

ANÁLISE DA ESTRUTURA GENÉTICA DA POPULAÇÃO DE *Hemileia vastatrix* EM CAFEIROS SOB CULTIVOS ORGÂNICO E CONVENCIONAL

Cristiano C. NUNES¹; Luiz A. MAFFIA¹, E-mail: lamaffia@ufv.br; Eduardo S. G. MIZUBUTI¹, E-mail: mizubuti@ufv.br; Sérgio H. BROMMONSCHENKEL¹, E-mail: shbromo@ufv.br

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Resumo:

Utilizaram-se os marcadores RAPD para estudar a diversidade genética de 120 isolados de *Hemileia vastatrix*, de cafeeiros de seis municípios da Zona da Mata e do Sul de Minas Gerais, sob dois sistemas de cultivos: convencional e orgânico. Considerando todos os locos, a diversidade gênica (h) foi de 0,28 e a diferenciação genética (Gst) de 0,22. 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. Pelas análises filogenéticas e 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.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, ferrugem, biologia de populações, diversidade genética.

GENETIC STRUCTURE ANALYSIS OF *Hemileia vastatrix* POPULATION IN COFFEE TREES GROWN ORGANICALLY AND CONVENTIONALLY

Abstract:

A total of 120 isolates of *Hemileia vastatrix* were obtained from two coffee crop systems (conventional and organic) and six counties of the Zona da Mata and Sul de Minas regions of Minas Gerais State. Genetic diversity was assessed with RAPD markers. 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 plants grown 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 the origin, crop system or production region of the isolates.

Key words: *Coffea arabica*, leaf rust, population biology, genetic diversity.

Introdução

A ferrugem, causada por *Hemileia vastatrix*, é a principal doença do cafeeiro (*Coffea* spp.) no mundo. Em alguns casos, perdas na produção podem atingir 40%, em *Coffea arabica* L. Medidas de controle da doença dependem do sistema de cultivo. Em lavouras conduzidas sob cultivo convencional utilizam-se, principalmente, variedades resistentes e pulverização com fungicidas (Zambolim *et al.*, 1997), enquanto em lavouras sob sistema de cultivo orgânico, utilizam-se caldas para controle da doença (Carvalho *et al.*, 2002; Ricci *et al.*, 2002). Independente do sistema de cultivo, deve-se enfatizar o uso de variedades resistentes. Entretanto, a obtenção de variedades com resistência duradoura à ferrugem é difícil (Eskes, 1989), pois a dinâmica de raças de *H. vastatrix* compromete a durabilidade dos materiais, como ocorreu com cafeeiros derivados do híbrido de Timor (Várzea & Marques, 2005). Mais de 45 raças fisiológicas foram caracterizadas (Várzea & Marques, 2005). No Brasil, no 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.

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), 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 (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*.

Material e Métodos

Entre abril e maio de 2005, coletaram-se amostras de folhas de cafeeiros com ferrugem em duas das principais regiões cafeeicultoras de Minas Gerais: Zona de Mata e Sul de Minas. Em cada município (três por região), as amostras originaram-se de lavouras conduzidas nos sistemas orgânico e convencional, num total de 172 amostras. Cada amostra constituía-se de, aproximadamente 100 folhas com pústulas, coletadas na mesma planta. Extraíram-se os urediniósporos de cada folha e se considerou como um isolado o conjunto de urediniósporos obtidos da raspagem das pústulas das folhas de cada amostra (1 amostra = 1 isolado). Multiplicou-se cada isolado em cafeeiros 'Catuaí Vermelho', de aproximadamente 6 meses de idade. Após o aparecimento de uredínias, coletaram-se os urediniósporos de 120 isolados.

De de 40 a 60 mg de urediniósporos de cada isolado, extraiu-se DNA genômico. 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). Extraíram-se o DNA genômico das folhas e do hiperparasita com o mesmo protocolo utilizado para *H. vastatrix*. Realizou-se a PCR, e analisou-se cada reação por eletroforese em gel de agarose.

Utilizaram-se os primers OPA-9, OPD-5 e OPF-6, os quais detectaram 77,8% de polimorfismo entre os fragmentos amplificados em 45 isolados de *H. vastatrix* (Gouveia *et al.*, 2005). Após estimar a frequência alélica para cada loco, efetuaram-se as análises de estatística de diversidade. Calcularam-se: número observado de alelos (*na*), número esperado de alelos (*ne*), diversidade gênica de Nei (*h*), coeficiente de diferenciação genética (*Gst*) e o número de migrantes (*Nm*). Adicionalmente, realizou-se análise de variância molecular (AMOVA) para avaliar a estrutura da população. Efetuaram-se as estimativas de diversidade para cada população (lavoura) e por grupos de populações agrupados segundo o 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 o teste de homogeneidade de χ^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 matriz de distância genética com o coeficiente de Jaccard. Construiu-se o dendrograma pelo método não ponderado de agrupamento aos pares utilizando médias aritméticas (UPGMA). Para análise filogenética, calculou-se a distância para fragmentos de restrição (Nei, 1987). Construiu-se árvore pelo método de "neighbor-joining", e verificou-se a consistência de agrupamento por bootstrap (1000 execuções). Finalmente, construiu-se rede de haplótipos pelo método de "median joining" para analisar a relação entre os isolados.

Resultados e Discussão

Não houve amplificação pelo, primer ITS, quando se utilizou o DNA genômico de *C. arabica*. Entretanto, obtiveram-se diferentes padrões de amplificação para *H. vastatrix* (Hv150) e *V. hemileiae*. 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.

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. Para cada loco, a frequência alélica média nos 120 isolados variou de 0,01 (OPA9-400) a 0,75 (OPD5-900). 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. O padrão de bandas amplificadas para *V. hemileiae* diferiu daquele para *H. vastatrix*. Nenhum fragmento foi amplificado com o DNA de *C. arabica* ou com o do controle negativo.

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, orgânico) a 0,29 (*n*= 10, Tombos, orgânico). A diversidade gênica média (*n*= 120) foi de 0,28. 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 1). 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 1). O teste do χ^2 foi significativo para 14 dos 20 locos RAPD analisados. Detectou-se ocorrer a maior parte da variação genética (>90%) entre isolados, dentro de populações locais.

Tabela 1 – 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>
Sistema de cultivo						
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
Região de cultivo						
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
Município						
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
Sobre todos os locos			$0,27 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,01$	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.

Populações de *H. vastatrix* em Minas Gerais estão estruturadas, principalmente em função do tipo de cultivo, se convencional ou orgânico. 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. Há pouca diferenciação genética entre subpopulações de *H. vastatrix* 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. Populações recentemente estabelecidas ainda refletiriam o efeito fundador, com menor diversidade gênica entre subpopulações. Por outro lado, constatou-se haver fluxo gênico entre subpopulações, o que contribuiu para menor diferenciação entre as mesmas.

Constatou-se maior diversidade genética em populações de *H. vastatrix* obtidas de cafeeiros orgânicos. Todos os alelos presentes em populações de lavouras convencionais também ocorreram em populações de lavouras 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 favoreceria 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.

Na análise de agrupamento, não se observou associação entre origem do isolado com sistema de cultivo ou a região de cultivo (Figura 1). Pela análise filogenética, não há evidência de diferenciação de isolados em função do sistema de cultivo ou de região. Grande número de haplótipos foi detectado em ambos os sistemas de cultivo.

Em Minas Gerais as lavouras cafeeiras estão distribuídas de forma quase contínua por todo o Estado. Acredita-se que a diferenciação genética observada e sua distribuição sejam influenciadas pela facilidade de dispersão aérea de esporos de *H. vastatrix* e pela continuidade geográfica dos cultivos. 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.

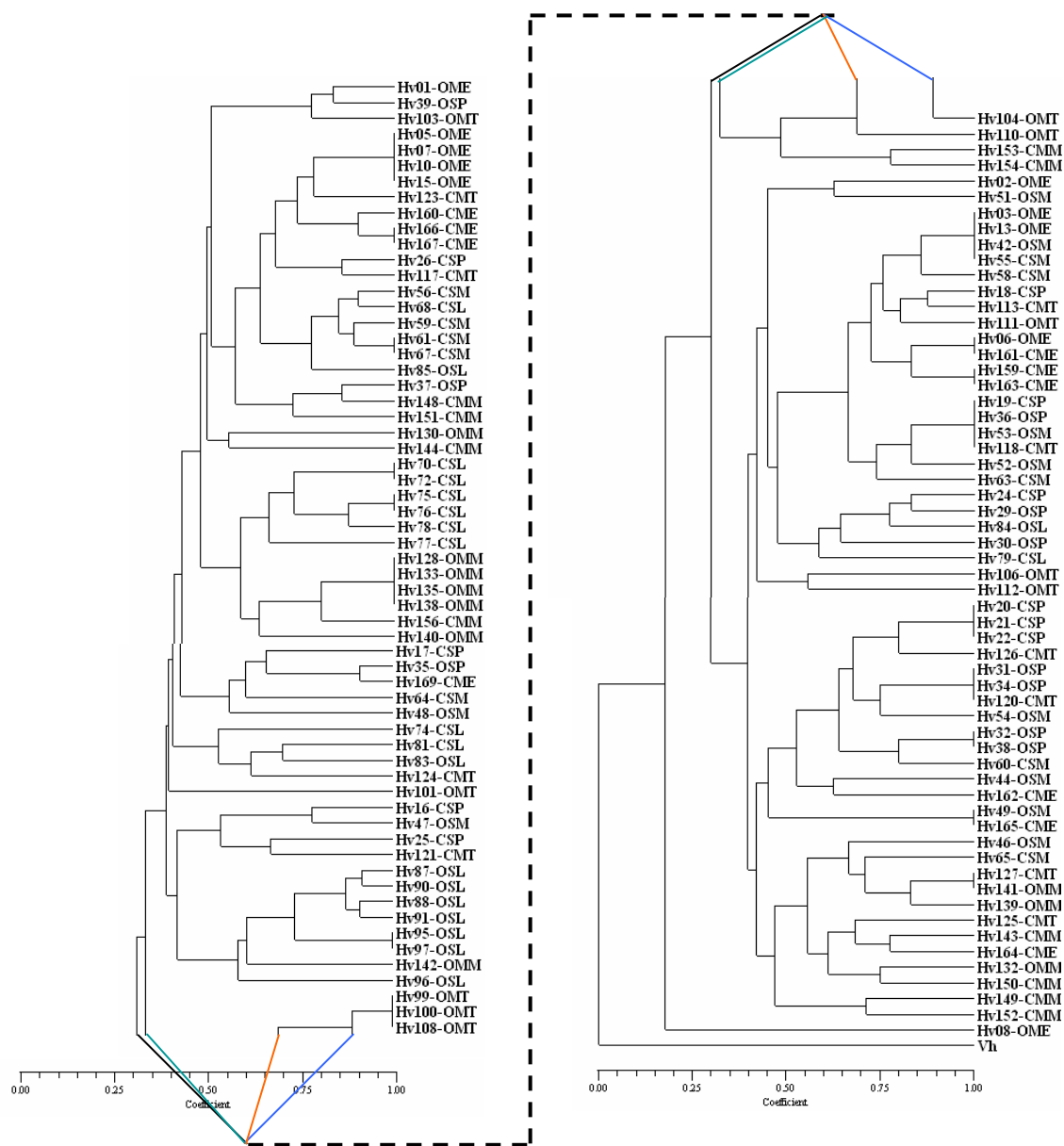


Figura 1 – Dendrograma com base na análise do marcador RAPD (Jaccard e UPGMA) em 120 isolados de *H. vastatrix*. Cada isolado é identificado pelo código de registro e mais três letras. A primeira letra corresponde ao sistema de cultivo (C = convencional e O = orgânico). A segunda letra representa a região 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). Vh = *Verticillium hemileiae*

Conclusões

Há variabilidade genética nas populações de *H. vastatrix*. Com base na frequência alélica, maior parte da variabilidade total se deve à alta diversidade entre indivíduos de uma dada população. A diversidade gênica entre populações foi relativamente baixa. Com base na AMOVA e análises filogenéticas, não foi possível distinguir diferenças genéticas importantes entre populações de cafeeiros cultivados em sistema convencional e orgânico.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro.

Referências Bibliográficas

- 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.
- 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.
- Gonçalves, S. M., Zambolim, 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.
- 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.
- McDonald, B. A. The population genetics of fungi: Tools and techniques. Phytopathology 87:448-453. 1997.
- McDonald, B. A., & C. Linde. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. Annual Review of Phytopathology 40:349-379. 2002.
- Nei, M. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York. 1987.
- Ricci, M. S. F., Araújo, M. C. F. & Franch, C. M. C. Cultivo orgânico do café. Recomendações técnicas, Embrapa. p. 101. 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.
- 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.
- 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.