

THIAGO ANDRADE MAIA

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

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  
2009

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

T

M217a  
2009

Maia, Thiago Andrade, 1981-  
Análise da estrutura genética da população de  
*Hemileia vastatrix* com base no marcador AFLP / Thiago  
Andrade Maia. – Viçosa, MG, 2009.  
viii, 38f.: il. ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Laércio Zambolim.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 26-30.

1. Café - Doenças e pragas. 2. *Hemileia vastatrix*.
  3. Genética de população. 4. Marcadores moleculares.
  5. Ferrugem-do-cafeeiro. I. Universidade Federal de Viçosa.
- I.I. Título.

CDD 22.ed. 633.7394

THIAGO ANDRADE MAIA

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

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*.

APROVADA: 16 de fevereiro de 2009.

---

Pesq. Eveline Teixeira Caixeta  
(Co-orientadora)

---

Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti  
(Co-orientador)

---

Pesq. Eunize Maciel Zambolim

---

Prof. Ney Sussumu Sakiyama

---

Prof. Laércio Zambolim  
(Orientador)

*“Quem guarda com avareza os dons que recebeu de Deus é pobre, mas aquele que mesmo pouco ou nada tendo, sabe doar-se em ajuda ao próximo é rico, imensamente rico”*

*Ao meu pai, Junio*

*Ao meu irmão, Caetano*

*À minha avó Iza, ofereço.*

*À Mulher que, mesmo longe,*

*sempre esteve ao meu lado*

*Fátima, minha mãe, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Acima de tudo agradeço a Deus, pela vida e oportunidade de realizar meus sonhos.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade em realizar este curso.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao PNP&D/CAFÉ (Programa Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento de Café) pelo apoio financeiro para realização do trabalho.

Ao Prof. Laércio Zambolim pela orientação, amizade, ensinamentos e contribuições para o desenvolvimento do trabalho.

À minha co-orientadora Dr<sup>a</sup>. Eunize Maciel Zambolim, pela confiança, orientação e amizade, desde minha graduação contribuindo para meu crescimento profissional, sem a qual eu não poderia ter alcançado às conquistas que obtive.

À pesquisadora da Embrapa e co-orientadora Dr<sup>a</sup>. Eveline Teixeira Caixeta, pelo apoio, amizade, ensinamentos e colaborações durante a realização do trabalho.

Ao co-orientador Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti pelas contribuições nas análises estatísticas e desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Ney Sussumu Sakiyama, pelas sugestões e aconselhamentos.

Ao Dr. Antônio Fernando de Souza, à agrônoma Poliane Cardoso e ao laboratorista Sérgio Milagres pelas viagens de coletas dos isolados de *H. vastatrix*.

Ao Prof. Olinto Pereira pelo auxílio na caracterização morfológica do fungo *Lecanicillium lecanii*.

À bolsista de iniciação científica Patrícia Cabral pela ajuda nas inoculações.

Ao biólogo Mateus Santana pelo apoio no uso dos programas Multilocus, Arlequin e POPGENE.

A minha família, por terem me dado condições para que eu realizasse um sonho, e hoje colho com muito orgulho o que eles plantaram.

A minha namorada Lorene, pela companhia e momentos agradáveis.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, pelos valiosos conhecimentos transmitidos.

Aos amigos do laboratório, pelo convívio agradável. Em especial à Rejane, Patrícia, Poliane, Elaine, Bruna, Alexandre, Everton, Robson Míssio, Telma, Fernanda, Guilherme, Alessandra, Raphael, Geovani, Ana, Andréa, Alini, Bárbara, Flávia, Marcelo Tomaz, Kátia, Júlio Barbosa, Mateus, Samuel, Tiago, Jeferson, Gerson, Fernando Haddad, Fernando Paiva, Tesfahun, Robson Almeida e Flávio.

A todos os meus companheiros e ex-companheiros de república, pela amizade e pelos momentos de descontração. Em especial para o Alexandre, Henrique, Leonardo, Alessandro e o Daniel.

A toda minha família e aqueles que, de alguma forma, torceram por mim.

Muito Obrigado!

## **BIOGRAFIA**

THIAGO ANDRADE MAIA, filho de Junio Cesar Rezende Maia e Fátima Maria Andrade Maia, nasceu em Belo Horizonte, Minas Gerais, em 01 de março de 1981.

Em março de 2004 ingressou no curso de Bioquímica na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em 16 de março de 2007.

No período de 07/2004 a 02/2007 foi bolsista de iniciação científica no Departamento de Fitopatologia da UFV, onde desenvolveu atividades de pesquisa com marcadores moleculares RAPD e AFLP.

Em março de 2007 iniciou no Programa de Pós-graduação, em nível de Mestrado, em Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 16 de fevereiro de 2009.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. O cafeeiro.....	3
2.2. A ferrugem do cafeeiro .....	3
2.3. Variabilidade patogênica em <i>Hemileia vastatrix</i> .....	5
2.4. Estrutura genética de populações.....	5
2.5. Variabilidade molecular em <i>Hemileia vastatrix</i> .....	7
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	9
3.1. Isolados de <i>Hemileia vastatrix</i> .....	9
3.1.1. Origem geográfica dos isolados.....	9
3.1.2. Amostragem dos isolados.....	10
3.1.3. Multiplicação dos isolados .....	10
3.2. Extração de DNA .....	11
3.3. Marcadores AFLP .....	12
3.4. Análises dos dados .....	13
3.4.1. Marcadores AFLP.....	13
3.4.2. População total .....	13
3.4.3. Análise de agrupamento.....	13
3.4.4. Populações subdivididas.....	13
3.4.5. Acasalamento aleatório .....	14
4. RESULTADOS .....	15
4.1. Marcadores AFLP .....	15
4.2. População total.....	18
4.3. Análise de agrupamento.....	18
4.4. Populações subdivididas .....	18
4.5. Acasalamento aleatório .....	20
5. DISCUSSÃO .....	21
6. CONCLUSÕES .....	25
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	26
8. ANEXOS.....	31

## RESUMO

MAIA, Thiago Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Análise da estrutura genética da população de *Hemileia vastatrix* com base no marcador AFLP.** Orientador: Laércio Zambolim. Co-Orientadores: Eveline Teixeira Caixeta e Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

A obtenção de cafeeiros com resistência durável à ferrugem tem sido dificultada pela carência de informação sobre o potencial evolutivo de *Hemileia vastatrix*. Visando dar subsídios ao programa de melhoramento, a estrutura genética da população de *H. vastatrix* foi analisada com base no marcador AFLP. Para isso, amostrou-se 91 isolados do fungo em genótipos de *Coffea arabica*, *C. canephora* e derivados de Híbrido de Timor e Icatu cultivados nas principais regiões produtoras do Brasil. Após amplificação seletiva usando quatro combinações de *primers* (*EcoRI/MseI*), 100 fragmentos polimórficos foram analisados. Cada isolado apresentou um padrão único de alelos AFLP, demonstrando alta diversidade genotípica. A similaridade genética entre os isolados do patógeno variou de 0,08 a 0,70 e nenhuma formação de grupos foi observada no dendrograma. Não houve correlação entre similaridade genética e distância geográfica entre os isolados ( $r = 0,307$ ,  $P = 0,234$ ). Os isolados de *H. vastatrix* foram agrupados com base no hospedeiro em três populações (*C. arabica*, *C. canephora* e derivados de Híbrido de Timor/Icatu) e observou-se baixa diferenciação genética ( $G_{ST} = 0,026$ ) entre elas. Após analisar as populações subdivididas com base na região geográfica a diversidade gênica ( $H_T$ ,  $H_S$  e  $G_{ST}$ ) não variou significativamente entre as populações e com base na AMOVA verificou-se que a variância genética (99,56%) ocorre dentro da população de *H. vastatrix*. A análise do número de migrantes ( $Nm$ ) revelou alta taxa de fluxo gênico entre as populações originadas de hospedeiros distintos. Com base no índice de associação, a hipótese de acasalamento aleatório não foi rejeitada ( $I_A = 0,22$ ,  $P = 0,12$ ) para a população do fungo proveniente de *C. canephora*. Os resultados apresentados demonstram que a população de *H. vastatrix* não possui uma estrutura populacional clonal, indicando um alto potencial evolutivo, o que traria implicações diretas no manejo deste patossistema, principalmente na obtenção de variedade com resistência durável.

## ABSTRACT

MAIA, Thiago Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2009. **Analysis of population structure of *Hemileia vastatrix* inferred from AFLP markers.** Adviser: Laércio Zambolim. Co-Advisers: Eveline Teixeira Caixeta and Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

Obtaining coffee plants with durable resistance to coffee rust has been hindered by the lack of information about the evolutionary potential of *Hemileia vastatrix*. Seeking to give subsidies to the breeding program, the population structure of *H. vastatrix* was analyzed based on AFLP markers. To do this, 91 pathogen isolates were collected in genotypes from *Coffea arabica*, *C. canephora*, Híbrido de Timor and Icatu derivatives cultivated in the main production regions in Brazil. After the selective amplification using four primer combinations (*EcoRI/MseI*), 100 polymorphic fragments were analyzed. Each isolate presented a unique pattern of AFLP alleles, accounting for a high genotype diversity. The genetic similarity between the *H. vastatrix* isolates ranged from 0.08 to 0.70 and no cluster formations were observed in the dendrogram. There was no correlation between genetic and geographical distance between the isolates ( $r = 0.307$ ,  $P = 0.234$ ). *H. vastatrix* isolates were separated based on the host in three populations (*Coffea arabica*, *C. canephora* and Híbrido de Timor/Icatu derivatives) and low genetic differentiation ( $G_{ST} = 0.026$ ) was observed among them. After analyzing the populations, subdivided based on their geographical area, the genetic diversity ( $H_T$ ,  $H_S$  and  $G_{ST}$ ) showed no significant difference among the populations and based on AMOVA it was verified that a genetic variance (99.56%) exists within the pathogen populations. The analysis of the number of migrants ( $Nm$ ) revealed a high gene flow rate among the populations originating from different hosts. The association index showed that the hypothesis of random mating was not rejected among *H. vastatrix* isolates from the *C. canephora* population ( $I_A = 0.15$ ,  $P = 0.18$ ). The presented results show that *H. vastatrix* populations are not consistent with clonal reproduction indicating a high evolutionary potential, which would have direct implications in handling this pathosystem, mainly in the variety with durable resistance obtained.

## 1. INTRODUÇÃO

As duas espécies de cafeeiro exploradas comercialmente no Brasil são *Coffea arabica* (café arábica) e *C. canephora* (café robusta), que representam, respectivamente, 75 e 25% da produção nacional. 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, responsáveis, respectivamente, por 50, 26 e 8% da produção nacional (Conab, 2009).

A ferrugem causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* é a doença mais destrutiva para a cultura do café no Brasil. Quando não se emprega o controle químico, a ferrugem pode ocasionar perdas da ordem de 30% na produção (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* e também acerca dos mecanismos envolvidos na resistência dos genótipos utilizados nos programas de melhoramento dificultam a obtenção de cultivares com resistência durável (Várzea & Marques, 2005).

No Brasil, os programas de melhoramento do cafeeiro que visam resistência à ferrugem utilizam como fonte de resistência os híbridos tetraplóides Icatu, e principalmente, Híbrido de Timor (HDT). Esses híbridos interespecíficos, oriundos do cruzamento entre *C. arabica* e *C. canephora* (Bettencourt, 1973; Monaco & Carvalho, 1975), possuem vários genes de resistência à ferrugem introgridos de *C. canephora* (Bettencourt & Rodrigues Jr., 1988; Rodrigues Jr. *et al.*, 1975). Entretanto, muitas das variedades originadas desses híbridos têm tido a resistência suplantada pelo surgimento de novas raças de *H. vastatrix* (Fazuoli *et al.*, 2005; Zambolim *et al.*, 2005).

Tradicionalmente, a variabilidade genética em *H. vastatrix* tem sido determinada pelo padrão de infecção em uma série de clones diferenciadores de cafeeiros (Rodrigues Jr. *et al.*, 1975) e até o momento, 45 raças fisiológicas do patógeno foram caracterizadas (Silva *et al.*, 2006; Várzea & Marques, 2005). Nas populações de *H. vastatrix* analisadas no Brasil, até o ano de 1988, foram identificadas 12 raças (I, II, III, VII, X, XIII, XV, XVI, XVII, XXIII, XXIV, XXV ou XXXI), com predominância da raça II (Cardoso, 1986; Cardoso *et al.*, 1988;

Ribeiro *et al.*, 1975). Em 2008 detectou-se, pela primeira vez no país, a raça XXXVII (v<sub>2,5,6,7,9</sub>), raça que possui amplo espectro de virulência (Cabral *et al.*, 2008). O surgimento e alternância de raças do patógeno assim como a ocorrência de raças complexas ilustram o potencial evolutivo da população de *H. vastatrix*. Como consequência, o desenvolvimento de cultivares de cafeeiros com resistência durável representa desafio de grandes proporções.

Para entender os processos que conduzem à suplantação de genes de resistência é necessário conhecer a estrutura populacional do patógeno, uma vez que esta se refere ao padrão de variabilidade genética dentro e entre populações (McDonald & Linde, 2002). Estudos realizados com o marcador RAPD concluíram que a diversidade genética entre isolados de *H. vastatrix* provenientes da Ásia, África e América do Sul é moderadamente baixa, e que a reprodução assexuada desempenha papel importante na biologia populacional do fungo (Gouveia *et al.*, 2005). No entanto, estudos realizados com amostras do fungo coletadas em cultivos de cafeeiro orgânicos e inorgânicos do estado de Minas Gerais - Brasil, demonstraram que a população de *H. vastatrix* apresenta alta diversidade genotípica com indícios de acasalamento aleatório (Nunes *et al.*, 2009).

O objetivo desse estudo foi caracterizar a estrutura genética da população de campo de *H. vastatrix* em cafeeiros comerciais e experimentais das principais regiões cafeeiras do Brasil, utilizando o marcador AFLP, visando dar subsídios aos programas de melhoramento que visam à obtenção de resistência durável.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. O cafeeiro

O café, um dos produtos mais negociado no mundo, é produzido em mais de 60 países, proporcionando meios de subsistência para cerca de 25 milhões de famílias (IOC, 2009). O Brasil ocupa posição de destaque na produção mundial de café, sendo o seu principal produtor e exportador. Em 2007, o Brasil produziu 36 milhões de sacas beneficiadas correspondendo a 28% da produção mundial (FAO, 2009).

As duas espécies de café exploradas comercialmente são *Coffea arabica* (café arábica) e *C. canephora* (café conilon), representando, respectivamente, 75 e 25% da produção nacional. O cultivo de café no Brasil encontra-se, em sua maioria, na região Sudeste, onde estão os três principais Estados produtores: Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo representando, respectivamente, 50, 26 e 8% da produção nacional (Conab, 2009).

### 2.2. A ferrugem do cafeeiro

Dentre as doenças do cafeeiro, a ferrugem causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* é considerada a mais importante, principalmente para *C. arabica*, que se não controlada por fungicidas pode ocasionar danos em torno de 30% na produção (Zambolim *et al.*, 1999).

A primeira constatação da ferrugem do cafeeiro foi em 1861, na região do Lago Vitória, no leste da África, por um explorador inglês (Rodrigues Jr *et al.*, 1975; Schieber & Zentmyer, 1984). Nas Américas, o primeiro relato da doença foi no Brasil, em janeiro de 1970, por Arnaldo Gomes Medeiros, no município Aurelino Leal, Estado da Bahia (Chaves *et al.*, 1970). Após 10 anos de descoberta no Brasil, a ferrugem havia se espalhado por quase todos os países produtores de café da América Latina (Schieber & Zentmyer, 1984). Acredita-se que os urediniósporos do fungo foram trazidos para o Hemisfério Oeste por correntes de ventos vindos da Angola (Bowden *et al.*, 1971) ou introduzidos acidentalmente por órgãos de plantas, bagagens ou roupas contaminadas (Kushalappa, 1989).

O fungo biotrófico *H. vastatrix*, taxonomicamente pertence ao Filo Basidiomycota, Classe Urediniomycetes, Ordem Uredinales e Família Chaconiaceae (Cummins & Hiratsura, 2003; Kirk *et al.*, 2001). Seu ciclo de vida inicia-se quando o urediniósporo binucleado germina dando origem ao apressório. Em seguida, forma-se o peg de infecção na abertura do estômato para penetrar na folha do café. Após colonização, as hifas somáticas se desenvolvem e agregam para formar um estroma na região subestomática. No estroma origina-se o esporóforo o qual atravessa o estômato e produz urediniósporo, que constitui a fase repetitiva do fungo, e durante um período determinado do ano, o teliósporo binucleado (Chinnappa & Sreenivasan, 1968). Antes da germinação do teliósporo ocorre a cariogamia. O núcleo diplóide migra para o promicélio desenvolvido, onde a meiose é completada, resultando na formação de quatro células no promicélio, cada célula contendo um núcleo. Ocorre então a formação de quatro esterigmas, um em cada célula, sustentando terminalmente um basidiósporo e o núcleo haplóide de cada célula do promicélio migra para dentro dos basidiósporos (Vishveshwara & Nag Raj, 1960). Todas tentativas de infecção artificial com basidiósporo em café não tiveram sucesso e em nenhuma outra espécie de planta inoculada houve a formação da fase sexuada no ciclo de vida de *H. vastatrix* (Gopalkrishnan, 1951).

Em estudos citológicos sobre o comportamento nuclear de *H. vastatrix* foi proposto uma alteração no seu ciclo de vida a partir da descrição da ocorrência de cariogamia e meiose nos urediniósporo, estrutura denominada “teliósporo uredinióide” (Rajendren, 1967a; b). No entanto, esse ciclo, chamado de “fenômeno-kamat” não foi observado posteriormente (Chinnappa & Sreenivasan, 1968). Entretanto, recentes pesquisas no Brasil também evidenciaram a ocorrência de cariogamia e meiose nos teliósporos uredinióides de *H. vastatrix* (Fernandes, 2007). Sendo assim, os urediniósporos do fungo são na verdade propágulos versáteis, podendo funcionar como estrutura de dispersão, infecção e também para a recombinação sexuada (Fernandes, 2007).

### **2.3. Variabilidade patogênica em *Hemileia vastatrix***

Tradicionalmente, a variabilidade genética em *H. vastatrix* tem sido determinada pelo padrão de infecção em uma série de clones diferenciadores de cafeeiros. Os primeiros estudos sobre a especialização fisiológica do patógeno foram realizados na Índia na década de 1930 (Mayne, 1932). Após a criação do Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), em Oeiras, Portugal, em 1955, pesquisas foram intensificadas com a análise de amostras de uredinósporos provenientes de diferentes países (Rodrigues Jr. *et al.*, 1975). Até o momento, 45 raças do patógeno foram caracterizadas no CIFC (Silva *et al.*, 2006; Várzea & Marques, 2005). No Brasil, até 1988, 12 raças fisiológicas de *H. vastatrix* (I, II, III, VII, X, XIII, XV, XVI, XVII, XXIII, XXIV, XXV ou XXXI) foram identificadas, sendo a raça II encontrada com maior frequência (Cardoso, 1986; Cardoso *et al.*, 1988; Ribeiro *et al.*, 1975). Recentemente, foi detectada a raça XXXVII (v<sub>2,5,6,7,9</sub>), que possui amplo espectro de virulência (Cabral *et al.*, 2008).

Os mecanismos que conduzem à formação de novas raças de *H. vastatrix* não são bem compreendidos. Como a fase sexuada ainda não foi encontrada (Gopalkrishnan, 1951), pesquisadores consideram a mutação como o principal mecanismo responsável pela variação da virulência no fungo (Várzea & Marques, 2005; Várzea *et al.*, 2002).

### **2.4. Estrutura genética de populações**

Estrutura genética refere-se à quantidade e distribuição da diversidade genética dentro e entre populações (McDonald & Linde, 2002). Normalmente as estimativas de diversidade gênica e diversidade genotípica são obtidas para inferir sobre a estrutura genética. A diversidade gênica refere-se ao número e frequência de alelos em um loco individual na população. Enquanto que a diversidade genotípica corresponde ao número de indivíduos geneticamente distintos na população (McDonald & Linde, 2002).

Os estudos da elucidação da estrutura genética de populações de fitopatógenos tiveram grandes avanços com o uso de marcadores moleculares (Brown, 1996; McDonald, 1997). Essas ferramentas possibilitam o estudo da variabilidade de fitopatógenos com menos ambiguidade e sem a interferência

do ambiente, ao contrário do que acontece nos estudos de virulência (McDermott & McDonald, 1993; Mebrate *et al.*, 2006).

O conhecimento da estrutura genética de fitopatógenos é essencial para o entendimento dos processos que conduzem a suplantação de genes de resistência. A estrutura genética pode ser condicionada pelos mecanismos evolutivos de mutação, tamanho efetivo da população, fluxo gênico, sistema de reprodução e seleção (McDonald & Linde, 2002).

A mutação corresponde em mudanças na sequência de nucleotídeos que compõem o genoma dos indivíduos. O número de mutantes é influenciado pelo tamanho da população. Desta forma, patógenos que apresentam grandes populações possuem maior número de mutantes do que aqueles com pequenas populações (McDonald & Linde, 2002). O fluxo gênico corresponde à migração de indivíduos entre populações separadas geograficamente. Em populações de patógeno com alto nível de fluxo gênico espera-se grande diversidade genética (McDonald & Linde, 2002).

O sistema de reprodução afeta a forma em que a diversidade gênica está distribuída entre indivíduos dentro da população. A reprodução de fitopatógenos pode ser sexuada, assexuada ou mista. As populações de patógenos com sistema de reprodução mista possuem vantagens sobre aquelas que apresentam reprodução estritamente sexuada ou assexuada, uma vez que nos ciclos sexuais novas combinações de alelos são criadas por recombinação. Esses novos genótipos quando são testados em diferentes ambientes, por exemplo, pela introdução de um cultivar resistente, as combinações de alelos mais adaptadas são mantidas por reprodução assexuada e sua frequência é aumentada na população (McDonald & Linde, 2002).

A seleção é o principal mecanismo para a mudança na frequência de alelos mutantes na população. Em relação ao hospedeiro, a pressão de seleção na população do patógeno pode ser exercida por resistência raça-específica e raça não-específica. A seleção imposta pela resistência raça-específica ocorre quando genes de resistência (codificador de um receptor) tornam-se distribuídos numa extensa área geográfica. Isso conduz ao aumento da frequência de mutantes virulentos os quais perderam o elicitador (alelo de avirulência) conduzindo à suplantação da resistência. A seleção imposta pela

resistência raça não-específica não é baseada no modelo receptor-elicitador, podendo ser exercida sobre todas as raças do patógeno. No entanto, esse tipo de seleção é mais difícil de ser observado, pois há fortes interações entre genótipo-ambiente para as características quantitativas tanto na planta como no patógeno (McDonald & Linde, 2002).

Pesquisas usando AFLP mostraram que a resistência raça-específica impõe forte seleção na população de *Cronartium ribicola* (ferrugem do pinheiro), resultando na redução da diversidade genética da população do patógeno, enquanto nenhuma evidência de seleção foi observada em hospedeiros com resistência raça não-específica (Richardson *et al.*, 2008). Experimentos com marcadores SSR demonstraram correlação entre patótipos e genótipos de isolados de *Puccinia triticina* (ferrugem da folha do trigo). A alta correlação foi atribuída à reprodução clonal associada com pressão de seleção exercida pelos cultivares de trigo (Goyeau *et al.*, 2007).

## **2.5. Variabilidade molecular em *Hemileia vastatrix***

Até o momento, o estudo da diversidade genética em *H. vastatrix* por meio de marcadores moleculares foi pouco explorado. Estudos realizados no CIFC, com uso do marcador RAPD, mostraram a ocorrência de variabilidade genética em isolados classificados na mesma raça fisiológica. Entretanto, verificaram que isolados de diferentes raças e origem geográfica eram indistinguíveis a nível molecular, concluindo que a diversidade genética em *H. vastatrix* é moderadamente baixa e consistente com uma estrutura populacional clonal (Gouveia *et al.*, 2005).

Estudos comparativos entre populações de *H. vastatrix* de cafeeiros orgânicos e convencionais, mostraram por RAPD, que a diversidade genética foi maior em populações provenientes de cultivo orgânico (Nunes *et al.*, 2007). A maior diversidade foi atribuída à menor pressão de seleção exercida pelo sistema orgânico de cultivo sobre o patógeno. No entanto, com base na AMOVA, não houve diferenças significativas entre as populações do patógeno provenientes dos dois sistemas de cultivo.

Desse modo, são escassos os estudos que utilizaram marcadores moleculares para estudar a variabilidade genética de *H. vastatrix*. Além disso,

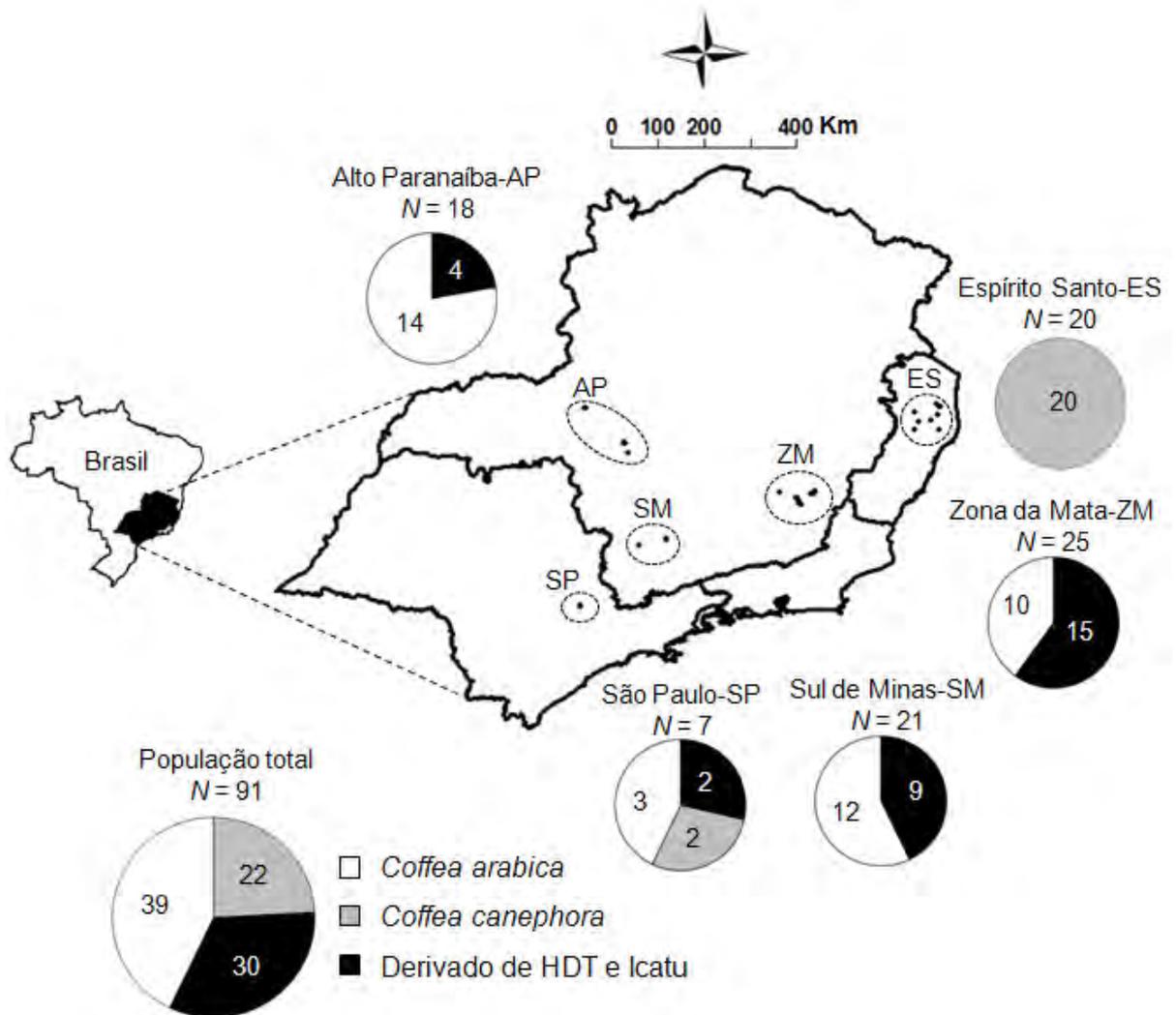
existe a necessidade da utilização de marcadores mais robustos e com capacidade de detectar maior polimorfismo entre os isolados. O marcador AFLP já foi empregado para discriminar isolados de *H. vastatrix* (Maia *et al.*, 2007), apresentando alto nível de polimorfismo. Entretanto, para a utilização desse tipo de marcador, há a necessidade de amostrar um maior número de isolados, em áreas geográficas representativas distintas de cultivo.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Isolados de *Hemileia vastatrix*

##### 3.1.1. Origem geográfica dos isolados

Os isolados de *H. vastatrix* foram coletados entre maio e agosto de 2007, nos três principais Estados produtores de café do Brasil: 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. Nessas regiões foram coletados 91 amostras e cada ponto de amostragem foi georeferenciado. Na Figura 1, encontra-se a distribuição das regiões com os respectivos números de isolados.



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

### **3.1.2. Amostragem dos isolados**

Cada amostra foi constituída por aproximadamente 100 folhas de cafeeiro, apresentando pústulas esporulantes, retiradas aleatoriamente de genótipos de um único hospedeiro. As folhas 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.

### **3.1.3. Multiplicação dos isolados**

Os isolados de *H. vastatrix* foram armazenados e multiplicados, segundo metodologia descrita por Zambolim & Chaves, (1974), com adaptações. A viabilidade dos urediniósporos foi preservada colocando-se as cápsulas dentro de Becker, colocados em dessecador contendo solução de ácido sulfúrico a 32,6%, para manter a umidade relativa do ar em 50%. A inoculação foi realizada com auxílio de um pincel, depositando-se os urediniósporos de *H. vastatrix* 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 recobertas com saco plástico, para evitar mistura, e foram 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 usando algodão, para evitar a colonização de fungos hiperparasitas. As plantas foram levadas para câmaras de crescimento contendo compartimentos individuais para cada isolado, a 22°C e fotoperíodo de 12 horas, até aparecimento abundante de urediniósporos.

### 3.2. Extração de DNA

Os DNAs genômicos dos isolados de *H. vastatrix* foram extraídos de 30 a 50 mg de urediniósporos, segundo protocolo de Raeder & Broda (1985), com adaptações. Os urediniósporos foram triturados com auxílio de nitrogênio líquido e transferidos para tubos de 1,5 ml, onde foi adicionado tampão de extração (Tris-HCl 200 mM pH 8,0, NaCl 250 mM, EDTA 50 mM e SDS 2%). A seguir, os tubos foram mantidos a 65°C por 30 minutos e, posteriormente, foi adicionado clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após agitação em vórtex e incubação no gelo por 30 minutos, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm (13.500 g) por 30 minutos. Os sobrenadantes foram cuidadosamente transferidos para tubos novos, onde foi adicionado igual volume de isopropanol. Os tubos foram novamente centrifugados e os sobrenadantes descartados. Os *pellets* foram ressuspensos em água milliQ autoclavada, as suspensões tratadas com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e, após incubação no gelo por 10 minutos, centrifugadas a 12.000 rpm (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. Após incubação no gelo por 1 hora, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm (13.500 g) por 30 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos, os DNAs genômicos foram precipitados com isopropanol, lavados com etanol 70% e ressuspensos em TE (Tris-HCl 10mM pH 8,0 e EDTA 1 mM). Em seguida, foi acrescentado RNase 10 ng/μl, deixando a suspensão a 37°C por 15 minutos. Os DNAs foram quantificados no espectrofotômetro SmartSpec 3000 e sua qualidade avaliada por eletroforese em gel de agarose. Os DNAs foram diluídos para a concentração de 50 ng/μl e armazenados a - 20°C até o uso.

Para verificar a pureza do DNA de *H. vastatrix* foram utilizados como controles: (i) DNA do fungo *Lecanicillium lecanii*, hiperparasita de *H. vastatrix* (Carrión & Rico-Gray, 2002; Vandermeer *et al.*, 2009) que foi extraído com o mesmo protocolo usado para *H. vastatrix* e (ii) DNA de 'Catuaí Vermelho IAC 44', hospedeiro de multiplicação do patógeno, que foi extraído segundo protocolo de Diniz *et al.* (2005).

### 3.3. Marcadores AFLP

Os marcadores foram obtidos utilizando o Kit AFLP<sup>®</sup> Analysis System I (Invitrogen) de acordo com manual de instruções, com adaptações. Para isso, 250 ng/μl de DNA foram digeridos com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *MseI* [1,25 U/μl em Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, BSA 0,1 mg/ml, glicerol 50 % (v/v), Triton<sup>®</sup> X-100 0,1%] a 37°C por 3 horas. Após inativação das enzimas a 70°C, foram adicionados ao tubo, solução de ligação/adaptadores [adaptadores *EcoRI/MseI*, ATP 0,4 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), acetato de Mg 10 mM, acetato de K 50 mM] e T4 DNA ligase [1 U/μl em Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), DTT 1 mM, KCl 50 mM, glicerol 50% (v/v)]. Após 3 horas a 22°C, o material foi diluído 1:10 em TE [Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 0,1 mM] e armazenado a - 20°C até a próxima etapa.

A pré-amplificação foi realizada utilizando, para cada reação, 2,5 μl do DNA digerido e ligado aos adaptadores (diluído), 2,5 μl do tampão 10X PCR plus Mg [Tris-HCl 200 mM (pH 8,4), MgCl<sub>2</sub> 15 mM, KCl 500 mM], 20 μl de mix de pré-amplificação (iniciadores *EcoRI* e *MseI* + dNTPs) e 0,5 μl *Taq* DNA polimerase (5U/μl). A amplificação do DNA foi realizada em 23 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 56°C por 60 segundos e extensão a 72 °C por 60 segundos. Após a amplificação, cada amostra foi diluída 1:20 em TE [Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 0,1 mM] e armazenado a - 20°C.

Na etapa de amplificação seletiva foram utilizadas quatro combinações de iniciadores *EcoRI* e *MseI* com três nucleotídeos adicionais, sendo o primeiro o mesmo da amplificação pré-seletiva (Tabela 1). Para cada reação de amplificação foram adicionados 5 μl do DNA pré-amplificado (diluído), 0,5 μl do iniciador E-ANN (10 ng/μl), onde a letra N corresponde às bases adicionais, 4,5 μl do iniciador M-CNN (6,7 ng/μl) + dNTPs, 0,3 μl de *Taq* DNA polimerase (5U/μl) em uma reação de 20 μl completada com água milliQ autoclavada. Os produtos resultantes da amplificação foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% desnaturante e visualizados por meio de coloração com nitrato de prata (Creste *et al.*, 2001).

### **3.4. Análises dos dados**

#### **3.4.1. Marcadores AFLP**

Diferenças nos padrões de eletroforese entre os isolados foram avaliadas manualmente. 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.

#### **3.4.2. População total**

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).

#### **3.4.3. Análise de agrupamento**

Para avaliar a relação genética entre os isolados construiu-se um dendrograma 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), com 1.000 permutações, implementada 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.

#### **3.4.4. Populações subdivididas**

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, o índice de Nei (1973), diversidade gênica total ( $H_T$ ), diversidade gênica intrapopulacional ( $H_S$ ) e a diferenciação genética ( $G_{ST}$ ), foram calculadas entre as populações de *H. vastatrix*. Posteriormente, essas análises foram realizadas separadamente para cada população subdividida com base na região geográfica. Adicionalmente, a diferenciação genética ( $G_{ST}$ ) e o número de migrantes ( $Nm$ ) foram calculados par-a-par entre as populações. Essas análises foram realizadas no 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).

#### **3.4.5. Acasalamento aleatório**

A evidência de acasalamento aleatório nas populações de *H. vastatrix* foi inferido pelo índice de associação ( $I_A$ ) (Maynard Smith *et al.*, 1993) usando o programa Multilocus 1.3. (Agapow & Burt, 2001). Para essas análises consideraram-se apenas os locos nos quais o alelo 1 ocorreu na frequência de 0,06 a 0,94. As análises foram realizadas na população total ( $N = 91$ ) e nas três populações definidas pelo hospedeiro.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Marcadores AFLP

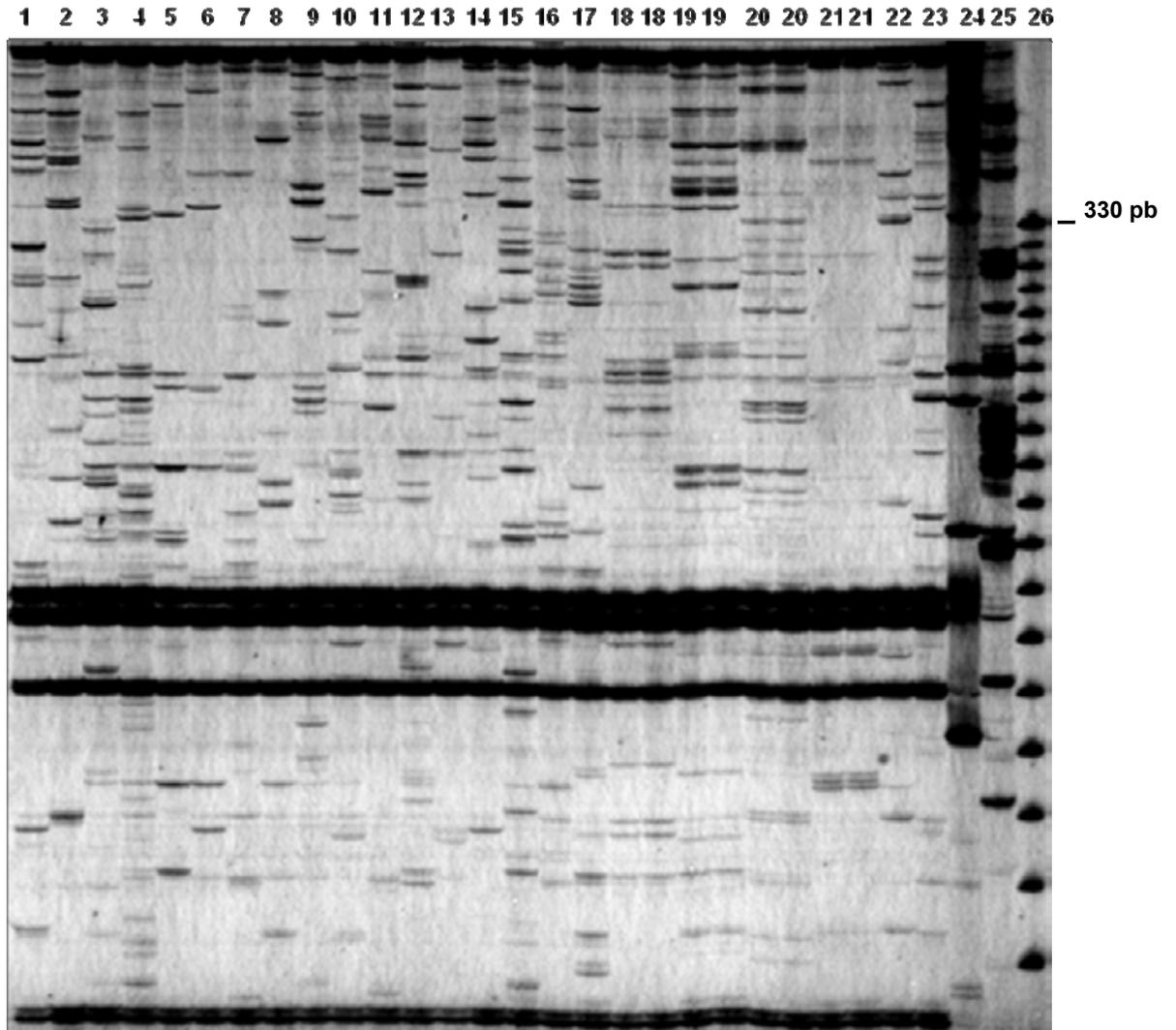
As quatro combinações de pares de iniciadores geraram alto nível de polimorfismo, e 100 bandas foram analisadas. O número de fragmentos polimórficos analisados por combinação de iniciadores variou de 10 (*E*-ACT / *M*-CAC) a 46 (*E*-ACG / *M*-CTA) com tamanho entre 128 a 400 pares de base (Tabela 1). O padrão de bandas obtido com a combinação *E*-ACT / *M*-CAC está apresentado na Figura 2. As réplicas (isolados de *H. vastatrix* amplificados duas vezes) foram idênticas baseadas nos marcadores AFLP, indicando a confiança dos dados (Figura 2). Os controles (*L. lecanii* e 'Catuaí') apresentaram padrões AFLP diferentes comparados aos isolados de *H. vastatrix*, demonstrando a ausência de contaminação (Figura 2).

**Tabela 1:** Descrição dos fragmentos polimórficos obtidos pelas quatro combinações de pares de iniciadores em 91 isolados de *Hemileia vastatrix*.

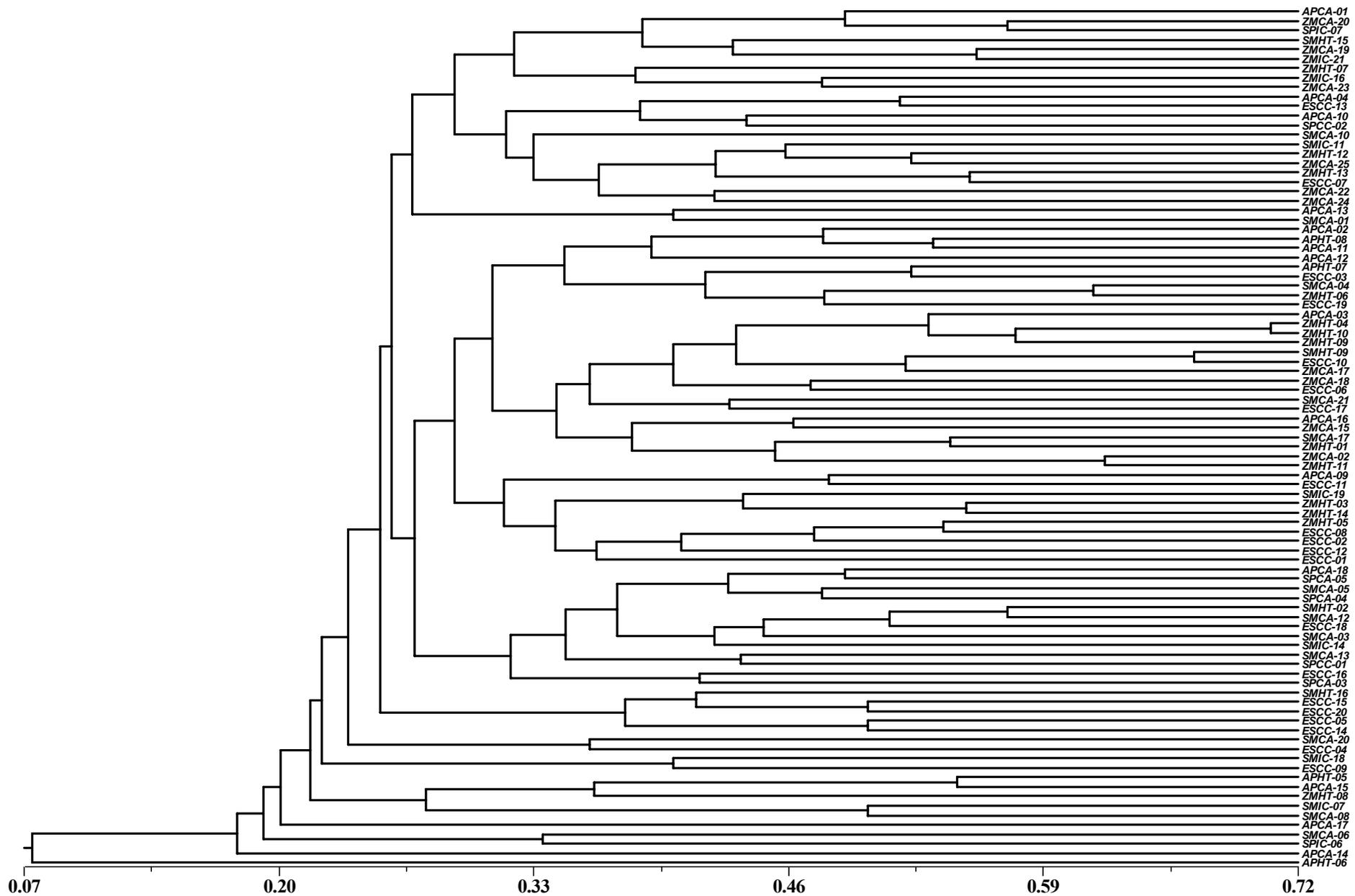
Pares de iniciadores	N <sup>a</sup>	Fragmentos polimórficos <sup>b</sup>
<i>E</i> -ACG / <i>M</i> -CTA	46	128, 130, 138, 140, 147, 148, 150, 152, 155, 157, 158, 160, 163, 165, 170, 192, 194, 196, 197, 200, 202, 204, 213, 215, 217, 218, 219, 222, 225, 227, 235, 248, 250, 252, 255, 258, 265, 272, 275, 280, 283, 285, 290, 295, 305, 315
<i>E</i> -ACT / <i>M</i> -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
<i>E</i> -ACC / <i>M</i> -CTG	20	216, 235, 240, 245, 248, 254, 264, 270, 274, 281, 285, 292, 298, 304, 308, 310, 318, 380, 395, 400
<i>E</i> -ACT / <i>M</i> -CAC	10	143, 160, 168, 170, 172, 178, 180, 192, 211, 240
Total	100	

<sup>a</sup> N = número de locos polimórficos analisados

<sup>b</sup> Tamanho dos fragmentos em pares de base



**Figura 2:** Gel de poliacrilamida contendo fragmentos AFLP amplificados com a combinação *E.ACT / M.CAC*. Do 1 ao 23 correspondem aos isolados de *Hemileia vastatrix*. Os isolados 18, 19, 20 e 21 foram amplificados duas vezes e carregados no gel em poços adjacentes para assegurar a confiança dos dados. O 24 corresponde ao fungo hiperparasita *Lecanicillium lecanii* e o 25 a planta 'Catuaí'. O 26 é o marcador de peso molecular (10 pb).



Coefficiente de similaridade de Dice

**Figura 3:** 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.

#### 4.2. População total

A diversidade genética foi acessada na população total ( $N = 91$ ) de *H. vastatrix*. Os índices de diversidade genotípica de Shannon-Wiener ( $H'$ ) e Stoddart & Taylor ( $G'$ ) foram 4,51 e 91,0, respectivamente, demonstrando máxima riqueza e igualdade na população, visto que cada isolado de *H. vastatrix* produziu um padrão único de alelos AFLP. Para cada loco, a frequência alélica na população variou de 0,02, encontrados em oito locos (E.ACG / M.CTA - 138, 150, 152, 165, 213, 235, 248, 283) a 0,95 no loco E.ACC / M.CTG - 304. A diversidade gênica ( $h$ ) sobre todos os locos na população foi de 0,19 (s.d.  $\pm$  0,13) verificando-se alta variabilidade genética na população de *H. vastatrix*.

#### 4.3. Análise de agrupamento

A similaridade genética entre os isolados de *H. vastatrix* variou de 0,08 a 0,70 (Figura 3). A maior similaridade genética ocorreu entre os isolados ZMHT04 e ZMHT10 ambos coletados na região da Zona da Mata em genótipos derivados de HDT (Figura 3). Constatou-se alta variabilidade genética entre os isolados. Baseado no dendrograma, não houve a formação de grupos entre isolados das mesmas origens geográficas e hospedeiros (Figura 3). Pelo teste de Mantel, não houve correlação entre distância genética e geográfica entre os isolados ( $r = 0,307$ ,  $P = 0,234$ ).

#### 4.4. Populações subdivididas

Os isolados de *H. vastatrix* foram divididos em três populações com base nos hospedeiros. Considerando o índice de Nei, a diversidade gênica total ( $H_T$ ) foi de 0,193 (s.d.  $\pm$  0,017), a diversidade gênica intrapopulacional ( $H_S$ ) de

0,188 (s.d.± 0,016) e o coeficiente de diferenciação genética entre populações ( $G_{ST}$ ) de 0,026. Esses resultados demonstram baixa diferenciação genética entre as populações de *H. vastatrix* agrupadas por hospedeiro.

Para verificar a influência do hospedeiro na estrutura genética de *H. vastatrix* analisaram-se as populações separadamente. As populações procedentes de *C. arabica* e derivados de HDT e Icatu apresentaram o maior número de locos polimórficos, 94 e 93%, respectivamente. Em contrapartida, menor percentagem de locos polimórficos foi encontrada na população procedente de *C. canephora* (85%) (Tabela 2). Conforme o índice de Nei acessado nas populações subdivididas por região geográfica, não houve diferença significativa entre as três populações de *H. vastatrix* (Tabela 2). A diversidade gênica total ( $H_T$ ) na população do patógeno variou de 0,177 (*C. canephora*) à 0,187 (*C. arabica*), enquanto que a diversidade gênica intrapopulacional variou de 0,159 (*C. arabica*) à 0,147 (*C. canephora*). A diferenciação genética entre as subpopulações de *H. vastatrix* ( $G_{ST}$ ) variou de 0,151 (*C. arabica*) à 0,194 (HDT/Icatu), indicando uma moderada diferenciação genética entre elas (Tabela 2).

**Tabela 2:** Estimativa da diversidade genética e índice de associação ( $I_A$ ) em populações de *Hemileia vastatrix* com base nas 100 marcas AFLP.

População	$P^a$	$H_T^b$	$H_S^c$	$G_{ST}^d$	$I_A^e$
<i>Coffea arabica</i>	94	0,187 ± 0,021	0,159 ± 0,014	0,151	0,538 (P = 0,002)
<i>Coffea canephora</i>	85	0,177 ± 0,029	0,147 ± 0,019	0,168	0,225 (P = 0,123)
HDT / Icatu*	93	0,181 ± 0,021	0,146 ± 0,013	0,194	0,805 (P < 0,001)

\* 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)

<sup>a</sup> Percentagem de locos polimórficos

<sup>b</sup> Diversidade gênica total

<sup>c</sup> Diversidade gênica intrapopulacional

<sup>d</sup> Diferenciação genética entre subpopulações

<sup>e</sup>  $I_A$  inferido com base em 64 marcas AFLP

A diferenciação genética e o número de migrantes par-a-par entre as três populações (Tabela 3) mostrou baixa diferenciação genética e alta taxa de número de migrantes entre elas. A maior similaridade genética foi observada entre as populações procedentes de *C. arabica* e derivados de HDT/Icatu ( $G_{ST}$  = 0,017), consequentemente onde a estimativa de migração foi maior ( $Nm$  = 29,61).

**Tabela 3:** Comparação par-a-par da diferenciação genética  $G_{ST}$  (diagonal superior) e número de migrantes  $Nm$  (diagonal inferior) entre as populações de *Hemileia vastatrix*.

População	<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea canephora</i>	HDT / Icatu*
<i>Coffea arabica</i>	----	0,020	0,017
<i>Coffea canephora</i>	25,13	----	0,024
HDT / Icatu*	29,61	20,11	----

\* 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)

Por meio da AMOVA verificou-se que a maior parte da variância genética (99,56%) encontra-se entre os isolados do mesmo hospedeiro, sendo baixa (0,44%) a variância entre as populações de *H. vastatrix* originadas de hospedeiros distintos (Tabela 4), confirmando a ausência de estrutura populacional no conjunto de isolados avaliados.

**Tabela 4:** Análise de variância molecular (AMOVA) entre e dentro as populações de *Hemileia vastatrix* definidas 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

#### 4.5. Acasalamento aleatório

A análise do índice de associação ( $I_A$ ) foi inferida com base em 64 locos, pois não foram considerados os locos nos quais os alelos encontravam-se fixados na população de *H. vastatrix*. Considerando a população total de *H. vastatrix*, o índice de associação foi diferente de zero ( $I_A = 0,598$ ,  $P < 0,001$ ) e a hipótese de acasalamento aleatório foi rejeitada. Porém, ao separar as populações de *H. vastatrix* por hospedeiro a hipótese de acasalamento aleatório não foi rejeitada para a população associada a *C. canephora* ( $I_A = 0,225$ ,  $P = 0,123$ ) (Tabela 2).

## 5. DISCUSSÃO

Nesse estudo foi demonstrado, por AFLP, que a população de *H. vastatrix* possui alta diversidade genética, tanto nos isolados coletados nas duas principais espécies cafeeiras cultivadas (*C. arabica* e *C. canephora*), como nos cafeeiros derivados de híbridos interespecíficos (HDT e Icatu). Esses híbridos constituem as principais fontes de resistência utilizadas nos programas de melhoramento do cafeeiro que visam resistência à ferrugem no Brasil. Nunes *et al.* (2009), utilizando marcador RAPD, encontraram 92 haplótipos em 120 isolados coletados em cafeeiro orgânico e convencional no estado de Minas Gerais. Esses resultados demonstram que a população de *H. vastatrix* existentes nos cafeeiros do Brasil não é consistente com a diversidade genética moderadamente baixa que foi apresentada pelos isolados de diferentes partes do mundo estudados no Centro de Investigação da Ferrugem do Cafeeiro (CIFC) (Gouveia *et al.*, 2005). Observações realizadas em casa-de-vegetação mostram que inoculações sucessivas de *H. vastatrix* em plantas susceptíveis ou na série diferenciadora de raças induzem a perda de capacidade do fungo em re-infectar determinados genótipos de cafeeiro. O estudo realizado no CIFC foi com raças do fungo previamente caracterizadas por inoculações sucessivas em diferentes genótipos. Esse fato pode ter levado a redução da variabilidade dos isolados de *H. vastatrix* por deriva genética e seleção. O estudo aqui realizado analisou populações naturais do patógeno utilizando quatro combinações de *primers* AFLP que geraram alto nível de polimorfismo, permitindo com clareza a análise de 100 marcas. A consistência dos dados foi verificada pela amplificação de réplicas.

O alto nível de diversidade genotípica em outras espécies de fungos ferruginos, inferido por AFLP, tem sido associado com a fase sexuada (Hurtado & Ramstedt, 2002; Pei *et al.*, 2007; Richardson *et al.*, 2008). Embora a fase de pécnio e écio permaneça desconhecida no ciclo de *H. vastatrix* (Gopalkrishnan, 1951), nossos resultados alertam para a possibilidade de acasalamento aleatório na população do fungo proveniente de *C. canephora*, corroborando com os dados apresentados por Nunes *et al.* (2009) de que há evidência indireta de recombinação genética na população de *H. vastatrix* no Brasil. Investigações realizadas no Brasil demonstraram a ocorrência de

formação de teliósporos (Fernandes *et al.*, 2009). Entretanto os basidiósporos formados como consequência de meiose não são infectivos (Vishveshwara & Nag Raj, 1960), dificultando a conclusão sobre sua real função na geração de variabilidade. Porém, estudos citológicos sobre o comportamento nuclear de *H. vastatrix*, conduzidos na Índia, relataram evidências de cariogamia e meiose nos urediniósporos, estrutura denominada “teliósporos uredinióides” (Rajendren, 1967a,b), o que explicaria a alta diversidade genética apresentada pelo fungo. No entanto, para se determinar de forma conclusiva que os urediniósporos funcionam como estrutura de variabilidade genética, técnicas de citogenética mais sofisticadas são necessárias.

Outra possível explicação para a alta variabilidade encontrada em *H. vastatrix* é a ausência de períodos desfavoráveis a doenças nas regiões tropicais, como invernos rigorosos e as secas prolongadas. Em plantas perenes como o café, o tecido suscetível encontra-se disponível durante todo o ano, assegurando a sobrevivência do inóculo pelos próprios hospedeiros doentes. Dessa forma, a população do patógeno não sofre reduções severas. Além disso, as pústulas de *H. vastatrix* podem permanecer produzindo urediniósporos por um período de tempo de até cinco meses, atingindo a produção de 300 mil a 2 milhões de esporos por pústula (McCain & Hennen, 1984). O plantio em larga escala, no Brasil, de cultivares suscetíveis à ferrugem é outro fator a ser considerado. Nesses hospedeiros suscetíveis, o tamanho da população de *H. vastatrix* pode estar contribuindo para a alta variabilidade, uma vez que, patógenos que apresentam grande população tendem a apresentar alta diversidade genética (McDonald & Linde, 2002).

Os isolados analisados não agruparam em função da origem geográfica e do hospedeiro. Gouveia *et al.* (2005) encontraram resultados semelhantes e concluíram que as populações de *H. vastatrix* estão desestruturadas em relação ao hospedeiro e a origem geográfica. Em outros fungos causadores de ferrugem (*Cronartium ribicola*, *Melampsora epitea*, *Puccinia triticina* e *M. larici-populina*) também foi relatado a ausência de correlação entre similaridade genética e distância geográfica (Hamelin *et al.*, 2005; Hurtado & Ramstedt, 2002; Mebrate *et al.*, 2006; Pei *et al.*, 2007). A ausência da formação de grupo espacial indica que a dispersão de propágulos de *H. vastatrix* ocorre à longa distância. A importância do vento no transporte de *H. vastatrix* foi comprovada

pela detecção da presença de uredíniosporos a 1.000 metros de altura com boa viabilidade e germinação (Martinez *et al.*, 1975). Assim, os uredíniosporos alcançam as correntes convectivas da atmosfera para serem dispersos a longas distâncias, podendo se deslocar de um país ao outro e até entre continentes (Kushalappa, 1989). Esse tipo de dispersão foi sugerida como a causa da introdução da ferrugem do cafeeiro na América do Sul (Bowden *et al.*, 1971) e da rápida disseminação no Brasil, após sua constatação em 1970 (Schieber, 1972; Schieber & Zentmyer, 1984).

As estimativas da diferenciação genética ( $G_{ST}$ ) encontradas nas populações de *H. vastatrix* (Tabela 2), indicam que há uma moderada diferença entre os isolados presentes nestes hospedeiros quando comparado à região na qual eles foram coletados (Figura 1). Gouveia *et al.* (2005), trabalhando com diferentes raças de *H. vastatrix*, encontraram alta diferenciação genética nas populações provenientes de *C. arabica* ( $G_{ST} = 0.788$ ) e HDT ( $G_{ST} = 0.783$ ). Estas estimativas podem ser explicadas pelo número de isolados analisados ( $N=45$ ), e pelas origens dos isolados de *H. vastatrix*, os quais foram provenientes de três continentes África, Ásia e América do Sul. Em nosso trabalho analisou-se um número maior de isolados ( $N=91$ ) coletados apenas na região Sudeste do Brasil.

Com base nos índices de diversidade gênica ( $H_T$ ,  $H_S$  e  $G_{ST}$ ) e AMOVA (Tabela 2 e 4), não houve diferença significativa entre as populações do patógeno originados de hospedeiros distintos. Os isolados de *H. vastatrix* provenientes de *C. arabica* foram coletados em genótipos de cultivares comerciais pertencentes ao grupo fisiológico E, possuidores do gene  $S_{H5}$ , portanto suscetíveis à maioria das raças de *H. vastatrix* (Bettencourt, 1968). Por outro lado, genótipos derivados de HDT e Icatu podem possuir genes de resistência à ferrugem introgridos de *C. canephora* ( $S_{H6}$ ,  $S_{H7}$ ,  $S_{H8}$  e  $S_{H9}$ ) (Bettencourt & Rodrigues Jr., 1988; Rodrigues Jr. *et al.*, 1975). Entretanto, nesse estudo não foi verificada diferenças na estrutura genética dentro de populações do fungo. Isto pode ser explicado por várias hipóteses: (i) os marcadores AFLP não estavam associados a regiões do genoma sob seleção imposta pelos genes-R; (ii) a introgressão de genes de resistência à ferrugem de *C. canephora* em genótipos de *C. arabica* pode estar contribuindo para a

não estruturação da população de *H. vastatrix* por hospedeiro; (iii) alta taxa de fluxo gênico entre as três populações.

Os resultados apresentados nesse trabalho corroboram com os apresentados por Nunes *et al.* (2009) e adicionalmente fornece maiores informações sobre a população do patógeno no Brasil, a qual encontra-se desestruturada em relação ao hospedeiro. A alta diversidade genotípica associada ao alto fluxo gênico na população de *H. vastatrix* são informações importantes que devem ser considerados nos programas de melhoramento que visam à obtenção de resistência à ferrugem. Segundo McDonald & Linde (2002), patógenos com essas características apresentam alto potencial de adaptação em mudanças de ambiente. Dessa forma, é necessário que os programas de melhoramento do cafeeiro busquem variedades com resistências mais duradouras, que sejam capazes de suportar a grande dinâmica populacional do patógeno.

## 6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- Os isolados de *H. vastatrix* apresentaram alta diversidade genotípica.
- As populações de *H. vastatrix* encontram-se desestruturadas com relação ao hospedeiro e região geográfica.
- As populações de *H. vastatrix* apresentaram alto nível de fluxo gênico e baixa diferenciação genética entre elas, sendo que a maior troca de indivíduos ocorre entre as populações provenientes de *C. arabica* e derivados de HDT e Icatu.
- A AMOVA revelou que a maioria da variância genética encontra-se entre isolados dentro da população e não houve diferenças significativas entre as populações de *H. vastatrix* definidas com base no hospedeiro.
- Com base no índice de associação ( $I_A$ ) a hipótese de acasalamento aleatório não foi rejeitada entre os isolados de *H. vastatrix* provenientes de *C. canephora*.
- Os resultados sugerem que o fungo apresenta elevado potencial evolutivo o que contribui para a suplantação da resistência dos cultivares de cafeeiro.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGAPOW, P.-M. & BURT, A. Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes* 1:101-102. 2001.
- BETTENCOURT, A.J. Melhoramento visando a resistência do cafeeiro à ferrugem. *Bragantia* 27:35-68. 1968.
- BETTENCOURT, A.J. Considerações gerais sobre o 'Híbrido de Timor'. Instituto Agrônomo de Campinas, Circular nº 23:20p. 1973.
- 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.
- BOWDEN, J., GREGORY, P.H. & JONHSON, C.G. Possible wind transport of coffee leaf rust across the Atlantic Ocean. *Nature* 229:500-501. 1971.
- BROWN, J.K.M. The choice of molecular marker methods for population genetics studies of plant pathogens. *New Phytologist* 133:183-195. 1996.
- CABRAL, P.G.C., ZAMBOLIM, E.M., CARDOSO, P.M.R., LELIS, T.P. & ZAMBOLIM, L. Raças de *Hemileia vastatrix* identificadas em cafeeiros de Minas Gerais. pp. S 211 In: 41º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Belo Horizonte (Resumos). 2008.
- CARDOSO, R.M.L. 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. *Magister Scientiae, Fitopatologia*, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 1986.
- CARDOSO, R.M.L., ZAMBOLIM, L. & CHAVES, G.M. Ocorrência no Brasil da raça XVI de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. coletada do germoplasma de *Coffea arabica* L. no Estado de Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira* 12:343-346. 1988.
- CARRIÓN, G. & RICO-GRAY, V. Mycoparasites on the coffee rust in Mexico. *Fungal Diversity* 11:49-60. 2002.
- CHAVES, G.M. Melhoramento do cafeeiro visando à obtenção de cultivares resistentes à *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. *Revista Ceres* 23:321-332. 1976.
- CHAVES, M.G., CRUZ-FILHO, J.D., CARVALHO, M.G., MATSUOKA, K., COELHO, D.T. & SHIMOYA, C. A ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.) revisão de literatura com observações e comentários sobre a enfermidade no Brasil. *Seiva* 30:1-76. 1970.
- CHINNAPPA, C.C. & SREENIVASAN, M.S. Cytology of *Hemileia vastatrix*. *Caryologia* 21:75-81. 1968.
- CONAB Acompanhamento da Safra Brasileira Café Safra 2009 - Primeira Estimativa - Janeiro/2009. Disponível em: <<http://conab.gov.br>> Acessado em: 10 de setembro:2009.

- CRESTE, S., TULMANN NETO, A. & FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* 19:299-306. 2001.
- CUMMINS, G. B. & HIRATSUKA, Y. *Illustrated Genera of rust fungi* (3). St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological society. 225p. 2003.
- 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. Analysis of AFLP markers associated to the Mex-1 resistance locus in Icatu progenies. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 5:387-393. 2005.
- 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.
- FAZUOLI, L. C., OLIVEIRA, A. C. B., BRAGHINI, M. T. & SILVAROLLA, M. B. Identification and use of sources of durable resistance to coffee leaf rust at IAC. In: *Durable Resistance to Coffee Leaf Rust* (eds. L. Zambolim, E.M. Zambolim and V.M.P. Várzea). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa:75-115. 2005.
- FERNANDES, R.C. Reavaliação do ciclo de vida de *Hemileia vastatrix* no Brasil. *Magister Scientiae, Fitopatologia*, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2007.
- FERNANDES, R. C., EVANS, H. C. & BARRETOS, R. W. Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination. *Tropical Plant Pathology* 34:108-113. 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.
- GOYEAU, H., HALKETT, F., ZAPATER, M.-F., CARLIER, J. & LANNOU, C. Clonality and host selection in the wheat pathogenic fungus *Puccinia triticina*. *Fungal Genetics and Biology* 44:474-483. 2007.
- HAMELIN, R.C., ALLAIRE, M., BERGERON, M.J., NICOLE, M.C. & LECOURS, N. Molecular epidemiology of white pine blister rust: Recombination and spatial distribution. *Phytopathology* 95:793-799. 2005.
- HILL, M.O. Diversity and evenness: A unifying notation and its consequences. *Ecology* 54:427-432. 1973.
- HURTADO, S. & RAMSTEDT, M. AFLP comparison of distant *Melampsora epitea* (willow rust) population. *Mycological Research* 106:1400-1407. 2002.

- IOC - International Coffee Organization. Disponível em: <<http://www.ico.org/mission.asp>> Acessado em: 22 de janeiro 2009.
- KIRK, P. M., CANNON, P. F., DAVID, J. C & STALPERS, J. A. Dictionary of the fungi (9). Wallingford: CAB Publishing. 655p. 2001.
- KUSHALAPPA, A.C. Biology and Epidemiology. pp.13-43 In: KUSHALAPPA, A.C. & ESKES, A.B. (Eds.) Coffee rust: epidemiology, resistance and management. Boca Raton: CRC Press. 1989.
- MAIA, T.A., ZAMBOLIM, E.M., CAIXETA, E.T., MISSIO, R.F. & ZAMBOLIM, L. Diversidade genética de *Hemileia vastatrix* utilizando marcador molecular AFLP. pp. CD ROM In: V Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Águas de Lindóia (Resumos). 2007.
- MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research 27:209-220. 1967.
- MARTINEZ, J.A., PALAZZO, D.A., KARAZAWA, M., MONTEIRO, M.V.M. & REU, N.R.N. 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. 1975.
- MAYNARD SMITH, J., SMITH, N.H., O'ROURKE, M., SPRATT, B.G. How clonal are bacteria? Proceeding of the National Academy of Sciences 90:4384-88. 1993.
- MAYNE, W.W. Physiologic specialization of *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. Nature 129:510. 1932.
- MCCAIN, J.W. & HENNEN, J.F. Development of the uredinial thallus and sorus in the orange coffee rust fungus, *Hemileia vastatrix*. Phytopathology 74:714-721. 1984.
- MCDERMOTT, J.M. & MCDONALD, B.A. Gene flow in plant pathosystems. Annual Review of Phytopathology 31:353-373. 1993.
- MCDONALD, B.A. The population genetics of fungi: tools and techniques. Phytopathology 87:448-453. 1997.
- MCDONALD, B.A. & LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potencial, and durable resistance. Annual Review of Phytopathology 40:349-379. 2002.
- MEBRATE, S.A., DEHNE, H.W., PILLEN, K. & OERKE, E.C. Molecular diversity in *Puccinia triticina* isolates from Ethiopia and Germany. Journal of Phytopathology 154:701-710 2006.
- MONACO, L.C. & CARVALHO, A. Resistência a "*Hemileia vastatrix*" no melhoramento do cafeeiro. Ciência e Cultura 27:1070-1081. 1975.
- 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.

- NUNES, C.C., MAFFIA, L.A., MIZUBUTI, E.S.G. & BROMMONSCHENKEL, S.H. Análise da estrutura genética da população de *Hemileia vastatrix* em cafeeiros sob cultivo orgânico e convencional. pp. CD ROM *In: V Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Águas de Lindóia (Resumos)*. 2007.
- NUNES, C. C., MAFFIA, L. A., MIZUBUTI, E. S. G., BROMMONSCHENKEL, S. H. & SILVA, J. C. Genetic diversity of populations of *Hemileia vastatrix* from organic and conventional coffee plantations in Brazil. *Australasian Plant Pathology* 38:445-452. 2009.
- PEI, M.H., BAYON, C., RUIZ, C. & TUBBY, I. Population structure of poplar rust *Melampsora larici-populina* in the UK inferred from AFLP. *Plant Pathology* 56:472-479. 2007.
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2007.
- RAEDER, U. & BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1:17-20. 1985.
- RAJENDREN, R.B. New type of nuclear life cycle in *Hemileia vastatrix*. *Nature* 213:105-106. 1967a.
- RAJENDREN, R.B. A new type of nuclear life cycle in *Hemileia vastatrix*. *Mycologia* 59:279-285. 1967b.
- RIBEIRO, I.J.A., SUGIMORI, M.H., MORAES, S.A. & MONACO, L.C. Raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica* 1:19-22. 1975.
- RICHARDSON, B.A., KLOPFENSTEIN, N.B., ZAMBINO, P.J., MCDONALD, G.I., GEILS, B.W. & CARRIS, L.M. Influence of host resistance on the genetic structure of the white pine blister rust fungus in the Western United States. *Phytopathology* 98:413-420. 2008.
- RODRIGUES JR, C.J., BETTENCOURT, A.J. & RIJO, L. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. *Annual Review of Phytopathology* 13:49-70. 1975.
- ROHLF, F.J. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Exeter, Software. 2005.
- SCHIEBER, E. Economic impact of coffee rust in Latin America. *Annual Review of Phytopathology* 10:491-510. 1972.
- SCHIEBER, E. & ZENTMYER, G.A. Coffee rust in the Western Hemisphere. *Plant Disease* 68:89-93. 1984.
- SILVA, M.C., VÁRZEA, V., GUERRA-GUIMARÃES, L., AZINHEIRA, H.G., FERNANDEZ, D., PETITOT, A.S., BERTRAND, B., LASHERMES, P. & NICOLE, M. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Brazilian Journal Plant Physiology* 18:119-147. 2006.
- STODDART, J.A. & TAYLOR, J.F. Genotypic diversity: estimation and prediction in samples. *Genetics* 118:705-711. 1988.
- VANDERMEER, J., PERFECTO, I. & LIERE, H. Evidence for hyperparasitism of coffee rust (*Hemileia vastatrix*) by the entomogenous fungus, *Lecanicillium lecanii*, through a complex ecological web. *Plant Pathology* 58:636-641. 2009.

- VÁRZEA, V.M.P. & MARQUES, D.V. 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. 2005.
- VÁRZEA, V.M.P., RODRIGUES, C.J., SILVA, M.C.M.L., GOUVEIA, M., MARQUES, D.V., GUERRA-GUIMARÃES, L. & RIBEIRO, A. Resistência do cafeeiro a *Hemileia vastatrix*. pp.297-320 In: ZAMBOLIM, L. (Ed.) O Estado da arte de tecnologias na produção de café. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa. 2002.
- VISHVESHWARA, S. & NAG RAJ, T.R. Nuclear status in basidiospores of *Hemileia vastatrix* B. & Br. Indian Coffee 3:118-119. 1960.
- 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.

## **8. ANEXOS**

**Anexo 1:** Total de isolados de *Hemileia vatatrix*, cidades amostradas, hospedeiro e coordenadas geográficas do local de coleta.

Nº	Sigla <sup>a</sup>	Cidade /Estado	<i>Coffea</i> sp.	Genótipo do hospedeiro	Latitude	Longitude	Altitude (m)
01	APCA-01	Patrocínio/MG	<i>C. arabica</i>	Rubi MG1192	S 18°59.457'	W 046°59.347'	1008
02	APCA-02	Patrocínio/MG	<i>C. arabica</i>	Catuaí amarelo IAC62	S 18°59.199'	W 046°58.932'	976
03	APCA-03	Patrocínio/MG	<i>C. arabica</i>	Topázio MG1190	S 18°59.198'	W 046°58.811'	980
04	APCA-04	Patrocínio/MG	<i>C. arabica</i>	Topázio	S 18°59.330'	W 046°59.528'	991
05	APHT-05	Patrocínio/MG	derivado de HDT*	Catiguá MG2	S 18°59.657'	W 046°59.452'	1013
06	APHT-06	Patrocínio/MG	derivado de HDT*	Progênie de catimor UFV7158	S 18°59.625'	W 046°59.419'	1007
07	APHT-07	Patrocínio/MG	derivado de HDT*	Progênie Catimor UFV7937	S 18°59.623'	W 046°59.412'	994
08	APHT-08	Patrocínio/MG	derivado de HDT*	Progênie H419-6-2-5-3	S 18°59.635'	W 046°59.385'	1022
09	APCA-09	Patrocínio/MG	<i>C. arabica</i>	Mundo Novo 476-4	S 18°59.259'	W 046°59.109'	999
10	APCA-10	Campos Altos/MG	<i>C. arabica</i>	Catuaí	S 19°41.302'	W 046°13.529'	1219
11	APCA-11	Campos Altos/MG	<i>C. arabica</i>	Catuaí	S 19°40.811'	W 046°13.702'	1215
12	APCA-12	Campos Altos/MG	<i>C. arabica</i>	Acaíá Cerrado MG1474	S 19°39.166'	W 046°14.352'	1211
13	APCA-13	Campos Altos/MG	<i>C. arabica</i>	Topázio	S 19°40.655'	W 046°12.372'	1211
14	APCA-14	Campos Altos/MG	<i>C. arabica</i>	Rubi MG1192	S 19°40.379'	W 046°12.315'	1203
15	APCA-15	Campos Altos/MG	<i>C. arabica</i>	Catuaí amarelo IAC62	S 19°40.771'	W 046°12.416'	1208
16	APCA-16	Campos Altos/MG	<i>C. arabica</i>	Catuaí vermelho IAC15	S 19°40.824'	W 046°12.440'	1218
17	APCA-17	Tapiraí/MG	<i>C. arabica</i>	Catuaí vermelho IAC99	S 19°52.105'	W 046°08.921'	954
18	APCA-18	Tapiraí/MG	<i>C. arabica</i>	Mundo Novo	S 19°51.628'	W 046°09.391'	974
19	SMCA-01	Machado/MG	<i>C. arabica</i>	Catuaí vermelho IAC44	S 21°40.774'	W 045°56.477'	867
20	SMHT-02	Machado/MG	derivado de HDT*	H-515-4-42	S 21°40.721'	W 045°56.540'	955
21	SMCA-03	Machado/MG	<i>C. arabica</i>	Acaíá Cerrado MG1474	S 21°40.710'	W 045°56.562'	955
22	SMCA-04	Machado/MG	<i>C. arabica</i>	Catuaí amarelo IAC17	S 21°40.817'	W 045°56.615'	973
23	SMCA-05	Machado/MG	<i>C. arabica</i>	Catuaí vermelho IAC15	S 21°40.825'	W 045°56.640'	961
24	SMCA-06	Machado/MG	<i>C. arabica</i>	Catuaí amarelo IAC62	S 21°40.844'	W 045°56.670'	972
25	SMIC-07	Machado/MG	derivado de Icatu**	Catuaí amarelo 6-30	S 21°40.890'	W 045°56.597'	957
26	SMCA-08	Machado/MG	<i>C. arabica</i>	Mundo Novo IAC379-19	S 21°40.932'	W 045°56.566'	940
27	SMHT-09	Machado/MG	derivado de HDT*	Progênie Catimor F6-F7	S 21°40.776'	W 045°56.590'	961

**Anexo 1: Continuação...**

<b>Nº</b>	<b>Sigla<sup>a</sup></b>	<b>Cidade /Estado</b>	<b>Coffea sp.</b>	<b>Genótipo do hospedeiro</b>	<b>Latitude</b>	<b>Longitude</b>	<b>Altitude (m)</b>
28	SMCA-10	Machado/MG	<i>C. arabica</i>	Catuaí IAC62	S 20°38.855'	W 043°11.184'	736
29	SMIC-11	Varginha/MG	derivado de Icatu**	Catuaí amarelo	S 21°33.752'	W 045°24.196'	947
30	SMCA-12	Varginha/MG	<i>C. arabica</i>	Topázio	S 21°33.745'	W 045°24.179'	942
31	SMCA-13	Varginha/MG	<i>C. arabica</i>	Rubi MG1192	S 21°33.750'	W 045°24.181'	961
32	SMIC-14	Varginha/MG	derivado de Icatu**	Catuaí amarelo 2SL	S 21°33.757'	W 045°24.210'	957
33	SMHT-15	Varginha/MG	derivado de HDT*	Canário	S 21°34.067'	W 045°23.970'	994
34	SMHT-16	Varginha/MG	derivado de HDT*	Sabiá cv398	S 21°34.052'	W 045°23.983'	993
35	SMCA-17	Varginha/MG	<i>C. arabica</i>	Mundo Novo IAC376-4	S 21°33.937'	W 045°24.265'	955
36	SMIC-18	Varginha/MG	derivado de Icatu**	Catuaí amarelo IAC6-30	S 21°33.963'	W 045°24.210'	958
37	SMIC-19	Varginha/MG	derivado de Icatu**	Catuaí amarelo IAC20-15	S 21°33.882'	W 045°24.059'	974
38	SMCA-20	Varginha/MG	<i>C. arabica</i>	Catuaí amarelo IAC74	S 21°34.271'	W 045°23.830'	957
39	SMCA-21	Varginha/MG	<i>C. arabica</i>	Acaíá IAC474-19	S 21°34.227'	W 045°23.939'	960
40	ZMHT-01	Piranga/MG	derivado de HDT*	Oeiras MG6851	S 20°38.992'	W 043°11.296'	815
41	ZMCA-02	Viçosa/MG	<i>C. arabica</i>	Catuaí	S 20°44.493'	W 042°52.615'	734
42	ZMHT-03	Viçosa/MG	derivado de HDT*	Progênie Catimor UFV6871	S 20°44.551'	W 042°50.824'	720
43	ZMHT-04	Viçosa/MG	derivado de HDT*	Progênie Catimor UFV6882	S 20°44.558'	W 042°50.830'	722
44	ZMHT-05	Viçosa/MG	derivado de HDT*	Progênie Catimor UFV6856	S 20°44.551'	W 042°50.832'	714
45	ZMHT-06	Viçosa/MG	derivado de HDT*	Progênie Catimor UFV7072	S 20°44.551'	W 042°50.834'	716
46	ZMHT-07	Viçosa/MG	derivado de HDT*	Progênie Catimor UFV7847	S 20°44.554'	W 042°50.861'	745
47	ZMHT-08	Viçosa/MG	derivado de HDT*	Progênie Catimor UFV7724	S 20°44.557'	W 042°50.860'	702
48	ZMHT-09	Viçosa/MG	derivado de HDT*	Progênie Catimor UFV7699	S 20°44.558'	W 042°50.826'	710
49	ZMHT-10	Viçosa/MG	derivado de HDT*	Progênie Catimor UFV6864	S 20°44.562'	W 042°50.812'	704
50	ZMHT-11	Viçosa/MG	derivado de HDT*	Progênie Catimor UFV7036	S 20°44.550'	W 042°50.830'	620
51	ZMHT-12	Viçosa/MG	derivado de HDT*	Progênie Catimor UFV7154	S 20°44.556'	W 042°50.847'	662
52	ZMHT-13	Viçosa/MG	derivado de HDT*	Progênie Catimor UFV6853	S 20°44.566'	W 042°50.820'	685
53	ZMHT-14	Viçosa/MG	derivado de HDT*	Progênie Catimor UFV6970	S 20°44.569'	W 042°50.815'	699
54	ZMCA-15	Coimbra/MG	<i>C. arabica</i>	Catuaí vermelho	S 20°52.177'	W 042°45.547'	771
55	ZMIC-16	Coimbra/MG	derivado de Icatu**	Catuaí amarelo	S 20°51.177'	W 042°49.214'	840
56	ZMCA-17	Coimbra/MG	<i>C. arabica</i>	Catuaí vermelho	S 20°51.046'	W 042°49.231'	814

**Anexo 1: Continuação...**

Nº	Sigla <sup>a</sup>	Cidade /Estado	<i>Coffea</i> sp.	Genótipo do hospedeiro	Latitude	Longitude	Altitude (m)
57	ZMCA-18	Coimbra/Cajuri/MG	<i>C. arabica</i>	Catuai	S 20°48.849'	W 042°49.596'	775
58	ZMCA-19	Araponga/MG	<i>C. arabica</i>	Catuai vermelho IAC44	S 20°40.638'	W 042°33.987'	904
59	ZMCA-20	Araponga/MG	<i>C. arabica</i>	Acaiá Cerrado	S 20° 40.592'	W 042°33.956'	953
60	ZMIC-21	Araponga/MG	derivado de Icatu**	Catuai vermelho 20-15	S 20°39.461'	W 042°30.963'	911
61	ZMCA-22	Araponga/MG	<i>C. arabica</i>	Catuai	S 20°39.551'	W 042°31.100'	910
62	ZMCA-23	Araponga/MG	<i>C. arabica</i>	Catuai vermelho IAC44	S 20°40.029'	W 042°31.487'	927
63	ZMCA-24	Araponga/MG	<i>C. arabica</i>	Catuai vermelho IAC44	S 20°38.932'	W 042°30.056'	1272
64	ZMCA-25	Estevão Araújo/MG	<i>C. arabica</i>	Catuai vermelho	S 20°37.528'	W 042°29.806'	1112
65	ESCC-01	Gov. Lindemberg/ES	<i>C. canephora</i>	Clone	S 19°14.523'	W 040°27.913'	157
66	ESCC-02	Marilândia/ES	<i>C. canephora</i>	Clone 02	S 19°24.211'	W 040°32.303'	158
67	ESCC-03	Marilândia/ES	<i>C. canephora</i>	Clone 54-87-1	S 19°24.284'	W 040°32.269'	154
68	ESCC-04	Marilândia/ES	<i>C. canephora</i>	Clone 97-87-1	S 19°24.282'	W 040°32.260'	157
69	ESCC-05	Marilândia/ES	<i>C. canephora</i>	Clone 96-87-1	S 19°24.287'	W 040°32.247'	162
70	ESCC-06	São Gabriel da Palha/ES	<i>C. canephora</i>	Clone 120	S 19°03.882'	W 040°32.525'	190
71	ESCC-07	São Gabriel da Palha/ES	<i>C. canephora</i>	Clone 13	S 19°03.879'	W 040°32.922'	190
72	ESCC-08	São Gabriel da Palha/ES	<i>C. canephora</i>	Clone 16	S 19°03.897'	W 040°32.936'	189
73	ESCC-09	São Gabriel da Palha/ES	<i>C. canephora</i>	Clone 07	S 19°03.894'	W 040°32.937'	192
74	ESCC-10	Rio Bananal/ES	<i>C. canephora</i>	Clone 02 X G35	S 19°14.308'	W 040°14.323'	78
75	ESCC-11	Linhares/ES	<i>C. canephora</i>	Clone 02	S 19°24.984'	W 040°04.650'	49
76	ESCC-12	Linhares/ES	<i>C. canephora</i>	Clone 03	S 19°24.982'	W 040°04.654'	53
77	ESCC-13	Sooretama/ES	<i>C. canephora</i>	Clone 02	S 19°07.285'	W 040°04.836'	57
78	ESCC-14	Sooretama/ES	<i>C. canephora</i>	Robusta Tropical	S 19°07.279'	W 040°04.829'	57
79	ESCC-15	Sooretama/ES	<i>C. canephora</i>	Clone 03	S 19°07.285'	W 040°04.825'	56
80	ESCC-16	Sooretama/ES	<i>C. canephora</i>	Clone 23	S 19°07.285'	W 040°04.828'	58
81	ESCC-17	Sooretama/ES	<i>C. canephora</i>	Clone 19	S 19°07.476'	W 040°04.891'	43
82	ESCC-18	Jaguaré/ES	<i>C. canephora</i>	Clone	S 18°55.024'	W 040°07.210'	68
83	ESCC-19	Jaguaré/ES	<i>C. canephora</i>	Clone 02	S 18°57.256'	W 040°02.850'	47
84	ESCC-20	Jaguaré/ES	<i>C. canephora</i>	Clone tardio	S 18°56.978'	W 040°03.909'	59

**Anexo 1: Continuação...**

<b>Nº</b>	<b>Sigla<sup>a</sup></b>	<b>Cidade /Estado</b>	<b>Coffea sp.</b>	<b>Genótipo do hospedeiro</b>	<b>Latitude</b>	<b>Longitude</b>	<b>Altitude (m)</b>
85	SPCC-01	Campinas/SP	<i>C. canephora</i>	<i>Coffea canephora</i> cv Laurentii	S 22°52.336'	W 047°04.735'	662
86	SPCC-02	Campinas/SP	<i>C. canephora</i>	<i>Coffea canephora</i> cv Kouilou	S 22°52.333'	W 047°04.741'	660
87	SPCA-03	Campinas/SP	<i>C. arabica</i>	<i>Coffea arabica</i> IAC1110-4	S 22°51.972'	W 047°04.916'	638
88	SPCA-04	Campinas/SP	<i>C. arabica</i>	Ibaaré	S 22°51.982'	W 047°04.981'	632
89	SPCA-05	Campinas/SP	<i>C. arabica</i>	<i>Coffea arabica</i> cv Geisha1137	S 22°51.980'	W 047°04.961'	631
90	SPIC-06	Campinas/SP	Icatu**	Icatu amarelo IAC2944-14	S 22°52.269'	W 047°05.438'	640
91	SPIC-07	Campinas/SP	Icatu**	Icatu vermelho IAC4041	S 22°52.252'	W 047°05.427'	643

<sup>a</sup> Figura 3.

\*HDT (Híbrido de Timor) - híbrido natural tetraplóide interespecífico: *C. arabica* x *C. canephora*

\*\*Icatu - híbrido artificial tetraplóide interespecífico: *C. arabica* x *C. canephora*

**Anexo 2:** Frequência dos 100 locos AFLP nas três populações definidas por hospedeiro, população total e a diferenciação genética por loco.

Nº	Marcas AFLP	<i>C. arabica</i> (N = 39)	HDT/Icatu (N = 30)	<i>C. canephora</i> (N = 22)	População total (N = 92)	G <sub>ST</sub>
1	E.ACG/M.CTA - 128	0,050	0,000	0,091	0,044	0,031
2	E.ACG/M.CTA - 130	0,175	0,200	0,046	0,152	0,038
3	E.ACG/M.CTA - 138	0,025	0,000	0,046	0,022	0,015
4	E.ACG/M.CTA - 140	0,250	0,100	0,227	0,196	0,028
5	E.ACG/M.CTA - 147	0,050	0,000	0,091	0,044	0,031
6	E.ACG/M.CTA - 148	0,050	0,000	0,046	0,033	0,017
7	E.ACG/M.CTA - 150	0,025	0,033	0,000	0,022	0,011
8	E.ACG/M.CTA - 152	0,050	0,000	0,000	0,022	0,034
9	E.ACG/M.CTA - 155	0,000	0,067	0,091	0,044	0,030
10	E.ACG/M.CTA - 157	0,050	0,033	0,091	0,054	0,011
11	E.ACG/M.CTA - 158	0,225	0,167	0,046	0,163	0,045
12	E.ACG/M.CTA - 160	0,050	0,033	0,000	0,033	0,016
13	E.ACG/M.CTA - 163	0,025	0,100	0,046	0,054	0,019
14	E.ACG/M.CTA - 165	0,000	0,033	0,046	0,022	0,014
15	E.ACG/M.CTA - 170	0,025	0,133	0,046	0,065	0,035
16	E.ACG/M.CTA - 192	0,100	0,067	0,182	0,109	0,023
17	E.ACG/M.CTA - 194	0,025	0,100	0,046	0,054	0,019
18	E.ACG/M.CTA - 196	0,000	0,033	0,136	0,044	0,063
19	E.ACG/M.CTA - 197	0,050	0,067	0,000	0,044	0,022
20	E.ACG/M.CTA - 200	0,200	0,167	0,182	0,185	0,001
21	E.ACG/M.CTA - 202	0,100	0,200	0,091	0,130	0,022
22	E.ACG/M.CTA - 204	0,050	0,067	0,000	0,044	0,022
23	E.ACG/M.CTA - 213	0,025	0,033	0,000	0,022	0,011
24	E.ACG/M.CTA - 215	0,075	0,133	0,000	0,076	0,046
25	E.ACG/M.CTA - 217	0,050	0,100	0,000	0,054	0,035
26	E.ACG/M.CTA - 218	0,050	0,033	0,046	0,044	0,001
27	E.ACG/M.CTA - 219	0,100	0,033	0,136	0,087	0,022
28	E.ACG/M.CTA - 222	0,075	0,000	0,046	0,044	0,025
29	E.ACG/M.CTA - 225	0,025	0,033	0,091	0,044	0,018
30	E.ACG/M.CTA - 227	0,025	0,033	0,046	0,033	0,002
31	E.ACG/M.CTA - 235	0,025	0,033	0,000	0,022	0,011
32	E.ACG/M.CTA - 248	0,050	0,000	0,000	0,022	0,034
33	E.ACG/M.CTA - 250	0,050	0,133	0,046	0,076	0,023
34	E.ACG/M.CTA - 252	0,075	0,067	0,091	0,076	0,001
35	E.ACG/M.CTA - 255	0,000	0,167	0,046	0,065	0,075
36	E.ACG/M.CTA - 258	0,050	0,100	0,136	0,087	0,015
37	E.ACG/M.CTA - 265	0,050	0,067	0,046	0,054	0,002
38	E.ACG/M.CTA - 272	0,000	0,133	0,046	0,054	0,055
39	E.ACG/M.CTA - 275	0,075	0,033	0,046	0,054	0,006
40	E.ACG/M.CTA - 280	0,050	0,033	0,182	0,076	0,055
41	E.ACG/M.CTA - 283	0,025	0,033	0,000	0,022	0,011
42	E.ACG/M.CTA - 285	0,050	0,100	0,000	0,054	0,035

Anexo 2: Continuação...

Nº	Marcas AFLP	<i>C. arabica</i> (N = 39)	HDT/ICT (N = 30)	<i>C. canephora</i> (N = 22)	População total (N = 91)	G <sub>ST</sub>
43	E.ACG/M.CTA - 290	0,075	0,100	0,046	0,076	0,007
44	E.ACG/M.CTA - 295	0,075	0,033	0,091	0,065	0,010
45	E.ACG/M.CTA - 305	0,050	0,067	0,000	0,044	0,022
46	E.ACG/M.CTA - 315	0,100	0,033	0,046	0,065	0,015
47	E.ACT/M.CAT - 176	0,400	0,467	0,318	0,402	0,015
48	E.ACT/M.CAT - 185	0,250	0,267	0,364	0,283	0,012
49	E.ACT/M.CAT - 187	0,125	0,167	0,046	0,120	0,025
50	E.ACT/M.CAT - 188	0,175	0,133	0,091	0,141	0,010
51	E.ACT/M.CAT - 193	0,100	0,033	0,091	0,076	0,013
52	E.ACT/M.CAT - 195	0,050	0,033	0,046	0,044	0,001
53	E.ACT/M.CAT - 203	0,075	0,100	0,046	0,076	0,007
54	E.ACT/M.CAT - 205	0,175	0,067	0,136	0,130	0,018
55	E.ACT/M.CAT - 215	0,075	0,067	0,091	0,076	0,001
56	E.ACT/M.CAT - 234	0,175	0,133	0,136	0,152	0,003
57	E.ACT/M.CAT - 236	0,225	0,400	0,182	0,272	0,045
58	E.ACT/M.CAT - 244	0,100	0,400	0,182	0,217	0,091
59	E.ACT/M.CAT - 248	0,175	0,067	0,000	0,098	0,070
60	E.ACT/M.CAT - 250	0,175	0,100	0,136	0,141	0,008
61	E.ACT/M.CAT - 301	0,350	0,267	0,318	0,315	0,006
62	E.ACT/M.CAT - 310	0,150	0,067	0,046	0,098	0,026
63	E.ACT/M.CAT - 315	0,175	0,100	0,136	0,141	0,008
64	E.ACT/M.CAT - 329	0,175	0,167	0,273	0,196	0,014
65	E.ACT/M.CAT - 331	0,600	0,567	0,455	0,554	0,016
66	E.ACT/M.CAT - 340	0,325	0,233	0,136	0,250	0,033
67	E.ACT/M.CAT - 365	0,150	0,067	0,136	0,120	0,013
68	E.ACT/M.CAT - 387	0,075	0,033	0,046	0,054	0,006
69	E.ACT/M.CAT - 390	0,075	0,267	0,091	0,141	0,061
70	E.ACT/M.CAT - 398	0,075	0,233	0,046	0,120	0,065
71	E.ACC/M.CTG - 216	0,275	0,333	0,182	0,272	0,020
72	E.ACC/M.CTG - 235	0,100	0,100	0,046	0,087	0,009
73	E.ACC/M.CTG - 240	0,075	0,167	0,227	0,141	0,030
74	E.ACC/M.CTG - 245	0,050	0,167	0,136	0,109	0,024
75	E.ACC/M.CTG - 248	0,100	0,067	0,046	0,076	0,008
76	E.ACC/M.CTG - 254	0,200	0,333	0,318	0,272	0,018
77	E.ACC/M.CTG - 264	0,025	0,067	0,046	0,044	0,007
78	E.ACC/M.CTG - 270	0,075	0,033	0,182	0,087	0,045
79	E.ACC/M.CTG - 274	0,100	0,100	0,500	0,196	0,199
80	E.ACC/M.CTG - 281	0,100	0,067	0,046	0,076	0,008
81	E.ACC/M.CTG - 285	0,400	0,533	0,318	0,424	0,032
82	E.ACC/M.CTG - 292	0,100	0,100	0,046	0,087	0,009
83	E.ACC/M.CTG - 298	0,025	0,100	0,000	0,044	0,045
84	E.ACC/M.CTG - 304	0,925	0,967	0,955	0,946	0,006
85	E.ACC/M.CTG - 308	0,150	0,033	0,136	0,109	0,029

**Anexo 2: Continuação...**

<b>Nº</b>	<b>Marcas AFLP</b>	<b><i>C. arabica</i> (N = 39)</b>	<b>HDT/ICT (N = 30)</b>	<b><i>C. canephora</i> (N = 22)</b>	<b>População total (N = 91)</b>	<b>G<sub>ST</sub></b>
86	E.ACC/M.CTG - 310	0,100	0,067	0,046	0,076	0,008
87	E.ACC/M.CTG - 318	0,075	0,100	0,046	0,076	0,007
88	E.ACC/M.CTG - 380	0,350	0,367	0,591	0,413	0,049
89	E.ACC/M.CTG - 395	0,100	0,067	0,091	0,087	0,003
90	E.ACC/M.CTG - 400	0,075	0,067	0,046	0,065	0,003
91	E.ACT/M.CAC - 143	0,325	0,233	0,227	0,272	0,010
92	E.ACT/M.CAC - 160	0,275	0,200	0,273	0,250	0,007
93	E.ACT/M.CAC - 168	0,300	0,467	0,364	0,370	0,020
94	E.ACT/M.CAC - 170	0,350	0,400	0,318	0,359	0,005
95	E.ACT/M.CAC - 172	0,300	0,400	0,455	0,370	0,017
96	E.ACT/M.CAC - 178	0,000	0,100	0,136	0,065	0,046
97	E.ACT/M.CAC - 180	0,075	0,200	0,091	0,120	0,029
98	E.ACT/M.CAC - 192	0,125	0,100	0,136	0,120	0,002
99	E.ACT/M.CAC - 211	0,250	0,200	0,091	0,196	0,030
100	E.ACT/M.CAC - 240	0,425	0,367	0,455	0,413	0,006