

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Hemileia vastatrix* UTILIZANDO MARCADOR MOLECULAR AFLP

Thiago Andrade MAIA^{1,2}, E-mail: biocafe@ufv.br; Eunize Maciel ZAMBOLIM^{1,2}; Eveline Teixeira CAIXETA^{1,3}; Robson Fernando MISSIO¹; Laércio ZAMBOLIM^{1,2}

¹Universidade Federal de Viçosa (UFV) / BIOAGRO, Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (BIOCAFÉ), 36.570-000, Viçosa-MG;

²UFV/Departamento de Fitopatologia; ³Embrapa Café. Apoio financeiro: EPAMIG/CNPq

Resumo:

Esse estudo teve como objetivo analisar a diversidade genética de 14 isolados de *Hemileia vastatrix* utilizando o marcador AFLP. Dentre eles, dois isolados do CIFC, Oeiras, Portugal biologicamente caracterizados como raça II, três do Brasil, caracterizados em 1986, como raça I, II e III, e nove provenientes de lavouras cafeeiras de Minas Gerais e Espírito Santo coletadas em 2006. As amplificações seletivas dos DNAs foram feitas utilizando quatro combinações de oligonucleotídeos iniciadores contendo três bases adicionais na extremidade 3'. As 93 bandas polimórficas analisadas geraram um dendrograma que dividiu os isolados em seis grupos. No grupo I foram agrupados os isolados de Portugal, Brasil (caracterizados como raças em 1986) e um isolado do Triângulo Mineiro, e no grupo II, os isolados da Zona da Mata, Alto Paranaíba e Sul de Minas Gerais. Os demais isolados formaram os grupos individuais III (região central de MG), IV (Zona da Mata, MG), V (Região Serrana, Espírito Santo) e VI (Zona da Mata, MG). A diversidade genética total (Ht) dos isolados agrupados dentro das nove populações definidas pelas origens foi de 0,313 e a diferenciação genética entre populações (Gst) de 0,916. Baseado no agrupamento UPGMA os isolados foram agrupados em seis populações onde a diversidade genética total (Ht) foi de 0,285 e a diferenciação genética entre populações (Gst) de 0,886. Esses resultados indicam que a variabilidade genética de *H. vastatrix* entre os isolados é bastante elevada e que os isolados provenientes do campo possuem baixa similaridade genética com as raças caracterizadas em 1986 e a raça II de Portugal. Um estudo mais amplo e detalhado envolvendo outros isolados, mais representativos da população atual no campo será necessário para definir os isolados prevalentes em cada região.

Palavras-chave: *Hemileia vastatrix*, diversidade genética, AFLP.

GENETIC DIVERSITY OF *Hemileia vastatrix* USING THE MOLECULAR MARKER AFLP

Abstract:

The objective of this study was to analyze genotypic diversity of 14 *Hemileia vastatrix* isolates by using AFLP markers. Among them, two isolates from CIFC, Oeiras, Portugal, biologically characterized as race II, three from Brazil, characterized in 1986 as race I, II and III, and nine field isolates, collected in 2006 in the Minas Gerais and Espírito Santo States coffee plantations. The selective amplifications of DNA were made using four primers combinations containing three selective nucleotides at the 3'-end. The analysis of 93 polymorphic bands generated a dendrogram which separated the isolates into six clusters. The cluster I was formed by the CIFC's race II, the Brazilian races, characterized in 1986, and one isolate from Triângulo Mineiro. The cluster II included the isolates from Zona da Mata, Alto Paranaíba and south of Minas Gerais State. The others isolates were separated among the individual clusters III (isolate from central area of MG), IV (isolate of Zona da Mata, MG), V (Serrana area of Espírito Santo State) and VI (Zona da Mata, MG). The total gene diversity (Ht) of the clustered isolates inside of the nine populations defined by the geographic origins was 0.313 and the genetic differentiation among populations (Gst) was 0.916. Based on the UPGMA method the isolates were clustered into six populations where the total genetic diversity (Ht) was 0.285 and the genetic differentiation among populations (Gst) was 0.886. Those results indicated that the genetic variability among *H. vastatrix* isolates is quite high and that the field isolates possess low genetic similarity with the races characterized in 1986 and the race II of Portugal. More extensive and detailed study of representative isolates in the current population of *H. vastatrix* in the Brazilian coffee fields are necessary to find out the prevalent ones.

Key words: *Hemileia vastatrix*, genetic diversity, AFLP.

Introdução

Entre os fatores que afetam a produtividade do café estão as doenças, em destaque, a ferrugem do cafeeiro causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk. et Br., que se não for devidamente controlada pode ocasionar prejuízos de 35% a produção (Zambolim et al., 1997).

A melhor forma de controlar a ferrugem do cafeeiro é por meio da utilização de cultivares portadores de genes de resistência, por ser mais econômica e não agredir o meio ambiente (Zambolim et al, 2003). Entretanto, apesar dos esforços dos melhoristas para a obtenção de variedades resistentes, tem se observado a doença em alguns desses cultivares, pelo surgimento de novas raças de *H. vastatrix* (Várzea & Marques, 2005).

A caracterização de raças fisiológicas de *H. vastatrix* é realizada pela série de cafeeiros diferenciadores do Centro Internacional da Ferrugem do Cafeeiro (CIFC, Portugal). Entretanto, o número de clones de cafeeiros existentes tem sido insuficiente para a caracterização de raças novas. Uma estratégia mais eficiente é o emprego de métodos moleculares que permitem a análise direta de polimorfismo de DNA, uma forma mais confiável de detectar a variação no organismo, especialmente de *H. vastatrix* cuja diversidade genética é pouco conhecida.

Os métodos moleculares RAPD, AFLP, RFLP e microssatélite têm sido utilizados para analisar a diversidade genética de ferrugens importantes como *Puccinia recondita* (Kolmer et al., 1995), *P. striiformis* (Steele et al., 2001), *Melampsora epitea* (Samils et al., 2001), *Cronartium flaccidum* (Morrica & Ragazzi, 1998), *Peridermium pini* (Hantula et al., 1998) e *H. vastatrix* (Gouveia et al., 2005).

O objetivo desse trabalho foi estudar a diversidade genética de isolados de *H. vastatrix*, utilizando o marcador molecular AFLP. Até o momento não existem relatos desse marcador para o estudo da variabilidade genética de *H. vastatrix*.

Material e Métodos

Os isolados e seus respectivos hospedeiros avaliados nesse estudo se encontram na Tabela 1. As raças I, II e III, foram biologicamente caracterizadas por clones diferenciadores da UFV/CIFC em 1986 (Cardoso, 1986). Isolados da raça II de *H. vastatrix* foram obtidas do CIFC (Oeiras/Portugal) em 2003 e 2004. Os urediniosporos das raças e dos isolados foram multiplicados em *Coffea arabica* 'Catuaí' e '*Coffea. excelsa*' para a obtenção dos DNAs.

Tabela 1. Origem geográfica e hospedeiros dos isolados e raças de *Hemileia vastatrix*.

Sigla	Isolados	Genótipo Hospedeiro	Origem
B1	Raça II	<i>C. arabica</i> *	África
B2	Raça II	<i>C. arabica</i> 'Mundo Novo'	Viçosa, MG - Zona da Mata
B3	Raça II	<i>C. arabica</i> *	África
B4	Raça I	Seleção KP 423	Caratinga, MG, Rio Doce
B5	Raça III	<i>C. arabica</i> 'Catuaí'	Campinas-SP
I1	Isolado I	<i>C. arabica</i> 'Oeiras'	Piranga, MG, Zona da Mata
I2	Isolado II	<i>C. arabica</i> 'Catuaí'	Araponga, MG, Zona da Mata
I3	Isolado III	<i>C. arabica</i> 'Obatã'	Mariana-MG, Região Central
I4	Isolado IV	<i>C. arabica</i> 'Catuaí'	Ervália-MG, Zona da Mata
I5	Isolado V	(H514-7-10-1)	Patrocínio-MG, Alto Paranaíba
I6	Isolado VI	Híbrido de Timor X 'Catuaí'	Senhora de Oliveira, MG- Zona da Mata
I7	Isolado VII	<i>C. arabica</i> 'Catimor'	São Sebastião do Paraíso, MG - Sul
I8	Isolado VIII	<i>C. arabica</i> 'Catuaí vermelho'	Capinópolis, MG, Triângulo Mineiro
I9	Isolado IX	<i>C. arabica</i> 'Catuaí'	Venda Nova dos Imigrantes, região serrana do ES

*Isolados da raça II proveniente do CIFC/Oeiras/Portugal.

Os DNAs genômicos dos isolados foram extraídos de 30 a 50 mg de urediniosporos de *H. vastatrix* macerados em nitrogênio líquido segundo Raeder & Broda (1985) com modificações. Os DNAs foram quantificados no espectrofotômetro SmartSpec 3000 e avaliados por eletroforese em gel de agarose. Foram incluídos como controles positivos os DNAs de *Verticillium hemileiae* e de *Acremonium* sp., fungos hiperparasistas de *H. vastatrix*, para excluir a possibilidade de contaminação desses fungos com os isolados. Da mesma forma, os DNAs, de *C. excelsa* e 'Catuaí', hospedeiras de multiplicação de *H. vastatrix*.

A análise da diversidade dos isolados de *H. vastatrix* por AFLP foi feita segundo o protocolo descrito por Vos et al. (1995) modificado. O DNA (concentração de 50 ng/μL) de cada amostra foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* (corte raro) e *MseI* (corte freqüente). Para reação de ligação foram adicionados às amostras os adaptadores, que foram então ligados às extremidades dos fragmentos de DNA digeridos em uma reação catalisada pela *T4* DNA ligase. As amostras foram amplificadas por PCR utilizando o produto da ligação dos adaptadores como DNA molde. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação pré-seletiva foram complementares aos sítios das enzimas de restrição e aos adaptadores com um nucleotídeo adicional seletivo na extremidade 3'. 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 etapa de amplificação seletiva foram utilizadas quatro combinações de oligonucleotídeos iniciadores com três nucleotídeos adicionais na extremidade 3', sendo o primeiro nucleotídeo correspondente ao utilizado na amplificação pré-seletiva. O programa de amplificação seletiva foi programado para 13 ciclos de desnaturação de 94° C por 30 segundos, anelamento de 65° C por 30 segundos (com rebaixamento de 0,7° C a cada ciclo) e extensão de 72° C por 60 segundos. A seguir foram realizados 23 ciclos de 94° C por 30 segundos, 56° C por 30 segundos e 72° C por 60 segundos. As reações foram desnaturadas a 95° C por cinco minutos antes do carregamento no gel de poliacrilamida desnaturante.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de bis-poliacrilamida 6% com tampão TBE a 1 X (100 mM de Tris-base, 100 mM de ácido bórico e 2 mM EDTA pH 8,0). A eletroforese foi efetuada numa potência constante de 80 W por aproximadamente 3 horas e meia.

Os géis foram revelados segundo protocolo adaptado de Creste et al., (2001) que consistiu em: 1) fixação em solução de ácido acético glacial (1%) e álcool etílico (10%); 2) lavagem em água ultrapura e pré-tratamento em ácido nítrico 1,5%; 3) tratamento com solução de nitrato de prata a 0,2%; 4) revelação pela imersão em solução contendo 30g/L de Na₂CO₃ acrescido de 600 µL/L de formaldeído a 37%. Os géis foram fixados em solução de ácido acético a 5% (solução bloqueadora) e lavados em água destilada. O gel corado foi mantido na posição vertical em local arejado para posterior análise dos fragmentos de DNA amplificados.

Na interpretação e análise dos géis, as bandas polimórficas para cada combinação de pares de oligonucleotídeos iniciadores foram identificadas com o número um (presença) e zero (ausência) para cada isolado de *H. vastatrix*. A distância genética foi calculada aos pares, utilizando-se o índice de similaridade de Jaccard (1908). A representação simplificada das distâncias genéticas foi efetuada por meio de dendrograma obtido pelo método hierárquico aglomerativo da média aritmética entre pares não-ponderados (UPGMA), com auxílio do programa GENES (Cruz, 1998).

A variabilidade genética existente entre as diferentes populações de *H. vastatrix* foi quantificada por meio do coeficiente de diversidade genética de Nei (1973). A estrutura genética das populações foi avaliada pelos cálculos da diversidade genética total (Ht), da diversidade genética média dentro de populações (Hs) e da diferenciação genética entre (Gst) as populações. A variabilidade genética foi avaliada de duas maneiras: os isolados foram agrupados dentro de nove populações definidas pelas origens, e dentro de seis populações previamente definidas pela análise de agrupamento UPGMA. Todos os cálculos das estimativas da diversidade genética foram realizados com o auxílio do programa Popgene versão 1.31 (Yeh et al., 1997).

Resultados e Discussão

As quatro combinações de oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 2) utilizadas na amplificação seletiva geraram 93 bandas polimórficas que foram utilizadas nas análises. Os controles (*V. hemileia*, *Acremonium* sp., *C. excelsa* e 'Catuaí') apresentaram diferentes padrões entre eles e os isolados de *H. vastatrix*. Esse resultado indica a ausência de contaminação do material em estudo.

Tabela 2. Fragmentos polimórficos obtidos pelas quatro combinações de iniciadores.

Código dos iniciadores	Nucleotídeos adicionais à extremidade 3'	Números de marcadores AFLP
EM01	E. AAC / M. CAA	15
EM02	E. AAG / M. CAC	18
EM03	E. ACA / M. CAA	30
EM04	E. AGC / M. CAG	30
Total de bandas polimórficas		93

O dendrograma gerado pela matriz de similaridade genética de Jaccard revelou seis grupos (Figura 1). O grupo I foi formado por seis isolados (B2, B5, B4, B1, B3 e I8) e o grupo II por quatro isolados (I5, I7, I4 e I2). Os grupos III, IV, V e VI correspondem aos isolados I3, I6, I9 e I1, respectivamente.

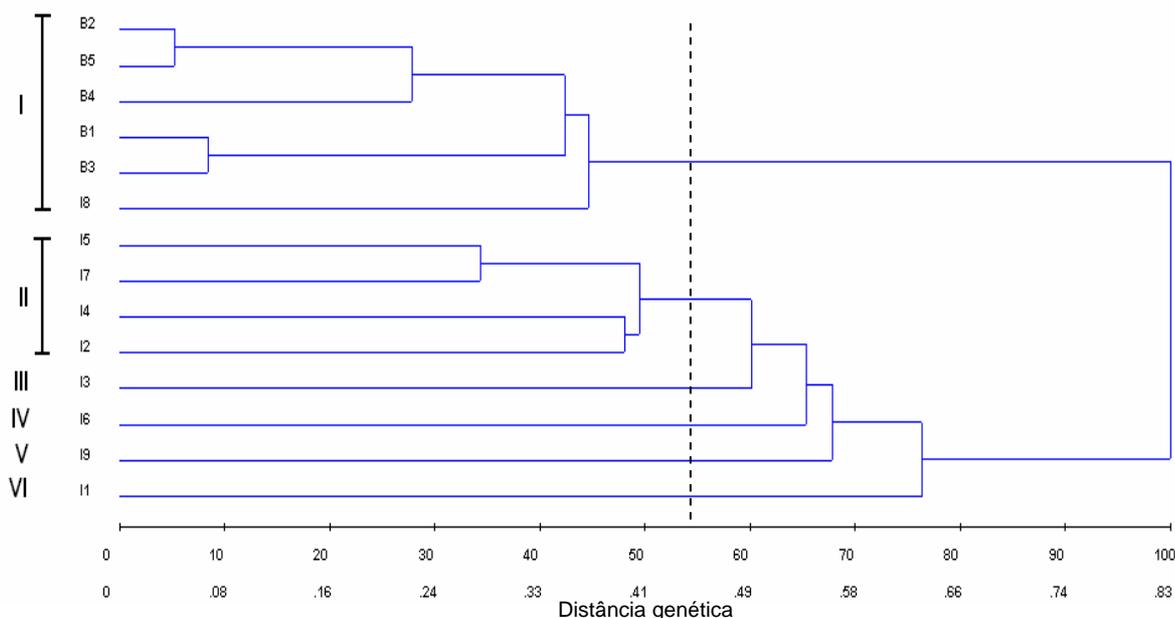


Figura 1. Dendrograma gerado pelo método UPGMA a partir das distâncias genéticas expressas em complementos de Jaccard com base na análise das 93 bandas (AFLP) polimórficas oriundas de quatro combinações de iniciadores. O significado das siglas se encontra na Tabela 1.

No estudo de diversidade, o isolado I8 coletado na região do Triângulo Mineiro (Tabela 1) foi único que agrupou com B4 (raça I), B1, B2 e B3 (raça II) e B5 (raça III). Este resultado demonstra a baixa similaridade genética dos isolados de *H. vastatrix* atualmente presentes nas lavouras cafeeiras com as raças I, II e III, caracterizadas em 1986. Os demais isolados se agruparam no grupo II ou em grupos isolados demonstrando a grande variabilidade do patógeno.

O conhecimento das mudanças genéticas nas populações de *H. vastatrix* é importante para dar suporte ao desenvolvimento de variedades resistentes. Nos estudos genéticos da resistência do cafeeiro à ferrugem, realizados no BIOCAFÉ têm se utilizado o isolado B2 (Tabela 1) como fonte de inoculo. Entretanto, a maioria dos isolados coletados recentemente (exceto I8) apresentaram-se distante geneticamente do B2 (Figura 2). Este fato evidencia a necessidade de utilizar outros isolados, mais representativos da população atualmente encontrada no campo, como fonte de inoculo para estudos de herança genética.

Para o estudo da diversidade genética entre os isolados, estes foram agrupados em populações de acordo com: (1) regiões de origens; e (2) o agrupamento de UPGMA.

Os isolados foram agrupados dentro das nove populações definidas pelas regiões de origens (Tabela 3), o valor da diversidade genética total (Ht) foi de 0,313 e a diferenciação genética entre populações (Gst) foi de 0,916 (Tabela 4). Portanto, aproximadamente 92% da diversidade genética total entre as populações podem ser explicados pelas bandas polimórficas geradas pelo marcador AFLP.

Tabela 3. Agrupamento dos isolados dentro de populações definidas pelas regiões de origens.

Origem	Isolados	Populações
CIFC	B1 e B3	I
Zona da Mata	B2, I1, I2, I4 e I6	II
Rio Doce	B4	III
Central	I3	IV
Alto Paraíba	I5	V
Sul de Minas	I7	VI
Triângulo	I8	VII
Venda Nova dos Imigrante - ES	I9	VIII
Campinas - SP	B5	IX

Com base no agrupamento UPGMA (Figura 1) a diversidade genética total (Ht) foi de 0,285 e a diferenciação genética entre populações (Gst) foi de 0,886 (Tabela 4), indicando que aproximadamente 89% da diversidade genética total encontra-se entre as populações estudadas. Gouveia et al (2005), utilizando marcas RAPD para estudar a diversidade genética de raças fisiológicas de *H. vastatrix* obtiveram menores índices de diversidade genética (Ht = 0,107 e Gst = 0,767). A diversidade genética encontrada entre os isolados brasileiros de *H. vastatrix* foi maior que a obtida por Gouveia et al (2005). Entretanto os resultados não podem ser comparados, uma vez que, o marcador AFLP utilizado nesse estudo é mais polimórfico que o RAPD.

Tabela 4. Estimativa da diversidade genética entre as populações baseado nas 93 bandas polimórficas AFLP.

Nível de comparação	H	Ht	Hs	Gst
Regiões	0,3292	0,3132	0,0264	0,9157
Agrupamento UPGMA	0,3302	0,2848	0,0324	0,8863

H - Diversidade genética de Nei (1973); Ht - Diversidade Genética total; Hs - Diversidade genética dentro de populações; Gst - Diferenciação genética entre populações.

Este trabalho é o ponto de partida para os estudos moleculares de diversidade genética de *H. vastatrix* no Brasil. A caracterização molecular de um número maior de isolados do fungo, representativos das diversas regiões cafeeiras do país e de diferentes genótipos terá continuidade no BIOCAFÉ/BIOAGRO/UFV. Esse estudo será de grande importância para a obtenção de variedades de cafeeiros com resistência duradoura à ferrugem.

Conclusões

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- 1- Os isolados de *H. vastatrix* apresentam alta variabilidade genética;
- 2- As marcas AFLP obtidas pelas quatro combinações foram eficientes para a análise da diversidade genética entre os isolados de *H. vastatrix*;
- 3- É necessário um estudo mais amplo e detalhado para definir os isolados prevalentes em cada região onde as variedades resistentes estão plantadas;
- 4- O marcador AFLP pode ser usado como uma ferramenta adicional, ao teste biológico, na caracterização de isolados.

Referências Bibliográficas

- Cardoso, R.M.L. (1986) Novas raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. no Brasil, Métodos de Identificação, e Detecção de Grupos fisiológicos em Cafeeiros Derivados do Híbrido de Timor. Viçosa: UFV, 1986. 102 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa.
- Crest, S., Tulmann, N., A, F. A. (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol Biol Repor.*, 19:4:299-306.
- Cruz, C. D. (1998) Genes versão 98.2.0: Programa para análise e processamento de dados baseado em modelos de genética e estatística experimental. Viçosa, MG: UFV.
- Gouveia, M.M.C., Ribeiro, A., Várzea, V.M.P., Rodrigues, C.J. (2005) Genetic diversity in *Hemileia vastatrix* based on RAPD markers. *Mycologia*, v. 97, p. 396-404.
- 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). *Eur J Forest Pathol* 28:361-372.
- Jaccard, P. (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Societé Vanddoise des Sciences Natureles*, v.44, p.223-270.
- 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.
- Moricca, S., Ragazzi, A. (1998) Use of RFLP and SSCP analysis to differentiate the pine rusts *Cronartium flaccidum* and *Peridermium pini*. *Mycol Res* 102:666-670.
- Nei, M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of American* 70: 3321-3323.
- Raeder, U., Broda, P. (1985) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letter of Applied Microbiology*, v.1, p. 17-20.
- Samils, B., Lagercrantz, U., Lascoux, M., Gullberg, U. (2001) Genetic structure of *Melampsora epitea* populations in Swedish *Salix viminalis* plantations. *Eur J Plant Pathol* 107:399-409.
- 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.
- Várzea, V.M.P., Marques, D.V. (2005) Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. pp.53-74 In: Zambolim, L.; Zambolim, E.M.; Várzea, V.M.P. (Eds.) *Durable Resistance to Coffee Leaf Rust*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Pelman, J., Kuiper, M. Zabeau, M. (1996) AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, v.23, p4407-4414.
- Yeh, F. C., Yang, R.C., Boyle, T. B. J., Ye, Z.H., Mao, J.X. (1997) POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. *Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada*.
- Zambolim, L., Vale, F.X.R.D., Pereira, A.A. & Chaves, G.M. (1997) Café (*Coffea arabica* L.): Controle de doenças causadas por fungos, bactérias e vírus. pp.83-180 In: VALE, F.X.R. & ZAMBOLIM, L. (Eds.) *Controle de doenças de plantas*. Viçosa-MG: Departamento de Fitopatologia, UFV.
- Zambolim, L., Vale, F. X. R.D., Zambolim, E.M. (2003) Produção Integrada do Cafeeiro: Manejo de Doenças. pp.443-508 In: Zambolim, L. (Ed.) *Produção Integrada de Café*. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa.