

CRISTIANO CAIXETA NUNES

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Hemileia vastatrix*  
NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Tese 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  
2006

CRISTIANO CAIXETA NUNES

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Hemileia vastatrix*  
NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Tese 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: 28 de abril de 2006.

---

Fabício de Ávila Rodrigues

---

José Rogério de Oliveira

---

Hudson Teixeira

---

Luiz Antônio dos Santos Dias

---

Luiz Antonio Maffia  
(Orientador)

Dedico esta conquista  
aos meus pais João Lázaro Caixeta e Vilma Caixeta Nunes,  
ao meu irmão Tiago Caixeta Nunes e  
a minha esposa Patrícia Mancio.  
Enfim, a todos os meus familiares que  
contribuíram direta ou indiretamente para a realização de meus estudos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Fitopatologia e a Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade da realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo durante o período do mestrado.

Ao Professor Luiz Antonio Maffia pela orientação, idéias, ensinamentos e principalmente pela amizade consolidada durante o curso.

Ao Professor Eduardo Seiti Gomide Mizubuti pelas significativas críticas, sugestões e idéias para a realização da tese.

Aos Professores Sérgio Hermínio Brommonschenkel e Acelino Couto Alfenas pelas dicas, orientações, críticas e sugestões.

Aos membros da banca Fabrício de Ávila Rodrigues, Hudson Teixeira, Luiz Antônio dos Santos Dias e José Rogério de Oliveira pelas sugestões durante a defesa.

A todos os Professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos.

Aos companheiros de república Leonardus, Flancer, Tiago, Henrique, Mauro, Everaldo, Evander, David, Brainer e Aderlan.

Aos companheiros do laboratório Luciano, Júlio César, Valdir, Brainer, Fernando, Antônio, Diógenes, Dulcélis, Paulo, Eugênio, Carine, Sandra, Tatiana e Magnólia.

Aos amigos Davi Mesquita e Reginaldo Buselli pelos valiosos conselhos e amizade firmada durante esta caminhada pela UFV.

Aos amigos da turma do mestrado pela companhia durante períodos de estudos.

Além da dedicação é necessário agradecer, mais uma vez, a minha amável esposa Patrícia Mancio e a minha insubstituível família João Lázaro, Vilma e Tiago não somente pelo suporte e incentivo mas principalmente pelos momentos que estive ausente de suas vidas durante a realização desta etapa. Obrigado pela compreensão.

## **BIOGRAFIA**

CRISTIANO CAIXETA NUNES, filho de João Lázaro Caixeta e Vilma Caixeta Nunes, nasceu em 24 de outubro de 1979, em Patos de Minas, Estado de Minas Gerais.

Em 1998, ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, obtendo o título de Engenheiro Agrônomo em Janeiro de 2004.

Em Março do mesmo ano, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

## ÍNDICE

|   | Página |
|---|--------|
| <b>RESUMO</b> .....   | vi     |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | vii    |
| <b>1- INTRODUÇÃO</b> .....  | 1      |
| <b>2- REVISÃO DE LITERATURA</b> .....   | 3      |
| <b>2.1- Características gerais de <i>Hemileia vastatrix</i></b> .....                                   | 3      |
| <b>2.2- Características gerais dos marcadores microssatélite e RAPD</b> .....                           | 4      |
| <b>2.3- Marcadores microssatélite e RAPD no estudo da estrutura populacional de fitopatógenos</b> ..... | 6      |
| <b>3- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 9      |
| <b>3.1- Material vegetal</b> .....  | 9      |
| <b>3.2- Obtenção dos isolados de <i>Hemileia vastatrix</i></b> .....                                    | 9      |
| <b>3.3- Multiplicação dos isolados de <i>Hemileia vastatrix</i></b> .....                               | 10     |
| <b>3.4- Extração de DNA</b> .....   | 10     |
| <b>3.5- Integridade do DNA genômico de <i>H. vastatrix</i></b> .....                                    | 11     |
| <b>3.6- Marcador microssatélite</b> .....   | 12     |
| <b>3.7- Marcador RAPD</b> .....   | 13     |
| <b>3.8- Análise dos marcadores moleculares</b> .....  | 14     |
| <b>4- RESULTADOS</b> .....  | 15     |
| <b>4.1- Integridade das amostras a partir dos primers ITS</b> .....                                     | 15     |
| <b>4.2- Marcador microssatélite</b> .....   | 16     |
| <b>4.3- Marcador RAPD</b> .....   | 18     |
| <b>5- DISCUSSÃO</b> .....   | 21     |
| <b>6- CONCLUSÕES</b> .....  | 25     |
| <b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | 26     |

## RESUMO

NUNES, Cristiano Caixeta, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Abril de 2006.  
**Diversidade genética de populações de *Hemileia vastatrix* no estado de Minas Gerais.** Orientador: Luiz Antonio Maffia. Conselheiros: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti, Sérgio Hermínio Brommonschenkel e Acelino Couto Alfenas.

Utilizaram-se os marcadores microssatélite e RAPD para a caracterização de 120 isolados de *Hemileia vastatrix* obtidos em 2005, de cafeeiros de seis municípios, sob dois sistemas de cultivos (convencional e orgânico), de duas das principais regiões cafeeicultoras de Minas Gerais (Zona da Mata e Sul de Minas). Após avaliar a integridade das amostras de DNA dos isolados, com o par de primers ITS 1 e ITS 4, empregaram-se três pares de primers microssatélites e três primers RAPD para estudar a diversidade genética de *H. vastatrix*. Obtiveram-se padrões de bandas monomórficas, com os primers microssatélites, e polimórficas, com os primers RAPD. Considerando todos os locos, a diversidade gênica ( $h$ ) foi de 0,28, a diferenciação genética ( $Gst$ ) de 0,22 e, portanto, o  $Gst$  foi considerado alto. Nas lavouras sob cultivo orgânico, ocorreram maiores valores de  $h$  (0,29) e  $Gst$  (0,25). Comparando-se as regiões de cultivo, na Zona da Mata ocorreram maior  $h$  (0,27), porém menor  $Gst$  (0,17). Os valores de  $h$  e do número de migrantes ( $Nm$ ) máximos ocorreram nos municípios de Tombos (0,29) e Poços de Caldas (11,90), respectivamente. Pela análise de agrupamento não foi possível identificar grupos de isolados com características que permitissem relacioná-los quanto à origem e ao sistema ou região de cultivo.

## ABSTRACT

NUNES, Cristiano Caixeta, M.S., Universidade Federal de Viçosa, April 2006. **Genetic diversity of *Hemileia vastatrix* populations from Minas Gerais State.** Advisor: Luiz Antonio Maffia. Committee Members: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti, Sérgio Hermínio Brommonschenkel and Acelino Couto Alfenas.

A total of 120 isolates of *Hemileia vastatrix*, obtained from two coffee crop systems (conventional and organic) and six counties from two main production regions in Minas Gerais (Zona da Mata and Sul de Minas), sampled and multiplied in 2005, were characterized by microsatellite and RAPD markers. After checking DNA integrity of the samples by ITS 1 and ITS 4 primer pairs, we assessed the genetic diversity of all isolates with three microsatellite primer pairs and three RAPD primers. Bands from microsatellite primers were monomorphic, whereas bands from RAPD primers were polymorphic. Over all loci, the genetic diversity ( $h$ ) was 0.28 and the genetic differentiation ( $Gst$ ) was 0.22, therefore the  $Gst$  was considered high. Higher  $h$  (0.29) and  $Gst$  (0.25) values were estimated for the crops under organic system. When regions were compared, for Zona da Mata we estimated high  $h$  (0.27), but low  $Gst$  (0.17) values. The highest  $h$  and number of migrants ( $Nm$ ) values were estimated for Tombos (0.29) and Poços de Caldas (11.90) counties, respectively. The cluster analysis did not show any structure regarding to the origin, crop system or production region of the isolates.



## 1- INTRODUÇÃO

A ferrugem, causada por *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., é a principal doença do cafeeiro (*Coffea* spp.) no mundo. O patógeno infecta folhas e causa, principalmente, redução na área fotossintética, desfolha prematura e redução na produtividade. Em alguns casos, perdas na produção podem atingir 30%, normalmente em *Coffea arabica* L., espécie responsável por 75% da produção mundial de café (Kushalapa & Eskes, 1989). Medidas de controle da doença dependem do sistema de cultivo. Em lavouras conduzidas sob sistema de cultivo convencional utilizam, principalmente, variedades resistentes e pulverização com fungicidas (Zambolim *et al.*, 1997). Em contrapartida, em lavouras sob sistema de cultivo orgânico utilizam-se caldas como medida alternativa de controle (Carvalho *et al.*, 2002; Ricci *et al.*, 2002).

No Brasil, o sistema de cultivo de café está sob período de transformações, que são reflexos diretos de demandas dos consumidores, principalmente do exterior, exigentes por cafés considerados especiais, como o orgânico. Em Minas Gerais, o principal estado produtor de café do Brasil, os cafeicultores vêm implantando lavouras no sistema orgânico ou transformando lavouras convencionais em orgânica. Conseqüentemente, deve-se enfatizar o uso de variedades resistentes no controle de doenças. Entretanto, a obtenção de variedades comerciais de café com resistência duradoura à ferrugem é difícil (Eskes, 1989), pois quando se desenvolvem variedades resistentes, o aparecimento de novas raças de *H. vastatrix* resulta na perda da resistência, como ocorreu com cafeeiros derivados do híbrido de Timor (Várzea & Marques, 2005). Até recentemente, mais de 45 raças fisiológicas de *H. vastatrix* foram caracterizadas pelo Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), em Oeiras, Portugal (Várzea & Marques, 2005). No Brasil, durante o período de 30 anos (1972 – 2002) 17 raças do fungo foram detectadas (Zambolim *et al.*, 2005). Conhecer os mecanismos evolutivos que governam mudanças genéticas nas populações do patógeno e a estrutura genética das populações tem implicações importantes para o manejo da doença (McDonald, 1997; McDonald & Linde, 2002). Entretanto, para populações de *H. vastatrix* essas informações são escassas.

Nas últimas décadas, em vista das limitações dos marcadores genéticos convencionais, incrementaram-se as análises genéticas de populações de fitopatógenos com o emprego dos marcadores moleculares baseados na separação eletroforética de proteínas e DNA (ácido desoxirribonucléico) (McDonald & McDermott, 1993, Parker *et al.*, 1998). Os marcadores moleculares que se baseiam na reação em cadeia da polimerase (PCR – ‘*Polymerase Chain Reaction*’) são mais apropriados para patógenos biotróficos, como as ferrugens (McDonald, 1997). Neste caso, destacam-se os marcadores microssatélite e o RAPD (‘*Random Amplified Polymorphic DNA*’). O marcador microssatélite tem as vantagens de ser altamente polimórfico, distinguir indivíduos homozigotos de heterozigotos, ser seletivamente neutro e ser específico para o organismo em estudo. O marcador RAPD é de baixo custo e não demanda conhecimento genético prévio do organismo a ser estudado. Entretanto, pode não ser específico ao organismo em estudo, ter baixa reprodutibilidade e não distinguir indivíduos homozigotos de heterozigotos (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Parker *et al.*, 1998; Liu & Cordes, 2004).

Apesar da importância de *H. vastatrix* para a cafeicultura mundial e dos relatos quanto à identificação de raças fisiológicas (Silva, 2000; Gonçalves *et al.*, 2002), direcionou-se pouca atenção a estudos genético-moleculares do fungo. Ainda mais raros são os estudos moleculares relacionados à diversidade genética de *H. vastatrix*. Recentemente, utilizou-se o marcador RAPD no estudo da diversidade genética de isolados do patógeno da coleção do CIFC (Gouveia *et al.*, 2005). Não se encontraram relatos quanto ao emprego de marcadores microssatélites em populações de *H. vastatrix*.

Considerando a hipótese de que existe variabilidade genética em populações de *H. vastatrix* e a importância da genética molecular como ferramenta para subsidiar estratégias visando o controle de doenças de plantas e do estudo da estrutura genética de populações de patógenos, este trabalho objetivou estudar a variabilidade de *H. vastatrix*. Para tal, utilizaram-se populações oriundas de cafezais de diferentes locais e sistemas de cultivo do estado de Minas Gerais, e se estimou a variabilidade genética por meio dos marcadores microssatélite e RAPD.

## 2- REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1- Características gerais de *Hemileia vastatrix*

As ferrugens possuem ciclo de vida complexo, pois podem formar até cinco tipos de estruturas: pécnio, écio, urédia, télia e basídia (Ono, 2002). Entretanto, *H. vastatrix* possui ciclo de vida incompleto, pois são conhecidos apenas os estádios de urédia, télia e basídia (Kushalappa, 1989), mas não os de pécnio e écio (Rajendren, 1967), quer em condições naturais ou controladas (Gopalkrishnam, 1951). Normalmente, há produção de urediniósporos em grande quantidade e, ocasionalmente, formam-se teliósporos e basidiósporos. No ciclo de vida do fungo, é fundamental o papel dos urediniósporos, pois eles são responsáveis pela dispersão e pelo início da infecção em *Coffea* spp. Os urediniósporos são dicarióticos (Ono, 2002). Para formação de teliósporos, exigem-se condições de umidade e temperaturas baixas (Coutinho, 1995).

Em *H. vastatrix*, conhece-se grande número de raças fisiológicas, caracterizadas por meio da inoculação do fungo e expressão de sintomas em variedades diferenciadoras. A caracterização das raças ocorre com maior frequência no CIFC (Eskes, 1989). Até o momento, foram caracterizadas mais de 45 raças fisiológicas de *H. vastatrix* no CIFC, a partir de amostras provenientes de vários países produtores (Várzea & Marques, 2005). No Brasil, de 1972 a 2002, caracterizaram-se 17 raças fisiológicas do patógeno (Zambolim *et al.*, 2005).

Desde o primeiro relato de ocorrência de *H. vastatrix* no Brasil (Chaves *et al.*, 1970), desenvolveram-se vários trabalhos visando o controle da ferrugem do cafeeiro. Obteve-se sucesso no controle químico da doença (Santos *et al.*, 2002; Garçon *et al.*, 2004), já se desenvolveram variedades resistentes (Pereira & Sakiyama, 1999), direcionaram-se esforços no monitoramento das raças fisiológicas (Silva, 2000; Gonçalves *et al.*, 2002), mas dedicou-se pouca atenção a estudos genéticos e moleculares do patógeno. Há poucos estudos moleculares da diversidade genética de *H. vastatrix* (Gouveia *et al.*, 2005; Zambolim *et al.*, 2005). Recentemente, empregou-se o marcador RAPD no estudo da diversidade genética de isolados de *H. vastatrix* da coleção do CIFC

(Gouveia *et al.*, 2005). Não se obteve relato quanto ao uso do marcador microssatélite em populações do fungo.

Apesar da importância de *H. vastatrix*, verificou-se o quanto o fungo é pouco estudado a nível molecular, após consulta ao banco de dados NCBI (*'National Center for Biotechnology Information'*), pois se encontraram apenas quatro seqüências de ácido nucléicos: seqüências parciais dos genes que codificam para o RNA ribossomal 28S, 18S, citocromo b e uma seqüência completa constituída pelo ITS (*'Internal Transcribed Spacer'*) 1, ITS 2 e do gene que codifica para o RNA ribossomal 5,8 S. Obteve-se, também, apenas uma seqüência protéica, caracterizada como citocromo b. Não se encontrou qualquer seqüência caracterizada como um possível loco microssatélite. Recentemente, com o seqüenciamento parcial do genoma de *H. vastatrix*, identificaram-se vários pressupostos locos microssatélites e muitas seqüências com retrotransposons (Brommonschenkel, S. H., 2005, dados não publicados).

## **2.2- Características gerais dos marcadores microssatélite e RAPD**

Pode-se caracterizar a variabilidade de fungos fitopatógenos por diferentes tipos de marcadores, como os baseados em características morfológicas, virulência, compatibilidade sexual e resistência a fungicidas (Michelmore & Hulbert, 1987; Pryor & Michailides, 2002; van der Waals *et al.*, 2004; Leonard & Martineli, 2005; Köller *et al.*, 2005). Entretanto, nas últimas décadas, cresceu a importância dos marcadores moleculares baseados na separação eletroforética de proteínas e DNA para análises genéticas de fungos fitopatogênicos (McDonald & McDermott, 1993, Gouveia *et al.*, 2005), pois as técnicas moleculares têm várias vantagens sobre os demais tipos de marcadores (Michelmore & Hulbert, 1987, Parker *et al.*, 1998; Liu & Cordes, 2004).

Define-se por marcador molecular todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, ou de um segmento específico de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Os principais marcadores moleculares são as isoenzimas, os polimórficos no comprimento de fragmentos de restrição (*'RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism'*), os polimórficos de DNA amplificado ao acaso (RAPD), os microssatélites ou seqüência simples repetida (*'SSR – Simple Sequence Repeat'*) e os

polimórficos de comprimento de fragmentos amplificados (‘AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism’) (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Parker *et al.*, 1998; Zane *et al.*, 2002; Liu & Cordes, 2004).

As vantagens e desvantagens de um marcador molecular dependem de várias características como especificidade ao organismo em estudo, custo para implementação, reprodutibilidade, número de alelos identificados por locos e distribuição no genoma. Estas características serão exemplificadas apenas para os marcadores microssatélites e RAPD, pois foram os empregados neste trabalho. Ambos os marcadores baseiam-se na reação em cadeia da polimerase. Esta é a primeira vantagem de ambos, pois são apropriados a patógenos biotróficos, como as ferrugens (McDonald, 1997). Adicionalmente, o marcador microssatélite é, normalmente, polimórfico, multialélico, seletivamente neutro, específico ao organismo em estudo e distingue indivíduos homozigotos de heterozigotos. As principais limitações desse marcador são ter custo elevado e demandar grande quantidade de trabalho para desenvolver pares de primers que flanqueiam o loco repetitivo (Zane *et al.*, 2002). Em contrapartida, o marcador RAPD é de baixo custo e não demanda conhecimento genético prévio para ser aplicado ao organismo em estudo (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Entretanto, este marcador não tem especificidade ao organismo a ser estudado, possui limitações quanto à reprodutibilidade e não distingue indivíduos homozigotos de heterozigotos (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Parker *et al.*, 1998; Liu & Cordes, 2004).

Os microssatélites constituem-se de unidades de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em seqüência, distribuídos por todo o genoma de vários organismos procarióticos e eucarióticos (Karaoglu *et al.*, 2005). Há várias técnicas para isolamento de locos microssatélites (Zane *et al.*, 2002). A tradicional baseia-se na extração de DNA genômico total do organismo de interesse, clivagem com enzima de corte freqüente, construção da biblioteca genômica e triagem de colônias com sonda complementar a fragmentos microssatélites. A partir destas colônias, confirma-se a presença e a extensão de seqüências que contenham microssatélites. Após seqüenciamento, desenham-se pares de primers por meio de softwares específicos, e se realiza a reação de PCR para verificar o nível de polimorfismo gerado pelos locos identificados (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Zane *et al.*, 2002). O uso de marcadores RAPD não requer nenhuma das etapas descritas

para os microssatélites, pois se identificam os locos RAPD pela aplicação arbitrária de primers. No entanto, é necessária a triagem de primers apropriados ao objetivo do trabalho (Williams *et al.*, 1990; Ferreira & Gratapaglia, 1998; Liu & Cordes, 2004; Gouveia *et al.*, 2005).

### **2.3- Marcadores microssatélite e RAPD no estudo da estrutura populacional de fitopatógenos**

É crescente a popularidade dos SSR, em vista do número de artigos publicados sobre o isolamento de locos microssatélites em vários organismos (Zane *et al.*, 2002), inclusive de fitopatógenos. Identificaram-se vários locos microssatélites em *Venturia inaequalis* (Tenzer *et al.*, 1999; Guerin *et al.*, 2004), *Mycosphaerella musicola* (Molina *et al.*, 2001), *Magnaporthe grisea* (Soubabere *et al.*, 2001), *Sclerotinia sclerotiorum* (Sirjusingh & Kohn, 2001), *Botrytis cinerea* (Fournier *et al.*, 2002), *Fusarium culmorum* (Giraud *et al.*, 2002), *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (Enjalbert *et al.*, 2002), *Heterodera schachtii* (Plantard & Porte, 2003), *Puccinia triticina* (Duan *et al.*, 2003), *Fusarium graminearum* (Suga *et al.*, 2004), *Microcyclus ulei* (Le Guen *et al.*, 2004), *Alternaria brassicicola* (Avenot *et al.*, 2005), *Cylindrocladium parasiticum* (Wright *et al.*, 2006) e *Melampsora larici-populina* (Barrès *et al.*, 2006).

Recentemente, Lim *et al.* (2004) basearam-se em seqüências de nucleotídeos de bancos de dados referentes ao genoma de 14 fungos para estudar a abundância de microssatélites compostos por diversos motivos. Os autores verificaram que a densidade de microssatélites foi maior em genomas com conteúdo reduzido de GC e que, dentre os microssatélites constituídos de 2 e 3 nucleotídeos analisados, os mais freqüentes eram os que continham os motivos (AC)<sub>n</sub>, (AG)<sub>n</sub>, (AAC)<sub>n</sub>, (AAG)<sub>n</sub> e (AAT)<sub>n</sub>. A presença freqüente destes motivos deve ser ponto de partida na busca por microssatélites em fungos cujas seqüências não estejam disponíveis em bancos de dados (Lim *et al.*, 2004).

Após caracterizados, os locos microssatélites tornam-se uma ferramenta valiosa no estudo de diversidade e estrutura genética de populações de fitopatógenos. Tenzer *et al.* (1999) utilizaram sete locos microssatélites no estudo de 350 isolados de *V. inaequalis*, coletados em 1995, em 11 regiões de cinco países europeus. Observou-se alta

diversidade dentro das populações e baixa diferenciação genética entre populações ( $Gst = 0,07$ ), provavelmente, em função de um efeito gargalo (Tenzer *et al.*, 1999). Em *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme*, ferrugem macrocíclica e heteróica, com microsatélite detectou-se variabilidade alta entre isolados coletados de regiões do EUA, sendo que 88,4% da variação ocorreu dentro das populações (Kubisiak *et al.*, 2004).

Marcadores RAPD ainda são utilizados para caracterizar diversidade e estrutura genética de populações de fitopatógenos como em *V. inaequalis* (Tenzer & Gessler, 1997), *Uromyces appendiculatus* (Sandlin *et al.*, 1999) e *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (McCallum *et al.*, 1999). Atualmente, o uso do RAPD reduziu principalmente com o desenvolvimento de outros marcadores. Contudo, apesar das desvantagens, o marcador RAPD continua sendo acessível, rápido, de baixo custo e fácil aplicação para o estudo da estrutura genética de fitopatógenos.

Populações de vários fungos causadores de ferrugens foram caracterizadas com o marcador RAPD. A partir de dez isolados de *U. appendiculatus*, separaram-se dois grupos: um com isolados específicos e outro com isolados não específicos a genótipos de feijão andino (Sandlin *et al.*, 1999). Os autores observaram, em dois isolados, padrão de bandas RAPD intermediário, o que sugeriu a presença de plasmogamia, mas não cariogamia, entre os isolados dos diferentes grupos. Com marcadores de virulência, isoenzimas e RAPD, não se diferenciaram populações de *P. graminis* f. sp. *tritici*, oriundas da América do Norte, América do Sul e Europa (McCallum *et al.*, 1999). Com esses resultados, os autores consideram lógica a hipótese de que as populações deste fungo nas três regiões originaram-se de um ancestral comum. Entre vários marcadores, apenas com o RAPD foi possível mostrar associação entre a diferenciação genética e a origem geográfica de duas populações de *Cronartium ribicola*, advindas do leste e do oeste dos EUA (Hamelim *et al.*, 2000). Para os autores, uma provável explicação para a diferenciação entre as duas populações seria uma barreira ao fluxo gênico, caracterizada pela ausência de hospedeiros da ferrugem.

Recentemente, empregou-se o marcador RAPD para estimar a diversidade genética de *H. vastatrix*, a partir de 45 isolados de diferentes regiões cafeeicultoras do mundo (Gouveia *et al.*, 2005). Inicialmente, os autores testaram 42 primers em 10 isolados diferentes em virulência. A partir do polimorfismo gerado, selecionaram-se os

primers OPA-9, OPD-5 e OPF-6 para as análises. A diversidade genética total ( $H_t$ ) nas populações da África e Ásia foi superior àquela dentro da população ( $H_s$ ). A diferenciação genética foi considerável entre os isolados da África ( $G_{st}= 0,865$ ) e Ásia ( $G_{st}= 0,768$ ), mas não entre os isolados da América do Sul ( $G_{st}= 0,266$ ).



### **3- MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1- Material vegetal**

Mantiveram-se plantas de *C. arabica*, ‘Catuaí Vermelho’, de aproximadamente 6 meses de idade, em vasos plásticos com capacidade de 4 L (duas plantas/vaso) com a mistura de solo: esterco bovino curtido: areia, proporção de 10:5:1, em condições de casa de vegetação. As plantas foram irrigadas diariamente e fertilizadas mensalmente com 35 ml do adubo Ouro Verde/vaso, seguindo as especificações do fabricante para o cafeeiro (2g/L). As plantas não receberam qualquer aplicação de fungicida ou inseticida.

#### **3.2- Obtenção dos isolados de *Hemileia vastatrix***

Em abril e maio de 2005, coletaram-se amostras de folhas de cafeeiros com ferrugem em duas das principais regiões cafeeicultoras do Estado de Minas Gerais (Zona de Mata e Sul de Minas). Efetuaram-se as coletas, na Zona da Mata, nos municípios de Ervália, Tombos e Manhumirim e, no Sul de Minas, em Poços de Caldas, Machado e Lavras. Em cada município, as amostras originaram-se de lavouras conduzidas nos sistemas orgânico e convencional.

Na amostragem, adotou-se caminamento em ‘W’. Coletaram-se 15 amostras em cada uma das duas lavouras dos municípios de Lavras, Tombos, Manhumirim e Ervália e 13 amostras por lavoura, nos municípios de Poços de Caldas e Machado, totalizando 172 amostras. Cada amostra foi constituída por, aproximadamente, 100 folhas de café com pústulas originadas da mesma planta. Georeferenciou-se o local de cada amostra. As amostras foram transportadas, em sacos plásticos em caixas de isopor, e mantidas no Laboratório de Epidemiologia, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa. Com um pincel de pelo macio, extraíram-se os urediniósporos de cada folha e se considerou como um isolado o conjunto de urediniósporos obtidos da raspagem das pústulas de todas as 100 folhas de cada amostra (1 amostra = 1 isolado) (Tabela 1).

### **3.3- Multiplicação dos isolados de *Hemileia vastatrix***

Multiplicou-se cada isolado em cafeeiros, conforme descrito no item 3.1, por uma geração de urediniósporos. Inoculou-se cada isolado, no segundo e terceiro pares de folhas das plantas, segundo método adaptado de Silva (2000). Na face abaxial de cada folha, pincelaram-se os urediniósporos com um pincel (Tigre® nº 6) e, em seguida, pulverizou-se água evitando-se a deposição de gotas grandes. Após a inoculação, transferiram-se as plantas para câmara de nevoeiro a 25°C e ausência de luz. Após 48 h, as plantas foram retiradas da câmara de nevoeiro e recobertas com sacos plásticos transparentes com dois furos de aproximadamente 10 cm<sup>2</sup> localizados nas extremidades superiores laterais do plástico. Cada saco plástico apoiava-se na estrutura de arame rígido sustentada pelo vaso para evitar o contato com as plantas. Em seguida, transferiram-se as plantas para câmara de crescimento a 22°C e fotoperíodo de 12 h.

Após o aparecimento de novas uredínias, cerca de 30 a 45 dias após as inoculações 27 isolados não produziram pústulas, 24 isolados produziram pústulas, porém com baixa quantidade de urediniósporos (5 mg, aproximadamente), conseqüentemente insuficiente para extração do DNA genômico. Multiplicação eficiente ocorreu com 120 isolados. Conforme descrito anteriormente, os urediniósporos dos 120 isolados foram coletados, armazenados em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, congelados em nitrogênio líquido (N<sub>L</sub>) e mantidos a -20°C até o momento de se extrair o DNA.

### **3.4- Extração de DNA**

Adaptou-se a metodologia de Faleiro (1997). De cada isolado, extraiu-se DNA genômico a partir de 40 a 60 mg de urediniósporos. Esses foram macerados na presença de N<sub>L</sub> com um pistilo em tubo de microcentrífuga. A cada tubo, adicionaram-se 800 µL do tampão de extração (SDS 3%; Tris 50 mM, pH 8,0; EDTA 50 mM, pH 8,0; NaCl 500 mM; e mercaptoetanol 2%) previamente aquecido a 65 °C. Após misturar o macerado ao tampão, manteve-se cada tubo a 65 °C durante 1 h, e, a cada 15 min, homogeneizava-se por suaves inversões. Centrifugou-se a 14.000 rpm, por 10 min a 4 °C e se transferiu o

sobrenadante para um tubo novo, ao qual se adicionaram 750 µL da mistura fenol tamponado: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1, v:v). Homogeneizou-se a mistura com suaves inversões, por 2 min, centrifugou-se a 14.000 rpm, por 10 min a 4 °C, e se transferiu o sobrenadante para um tubo novo, ao qual se adicionaram 500 µL da mistura clorofórmio-álcool isoamílico (24:1, v:v). Homogeneizou-se a mistura por meio de suaves inversões por 2 min, centrifugou-se a 14.000 rpm, por 10 min a 4 °C, e se transferiram aproximadamente 500 µL da fase superior para um tubo limpo, ao qual se adicionaram 500 µL de isopropanol gelado e 15 µL de acetato de sódio, 3,0 M, pH 7,0 e se incubou a -20 °C. Após 24 h, centrifugou-se a 12.000 rpm, por 10 min a 4°C, descartou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o pellet resultante em 500 µL de etanol 70% e se centrifugou a 12.000 rpm, por 10 min a 4°C. Esta etapa foi repetida, porém com etanol 95%. O pellet resultante foi seco à temperatura ambiente durante 35 min, ressuspendido em 40 µL de tampão TE (Tris, 10 mM, pH 8,0; EDTA, 1 mM), contendo 50 µg/mL de RNase e a mistura incubada a 37 °C durante 30 min. Avaliou-se a qualidade e a quantidade do DNA total extraído de cada isolado por espectrofotometria e por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) no tampão TBE 1X. As amostras com qualidade e quantidade satisfatórias foram diluídas para a concentração de trabalho de 10 ng/µL e armazenadas a -20 °C.

### **3.5- Integridade do DNA genômico de *H. vastatrix***

Como *H. vastatrix* é fungo biotrófico, contaminações com DNA exógeno podem ocorrer durante a coleta de amostras e extração de urediniósporos. Visando excluir possíveis fontes de contaminação, compararam-se fragmentos gerados pela reação de PCR com os primers ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS 4 (5'-TCCTCCG CTTATTGATATGC-3') a partir de DNA genômico extraído de *H. vastatrix*, de folhas sadias (segundo par) de *C. arabica* e de *Verticillium hemileiae* Bour. (hiperparasita do patógeno). Estimou-se o tamanho de cada fragmento por comparação ao marcador de peso molecular padrão de 100 Kb (Invitrogen). Extraíram-se o DNA genômico das folhas e do hiperparasita com o mesmo protocolo utilizado para *H. vastatrix*.

Realizou-se a PCR para o volume final de 25  $\mu$ L, contendo: 10 ng de DNA de *H. vastatrix*; 1X do tampão da enzima (20 mM Tris-HCL pH 8,4; 50 mM KCL e 3 mM MgCl<sub>2</sub>); 0,4  $\mu$ molar do primer ITS 1; 0,4  $\mu$ molar do primer ITS 4; 0,4 mM de dNTP; e 1 U da enzima *Taq* polimerase (Invitrogen). Utilizou-se o termociclador modelo PTC-100 (MJ Research Inc.) para o processo de amplificação. Programou-se uma etapa inicial de desnaturação (1 min a 94 °C), seguindo-se 40 ciclos constituído de desnaturação (30 s a 94 °C), anelamento (1 min a 52 °C) e extensão (30 s a 72 °C). Por fim, uma etapa de extensão final (5 min a 72 °C). Após a PCR, analisaram-se 5  $\mu$ L de cada reação por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE 1X, corou-se o gel com brometo de etídio e se capturou a imagem no programa Kodak 1D 3.6 Image Analysis Software.

### **3.6- Marcador microssatélite**

A partir do seqüenciamento amostral do genoma de *H. vastatrix* realizado pela equipe do Prof. Sérgio H. Brommonschenkel, Laboratório de Genômica, Bioagro – UFV, identificaram-se possíveis pressupostos locos microssatélites (dados não publicados). As seqüências dos locos microssatélites e de seus respectivos pares de primers que flanquiam cada extremidade provieram daquele laboratório. Durante a seleção dos potenciais locos microssatélites a serem testados neste trabalho, adotou-se o seguinte critério: o maior número de repetições de motivos com dois ou três nucleotídeos. Como resultado, selecionou-se o total de oito locos microssatélites.

Os pares de primers foram sintetizados (Integrated DNA Technologies, Inc.) e testados com o isolado Hv150. Comparou-se a especificidade dos pressupostos locos microssatélites em *H. vastatrix*, *C. arabica* e *V. hemileiae*. Testaram-se todos os primers em dois grupos de isolados de *H. vastatrix*: no primeiro com 12 isolados (um de cada lavoura) e, no segundo, 10 isolados (da lavoura orgânica de Ervália). Testaram-se os primers considerados como promissores nos 120 isolados. Para as reações de PCR, utilizaram-se as condições e números de ciclos descritos em 3.5, porém utilizou-se a temperatura de anelamento específica para cada par de primer.

Após eletroforese em gel de agarose, seguindo-se a metodologia descrita no item 3.4, realizou-se também eletroforese vertical em gel desnaturante de poli(acrilamida) 6% corado com solução de nitrato de prata. Após a eletroforese vertical, manteve-se o gel aderido a uma das duas placas de vidro utilizadas durante a eletroforese, e se utilizou a placa menor. Submergiu-se o conjunto gel-placa menor em 2 L da solução de ácido acético 10%, dentro de uma bandeja, e agitou-se a 40 rpm. Após 20 min, lavou-se o gel por três vezes em 2 L de água destilada por 2 min a 40 rpm e corou-se em 2 L solução de nitrato de prata (3 g AgNO<sub>3</sub>, 3 mL de formaldeído 3%) durante 30 min a 40 rpm. Revelou-se o gel em 2 L de solução de 60 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 3 mL de formaldeído 3% e 60 µL de tiosulfato de sódio (1g/mL) até aparecimento das bandas, quando se interrompeu a reação de coloração, em 2 L da solução de ácido acético 10%. Analisou-se visualmente cada gel e se registraram as respectivas imagens em escaner (Amersham Biosciences).

### **3.7- Marcador RAPD**

Baseado em trabalho anterior, utilizaram-se os primers OPA-9 (5'-GGGTAACGCC-3'), OPD-5 (5'-TGAGCG GACA-3') e OPF-6 (5'-GGGAATTCGG-3'), os quais detectaram 77,8% de polimorfismo entre os fragmentos amplificados em 45 isolados de *H. vastatrix* (Gouveia *et al*, 2005). Após sintetizados (Integrated DNA Technologies, Inc.), empregaram-se os três primers na reação de PCR contendo DNA genômico de *H. vastatrix* (Hv150), *C. arabica* e *V. hemileiae*. Posteriormente, utilizou-se cada primer para reações nos 120 isolados de *H. vastatrix*.

Realizaram-se as reações de PCR no volume final de 25 µL, contendo: 50 ng de DNA de *H. vastatrix*; 1X do tampão da enzima (20 mM Tris-HCL pH 8,4, 50 mM KCL e 3 mM MgCl<sub>2</sub>); 0,3 µmolar de primer; 0,2 mM de dNTP; e 1 U da enzima *Taq* polimerase (Invitrogen). Programou-se o termociclador para uma etapa inicial de desnaturação (1 min a 94 °C), seguida de 40 ciclos, constituídos de desnaturação (30 s a 94 °C), anelamento dos pares (1 min a 35 °C) e uma etapa de extensão (30 s a 72 °C). Por fim, uma etapa de extensão final (5 min a 72 °C). Após a etapa de amplificação, analisaram-se

10 µL de cada reação por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) em tampão TBE 1X. Corou-se o gel com brometo de etídio e se capturou a imagem no programa Kodak.

### 3.8- Análise dos marcadores moleculares

Para os pressupostos locos microssatélites, realizou-se apenas uma análise descritiva dos dados em função das bandas monomórficas geradas pelos pares de primers. Para o marcador RAPD, estimaram-se vários parâmetros genéticos. Considerou-se um loco com dois alelos, nomeados em 0 e 1, para ausência e presença de fragmentos do gel, respectivamente. Além disso, consideraram-se os urediniósporos como diplóides.

Inicialmente, estimou-se a frequência alélica para cada loco e, posteriormente, efetuaram-se as análises de estatística de diversidade com o programa POPGENE v. 1.31 (Yeh *et al.*, 1997). Calcularam-se: número observado de alelos ( $n_a$ ), número esperado de alelos ( $n_e$ ), diversidade gênica de Nei ( $h$ ), coeficiente de diferenciação genética de Nei ( $G_{st}$ ) (Nei, 1973) e o número de migrantes ( $N_m$ ). Efetuaram-se as estimativas de diversidade para cada população (lavoura) e por grupos de populações agrupados de acordo com sistema de cultivo (convencional e orgânico), região de cultivo (Zona da Mata e Sul de Minas) e município (representado pelos dois sistemas de cultivo). Ademais, aplicou-se para locos RAPD o teste de homogeneidade de  $X^2$ , a partir de frequências entre as populações e da hipótese nula de igualdade na frequência alélica de cada loco entre as 12 populações.

A partir dos dados binários, gerados pelos três primers RAPD nas populações de *H. vastatrix* e do hiperparasita *V. hemileiae*, construiu-se através do módulo SIMQUAL ('similarity for qualitative data') uma matriz de distância genética com o coeficiente de Jaccard ( $J = a/a+b+c$ ) no programa NTSYSpc versão 2.02h. Nesse mesmo programa, por meio do módulo SAHN ('sequential agglomerative hierarical nested cluster analysis') e do método não ponderado de agrupamento aos pares utilizando médias aritméticas (UPGMA – 'unweighted pair-group method using an arithmetic average') construiu-se o dendrograma. Para interpretar os resultados, baseou-se em Dias (1998).

## 4- RESULTADOS

### 4.1- Integridade das amostras a partir dos primers ITS

O par de primers ITS não amplificou nenhum fragmento, quando se utilizou o DNA genômico de *C. arabica*. Entretanto, obtiveram-se diferentes padrões de amplificação para *H. vastatrix* (Hv150) e *V. hemileiae* (Figura 1). Em Hv150, amplificaram-se dois fragmentos de aproximadamente 950 e 650 pares de base (pb). Em *V. hemileiae*, amplificou-se apenas um fragmento de aproximadamente 550 pb. No controle negativo (ausência de qualquer DNA genômico) nenhum fragmento foi amplificado (Figura 1).

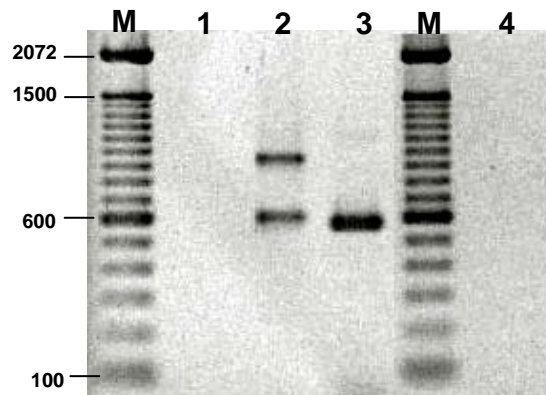


Figura 1 – Padrão de bandas amplificadas pelo par de primers ITS 1 e ITS 4. Aplicaram-se 3,0 µL do produto da PCR em gel de agarose 1,0% (p/v) contendo DNA genômico dos organismos: 1- *Coffea arabica*, 2- *Hemileia vastatrix* (Hv150), 3- *Verticillium hemileiae*, 4- reação sem DNA (controle negativo) e M- marcador de peso molecular de 100 pb.

#### 4.2- Marcador microssatélite

Detalhou-se o código de identificação, sequência de nucleotídeos, tamanho do fragmento esperado e os motivos repetitivos dos oito pressupostos microssatélites (Tabela 2). Para os oito pares de primers, amplificaram-se fragmentos de tamanhos esperados quando o DNA genômico de Hv150 foi utilizado na reação de PCR (Figura 2A). Os primers ppSSR04, ppSSR06 e ppSSR07 foram considerados promissores, pois amplificaram bandas com características de um loco microssatélite. Por outro lado, os primers ppSSR01, ppSSR02, ppSSR03, ppSSR05 e ppSSR08 amplificaram fragmentos não característicos de um loco microssatélite (Figura 2A). Repetiram-se estes padrões, característicos e não característicos de locos microssatélites, quando se testaram os oito pares de primers em dois grupos de isolados de *H. vastatrix*. O primeiro grupo constituído de 12 isolados, sendo um isolado de cada lavoura (dados não apresentados) e o segundo grupo constituído por 10 isolados oriundos da lavoura de sistema orgânico de Ervália (Figura 3).

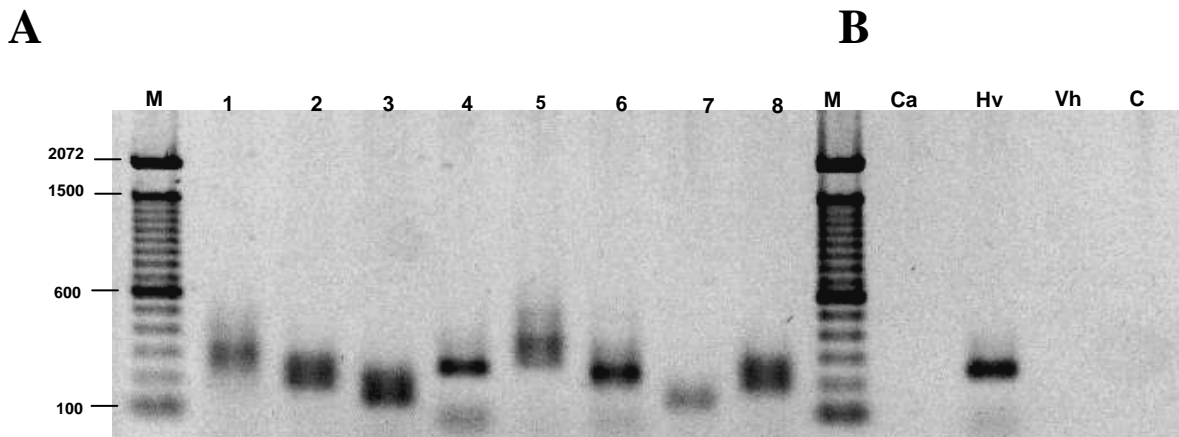


Figura 2 – Padrão de amplificação dos pressupostos locos microssatélites (SSR) e especificidade à *H. vastatrix*. Aplicaram-se cerca de 5,0 µL de cada reação de PCR em gel de agarose 1,0% (p/v). A – O isolado Hv150 foi testado com todos os pares de primers, sendo 1- ppSSR01, 2- ppSSR02, 3- ppSSR03, 4- ppSSR04, 5- ppSSR05, 6- ppSSR06, 7- ppSSR07, 8- ppSSR08 e B- Ca- *Coffea arabica*, Hv- *Hemileia vastatrix* (Hv150), Vh- *Verticillium hemileiae*, C- reação sem DNA e M- marcador de peso molecular 100 pb.



Os primers considerados promissores foram específicos ao isolado Hv150, conforme mostrado para o ppSSR04 (Figura 2B). Quando testados nos 120 isolados, os primers resultaram em fragmentos monomórficos tanto em gel de agarose quanto em gel desnaturante de poliacrilamida (Figura 4). Em poliacrilamida, além do alelo microssatélite de tamanho esperado, verificaram-se também “sombras” de pequena intensidade, resultantes de ampliações não específicas, as quais foram desconsideradas.

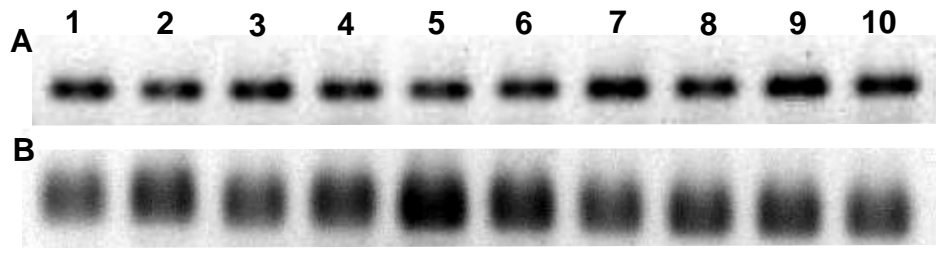


Figura 3 – Confirmação do padrão de bandas não características de locos microssatélites em 10 isolados de *H. vastatrix*. Aplicaram-se cerca de 5,0  $\mu$ L de cada reação de PCR em gel de agarose 1,0% (p/v), sendo: A – reações com ppSSR04 e B – reações com ppSSR02. Os números representam todos os isolados do município de Ervália sob sistema de cultivo orgânico: 1- Hv01, 2- Hv02, 3- Hv03, 4-Hv05, 5- Hv06, 6- Hv07, 7- Hv08, 8- Hv10, 9- Hv13 e 10- Hv15.

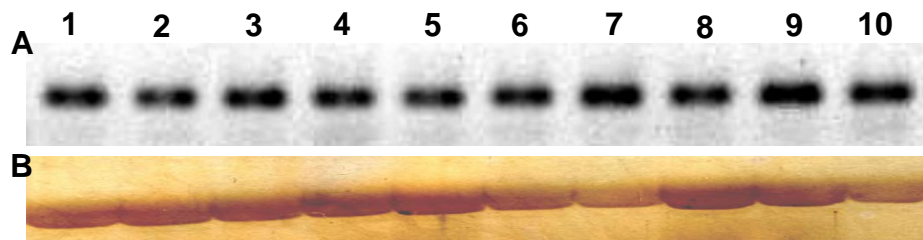


Figura 4 – Confirmação de bandas monomórficas em 10 isolados de *H. vastatrix* A – aplicaram-se cerca de 5,0  $\mu$ L da reação de PCR em gel de agarose 1,0% (p/v) e B – cerca de 2,0  $\mu$ L da reação de PCR (diluição 1:5) em gel de poliacrilamida 6%. Os números representam os isolados coletados no município de Ervália sob sistema de cultivo orgânico: 1- Hv01, 2- Hv02, 3- Hv03, 4-Hv05, 5- Hv06, 6- Hv07, 7- Hv08, 8- Hv10, 9- Hv13 e 10- Hv15.

### 4.3- Marcador RAPD

Os primers RAPD amplificaram 20 locos em *H. vastatrix*. Os primers OPD-5, OPA-9 e OPF-6 amplificaram 6, 7 e 7 bandas, respectivamente. Nomeou-se cada loco a partir da combinação entre o nome do primer e o tamanho do fragmento (Tabela 3). Para cada loco, a frequência alélica média nos 120 isolados variou de 0,01 (OPA9-400) a 0,75 (OPD5-900) (Tabela 3).

Independentemente da frequência, os locos OPD5-2100, OPD5-900, OPA9-1300, OPA9-1150, OPA9-1000, OPA9-900 e OPF6-1300 ocorreram nas 12 populações; OPF6-1500, OPF6-1000 e OPF6-900 em 11 populações; OPD5-1400 e OPF6-1100 em 10 populações; OPF6-1200 em 9 populações; OPD5-1500, OPD5-1200 e OPF6-1000 em 8 populações; OPA9-1700 e OPA9-1500 em 5 populações; OPA9-400 em 4 populações e OPD5-1800 em 3 populações (Tabela 3). O padrão de bandas amplificadas para *V. hemileiae* diferiu daquele para *H. vastatrix*, e nenhum fragmento foi amplificado com o DNA de *C. arabica* ou com o do controle negativo (Figura 5).

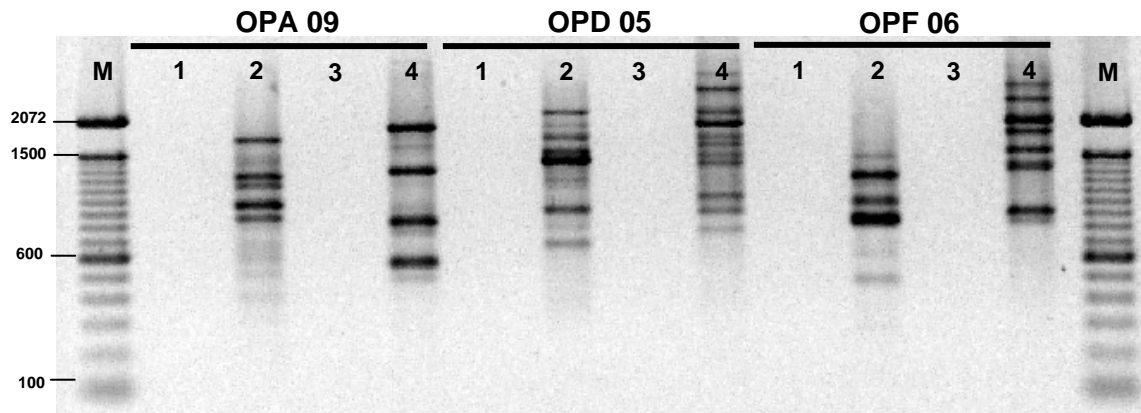


Figura 5 – Padrão de amplificação gerado pelos primers RAPD. Aplicaram-se cerca de 10,0  $\mu$ L de cada reação de PCR em gel de agarose 1,5% (p/v), sendo: 1- reação sem DNA (controle negativo), 2- *Hemileia vastatrix* (Hv150), 3- *Coffea arabica*, 4- *Verticillium hemileiae* e M- marcador de peso molecular 100 pb.

Estimaram-se as estatísticas de diversidade a partir dos vários critérios de hierarquização. A diversidade gênica ( $h$ ), foi maior no cultivo orgânico ( $h= 0,29$ ,  $n= 60$ ), na Zona da Mata ( $h= 0,27$ ,  $n= 60$ ) e no município de Tombos ( $h= 0,28$ ,  $n= 20$ ). Quando se analisaram as lavouras separadamente,  $h$  variou de 0,14 ( $n= 10$ , Poços de Caldas, sistema orgânico) a 0,29 ( $n= 10$ , Tombos, sistema orgânico). A diversidade gênica média ( $n= 120$ ) foi de 0,28 (Tabela 4).

O coeficiente de diferenciação genética de Nei ( $Gst$ ) médio foi de 0,22 e foi maior nas lavouras conduzidas organicamente ( $Gst= 0,25$ ,  $n= 60$ ), no Sul de Minas ( $Gst= 0,23$ ,  $n= 60$ ) e no município de Lavras ( $Gst= 0,25$ ,  $n= 20$ ) (Tabela 5). O número médio de migrantes foi de 1,70 e foi máximo em Poços de Caldas ( $Nm= 11,90$ ) e mínimo em Lavras ( $Nm= 1,89$ ) (Tabela 5). O teste do  $X^2$  foi significativo para 14 dos 20 locos RAPD analisados (Tabela 6).

Na análise de agrupamento, não se observou associação entre origem do isolado com sistema de cultivo ou a região de cultivo (Figura 6).

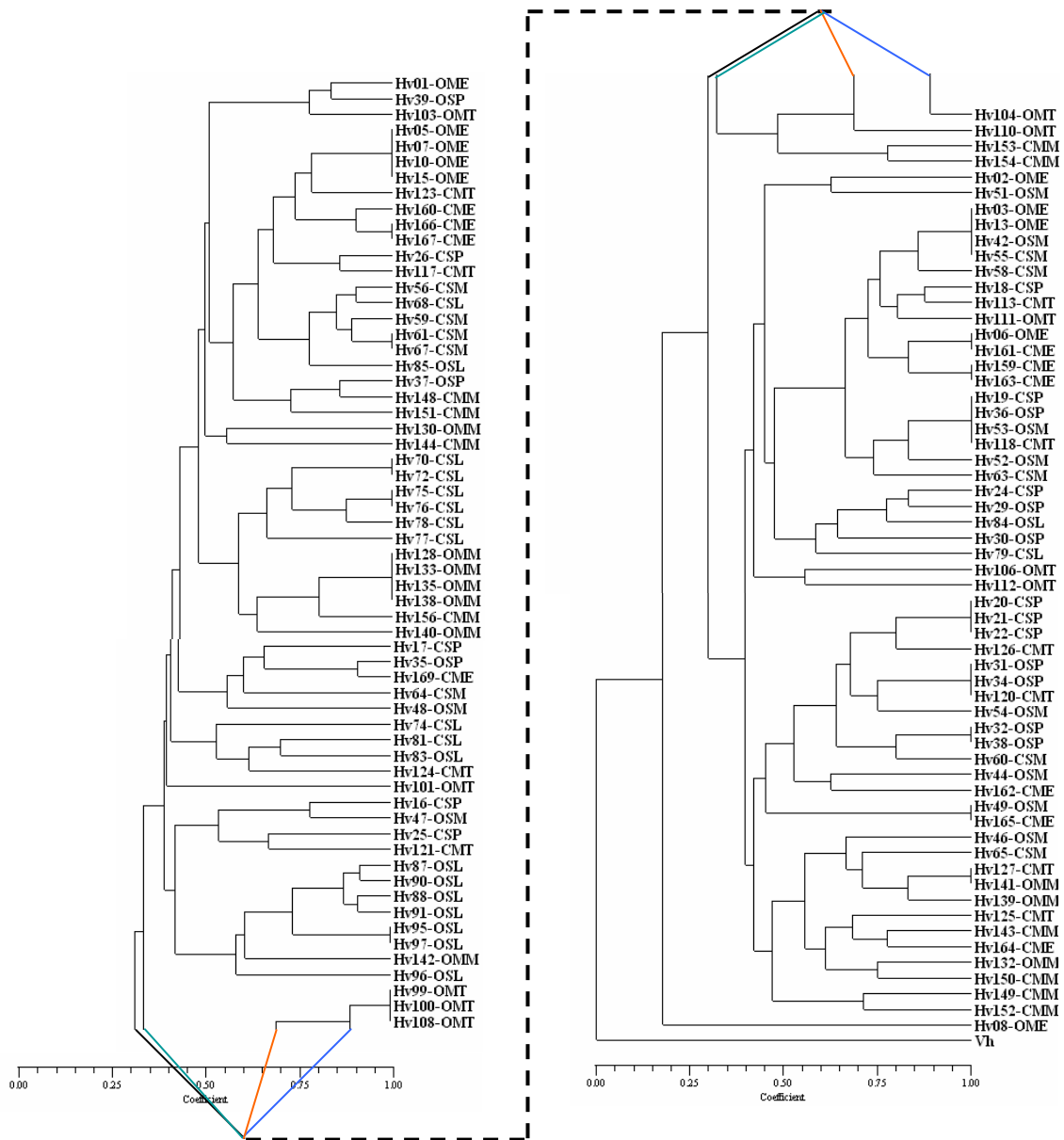


Figura 6 – Dendrograma gerado a partir do método não ponderado de agrupamento aos pares utilizando médias aritméticas (UPGMA) com base na análise do marcador RAPD em 120 isolados de *H. vastatrix*. Criou-se uma nomenclatura composta para cada isolado a partir da combinação entre a identificação original do fungo com mais três letras. A primeira letra corresponde ao sistema de cultivo, sendo C = convencional e O = orgânico. A segunda letra representa a região de cultivo (M = Zona da Mata e S = Sul de Minas). A terceira letra representa os municípios (E = Ervália, M = Manhumirim, T = Tombos, L = Lavras, M = Machado e P = Poços de Caldas). Finalizando, Vh- *Verticillium hemileiae*

## 5- DISCUSSÃO

A diversidade genética em populações de *H. vastatrix* variou com os marcadores utilizados e com o sistema de cultivo. Devem-se ressaltar dois aspectos relativos aos resultados obtidos: o desenvolvimento e a análise de marcadores microssatélites para estudos populacionais de *H. vastatrix* e a maior diversidade genética detectada em populações do patógeno em cultivos orgânicos.

Do ponto de vista metodológico, o desenvolvimento de marcadores de alta resolução é desejado para estudos de biologia de populações de fitopatógenos. Os microssatélites são, em tese, marcadores de alta resolução e, portanto, seriam potencialmente mais poderosos para detectar polimorfismos em populações de *H. vastatrix*. Em contrapartida os primers selecionados no presente estudo, que correspondem aos oito motivos - (TAA)<sub>9</sub>, (TA)<sub>7</sub>, (GGA)<sub>7</sub>, (AT)<sub>7</sub>, (TGA)<sub>5</sub>, (AT)<sub>5</sub>, (TC)<sub>5</sub> e (AT)<sub>6</sub> - não resultaram em polimorfismo, provavelmente, em função do critério adotado na seleção dos pressupostos microssatélites. Especula-se que os locos microssatélites selecionados pertencem a outras classes de DNA repetitivo que não microssatélites. Apesar de não polimórficos, três dos oito motivos foram previamente relatados em outros fitopatógenos. Por exemplo, (TA)<sub>9</sub> e (AT)<sub>12</sub> foram descritos em *Botrytis cinerea* (Fournier *et al.*, 2002) e (TC) foi descrito com sete repetições em *Alternaria brassicicola* (Avenot *et al.*, 2005), com dez repetições em *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (Enjalbert *et al.*, 2002) e com dezessete repetições em *Venturia inaequalis* (Tenzer *et al.*, 1999).

É possível que estes microssatélites estejam localizados em outras regiões conservadas do genoma, o que explicaria a ausência de polimorfismo. Efetuar-se-ão análises genéticas mais detalhadas para testar esta hipótese. Apesar de os motivos utilizados nesse trabalho serem constituídos de dois ou três nucleotídeos, eles não tiveram a mesma seqüência de nucleotídeos em relação àqueles comumente encontrados em outros fungos (Lim *et al.*, 2004). Estes autores concluíram que os motivos (AC)<sub>n</sub>, (AG)<sub>n</sub>, (AAC)<sub>n</sub>, (AAG)<sub>n</sub> e (AAT)<sub>n</sub> foram mais abundantes quando analisados no genoma de 14 espécies diferentes de fungos (Lim *et al.*, 2004). Adicionalmente aos oito motivos testados no presente trabalho, restaram 120 motivos com diversas seqüências de nucleotídeos e número de repetições. Entre os 120 possíveis candidatos a locos

microsatélites a serem testados, os motivos (AAG)<sub>4</sub> e (AAT)<sub>4</sub> foram encontrados em 1 e 2 seqüências, respectivamente. Planeja-se adotar os critérios de Lim *et al.* (2004), e incluir estes dois motivos em estudos futuros de populações de *H. vastatrix*. Entretanto, as análises realizadas neste trabalho foram importantes, pois subsidiaram a definição de critérios na escolha de outros microsatélites, uma vez que não se encontrou qualquer relato de microsatélites em *H. vastatrix*.

Ao contrário do constatado com os marcadores microsatélites, houve alta diversidade genética nas populações de *H. vastatrix* quando analisadas com marcadores RAPD. Já se havia comprovado a adequabilidade de marcadores RAPD em outros estudos (Gouveia *et al.*, 2005). A facilidade de uso desses marcadores é vantajosa operacionalmente, bem como por permitir a comparação de estudos conduzidos em diferentes locais, mas com mesmos primers. Assim, a dinâmica evolutiva das mudanças genéticas nas populações de *H. vastatrix* poderá ser monitorada. O conhecimento acerca das mudanças genéticas nas populações é importante para subsidiar medidas de controle da doença, como o controle químico e, no caso do patossistema *C. arabica* – *H. vastatrix*, principalmente, o uso de variedades resistentes.

Populações de *H. vastatrix* em Minas Gerais estão estruturadas, principalmente em função do tipo de cultivo, se convencional ou orgânico. No presente estudo, a diferenciação genética média ( $Gst = 0,22$ ) foi similar à encontrada por Gouveia *et al.*, (2005) ( $Gst = 0,26$ ) para isolados provenientes da América do Sul. O valor de  $Gst$  aqui obtido foi inferior àqueles para isolados da África ( $Gst = 0,86$ ) e Ásia ( $Gst = 0,76$ ) (Gouveia *et al.*, 2005), porém ainda é considerado alto. Comparado ao que ocorre na África e Ásia, os resultados aqui obtidos corroboram o relatado por Gouveia *et al.* (2005), e é possível concluir que há menor diferenciação genética entre subpopulações de *H. vastatrix* na América do Sul e, especificamente, em Minas Gerais. Dois mecanismos evolutivos podem estar associados a estes resultados: deriva genética e fluxo gênico. A ferrugem do cafeeiro foi primeiramente relatada em 1970 no Brasil, aproximadamente 100 anos após seu aparecimento no Ceilão. Assim, populações recentemente estabelecidas ainda refletiriam o efeito fundador, com menor diversidade gênica entre subpopulações. Por outro lado, constatou-se haver fluxo gênico entre subpopulações ( $Nm$  de 1,45 a 11,9), o que contribuiu para menor diferenciação entre as mesmas.

Comparações entre as frequências alélicas e genotípicas entre populações de Minas Gerais, quantificadas no presente trabalho, àquelas relatadas para a América do Sul, África e Ásia poderão revelar fatos interessantes, como por exemplo, os relacionados à presença ou ausência de alelos privados, como mais um elemento a ser analisado no estudo sobre a origem da introdução da ferrugem no Brasil.

Maior diversidade genética foi constatada em populações de *H. vastatrix* obtida de cafeeiros orgânicos. Todos os alelos presentes em populações de lavouras convencionais também ocorreram em populações de lavouras orgânicas. Porém, dois alelos (OPD5-1800 e OPA9-400) podem ser considerados como privados de populações orgânicas. Sob condições de lavouras orgânicas implantadas com variedades suscetíveis e não utilização de fungicidas específicos, a pressão de seleção será menor sobre os indivíduos da população, o que favorecerá uma maior diversidade genética. Essa maior diversidade observada em cultivos orgânicos reforça a importância do melhoramento genético voltado para o desenvolvimento de cultivares com resistência multigênica, principalmente para a implementação de lavouras manejadas com práticas alternativas de controle da ferrugem.

Considerando-se os resultados obtidos com isolados de Minas Gerais, obteve-se diferenciação genética em populações de *H. vastatrix* entre sistemas e regiões de cultivo do cafeeiro. Provavelmente, o sistema de cultivo assim como a região de cultivo estejam influenciando populações de *H. vastatrix*. Hamelim *et al.* (2000) verificaram associação entre diferenciação genética e a origem geográfica de duas populações de *C. ribicola*, ferrugem heteróica, provavelmente advinda da ausência de hospedeiros entre o leste e oeste dos EUA, o que dificultou o fluxo gênico de populações do fungo. Entretanto, o mesmo não ocorre para *H. vastatrix*, pois em Minas Gerais as lavouras cafeeiras estão distribuídas de forma quase contínua por todo o Estado. Acredita-se que a diferenciação genética observada seja mais influenciada pelas práticas de manejo adotadas nos cafezais convencionais, as quais contribuiriam para seleção e posterior estabelecimento de populações geneticamente distintas das observadas em populações de *H. vastatrix* em cafeeiros orgânicos.

Além do estudo populacional, avaliou-se, como ponto de partida, a integridade das amostras de DNA de *H. vastatrix*. Para tal, utilizou-se o par de primers ITS 1 e ITS 4.

O padrão de bandas gerado pelo par de primers ITS no isolado Hv150 e *V. hemileiae* foi similar àquele obtido por Zambolim *et al.* (2005). Em Hv150, os dois fragmentos aqui amplificados de aproximadamente 950 e 650 pb foram idênticos ao do isolado de *H. vastatrix* proveniente de *C. canephora* ‘Conillon’, mas diferentes do isolado de *H. vastatrix* raça II, cujo padrão continha apenas um fragmento de 950 pb (Zambolim *et al.*, 2005). O padrão de bandas de Hv150 diferiu também daquele do isolado de *H. vastatrix* de *C. arabica* ‘Catuaí’, o qual, além dos fragmentos de 950 e 650 pb, tem um terceiro fragmento de 500 pb aproximadamente (Zambolim *et al.*, 2005). O padrão de bandas do isolado Hv150 repetiu-se nos 20 isolados monopustulares do fungo (*H. vastatrix*) (dados não apresentados). Inicialmente, utilizaram-se os primers ITS para assegurar a integridade das amostras de DNA de *H. vastatrix*. Porém, concluiu-se que, como em *Ceratocystis fimbriata* (Thorpe *et al.*, 2005), poder-se-iam utilizar estes primers para detectar a variabilidade genética em regiões ITS do DNA ribossomal de isolados de *H. vastatrix*. Assim, em função das divergências obtidas no padrão de fragmentos gerados pelos primers ITS, em relação ao obtido por Zambolim, *et al.* (2005), pretende-se empregar os primers ITS 1 e ITS 4 para estudar a diversidade genética nos 120 isolados de *H. vastatrix* da coleção do Laboratório de Epidemiologia.

Acredita-se que esse trabalho seja o ponto de partida para direcionar estudos relacionados a aspectos moleculares de *H. vastatrix*. A partir da otimização das metodologias de coleta, multiplicação, extração de DNA, PCR e de análises, planeja-se aumentar o número de isolados/populações do patógeno, inclusive de outros estados produtores de café, em estudos futuros. Buscar-se-á, também, obter novos locos microssatélites que gerem polimorfismo, marcadores considerados mais eficientes que o RAPD (Liu & Cordes, 2004). Finalmente, será importante associar resultados obtidos com marcadores moleculares àqueles de monitoramento de raças fisiológicas, virulência e resistência a fungicidas. O conhecimento acumulado será fundamental para caracterizar mecanismos de variabilidade do patógeno, os quais, em última análise, poderão subsidiar estratégias para aumentar a durabilidade da resistência do cafeeiro à ferrugem.



## 6- CONCLUSÕES

Com base na hipótese inicial e nos resultados obtidos, concluiu-se que:

- O par de primers ITS 1 e ITS 4 foi eficiente em verificar a integridade das amostras de DNA de *H. vastatrix*.
- O par de primers ITS 1 e ITS 4 tem potencial como marcador molecular e poderá ser utilizado para estudar a variabilidade genética de isolados de *H. vastatrix* em experimentos futuros.
- Com os pressupostos locos microssatélites selecionados, não foi possível detectar variabilidade genética entre os isolados de *H. vastatrix*. Assim, outros microssatélites deverão ser avaliados.
- Os primers RAPD detectaram polimorfismos nos alelos presentes nas 12 populações de *H. vastatrix* estudadas.
- Maior diversidade gênica foi observada em populações de *H. vastatrix* obtidas em cafeeiros orgânicos.
- Considerando todos os locos, o coeficiente de diferenciação genética (*Gst*) entre as populações de *H. vastatrix* avaliadas foi alto (0,22).

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Avenot, H., Dongo, A., Bataille-Simoneau, N., Iacomi-Vasilescu, B., Hamon, B., Peltier, D. & Simoneau, P. Isolation of 12 polymorphic microsatellite loci in the phytopathogenic fungus *Alternaria brassicicola*. *Molecular Ecology Notes* 5: 948-950. 2005.

Barrès, B., Dutech, C., Andrieux, A., Caron, H., Pinon, J. & Frey P. Isolation and characterization of 15 microsatellite loci in the poplar rust fungus, *Melampsora larici-populina*, and cross-amplification in related species. *Molecular Ecology Notes* 6: 60-64. 2006.

Carvalho, V. L., Cunha, R. L. & Chalfoun, S. M. Manejo ecológico das principais doenças do cafeeiro. In: Informe Agropecuário: Café Orgânico, Belo Horizonte. 214/215: 101-114. 2002.

Chaves, G. M., Filho, J. C., 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. Edição especial: Seiva, ano 30, p 75, 1970.

Coutinho, T. A., Rijkenberg, F. H. J., & Van Asch, M. A. J. Teliospores of *Hemileia vastatrix*. *Mycological Research* 99: 932-934. 1995.

Dias, L. A. S. Variância de frequências alélicas. In: Alfenas, A. C. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. p.381-404, 1998.

Duan, X., Enjalbert, J., Vautrin, D., Solignac, M. & Giraud, T. Isolation of 12 microsatellite loci, using an enrichment protocol, in the phytopathogenic fungus *Puccinia triticina*. *Molecular Ecology Notes* 3: 65-67. 2003.

Enjalbert, J., Duan, X., Giraud, T., Vautrin, D., De Vallavieille-Pope, C. & Solignac, M. Isolation of twelve microsatellite loci, using an enrichment protocol, in the phytopathogenic fungus *Puccinia striiformis* sp. *tritici*. *Molecular Ecology Notes* 2: 563-565. 2002.

Eskes, A. B. Resistance. In: A. C. Kushalappa and A. B. Eskes (Ed.) *Coffee rust: epidemiology, resistance and management*. Boca Raton. CRC Press. pp. 171- 291. 1989.

Faleiro, F. G. Identificação de raças, diversidade genética de *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* e herança da resistência no feijoeiro. (Mestrado em Genética e Melhoramento). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 1997.

Ferreira, M. E. & Grattapaglia, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3<sup>a</sup> ed Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998.

Fournier, E., Giraud, T., Loiseau, A., Vautrin, D., Estoup, A., Solignac, M., Cornuet, J. M. & Brygoo, Y. Characterization of nine polymorphic microsatellite loci in the fungus *Botrytis cinerea* (Ascomycota). *Molecular Ecology Notes* 2: 253-255. 2002.

Garçon, C. L. P., Zambolim, L., Mizubuti, E. S. G., Vale, F. X. R., Costa, H. Controle da ferrugem do cafeeiro com base no valor de severidade. *Fitopatologia Brasileira* 29: 486-491. 2004

Giraud, T., Fournier, E., Vautrin, D., Solignac, M., Vercken, E., Bakan, B. & Brygoo, Y. Isolation of eight polymorphic microsatellite loci, using an enrichment protocol, in the phytopathogenic fungus *Fusarium culmorum*. *Molecular Ecology Notes* 2: 121-123. 2002.

Gonçalves, S. M., Zambolin, L., Vale, F. X. R., Pereira, A. A. & Sakiyama, N. S. Monitoramento de raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. em cafeeiros

(*Coffea arabica*) resistentes. In: Congresso Brasileiro Pesquisa Cafeeiras, 28, p. 267. Caxambú, 2002.

Gopalkrishnam, K. S. Notes on the morphology of the genus *Hemileia*. Mycologia 43: 271-283. 1951.

Gouveia, M. M. C., Ribeiro, A., Varzea, V. M. P. & Rodrigues, C. J. Genetic diversity in *Hemileia vastatrix* based on RAPD markers. Mycologia 97: 396-404. 2005.

Guerin, F., Franck, P., Loiseau, A., Devaux, M. & Le Cam, B. Isolation of 21 new polymorphic microsatellite loci in the phytopathogenic fungus *Venturia inaequalis*. Molecular Ecology Notes 4: 268-270. 2004.

Hamelim, R. C., Hunt, R. S. Geils, B. W., Jensen, G. D., Jacobi, V. & Lerours, N. Barrier to gene flow between eastern and western populations of *Cronartium ribicola* in North America. Phytopathology 90: 1073-1078. 2000.

Karaoglu, H., Lee, C. M. Y. & Meyer, W. Survey of simple sequence repeats in completed fungal genomes. Molecular Biology and Evolution 22: 639-649. 2005.

Köller, W., Wilcox, W. F. & Parker, D. M. Sensitivity of *Venturia inaequalis* populations to anilinopyrimidine fungicides and their contribution to scab management in New York. Plant Disease 89 (4):357-365. 2005.

Kubisiak, T. L., Roberds, J. H., Spaine, P. C. & Doudrick, R. L. Microsatellite DNA suggests regional structure in the fusiform rust fungus *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme*. Heredity 92: 41-50. 2004.

Kushalappa, A. C. Biology and Epidemiology. In: Kushalappa, A. C. & Eskes, A. B. (Ed.) Coffee rust: epidemiology, resistance, and management. Boca Raton. CRC Press. pp. 13-80. 1989.

Kushalappa, A. C. & Eskes, A. B. Advances in coffee rust research. *Annual Review of Phytopathology* 27: 503-531. 1989.

Le Guen, V., Rodier-Goud, M., Troispoux, V., Xiong, T. C., Brottier, P., Billot, C. & Seguin, M. Characterization of polymorphic microsatellite markers for *Microcyclus ulei*, causal agent of South American leaf blight of rubber trees. *Molecular Ecology Notes* 4: 122-124. 2004.

Leonard, K. J. & Martinelli, J. A. Virulence of oat crown rust in Brazil and Uruguay. *Plant Disease* 89: 802-808. 2005.

Lim, S., Notley-McRobb, L., Lim, M. & Carter, D. A. A comparison of the nature and abundance of microsatellites in 14 fungal genomes. *Fungal Genetics and Biology* 41: 1025-1036. 2004.

Liu, Z. J. & Cordes, J. F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238:1-37. 2004.

McCallum, B. D., Roelfs, A. P., Szabo, L. J. & Groth, J. V. Comparison of *Puccinia graminis* f.sp *tritici* from South America and Europe. *Plant Pathology* 48:574-581. 1999.

McDonald, B. A., & C. Linde. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40:349-379. 2002.

McDonald, B. A. The population genetics of fungi: Tools and techniques. *Phytopathology* 87:448-453. 1997.

McDonald, B. A. & McDermott, J. M. Population genetics of plant pathogenic fungi. *Bioscience* 43: 311-319. 1993.

Michelmore, R. W. & Hulbert, S. H. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 25: 383-404. 1987.

Molina, C., Kaemmer, D., Aponte, S., Weising, K., & Kahl, G. Microsatellite markers for the fungal banana pathogen *Mycosphaerella musicola*. *Molecular Ecology Notes* 1:137-139. 2001.

Nei, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3321-3323. 1973.

Ono, Y. The diversity of nuclear cycle in microcyclic rust fungi (Uredinales) and its ecological and evolutionary implications. *Mycoscience* 43: 421-439. 2002

Parker, P. G., Snow, A. A., Schug, M. D., Booton, G. C. & Fuerst, P. A. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79: 361-383. 1998.

Pereira, A. A. & Sakiyama, N. S. Cultivares melhoradas de café arábica. In: Zambolim, L. I Encontro sobre produção de café com qualidade. p. 241-257. 1999.

Plantard, O. & Porte C. Isolation and characterization of microsatellite loci in the sugar beet cyst nematode *Heterodera schachtii*. *Molecular Ecology Notes* 3: 139-141. 2003.

Pryor, B. M., & Michailides, T. J. Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio. *Phytopathology* 92: 406-416. 2002.

Rajendren, R. B. New type of nuclear life cycle in *Hemileia vastatrix*. *Nature* 213 (5071):105-106. 1967.

Ricci, M. S. F., Araújo, M. C. F. & Franch, C. M. C. Cultivo orgânico do café. Recomendações técnicas, Embrapa. p. 101. 2002.

Sandlin, C. M., Steadman, J. R. & Araya, C. M.. Isolates of *Uromyces appendiculatus* with specific virulence to landraces of *Phaseolus vulgaris* of Andean origin. Plant Disease 83: 108-113. 1999.

Santos, J. M. F., Oliveira, S. H. F., Domingues, R. J., Guzzo, S. D. Avaliação da eficácia de fungicidas sistêmicos no controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix* L.) do cafeeiro, sob chuva simulada. Arquivos do Instituto Biológico. 69: 45-49. 2002.

Silva, D. G. Levantamento de raças fisiológicas de *Hemileia vastratrix* e resistência de clones de *Coffea canephora* var. *conillon* à ferrugem. (Tese de Doutorado). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 2000.

Sirjusingh, C. & Kohn, L. M. Characterization of microsatellites in the fungal plant pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum*. Molecular Ecology Notes 1:267-269. 2001.

Soubabere, O., Jorge, V., Notteghem, J. L., Lebrun, M. H., & Tharreau, D. Sequence characterized amplified region markers for the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. Molecular Ecology Notes 1: 19-21. 2001.

Suga, H., Gale, L. R., & Kistler, H. C. Development of VNTR markers for two *Fusarium graminearum* clade species. Molecular Ecology Notes 4: 468-470. 2004.

Tenzer, I., degli Ivanissevich, S., Morgante, M. & Gessler, C. Identification of microsatellite markers and their application to population genetics of *Venturia inaequalis*. Phytopathology 89: 748-753. 1999.

Tenzer, I. & Gessler, C. Subdivision and genetic structure of four populations of *Venturia inaequalis* in Switzerland. European Journal of Plant Pathology 103: 565-571. 1997.

Thorpe, D. J., Harrington, T. C. & Uchida, J. Y. Pathogenicity, internal transcribed spacer-rDNA variation, and human dispersal of *Ceratocystis fimbriata* on the family Araceae. *Phytopathology* 95: 316-323. 2005.

van der Waals, J. E., Korsten, L., & Slippers, B. Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from potatoes in South Africa. *Plant Disease* 88:959-964. 2004.

Várzea, V. M. P. & Marques, D. V. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: Zambolim, L., Zambolim, E. M. & Várzea, V. M. P. Durable resistance to coffee leaf rust. p. 53-74. 2005.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535. 1990.

Wright, L. P., Wingfield, B. D., Crous, P. W., Brenneman, T. & M. J. Wingfield. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Cylindrocladium parasiticum*. *Molecular Ecology Notes* 6:110-112. 2006.

Yeh, F. C., Yang, R-C., Boyle, T. B. J., Ye, Z-H, Mao, J. X. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada 1997.

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-physiological variability, current situation and future prospects. In: Zambolim, L., Zambolim, E. M. & Várzea, V. M. P. Durable resistance to coffee leaf rust. p. 75-98. 2005.



Zambolim, L., Vale, F. X. R., Pereira, A. A. & Chaves, G. M. Café. In: F. X. R. Vale and L. Zambolim (Ed.) Controle de doenças de plantas. Viçosa. p. 83-179. 1997.

Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16. 2002.

Tabela 1 – Origem dos 120 isolados de *Hemileia vastatrix* coletados em Minas Gerais e avaliados nesse trabalho.

| Região/<br>Município   | Sistema<br>de<br>cultivo | Isolados (Coordenadas geográficas do local de coleta)   |
|------------------------|--------------------------|---|
| <b>1) Zona da Mata</b> |                          |   |
| Ervália                | (C)                      | Hv159 (20°48'45" S, 42°39'37" W); Hv160 (20°48'46" S, 42°39'38" W); Hv161 (20°48'45" S, 42°39'37" W); Hv162 (20°48'45" S, 42°39'36" W); Hv163 (20°48'44" S, 42°39'36" W); Hv164 (20°48'44" S, 42°39'36" W); Hv165 (20°48'43" S, 42°39'37" W); Hv166 (20°48'43" S, 42°39'37" W); Hv167 (20°48'43" S, 42°39'38" W); Hv169 (20°48'43" S, 42°39'38")    |
|                        | (O)                      | Hv01 (20°54'48" S, 42°37'24" W); Hv02 (20°54'48" S, 42°37'23" W); Hv03 (20°54'48" S, 42°37'23" W); Hv05 (20°54'48" S, 42°37'22" W); Hv06 (20°54'49" S, 42°37'22" W); Hv07(20°54'48" S, 42°37'22" W); Hv08(20°54'48" S, 42°37'21" W); Hv10(20°54'49" S,42°37'21" W); Hv13(20°54'48" S,42°37'21" W); Hv15(20°54'47" S, 42°37'23" W);                  |
| Manhumirim             | (C)                      | Hv143 (20°19'48" S, 41°58'28" W); Hv144 (20°19'49" S, 41°58'30" W); Hv148 (20°19'48" S, 41°58'30" W); Hv149 (20°19'47" S, 41°58'30" W); Hv150 (20°19'47" S, 41°58'30" W); Hv151 (20°19'47" S, 41°58'30" W); Hv152 (20°19'46" S, 41°58'31" W); Hv153 (20°19'46" S, 41°58'32" W); Hv154 (20°19'45" S, 41°58'32" W); Hv156 (20°19'46" S, 41°58'32" W); |
|                        | (O)                      | Hv128 (20°19'47" S, 41°59'02" W); Hv130 (20°19'46" S, 41°59'00" W); Hv132 (20°19'46" S, 41°58'58" W); Hv133 (20°19'46" S, 41°58'58" W); Hv135 (20°19'47" S, 41°59'03" W); Hv138 (20°19'48" S, 41°59'06" W); Hv139 (20°19'48" S, 41°59'06" W); Hv140 (20°19'48" S, 41°59'07" W); Hv141 (20°19'49" S, 41°59'07" W); Hv142 (20°19'49" S, 41°59'07" W); |
| Tombo                  | (C)                      | Hv113 (20°54'25" S, 42°08'32" W); Hv117 (20°54'23" S, 42°08'32" W); Hv118 (20°54'23" S, 42°08'32" W); Hv120 (20°54'23" S, 42°08'31" W); Hv121 (20°54'23" S, 42°08'32" W); Hv123 (20°54'24" S, 42°08'33" W); Hv124 (20°54'24" S, 42°08'32" W); Hv125 (20°54'24" S, 42°08'32" W); Hv126 (20°54'24" S, 42°08'33" W); Hv127 (20°54'24" S, 42°08'32" W); |
|                        | (O)                      | Hv99 (20°56'57" S, 42°10'34" W); Hv100 (20°56'58" S, 42°10'34" W); Hv101 (20°56'57" S, 42°10'34" W); Hv103 (20°56'58" S, 42°10'33" W); Hv104 (20°56'58" S, 42°10'32" W); Hv106 (20°56'59" S, 42°10'25" W); Hv108 (20°57'00" S, 42°10'24" W); Hv110 (20°56'56" S, 42°10'23" W); Hv111 (20°56'59" S, 42°10'22" W); Hv112 (20°56'69" S, 42°10'22" W);  |
| <b>2) Sul de Minas</b> |                          |   |
| Lavras                 | (C)                      | Hv68 (21°19'77" S, 44°54'75" W); Hv70 (21°19'82" S, 44°54'77" W); Hv72 (21°19'89" S, 44°54'77" W); Hv74 (21°19'86" S, 44°54'76" W); Hv75 (21°19'84" S, 44°54'76" W); Hv76 (21°19'79" S, 44°54'75" W); Hv77 (21°19'78" S, 44°54'75" W); Hv78 (21°19'77" S, 44°54'75" W); Hv79 (21°19'78" S, 44°54'77" W); Hv81 (21°19'81" S, 44°54'78" W);           |
|                        | (O)                      | Hv83 (21°19'20" S, 44°55'34" W); Hv84 (21°19'21" S, 44°55'33" W); Hv85 (21°19'23" S, 44°55'32" W); Hv87 (21°19'28" S, 44°55'31" W); Hv88 (21°19'37" S, 44°55'31" W); Hv90 (21°19'38" S, 44°55'29" W); Hv91 (21°19'40" S, 44°55'28" W); Hv95 (21°19'53" S, 44°55'30" W); Hv96 (21°19'57" S, 44°55'32" W); Hv97 (21°19'55" S, 44°55'31" W);           |
| Machado                | (C)                      | Hv55 (21°36'07" S, 45°47'55" W); Hv56 (21°36'11" S, 45°47'56" W); Hv58 (21°36'19" S, 45°48'01" W); Hv59 (21°36'25" S, 45°48'05" W); Hv60 (21°36'26" S, 45°48'06" W); Hv61 (21°36'29" S, 45°48'12" W); Hv63 (21°36'37" S, 45°48'03" W); Hv64 (21°36'35" S, 45°48'00" W); Hv65 (21°36'30" S, 45°48'02" W); Hv67 (21°36'10" S, 45°47'56" W);           |
|                        | (O)                      | Hv42 (21°36'07" S, 45°48'12" W); Hv44 (21°36'09" S, 45°48'21" W); Hv46 (21°36'02" S, 45°48'14" W); Hv47 (21°36'04" S, 45°48'12" W); Hv48 (21°36'00" S, 45°48'07" W); Hv49 (21°35'53" S, 45°48'00" W); Hv51 (21°35'55" S, 45°47'57" W); Hv52 (21°35'58" S, 45°47'52" W); Hv53 (21°35'50" S, 45°47'48" W); Hv54 (21°35'46" S, 45°47'46" W);           |
| Poços de<br>Caldas     | (C)                      | Hv16 (21°43'27" S, 46°33'25" W); Hv17 (21°43'23" S, 46°33'24" W); Hv18 (21°43'20" S, 46°33'28" W); Hv19 (21°43'12" S, 46°33'28" W); Hv20 (21°43'14" S, 46°33'27" W); Hv21 (21°43'18" S, 46°33'27" W); Hv22 (21°43'20" S, 46°33'25" W); Hv24 (21°43'32" S, 46°33'26" W); Hv25 (21°43'33" S, 46°33'23" W); Hv26 (21°43'36" S, 46°33'35" W);           |
|                        | (O)                      | Hv29 (21°43'28" S, 46°35'30" W); Hv30 (21°43'33" S, 46°35'29" W); Hv31 (21°43'35" S, 46°35'31" W); Hv32 (21°43'40" S, 46°35'37" W); Hv34 (21°43'50" S, 46°35'43" W); Hv35 (21°43'54" S, 46°35'38" W); Hv36 (21°43'53" S, 46°35'36" W); Hv37 (21°43'50" S, 46°35'33" W); Hv38 (21°43'48" S, 46°35'31" W); Hv39 (21°43'49" S, 46°35'40" W)            |

\* C = Sistema de cultivo Convencional, O = Sistema de Cultivo Orgânico

Tabela 2 – Código de identificação, seqüência de nucleotídeos, tamanho do fragmento a ser amplificado e motivos repetitivos dos oito pressupostos locos microsatélites.

| Primer  | Código   | Seqüência (5' – 3')  | Fragmento (pb) | Motivo               |
|---|----------|--|----------------|----------------------|
| HEVA <sup>1</sup> -SG <sup>2</sup> -001-003-A09 | ppSSR01  | F: AATGTCATTGAGCACGGTATT<br>R: CCAGGCTGCTAGACTTACCC              | 222            | (TAA) <sub>9</sub>   |
| HEVA-SG-001-006-C08                             | ppSSR02  | F: TCCTTAGGACTGAGTATTTCTTATGC<br>R: TTAGGCCATGGATTAGCTATTT       | 172            | (TA) <sub>7</sub> ** |
| HEVA-SG-001-010-C05                             | ppSSR03  | F: ACCAGGTGGTGGTAAAGGTG<br>R: CACTGGCCCATCACATACTG               | 136            | (GGA) <sub>7</sub>   |
| HEVA-SG-001-012-G06                             | ppSSR04* | F: CGGCCTCCCTTATCTCATTC<br>R: TGGATTTCTGCATTACAGTTTCA            | 206            | (AT) <sub>7</sub> ** |
| HEVA-SG-002-001-C05                             | ppSSR05  | F:<br>AAAACACTACTCATACTGAACAGGTGGT<br>R: TCCATGATAGCTTCTTCTTGCTT | 260            | (TGA) <sub>5</sub>   |
| HEVA-SG-001-005-A08                             | ppSSR06* | F: GTTTAAGCATTCCGCACGTA<br>R: CCTAATCAAATGGCTGGTGG               | 228            | (AT) <sub>5</sub> ** |
| HEVA-SG-001-008-D08                             | ppSSR07* | F: TTTTGACGCCTTCTTTTTTGG<br>R: AGGAGAGACAAAGCACGGAA              | 117            | (TC) <sub>5</sub> ** |
| HEVA-SG-001-008-D12                             | ppSSR08  | F: TCTTTCCAGCCACCTACACC<br>R: AAAACAAAAACAAAAACAAAAGCA           | 152            | (AT) <sub>6</sub>    |

1 = *Hemileia vastatrix*

2 = Shot gun

\* = par de primer inicialmente considerado promissor.

\*\* = motivos comuns à *Hemileia vastatrix* e a outros fitopatógenos.

Tabela 3 – Frequência dos 20 locos RAPD nas 12 populações de isolados de *Hemileia vastatrix* obtidos em sistemas de cultivo convencional (C) e orgânico (O) de municípios da Zona da Mata e do Sul de Minas.

| Populações<br><br>Locos | Zona da Mata |      |            |      |        |      | Sul de Minas |      |         |      |                 |      | Frequência.<br>média/loco |
|-------------------------|--------------|------|------------|------|--------|------|--------------|------|---------|------|-----------------|------|---------------------------|
|                         | Ervália      |      | Manhumurim |      | Tombos |      | Lavras       |      | Machado |      | Poços de Caldas |      |                           |
|                         | C            | O    | C          | O    | C      | O    | C            | O    | C       | O    | C               | O    |                           |
| OPD5-2100               | 0,68         | 0,22 | 0,29       | 1,00 | 0,45   | 0,22 | 0,68         | 1,00 | 0,68    | 0,45 | 0,36            | 0,45 | 0,47                      |
| OPD5-1800               | 0,00         | 0,00 | 0,00       | 0,05 | 0,00   | 0,00 | 0,00         | 0,36 | 0,00    | 0,05 | 0,00            | 0,00 | 0,03                      |
| OPD5-1500               | 0,10         | 0,00 | 0,00       | 0,29 | 0,05   | 0,29 | 0,36         | 0,00 | 0,05    | 0,05 | 0,05            | 0,00 | 0,09                      |
| OPD5-1400               | 0,10         | 0,00 | 0,68       | 0,36 | 0,05   | 0,36 | 0,36         | 0,00 | 0,05    | 0,05 | 0,05            | 0,05 | 0,15                      |
| OPD5-1200               | 0,00         | 0,10 | 0,00       | 0,00 | 0,16   | 0,00 | 0,16         | 1,00 | 0,22    | 0,22 | 0,16            | 0,16 | 0,14                      |
| OPD5-900                | 1,00         | 1,00 | 1,00       | 1,00 | 1,00   | 0,29 | 1,00         | 1,00 | 0,68    | 0,68 | 1,00            | 1,00 | 0,75                      |
| OPA9-1700               | 0,00         | 0,00 | 0,05       | 0,22 | 0,00   | 0,68 | 0,00         | 0,00 | 0,05    | 0,00 | 0,05            | 0,00 | 0,07                      |
| OPA9-1500               | 0,00         | 0,00 | 1,00       | 0,05 | 0,00   | 0,36 | 0,00         | 0,00 | 0,00    | 0,05 | 0,05            | 0,00 | 0,04                      |
| OPA9-1300               | 0,22         | 0,36 | 0,36       | 0,45 | 0,10   | 0,45 | 0,22         | 0,22 | 0,29    | 0,05 | 0,10            | 0,10 | 0,23                      |
| OPA9-1150               | 0,22         | 0,22 | 0,16       | 0,05 | 0,10   | 0,29 | 0,05         | 0,55 | 0,16    | 0,10 | 0,10            | 0,05 | 0,16                      |
| OPA9-1000               | 0,22         | 0,36 | 0,36       | 0,45 | 0,16   | 0,29 | 1,00         | 0,68 | 0,29    | 0,10 | 0,22            | 0,16 | 0,32                      |
| OPA9-900                | 0,68         | 0,55 | 0,36       | 0,68 | 0,68   | 0,22 | 0,29         | 0,29 | 1,00    | 0,68 | 0,55            | 1,00 | 0,51                      |
| OPA9-400                | 0,00         | 0,05 | 0,00       | 0,00 | 0,00   | 0,05 | 0,00         | 0,00 | 0,00    | 0,05 | 0,00            | 0,05 | 0,01                      |
| OPF6-1500               | 0,68         | 0,22 | 0,22       | 0,10 | 0,10   | 0,10 | 0,00         | 0,36 | 0,16    | 0,36 | 0,10            | 0,10 | 0,20                      |
| OPF6-1300               | 0,22         | 0,22 | 0,68       | 0,55 | 0,29   | 0,36 | 0,68         | 0,16 | 0,29    | 0,05 | 0,05            | 0,10 | 0,27                      |
| OPF6-1200               | 0,10         | 0,00 | 0,00       | 0,00 | 0,05   | 1,00 | 0,16         | 0,29 | 0,16    | 0,16 | 0,16            | 0,05 | 0,09                      |
| OPF6-1100               | 0,16         | 0,16 | 0,00       | 0,05 | 0,22   | 0,16 | 0,16         | 0,05 | 0,36    | 0,10 | 0,05            | 0,00 | 0,12                      |
| OPF6-1050               | 0,45         | 0,22 | 0,16       | 0,05 | 0,05   | 0,00 | 0,45         | 0,68 | 0,22    | 0,10 | 0,36            | 0,22 | 0,22                      |
| OPF6-1000               | 0,05         | 0,16 | 0,10       | 0,10 | 0,00   | 0,05 | 0,00         | 0,00 | 0,05    | 0,16 | 0,10            | 0,00 | 0,06                      |
| OPF6-900                | 0,36         | 0,29 | 0,68       | 0,55 | 0,55   | 0,45 | 0,00         | 0,36 | 0,10    | 0,29 | 0,55            | 0,68 | 0,37                      |

Tabela 4 – Estatísticas de diversidade entre populações de *Hemileia vastatrix*, hierarquizadas por sistema de cultivo, região de cultivo, municípios e lavouras.

| <b>Nível de hierarquia</b>  |     | <i>n</i> | <i>na</i>   | <i>ne</i>   | <i>h</i>    |
|-----------------------------|-----|----------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Sistema de Cultivo</b>   |     |          |             |             |             |
| Convencional                | (C) | 60       | 1,9 ± 0,30* | 1,42 ± 0,34 | 0,26 ± 0,17 |
| Orgânico                    | (O) | 60       | 2,0 ± 0,00  | 1,46 ± 0,29 | 0,29 ± 0,13 |
| <b>Região de Cultivo</b>    |     |          |             |             |             |
| Zona da Mata                | (M) | 60       | 2,0 ± 0,00  | 1,45 ± 0,34 | 0,27 ± 0,17 |
| Sul de Minas                | (S) | 60       | 2,0 ± 0,00  | 1,42 ± 0,32 | 0,26 ± 0,15 |
| <b>Município</b>            |     |          |             |             |             |
| Ervália                     | M   | 20       | 1,80 ± 0,41 | 1,40 ± 0,37 | 0,24 ± 0,19 |
| Manhumirim                  | M   | 20       | 1,80 ± 0,41 | 1,41 ± 0,40 | 0,24 ± 0,19 |
| Tombos                      | M   | 20       | 1,95 ± 0,22 | 1,46 ± 0,33 | 0,28 ± 0,17 |
| Lavras                      | S   | 20       | 1,75 ± 0,44 | 1,42 ± 0,32 | 0,26 ± 0,17 |
| Machado                     | S   | 20       | 2,00 ± 0,00 | 1,36 ± 0,25 | 0,24 ± 0,13 |
| Poços de Caldas             | S   | 20       | 1,90 ± 0,30 | 1,27 ± 0,29 | 0,18 ± 0,15 |
| <b>Lavoura</b>              |     |          |             |             |             |
| Ervália                     | C   | 10       | 1,70 ± 0,42 | 1,37 ± 0,33 | 0,23 ± 0,18 |
|                             | O   | 10       | 1,65 ± 0,49 | 1,36 ± 0,33 | 0,22 ± 0,19 |
| Manhumirim                  | C   | 10       | 1,60 ± 0,50 | 1,36 ± 0,36 | 0,21 ± 0,20 |
|                             | O   | 10       | 1,75 ± 0,44 | 1,39 ± 0,40 | 0,22 ± 0,20 |
| Tombos                      | C   | 10       | 1,70 ± 0,47 | 1,29 ± 0,33 | 0,18 ± 0,17 |
|                             | O   | 10       | 1,80 ± 0,41 | 1,50 ± 0,36 | 0,29 ± 0,19 |
| Lavras                      | C   | 10       | 1,55 ± 0,51 | 1,33 ± 0,37 | 0,20 ± 0,20 |
|                             | O   | 10       | 1,55 ± 0,51 | 1,37 ± 0,39 | 0,21 ± 0,21 |
| Machado                     | C   | 10       | 1,80 ± 0,41 | 1,37 ± 0,30 | 0,23 ± 0,17 |
|                             | O   | 10       | 1,95 ± 0,22 | 1,35 ± 0,30 | 0,23 ± 0,15 |
| Poços de Caldas             | C   | 10       | 1,85 ± 0,37 | 1,32 ± 0,33 | 0,20 ± 0,17 |
|                             | O   | 10       | 1,60 ± 0,50 | 1,20 ± 0,27 | 0,14 ± 0,15 |
| <b>Sobre todos os locos</b> |     |          | 2,00 ± 0,00 | 1,44 ± 0,31 | 0,28 ± 0,15 |

n = número de indivíduos.

na = número observado de alelos.

ne = número efetivo de alelos.

h = Diversidade gênica de Nei.

\* = desvio padrão.

Tabela 5 – Estimativas de diversidade genética de populações de *Hemileia vastatrix* por sistema de cultivo, região de cultivo e entre municípios.

| Níveis de hierarquia        |     | <i>n</i> | $H_t$             | $H_s$           | <i>Gst</i> | <i>Nm</i> |
|-----------------------------|-----|----------|-------------------|-----------------|------------|-----------|
| <b>Sistema de cultivo</b>   |     |          |                   |                 |            |           |
| Convencional                | (C) | 60       | $0,25 \pm 0,03^*$ | $0,21 \pm 0,02$ | 0,18       | 2,22      |
| Orgânico                    | (O) | 60       | $0,29 \pm 0,01$   | $0,22 \pm 0,01$ | 0,25       | 1,45      |
| <b>Região de cultivo</b>    |     |          |                   |                 |            |           |
| Zona da Mata                | (M) | 60       | $0,27 \pm 0,02$   | $0,22 \pm 0,02$ | 0,17       | 2,32      |
| Sul de Minas                | (S) | 60       | $0,26 \pm 0,15$   | $0,20 \pm 0,01$ | 0,23       | 1,64      |
| <b>Município</b>            |     |          |                   |                 |            |           |
| Ervália                     | M   | 20       | $0,24 \pm 0,03$   | $0,22 \pm 0,03$ | 0,06       | 7,57      |
| Manhumirim                  | M   | 20       | $0,24 \pm 0,04$   | $0,22 \pm 0,03$ | 0,09       | 4,82      |
| Tombos                      | M   | 20       | $0,28 \pm 0,03$   | $0,23 \pm 0,02$ | 0,15       | 2,71      |
| Lavras                      | S   | 20       | $0,26 \pm 0,03$   | $0,20 \pm 0,02$ | 0,20       | 1,89      |
| Machado                     | S   | 20       | $0,24 \pm 0,02$   | $0,23 \pm 0,01$ | 0,05       | 9,39      |
| Poços de Caldas             | S   | 20       | $0,18 \pm 0,02$   | $0,17 \pm 0,02$ | 0,04       | 11,90     |
| <b>Sobre todos os locos</b> |     |          | $0,27 \pm 0,02$   | $0,21 \pm 0,01$ | 0,22       | 1,70      |

*n* = número de indivíduos.

$H_t$  = diversidade total.

$H_s$  = diversidade dentro de população.

*Gst* = diferenciação genética entre população.

*Nm* = número de migrantes.

\* = desvio padrão.

Tabela 6 – Teste de homogeneidade dos 20 locos RAPD nas 12 populações de *Hemileia vastatrix*, com 11 graus de liberdade.

| <b>Loco</b> | <b><math>X^2</math></b> | <b>Probabilidade</b> |
|-------------|-------------------------|----------------------|
| OPD5-2100   | 32,11                   | 0,0007               |
| OPD5-1800   | 32,39                   | 0,0007               |
| OPD5-1500   | 20,70                   | 0,0365               |
| OPD5-1400   | 34,86                   | 0,0003               |
| OPD5-1200   | 54,09                   | 0,0000               |
| OPD5-900    | 55,50                   | 0,0000               |
| OPA9-1700   | 53,51                   | 0,0000               |
| OPA9-1500   | 28,94                   | 0,0023               |
| OPA9-1300   | 11,53                   | 0,3997               |
| OPA9-1150   | 15,43                   | 0,1634               |
| OPA9-1000   | 30,77                   | 0,0012               |
| OPA9-900    | 30,18                   | 0,0014               |
| OPA9-400    | 4,17                    | 0,9644               |
| OPF6-1500   | 22,35                   | 0,0217               |
| OPF6-1300   | 25,97                   | 0,0065               |
| OPF6-1200   | 11,25                   | 0,4222               |
| OPF6-1100   | 11,18                   | 0,4282               |
| OPF6-1050   | 24,27                   | 0,0116               |
| OPF6-1000   | 6,72                    | 0,8208               |
| OPF6-900    | 20,88                   | 0,0346               |