de origem dos isolados. A maior porcentagem da variância genética (90%) ocorreu entre isolados dentro da subpopulação. Desse modo, mecanismos de variabilidade genética, concomitantemente com dispersões de inóculo, promovem grande variabilidade genética dentro da subpopulação. Essa variabilidade é conservada entre as populações, devido ao fluxo gênico que promove a homogeneização das frequências alélicas nas populações de *H. vastatrix*.

A deriva genética e fluxo gênico são os dois mecanismos evolutivos que podem estar associados com estes resultados. A ferrugem do cafeeiro foi primeiramente relatada no Brasil em 1970, aproximadamente 100 anos após seu relato no Ceilão. Assim, populações recentemente estabelecidas ainda refletiriam o efeito fundador, com menor diversidade gênica entre as populações (Nunes *et al.*, 2009). Por outro lado, constatou-se haver fluxo gênico entre as populações, o que contribuiu para uma menor diferenciação entre as mesmas.

A hipótese de recombinação sexual na população total ($n = 115$) de *H. vastatrix* foi rejeitada. Maia (2009), encontrou resultado semelhante não evidenciando a presença de recombinação sexual em sua população de estudo. Em outro trabalho, Nunes *et al.* (2009) detectaram o desequilíbrio de ligação em apenas 22% dos pares de testes realizados. Nos outros 78% dos testes, a hipótese nula de associação aleatória de alelos foi aceita. Se a recombinação sexual realmente existe, ela pode ser explicada pelo fenômeno da criptossexualidade descrita por Carvalho *et al.* (2011), a qual consiste na

ocorrência de uma reprodução sexuada dentro de uma estrutura assexuada, o uredíniosporo.

Portanto, todo esse conhecimento da variabilidade genética de fitopatógenos, como *H. vastatrix*, é essencial para a escolha de estratégias de manejo. O baixo grau de diferenciação em populações de *H. vastatrix* do Brasil é consistente com a introdução relativamente recente do patógeno e com a recente observação da ocorrência de suscetibilidade à ferrugem dos cultivares derivados de HDT. Além disso, esta grande variação dentro das populações do fungo no Brasil sugere uma alta taxa evolutiva e pode explicar a suplantação da resistência das cultivares derivadas de HDTI pela ferrugem.

5. CONCLUSÕES

- As raças XXIX e XXX de *H. vastatrix* foram relatadas pela primeira vez no Brasil.
- Um total de 11 novas raças de *H. vastatrix* foi relatado pela primeira vez no Brasil. Essas raças não possuem referência na literatura e foram nomeadas de raças UFV-Hv-01, UFV-Hv-02, UFV-Hv-03, UFV-Hv-04, UFV-Hv-05, UFV-Hv-06, UFV-Hv-07, UFV-Hv-08, UFV-Hv-09, UFV-Hv-10 e UFV-Hv-11 de *H. vastatrix*.
- As raças I, II, III, XIII e XV ocorrem tanto em *C. arabica* quanto em *C. canephora*.
- Os isolados de *H. vastatrix* apresentaram baixa diversidade genotípica.
- A maioria da variância genética foi encontrada entre os isolados dentro das subpopulações. Não houve diferenças significativas entre as populações de *H. vastatrix* definidas por hospedeiro ou Estado de origem.
- As populações de *H. vastatrix* encontraram-se desestruturadas com relação ao hospedeiro e origem geográfica.
- As populações de *H. vastatrix* apresentaram fluxo gênico e baixa diferenciação genética entre elas, sendo que a maior troca de indivíduos ocorreu entre as populações do Espírito Santo e da Bahia.
- A hipótese de acasalamento ao acaso foi rejeitada para a população estudada de *H. vastatrix*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGAPOW, P., BURT, A. 2001. Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes* 1:101-102.
- BATISTA, D., GUERRA-GUIMARÃES, L., TALHINHAS, P., LOUREIRO, A., SILVA, D.N., GONZALEZ, L., PEREIRA, A.P., VIEIRA, A., AZINHEIRA, H.G., STRUCK, C., SILVA, M.C., PAULO, O.S., VÁRZEA, V. 2010. Analysis of population genetic diversity and differentiation in *Hemileia vastatrix* by molecular markers. Resumo Congresso. 23 International Scientific Conference on Coffee - ASIC 2010. Bali, Indonésia.
- BOWDEN, J., GREGORY, P.H., JONHSON, C.G. 1971. Possible wind transport of coffee leaf rust across the Atlantic Ocean. *Nature* 229:500-501.
- BRITO, G.G., CAIXETA, E.T., GALLINA, A.P., MACIEL-ZAMBOLIM, E., ZAMBOLIM, L., DIOLA, V., LOUREIRO, M.E. 2010. Inheritance of coffee leaf rust resistance and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. *Euphytica* 173:255-264.
- CABRAL, P.G.C., ZAMBOLIM, E.M., ZAMBOLIM, L., LELIS, T.P., CAPUCHO, A.S., CAIXETA, E.T. 2009. Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes* 4:129-130.
- CARDOSO, R.M.L. 1986. Novas raças de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. no Brasil, métodos de identificação, e detecção de grupos fisiológicos em cafeeiros derivados do Híbrido de Timor. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.
- CAPUCHO, A.S., ZAMBOLIM, E.M., FREITAS, R.L., HADDAD, F., CAIXETA, E.T., ZAMBOLIM, L. 2012a. Identification of race XXXIII of *Hemileia vastatrix* on *Coffea arabica* Catimor derivatives in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes* 7:1-3.
- CAPUCHO, A.S., ZAMBOLIM, L., CABRAL, P.G.C., MACIEL-ZAMBOLIM, E., CAIXETA, E.T. 2012b. Climate favourability to leaf rust in Conilon coffee. *Australasian Plant Pathology* 1-4.
- CAPUCHO, A.S., CAIXETA, E.T., ZAMBOLIM, E.M., ZAMBOLIM, L. 2009. Herança da resistência do Híbrido de Timor UFV443-03 à ferrugem-do-cafeeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44:276-282.
- CARVALHO, C.R., FERNANDES, R.C., CARVALHO, G.M.A., BARRETO, R.W., EVANS, H.C. 2011. Cryptosexuality and the genetic diversity paradox in coffee rust, *Hemileia vastatrix*. *Plos one* 6:e26387.
- CHAVES, G.M., PEREIRA, A.A. 1980. Identificação de raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. In: Empresa de pesquisa agropecuária de Minas Gerais. Resumos de trabalhos realizados pelo Sistema Estadual de Pesquisas Agropecuárias. Belo Horizonte, 170-174.
- CHAVES, G.M., CRUZ FILHO, J., CARVALHO, M.G., MATSUOKA, K., COELHO, D.J., SHIMOYA, C.A. 1970. Ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*). Revisão de literatura com observações e comentários sobre a enfermidade no Brasil. *Seiva* 30:1-75.

- CRUZ, C.D., MEDEIROS, F.F., PESSONI, L.A. 2011. Estrutura genética de populações. In: CRUZ, C.D., MEDEIROS, F.F., PESSONI, L.A. Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética. p.219-315.
- CHINNAPPA, C.C., SREENIVASAN, M.S. 1965. Cytological studies on germinating teliospores of *Hemileia vastatrix*. *Caryologia* 18:625-631.
- DINIZ, L.E.C., SAKIYAMA, N.S., LASHERMES, P., CAIXETA, E.T., OLIVEIRA, A.C.B., ZAMBOLIM, E.M., LOUREIRO, M.E., PEREIRA, A.A., ZAMBOLIM, L. 2005. Analysis of AFLP markers associated to the Mex-1 resistance locus in Icatu progenies. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 5:387-393.
- EARL, D.A., VONHOLDT, B.M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4:359-361.
- ELYASI-GOMARI, S., PANTELEEV, V.K. 2006. Virulence polymorphism of *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* and effectiveness of Lr genes for leaf rust resistance of wheat in Ukraine. *Plant Disease* 90:853-857.
- ENJALBERT, J., DUAN, X., LECONTE, M., HOVMOLLER, M.S., VALLAVIEILLE-POPE, C. 2005. Genetic evidence of local adaptation of wheat yellow rust (*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*) within France. *Molecular Ecology* 14: 2065-2073.
- ESKES, A.B. 1982. The use of leaf disk inoculations in assessing resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). *Netherlands Journal of Plant Pathology* 88:127-141.
- EVANNO, G., REGNAUT, S., GOUDET, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611-2620.
- EXCOFFIER, L., LAVAL, G., SCHNEIDER, S. 2006. Arlequin ver 3.01. An integrated software package for population genetics data analysis. Computational and molecular population genetics Lab (CMPG). Institute of Zoology. University of Berne.
- EXCOFFIER, L., SMOUSE, P.E., QUATTRO, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- GICHURU, E.K., ITHIRU, J.M., SILVA, M.C., PEREIRA, A.P., VÁRZEA, V.M.P. 2012. Additional physiological races of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) identified in Kenya. *Tropical Plant Pathology* 37:424-427.
- GOMEZ, D.R., EVANS, K.J., HARVEY, P.R., BAKER, J., BARTON, J., JOURDAN, M., MORIN, L., PENNYCOOK, S.R., SCOTT, E.S. 2006. Genetic diversity in the blackberry rust pathogen, *Phragmidium violaceum*, in Europe and Australasia as revealed by analysis of SAMPL. *Mycological Research* 423-430.

- GOUVEIA, M.M.C., RIBEIRO, A., VÁRZEA, V.M.P., RODRIGUES JR, C.J. 2005. Genetic diversity in *Hemileia vastatrix* based on RAPD markers. *Mycologia* 97:396-404.
- GOPALKRISHNAN, K.S. 1951. Notes on the morphology of the genus *Hemileia*. *Mycologia* 43:271-283.
- GRÜNWALD, N.J., GOODWIN, S.B., MILGROOM, M.G., FRY, W.E. 2003. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology* 93:738-746.
- HAMELIN, R.C., ALLAIRE, M., BERGERON, M.J., NICOLE, M.C., LECOURE, N. 2005. Molecular epidemiology of white pine blister rust: recombination and spatial distribution. *Phytopathology* 95:793-799.
- HAMELIN, R.C., HUNT, R.S., GEILS, B.W., JENSEN, G.D., JACOBI, V., LECOURE, N. 2000. Barrier to gene flow between Eastern and Western populations of *Cronartium ribicola* in North America. *Phytopathology* 90: 1073-1078.
- HAMELIN, R.C., DUSABENYAGASANI, M., ET-TOUIL, K. 1998. Fine-level genetic structure of white pine blister rust populations. *Phytopathology* 88:1187-1191.
- HAMELIN, R.C. 1996. Genetic diversity between and within cankers of the white pine blister rust. *Phytopathology* 86:875-879.
- HANTULA, J., NIEMI, E.M, KAITERA, J., JALKANEN, R., KURKELA, T. 1998. Genetic variation of the resin top fungus in Finland as determined by random amplified microsatellites (RAMS). *European Journal of Forest Pathology* 28:361-372.
- HILL, M.O. 1973. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology* 54:427-432.
- HURTADO, S., RAMSTEDT, M. 2002. AFLP comparison of distant *Melampsora epitea* (willow rust) population. *Mycological Research* 106:1400-1407.
- ICO. www.ico.org/trade_statistics.asp (acessado em 08/01/2013).
- JACCARD, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la société vandoise des sciences naturelles* 44:223-270.
- JUSTESEN, A.F., RIDOUT, C.J., HOVMOLLER, M.S. 2002. The recent history of *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* in Denmark as revealed by disease incidence and AFLP markers. *Plant Pathology* 51:13-23.
- KEIPER, F.J., HAQUE, M.S., HAYDEN, M.J., PARK, R.F. 2006. Genetic diversity in Australian populations of *Puccinia graminis* f.sp. *avenae*. *Phytopathology* 96:96-104.
- KEIPER, F.J., HAYDEN, M.J., PARK, R.F., WELLINGS, C.R. 2003. Molecular genetic variability of Australian isolates of five cereal rust pathogens. *Mycological Research* 107: 545-556.

- KOLMER, J.A., ORDONEZ, M.E. 2007. Genetic differentiation of *Puccinia triticina* populations in Central Asia and the Caucasus. *Phytopathology* 97:1141-1149.
- KOLMER, J.A., LIU, J.Q., SIES, M. 1995. Virulence and molecular polymorphism in *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* in Canada. *Phytopathology* 85:276-285.
- KUBISIAK, T.L., ROBERDS, J.H., SPAINE, P.C., DOUDRICK, R.L. 2004. Microsatellite DNA suggests regional structure in the fusiform rust fungus *Cronartium quercuum* f.sp. *fusiforme*. *Heredity* 92:41-50.
- LEONARD, K.J., ANIKSTER, Y., MANISTERSKI, J. 2005. Virulence associations in oat crown rust. *Phytopathology* 95:53-61.
- MAIA, T.A. 2009. Análise da diversidade genética de *Hemileia vastatrix* e influência da espécie hospedeira em sua estrutura populacional. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG. 46p.
- MANTEL, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27:209-220.
- MARTINEZ, J.A., PALAZZO, D.A., KARAZAWA, M., MONTEIRO, M.V.M., REU, N.R.N. 1975. Presença de esporos de *Hemileia vastatrix* Berk & Br. agente causal da ferrugem do cafeeiro, em diferentes altitudes nas principais áreas cafeeiras dos Estados de São Paulo e Paraná (Brasil). *O Biológico* 41:77-88.
- MAYNARD SMITH, J., SMITH, N.H., O'ROURKE, M., SPRATT, B.G. 1993. How clonal are bacteria? *Proceeding of the National Academy of Sciences* 90:4384-4388.
- MAYNE, W.W. 1932. Annual report of coffee scientific officer, 1931-1932. Bangalou, Superintendent at the Government, 32 p. (Myssore Coffee Experiment Station- Bulletin, 7).
- MCCALLUM, B.D., ROELFS, A.P., SZABO, L.J., GROTH, J.V. 1999. Comparasion of *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* from South American and Europe. *Plant Pathology* 48:574-581.
- MCDONALD, B.A., LINDE, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40:349-379.
- MEBRATE, S.A., DEHNE, H.W., PILLEN, K., OERKE, E.C. 2006. Molecular diversity in *Puccinia triticina* isolates from Ethiopia and Germany. *Journal of Phytopathology* 154:701-710.
- MILGROOM, M.G. 1996. Recombination and the multilocus structure of fungal populations. *Annual Review of Phytopathology* 34:457-477.
- MORICCA, S., RAGAZZI, A. 1998. Use of RFLP and SSCP analysis to differentiate the pine rusts *Cronartium flaccidum* and *Peridermium pini*. *Mycological Research* 102:666-670.

- NEI, M., KUMAR, S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford: University Press. 333p.
- NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivision populations. Proceeding of the National Academy of Sciences 70:3321-3323.
- NUNES, C.C., MAFFIA, L.A., MIZUBUTI, E.S.G., BROMMONSCHENKEL, S.H., SILVA, J.C. 2009. Genetic diversity of populations of *Hemileia vastatrix* from organic and conventional coffee plantations in Brazil. Australasian Plant Pathology 38:445-452.
- PEI, M.H., BAYON, C., RUIZ, C., TUBBY, I. 2007. Population structure of poplar rust *Melampsora larici-populina* in the UK inferred from AFLP. Plant Pathology 56:472-479.
- PEI, M.H., WHELAN, M.J., HALFORD, N.G., ROYLE, D.J. 1997. Distinction between stem and leaf infecting forms of *Melampsora* rust on *Salix viminalis* using RAPD markers. Mycological Research 101:7-10.
- PRITCHARD, J.K., STEPHENS, M., DONNELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155:945-956.
- R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- RAEDER, U., BRODA, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Letters in Applied Microbiology 1:17-20.
- RAJENDREN, R.B. 1967a. New type of nuclear life cycle in *Hemileia vastatrix*. Nature 213:105-106.
- RAJENDREN, R.B. 1967b. A new type of nuclear life cycle in *Hemileia vastatrix*. Mycologia 59:279-285.
- RIDOUT, C.J., DONINI, P. 1999. Use of AFLP in cereals research. Trends in Plant Science 4:76-79.
- RODRIGUES JR, C.J. 2002. Centro de investigação das ferrugens do cafeeiro: Estudos e ensaios. Oeiras, Portugal, 55p.
- ROHLF, F.J. 2005. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Exeter.
- ROZO, Y., ESCOBAR, C., GAITÁN, A., CRISTANCHO, M. 2012. Aggressiveness and genetic diversity of *Hemileia vastatrix* during an epidemic in Colombia. Journal of Phytopathology 160:732-740.
- SAMILS, B., LAGERCRANTZ, U., LASCOUX, M., GULBERG, U. 2001. Genetic structure of *Melampsora epitea* populations in Swedish *Salix viminalis* plantations. European Journal of Plant Pathology 107:399-409.
- SANDLIN, C.M., STEADMAN, J.R., ARAYA, C.M. 1999. Isolates of *Uromyces appendiculatus* with specific virulence to landraces of *Phaseolus vulgaris* of Andean origin. Plant Disease 83:108-113.

- SILVA, D.G. 2000. Levantamento de raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* e resistência de clones de *Coffea canephora* var. Conilon à ferrugem. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG. 80p.
- STEELE, K.A., HUMPHREYS, E., WELLINGS, C.R., DICKINSON, M.J. 2001. Support for a stepwise mutation model for pathogen evolution in Australasian *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* by use of molecular markers. *Plant Pathology* 50:174-180.
- STODDART, J.A., TAYLOR, J.F. 1988. Genotypic diversity: estimation and prediction in samples. *Genetics* 118:705-711.
- VÁRZEA, V.M.P., MARQUES, D.V. 2005. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. Coffee durable resistance. In: ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E. M., VÁRZEA, V.M.P. (Eds). Durable resistance to coffee leaf rust. Viçosa, UFV, p.53-74.
- VÁRZEA, V.M.P., RODRIGUES, C.J., SILVA, M.C.M.L., GOUVEIA, M., MARQUES, D.V., GUERRA-GUIMARÃES, L., RIBEIRO, A. 2002. Resistência do cafeeiro a *Hemileia vastatrix*. In: ZAMBOLIM, L. (Ed) O estado da arte de tecnologias na produção de café. Viçosa, UFV, p.297-320.
- YEH, F.C., YANG, R., BOYLE, T. 1999. Popgene: Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. Edmonton: University of Alberta, Canadá.
- ZAMBOLIM, L., MACIEL-ZAMBOLIM, E., VALE, F.X.R., PEREIRA, A.A., SAKIYAMA, N.S., CAIXETA, E.T. 2005. Physiological races of *Hemileia vastatrix* in Brazil: physiological variability, current situation and future prospects. In: ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E. M., VÁRZEA, V.M.P. (Eds). Durable resistance to coffee leaf rust. Viçosa, UFV, p.75-98.
- ZAMBOLIM, L., VALE, F.X.R.D., PEREIRA, A.A., CHAVES, G.M. Manejo integrado das doenças do cafeeiro. 1999. In: ZAMBOLIM, L. (Ed) Produção de café com qualidade. Viçosa, UFV, p.134-215.
- ZAMBOLIM, L., CHAVES, G.M. 1974. Efeito de baixas temperaturas e do binômio temperatura-umidade relativa sobre a viabilidade dos uredosporos de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. e *Uromyces phaseolityca* Arth. *Experientiae* 151-184.