

ESTRUTURA GENÉTICA DA POPULAÇÃO DE *Hemileia vastatrix* COM BASE NO MARCADOR AFLP

Thiago Andrade Maia²; Eunize Maciel Zambolim³; Eveline Teixeira Caixeta⁴; Eduardo Seiti Gomide Mizubuti⁵; Mateus Ferreira Santana⁶; Laércio Zambolim⁷

¹ Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café - CBP&D/Café

² Doutorando, M. Sc., UFV, Viçosa-MG, thmaiaufv@yahoo.com.br

³ Pesquisador, D.Sc., UFV, Viçosa-MG, eunize@ufv.br, autor para correspondência

⁴ Pesquisador, D.Sc., Embrapa Café, Brasília-DF, eveline.caixeta@embrapa.br

⁵ Professor, Ph.D., UFV, Viçosa-MG, mizubuti@ufv.br

⁶ Mestrando UFV., Viçosa-MG, mateusferreirasantana@yahoo.com.br

⁷ Professor, Ph.D., UFV, Viçosa-MG, zambolim@ufv.com.br

RESUMO: A estrutura genética populacional de *Hemileia vastatrix* foi determinada usando o marcador AFLP em 91 isolados coletados em lavouras cafeeiras de Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo. Após ampliações seletivas, usando quatro combinações de *primers* (*EcoRI/MseI*), foram analisados 100 fragmentos polimórficos. Cada isolado apresentou um padrão único de alelos AFLP, constatando-se alta diversidade genotípica. A similaridade genética entre os isolados de *H. vastatrix* variou de 0,08 a 0,70, indicando alta variabilidade genética. Pela análise de agrupamento não foi observado a formação de grupos entre isolados do mesmo hospedeiro e origem geográfica. Não houve correlação entre distância genética e geográfica entre os isolados ($r = 0,307$, $P = 0,234$). Foi observada baixa diferenciação genética ($G_{ST} = 0,026$) entre as populações de *H. vastatrix* divididas por hospedeiros (*Coffea arabica*, *C. canephora* e Híbrido de Timor/Icatu). Os índices de diversidade gênica de Nei (H_T , H_S e G_{ST}) não mostraram diferença significativa entre as populações de *H. vastatrix* subdivididas por região geográfica. A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que a maior variância genética (99,56%) encontra-se dentro das populações do patógeno. O alto nível de diversidade genotípica encontrado entre os isolados sugere que as populações de *H. vastatrix* analisadas não são consistentes com a reprodução clonal e não estão estruturadas com relação ao hospedeiro e a origem geográfica. Os resultados obtidos demonstram que o fungo apresenta alto potencial evolutivo.

Palavras-chave: *Hemileia vastatrix*, genética de população, AFLP.

POPULATION STRUCTURE OF *Hemileia vastatrix* INFERRED FROM AFLP MARKERS

ABSTRACT: The population structure of *Hemileia vastatrix* was determined using AFLP markers in 91 isolates collected from coffee plantations in Minas Gerais, Espírito Santo and São Paulo. After selective amplification using four primers combinations (*EcoRI/MseI*), 100 polymorphic fragments were analyzed. Each isolate presented a unique pattern of AFLP alleles, accounting for high genotype diversity. The genetic similarity between the *H. vastatrix* isolates ranged from 0.08 to 0.70 indicating high genetic variability. Cluster analysis revealed that there was no formation of clusters between isolates of the same geographical origin and host. There was no correlation between genetic and geographical distance between the isolates ($r = 0.307$, $P = 0.234$). Low genetic differentiation ($G_{ST} = 0.026$) was observed among the populations divided on the host basis (*Coffea arabica*, *C. canephora* e Híbrido de Timor/Icatu). The genetics diversity index of Nei (H_T , H_S and G_{ST}) showed no significant difference among the *H. vastatrix* populations subdivided on the basis of geographical region. Analysis of molecular variance (AMOVA) showed that the major (99.56 %) genetic variance is found within the pathogen populations. The high genotype diversity found indicated that the *H. vastatrix* populations are not consistent with clonal reproduction and unstructured with regards to the host and geographical origin. The results obtained suggest that the fungus has high evolutive potential.

Key words: *Hemileia vastatrix*, population genetics, AFLP.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de café, responsável por 28% de toda produção mundial (FAO, 2009). O cultivo de café no país encontra-se, em sua maioria, na região Sudeste, onde estão os três principais Estados produtores: Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo, representando, respectivamente, 49, 25 e 9% da produção nacional (Conab, 2009).

A ferrugem causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. é a doença mais importante para o café, podendo ocasionar perdas de 30% na produção quando não se emprega o controle químico (Zambolim *et al.*, 1999). Embora a utilização da resistência genética em cafeeiros seja comprovadamente uma medida promissora e ideal no controle da doença (Zambolim *et al.*, 2005), a falta de conhecimento sobre a variabilidade genética de *H. vastatrix* dificulta a obtenção de cultivares com resistência durável.

Para entender os processos que conduzem à suplantação de genes de resistência do cafeeiro por *H. vastatrix* é necessário conhecer a maneira em que a população do patógeno está estruturada (McDonald & Linde, 2002). Estudos realizados no CIFC, com o marcador RAPD, mostraram a ocorrência de variabilidade genética em isolados classificados dentro da mesma raça fisiológica. Verificaram ainda que isolados de diferentes raças e origem geográfica

eram indistinguíveis a nível molecular, levando-os a conclusão de que a diversidade genética em *H. vastatrix* era moderadamente baixa e consistente com uma estrutura populacional clonal (Gouveia *et al.*, 2005).

Para que os estudos acerca da variabilidade genética de *H. vastatrix* sejam mais informativos é necessária a utilização de marcadores moleculares de maior resolução para detectar polimorfismos entre os isolados. Adicionalmente, é preciso a amostragem de um número maior de isolados em áreas geográficas representativas da cafeicultura brasileira. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade genética de *H. vastatrix* por AFLP, e verificar se o hospedeiro influencia a estrutura genética da sua população.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados de Hemileia vastatrix

Os isolados de *H. vastatrix* foram coletados entre maio e agosto de 2007 em lavouras cafeeiras de Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo. Em Minas Gerais as amostragens foram realizadas em três regiões: Alto Paranaíba, Sul de Minas e Zona da Mata. Foram coletadas 91 amostras de diferentes genótipos provenientes de *Coffea arabica*, *C. canephora* e derivados de Híbrido de Timor (HDT) e Icatu, sendo cada ponto de amostragem georeferenciado (Figura 1).

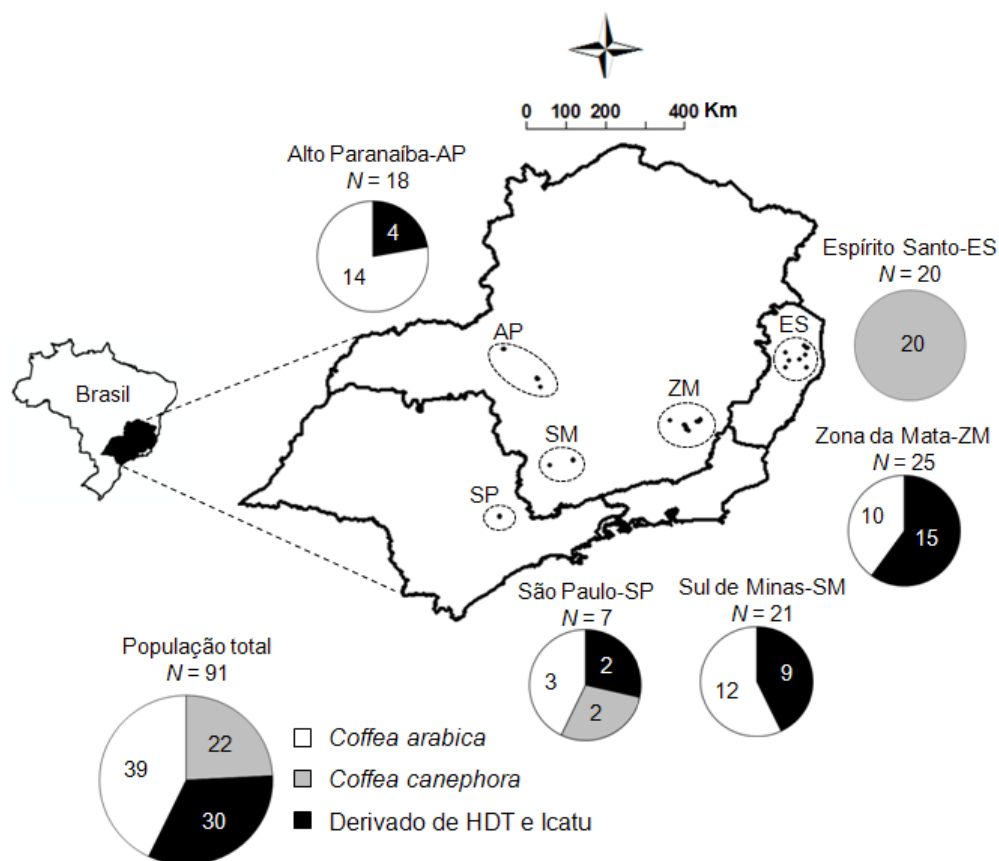


Figura 1 - Origem geográfica e número de isolados amostrados por região e hospedeiro.

A amostra foi constituída por aproximadamente 100 folhas de cafeeiro com pústulas esporulantes, retiradas aleatoriamente de um mesmo genótipo e local. As folhas de cada amostra foram acondicionadas em sacos individuais e transportadas para o laboratório BioCafé (BIOAGRO/UFV) em caixas de isopor. No laboratório, os urediniósporos de cada amostra foram transferidos diretamente para uma cápsula de gelatina, e considerados como um isolado.

Os isolados de *H. vastatrix* foram individualmente armazenados e multiplicados segundo metodologia de Zambolim & Chaves (1974), com adaptações. As inoculações foram realizadas com auxílio de um pincel, depositando-se os urediniósporos nas faces abaxiais de folhas jovens e completamente desenvolvidas, de mudas do cultivar Catuaí Vermelho IAC 44. Em seguida, aspergiu-se água destilada sobre as folhas até atingir um leve molhamento superficial. Após a inoculação, as plantas foram cobertas com saco plástico e transferidas para câmara de nevoeiro a 22°C, na ausência de luz, por 48 horas. Após este período, os urediniósporos que permaneceram na face abaxial das folhas foram removidos com algodão, para evitar a colonização de fungos hiperparasitas. As mudas inoculadas foram transferidas para compartimentos individuais, dentro de câmaras de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados até aparecimento abundante de urediniósporos.

Extração de DNA

Os DNAs genômicos de cada isolado de *H. vastatrix* foram extraídos de 30 a 50 mg de urediniosporos (Maia, 2009). Para verificar a pureza do DNA de *H. vastatrix* foram utilizados como controles os DNAs do fungo *Lecanicillium lecanii* (Zimmerm.) Zare & W. Gams, hiperparasita de *H. vastatrix* e de ‘Catuaí Vermelho IAC 44’, hospedeiro de multiplicação do fungo.

Marcadores AFLP

Os marcadores foram obtidos com o Kit AFLP® Analysis System I (Invitrogen) de acordo com manual de instruções e adaptações (Maia, 2009). Na etapa de amplificação seletiva foram utilizadas quatro combinações de primers *EcoRI* e *MseI* com três nucleotídeos adicionais (Tabela 1).

Análises dos dados

As diferenças nos padrões de eletroforese entre os isolados foram avaliadas visualmente. Os fragmentos AFLP foram codificados como caracteres binários: presença (1) ou ausência (0). Apenas bandas robustas e inequívocas que apresentaram polimorfismo entre os isolados foram consideradas nas análises. Para assegurar a confiabilidade dos dados, cerca de 10% dos isolados foram amplificados duas vezes (réplica) para cada combinação de iniciadores e carregados em dobro no gel em poços adjacentes.

A diversidade genotípica foi estimada pelos índices de Shannon-Wiener (H') e Stoddart e Taylor (G) (Hill, 1973; Stoddart & Taylor, 1988), usando o R package versão 2.6.2 (R Development Core Team, 2007). Após estimar a frequência alélica para cada loco, a análise da diversidade gênica de Nei (1973) foi realizada usando o programa POPGENE 1.31 (Yeh *et al.*, 1999).

Para avaliar a relação genética entre os isolados construiu-se um dendograma pelo método UPGMA com base no coeficiente de similaridade de Dice (Nei & Li, 1979), usando o programa NTSYS-pc versão 2.10 (Rohlf, 2005). A correlação entre similaridade genética e distância geográfica entre os isolados de *H. vastatrix* foi analisada pelo teste de Mantel (1967) no programa Arlequin 3.01 (Excoffier *et al.*, 2006). Para isso, a matriz de distância geográfica foi gerada calculando-se a distância em quilômetros entre os isolados, usando as coordenadas geográficas.

Para investigar a influência do hospedeiro na estrutura genética de *H. vastatrix*, os isolados foram agrupados em três populações, com base no hospedeiro: (i) *C. arabica*; (ii) *C. canephora* e (iii) derivados de HDT e Icatu. A distribuição dos locos nas populações de *H. vastatrix* foi analisada por meio do cálculo da porcentagem de locos polimórficos (P). Inicialmente as estimativas da diversidade gênica total (H_T), diversidade gênica intra-populacional (H_S) e a diferenciação genética (G_{ST}) foram calculadas entre as populações de *H. vastatrix* pelos índices de Nei (1973). Posteriormente, essas análises foram realizadas separadamente para cada população subdividida com base na região geográfica. Essas análises foram realizadas pelo programa POPGENE 1.31 (Yeh *et al.*, 1999). A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada de acordo com Excoffier *et al.* (1992), usando o programa Arlequin 3.01 (Excoffier *et al.*, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises dos fragmentos AFLP

As quatro combinações de primers geraram alto nível de polimorfismo, permitindo a análise de 100 bandas (Tabela 1). As réplicas foram idênticas baseadas nos marcadores AFLP, indicando a confiança dos dados. Os controles (*L. lecanii* e ‘Catuaí’) apresentaram padrões AFLP distintos e diferentes dos isolados de *H. vastatrix*, demonstrando a ausência de contaminação. Cada isolado de *H. vastatrix* produziu um padrão único de alelos AFLP constatando-se clara diferença entre eles. Os índices de diversidade genotípica de Shannon-Wiener (H') e Stoddart & Taylor (G) foram, respectivamente, de 4,51 e 91,0. A diversidade gênica de Nei (h) foi de 0,194 com desvio padrão de $\pm 0,13$.

Tabela 1 - Fragmentos polimórficos resultantes das quatro combinações de primers nos 91 isolados de *Hemileia vastatrix*.

Pares de primers	N ^a	Tamanho dos Fragmentos polimórficos (pb)
E-ACG / M-CTA	46	128, 130, 138, 140, 147, 148, 150, 152, 155, 157, 158, 160, 163, 165, 170, 192, 194, 196, 197, 200, 202, 204, 213, 215, 217, 218, 219, 222, 225, 227, 235, 248, 250, 252, 255, 258, 265, 272, 275, 280, 283, 285, 290, 295, 305, 315
E-ACT / M-CAT	24	176, 185, 187, 188, 193, 195, 203, 205, 215, 234, 236, 244, 248, 250, 301, 310, 315, 329, 331, 340, 365, 387, 390, 398
E-ACC / M-CTG	20	216, 235, 240, 245, 248, 254, 264, 270, 274, 281, 285, 292, 298, 304, 308, 310, 318, 380, 395, 400
E-ACT / M-CAC	10	143, 160, 168, 170, 172, 178, 180, 192, 211, 240
Total	100	

^aN = número de locos polimórficos analisados

O alto nível de diversidade genotípica encontrado entre os isolados sugere que a população de *H. vastatrix* não foi consistente com uma estrutura populacional clonal. Embora a fase de pínio e écio permaneça desconhecida

(Gopalkrishnan, 1951), estudos citológicos sobre o comportamento nuclear de *H. vastatrix* evidenciaram a ocorrência de cariogamia e meiose nos urediniosporos, estrutura denominada de “teliosporos uredinioides” (Rajendren, 1967a; 1967b). Dessa forma, a recombinação genética pode estar contribuindo para a alta variabilidade genética do fungo.

Similaridade genética e distância geográfica

A similaridade genética entre os isolados de *H. vastatrix* variou de 0,08 a 0,70 (Figura 2). A maior similaridade genética ocorreu entre os isolados ZMHT04 e ZMHT10 ambos coletados na região da Zona da Mata em genótipos derivados de Híbrido de Timor (HDT) (Figura 2). Constatou-se alta variabilidade genética entre os isolados. Não houve a formação de grupos entre isolados das mesmas origens geográficas e hospedeiros (Figura 2). Pelo teste de Mantel, não houve correlação entre distância genética e geográfica entre os isolados ($r = 0,307$, $P = 0,234$).

A ausência da formação de agrupamento espacial indica que a dispersão de urediniosporos de *H. vastatrix* ocorre a longa distância, possivelmente pela ação do vento.

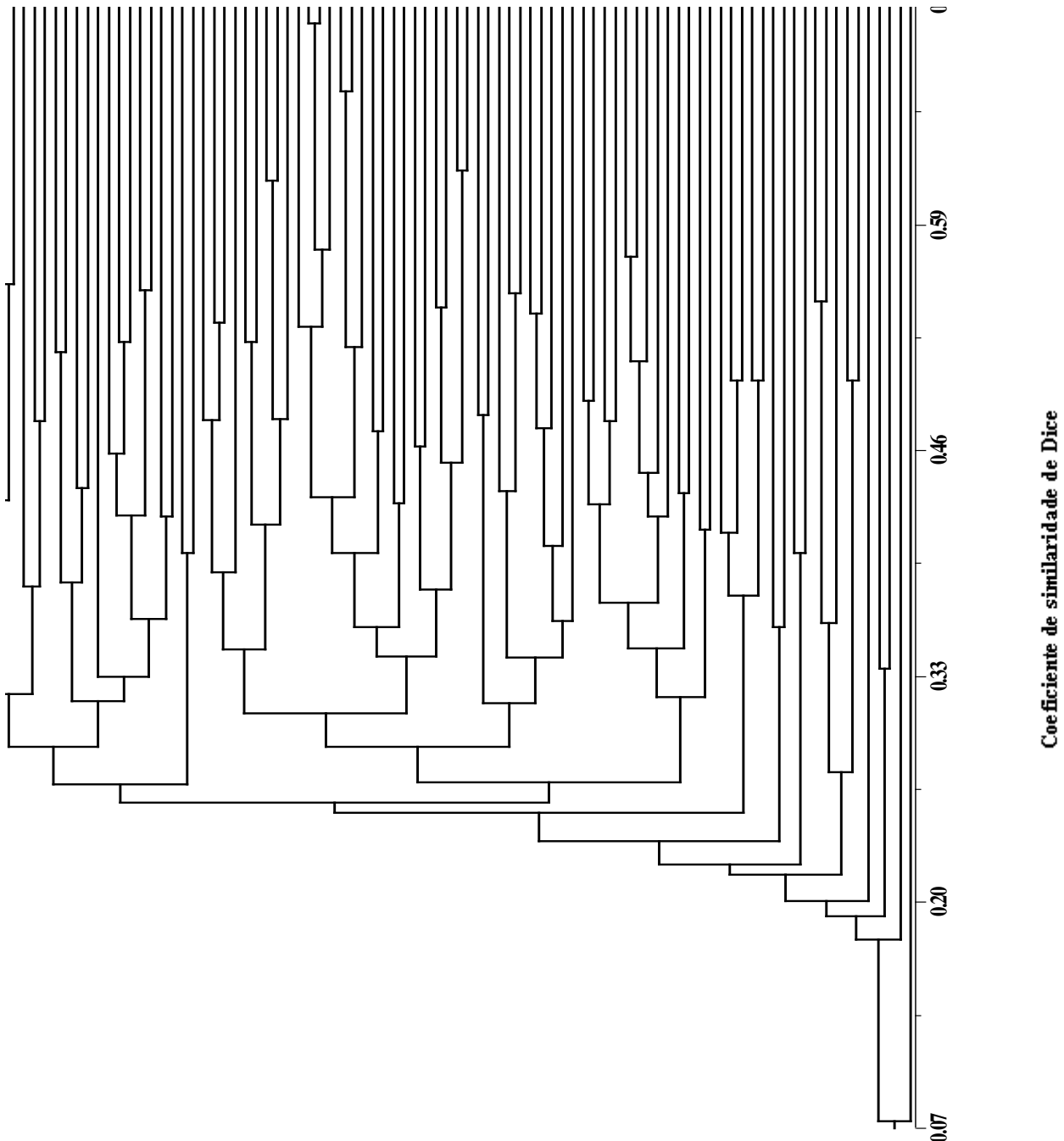


Figura 2 - Representação gráfica da similaridade genética entre os 91 isolados de *Hemileia vastatrix* obtido pelo método UPGMA com base no coeficiente de similaridade de Dice. Nomeou-se os isolado com uma sigla, as duas primeiras letras referem-se à origem geográfica: Alto Paranaíba (AP), Sul de Minas (SM), Zona da Mata (ZM), Espírito

Santo (ES) e São Paulo (SP). As duas últimas letras referem-se ao hospedeiro: *C. arabica* (CA), *C. canephora* (CC), derivado de HDT (HT) e derivado de Icatu (IC). O número corresponde à quantidade de isolados por origem geográfica.

Populações de Hemileia vastatrix

Os isolados de *H. vastatrix* foram divididos em três populações com base nos hospedeiros. A diversidade gênica total (H_T) encontrada foi de $0,193 \pm 0,017$, a diversidade gênica intra-populacional (H_S) foi de $0,188 \pm 0,016$ e o coeficiente de diferenciação genética entre populações (G_{ST}) de $0,026$. O baixo valor de diferenciação genética indica alta similaridade genética entre as populações de *H. vastatrix*.

Para verificar a influência do hospedeiro na estrutura genética do patógeno analisaram-se as populações separadamente. As populações procedentes de *C. arabica* e derivados de HDT e Icatu apresentaram maior número de locos polimórficos, 94 e 93%, respectivamente. Em contrapartida, menor percentagem de locos polimórficos foi encontrada na população de *C. canephora* (85%) (Tabela 2). Conforme os índices de Nei (H_T , H_S e G_{ST}), acessados nas populações subdivididas por região geográfica, não houve diferença significativa entre as três populações de *H. vastatrix* (Tabela 2).

Tabela 2 - Estimativa da diversidade genética nas populações de *Hemileia vastatrix* com base nas 100 marcas AFLP.

População	P^a	H_T^b	H_S^c	G_{ST}^d
<i>Coffea arabica</i>	94	$0,187 \pm 0,021$	$0,159 \pm 0,014$	0,151
<i>Coffea canephora</i>	85	$0,177 \pm 0,029$	$0,147 \pm 0,019$	0,168
HDT / Icatu*	93	$0,181 \pm 0,021$	$0,146 \pm 0,013$	0,194

* HDT / Icatu: genótipos derivados de HDT e Icatu - híbridos originados do cruzamento entre *C. arabica* e *C. canephora* (Bettencourt, 1973; Monaco & Carvalho *et al.*, 1975)

^a Percentagem de locos polimórficos

^b Diversidade gênica total

^c Diversidade gênica intra-populacional

^d Diferenciação genética entre subpopulações

Como os isolados de *H. vastatrix* foram multiplicados em 'Catuaí Vermelho IAC 44', que possui o gene de resistência S_{H5} (Bettencourt, 1968), não se descarta a possibilidade de seleção para isolados que possuem o gene de virulência correspondente. Deste modo, pode ter ocorrido uma redução nas populações naturais de *H. vastatrix* provenientes de *C. canephora* e derivados de HDT e Icatu, uma vez que nesses hospedeiros estão presente genes de resistência raça-específica que não estão presente em *C. arabica* (S_{H6} ao S_{H9}) (Bettencourt & Rodrigues Jr, 1988).

O valor da diferenciação genética (G_{ST}) encontrado nas populações de *H. vastatrix* subdivida pela região geográfica (Tabela 2), indica que há uma moderada diferença entre os isolados presentes nesses hospedeiros quando comparado à região a qual eles foram coletados (Figura 1).

Por meio da AMOVA (análise de variância molecular) verificou-se que a variância encontrada entre isolados dentro da população foi de 99,56%, e entre as populações de 0,44% (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise de variância molecular (AMOVA) entre e dentro as três populações de *Hemileia vastatrix* divididas com base no hospedeiro.

Fonte de variação	GL	SQ	CV	% variação	Valor P
Entre população	2	21,173	0,036	0,44	0,148
Dentro população	89	847,761	9,526	99,56	<0,001
Total	91	868,935	9,561		

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; CV = componente de variação

Assim sendo, mecanismos de variabilidade genética, concomitantemente com dispersões de inóculo, promovem grande variabilidade genética dentro da população. A variabilidade é conservada entre as populações, devido ao fluxo gênico, promovendo a homogeneização das frequências alélicas nas populações do patógeno.

CONCLUSÕES

- Os isolados de *H. vastatrix* apresentaram alta diversidade genotípica.
- As populações de *H. vastatrix* encontram-se desestruturadas com relação ao hospedeiro e região geográfica.
- A maioria da variância genética encontra-se entre isolados dentro da população. Não houve diferenças significativas entre as populações de *H. vastatrix* definidas com base no hospedeiro.
- Esses resultados demonstram que o fungo apresenta elevado potencial evolutivo o que contribui para a suplantação da resistência dos cultivares de café.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- BETTENCOURT, A.J. Melhoria Visando a Resistência do Cafeeiro à Ferrugem. **Bragantia** 27:35-68. 1968.
- BETTENCOURT, A.J. & RODRIGUES JR, C.J. Principles and Practice of Coffee Breeding for Resistance to Rust and Other Diseases. pp.199-234 In: CLARKE, R.J. & MACRAE, R. (Eds.) *Coffee: Agronomy*. London: Elsevier Applied Science. 1988.
- CONAB Acompanhamento da Safra Brasileira Café Safra 2009 - Primeira Estimativa - Janeiro/2009. Disponível em: <<http://conab.gov.br>> Acessado em: 22 de janeiro:2009.
- EXCOFFIER, L., LAVAL, G. & SCHNEIDER, S. 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. 2006.
- EXCOFFIER, L., SMOUSE, P.E. & QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** 131:479-491. 1992.
- FAO - FAO Statistics Division: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2009. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>> Acessado em: 22 de janeiro:2009.
- GOPALKRISHNAN, K.S. Notes on the morphology of the genus *Hemileia*. **Mycologia** 43:271-283. 1951.
- GOUVEIA, M.M.C., RIBEIRO, A., VÁRZEA, V.M.P. & RODRIGUES JR, C.J. Genetic diversity in *Hemileia vastatrix* based on RAPD markers. **Mycologia** 97:396-404. 2005.
- HILL, M.O. Diversity and evenness: A unifying notation and its consequences. **Ecology** 54:427-432. 1973.
- MAIA, T.A. Análise da estrutura genética da população de *Hemileia vastatrix* com base no marcador AFLP. Magister Scientiae, Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2009.
- MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research** 27:209-220. 1967.
- MCDONALD, B.A. & LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology** 40:349-379. 2002.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivision populations. **Proceeding of the National Academy of Sciences** 70:3321-3323. 1973.
- NEI, M. & LI, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceeding of the National Academy of Sciences** 76:5269-5273. 1979.
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2007.
- RAJENDREN, R.B. A new type of nuclear life cycle in *Hemileia vastatrix*. **Mycologia** 59:279-285. 1967a.
- RAJENDREN, R.B. New type of nuclear life cycle in *Hemileia vastatrix*. **Nature** 213:105-106. 1967b.
- ROHLF, F.J. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Exeter, Software. 2005.
- STODDART, J.A. & TAYLOR, J.F. Genotypic diversity: Estimation and prediction in samples. **Genetics** 118:705-711. 1988.
- YEH, F.C., YANG, R. & BOYLE, T. POPGENE. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Release 1.31. Edmonton: University of Alberta, Canada. 1999.
- ZAMBOLIM, L. & CHAVES, G.M. 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. 1974.
- ZAMBOLIM, L., VALE, F.X.R.D., PEREIRA, A.A. & CHAVES, G.M. Manejo integrado das doenças do cafeeiro. pp.134-215 In: ZAMBOLIM, L. (Ed.) *Produção de café com qualidade*. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa. 1999.
- ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E.M., VALE, F.X.R., PEREIRA, A.A., SAKIYAMA, N.S. & CAIXETA, E.T. Physiological races of *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. in Brazil. pp.75-115 In: ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E.M. & VARZEA, V.M.P. (Eds.) *Durable Resistance to Coffee Leaf Rust*. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa. 2005.