

ANÁLISE MOLECULAR DO rDNA DE *Hemileia vastatrix*

Mateus FERREIRA Santana¹; Eunize Maciel ZAMBOLIM^{1,2}; Luiz Orlando de OLIVEIRA³; Eveline Teixeira Caixeta⁴; Laércio ZAMBOLIM².

¹Universidade Federal de Viçosa (UFV) / BIOAGRO, Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (BIOCAFÉ), 36.570-000, Viçosa-MG, E-mail: biocafe@ufv.br; ²UFV/Departamento de Fitopatologia; ³UFV/Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular; ^{1,4}Embrapa Café

Resumo:

Os espaçadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) e o gene 5,8S do rDNA nuclear de 15 populações de *H. vastatrix* foram amplificados por PCR com o objetivo de estudar a diversidade genética. Os fragmentos amplificados foram clonados, e dos clones resultantes, 4 a 7 foram seqüenciados. As 82 seqüências resultantes revelaram a existência de 68 haplótipos definidos por 63 substituições de base e cinco *indels*. Entre os 68 haplótipos, 64 foram exclusivos, isto é, cada um deles foi detectado em uma única lavoura, dois (1 e 2) foram compartilhados entre lavouras distintas e dois (19 e 29) foram exclusivos, mas detectados duas vezes na mesma lavoura. Os haplótipos geraram uma rede única mostrando que 65 deles são de origem mais recente e de distribuição restrita, e três são ancestrais e geograficamente mais bem distribuídos. A região ITS de *H. vastatrix* é altamente variável e mostrou que existe variação intra-específica e que a maioria dos haplótipos é restrita a uma única população. As raças fisiológicas e as populações coletadas no campo possuem seqüências com níveis similares de diversidade genética e nucleotídica. A diversidade de *H. vastatrix* dentro das lavouras foi mais elevada (90,3%) do que entre elas (9,7%).

Palavras Chaves: *Hemileia vastatrix*, haplótipos, ITS (Internal transcribed spacer), rDNA, diversidade genética.

MOLECULAR ANALYSIS OF THE *Hemileia vastatrix* rDNA

Abstract:

The internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and the 5,8S gene of the nuclear ribosomal DNA (rDNA) from 15 populations of *H. vastatrix* were PCR-amplified to assess genetic diversity. The amplified fragments were cloned and four to seven resultant clones were sequenced. The 82 sequences revealed 68 haplotypes defined by 63 base substitutions and five indels. Among the 68 haplotypes, 64 were unique, each one of them was detected in a single field; two (1 and 2) were shared among different fields and two (19 and 29) were unique, but detected twice in the same field. The haplotypes generated one unique net showing that 65 haplotypes have a more recent origin and a restricted distribution and three are ancestral haplotypes and geographically distributed. The ITS region of *H. vastatrix* is highly variable, and it was shown that there is an intra-specific variation and that most of the haplotypes are restricted to a single population. The samples characterized as physiologic races and the field populations share sequences with similar levels of genetic and nucleotides diversity. The *H. vastatrix* population diversity inside the field was higher (90.3%) than among them (9.7%).

Key words: *Hemileia vastatrix*, haplotypes, ITS (Internal transcribed spacer), rDNA, genetic diversity

Introdução:

A melhor alternativa para o controle da ferrugem alaranjada do cafeeiro é o plantio de cultivares resistentes a *H. vastatrix*. No entanto, a resistência de muitos desses cultivares vem sendo suplantada pela formação de novas raças fisiológicas do fungo (Várzea e Marques, 2005).

A variabilidade de *H. vastatrix* é conhecida desde a década de 1930 (Rodrigues Júnior, et al, 1975) e tem sido estudada pela leitura das expressões fenotípicas na série de clones de cafeeiros diferenciadores do CIFC/Oeiras, Portugal (D'Oliveira, 1954-57). O conjunto de cafeeiros diferenciadores mostra-se, contudo, insuficiente para caracterizar novas raças virulentas em derivados de Híbridos de Timor. Por isso, os marcadores moleculares, por permitirem a análise genética direta pela variação na seqüência de DNA são a alternativa mais viável. Nandris et al. (1988), utilizando RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) encontraram polimorfismo em populações de ferrugem do cafeeiro provenientes de Nova Caledônia e Papua Nova Guiné. Gouveia et al. (2005) usaram marcas de RAPD para estimar a variação genética em *H. vastatrix* e para determinar se a estrutura da população está relacionada com a raça fisiológica, hospedeiro ou origem geográfica.

Muitos estudos moleculares de fitopatógenos têm sido realizados com bases nas regiões ITS (*Internal transcribed spacers*) do DNA nuclear ribossomal. A utilização de oligonucleotídeos que amplificam estas regiões tem-se mostrado eficientes na análise de diversidade genética. A variação nas seqüências de ITS tem sido usada na caracterização de novas espécies, separação de espécies muito próximas ou de raças de uma mesma espécie (Grube e Kroken, 2000) e para estudos de filogeografia intraespecífica.

O objetivo desse trabalho foi estudar a diversidade genética de *H. vastatrix* por meio do sequenciamento da região do espaçador interno transcrito (ITS) do gene rDNA.

Material e métodos:

Foram utilizadas nesse estudo 15 populações de *H. vastatrix*. Dez destas populações foram coletadas em 10 lavouras cafeeiras de Minas Gerais, sendo que cada lavoura constitui uma população. Duas outras populações (B1 e B3) são provenientes do CIFC Oeiras (Portugal), que haviam sido anteriormente caracterizados como sendo raça II e que estão sendo mantidos pelo BioCafê/UFV. Três populações (B2, B4 e B5) foram provenientes de estudos conduzidos pelo BioCafê/UFV e caracterizados como sendo raças I, II, III, respectivamente. Os DNAs dos uredosporos foram purificados segundo o método de Raeder & Broda (1985), com modificações. As regiões ITS 1, ITS2 e 5,8S do rDNA nuclear foram amplificadas via PCR utilizando-se os iniciadores ITS1 e ITS4, descritos por White *et al.*, 1990. O uso destes iniciadores possibilitou a obtenção de dois fragmentos, um de aproximadamente 950 kb proveniente do genoma de *H. vastatrix* e outro de aproximadamente 600 kb do genoma de *C. arabica* 'Catuai', hospedeiro de multiplicação de *H. vastatrix*. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% e o de maior tamanho foi extraído do gel e purificado com o KIT Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA, Madison, WI, EUA). A região do ITS de cada uma das 15 populações do fungo foi clonada no vetor p-GEM-T Easy (PROMEGA), seguindo de transformação em *E.coli* DH 5 α . Foram selecionadas 4 a 7 colônias transformadas para cada um das 15 populações. O DNA plasmidial das colônias selecionadas foi purificado com o KIT Wizard SV Minipreps DNA purification System (PROMEGA, Madison, WI, EUA) e seqüenciado com os iniciadores M13R e M13F, utilizando-se um seqüenciador automatizado "MegaBace DNA Analysis System 500" (AMERSHAM BIOSCIENCES CORP). As seqüências correspondentes aos clones foram importadas, editadas e alinhadas manualmente no aplicativo *Codoncode Aligner* (CódonCode Corporation). Os alinhamentos das seqüências para cada clone foram realizados com a introdução de *gaps* (quebra da continuidade da seqüência de DNA) para compensar a presença de *indels* (inserção ou deleção de bases). Foram removidas as regiões flanqueadoras das extremidades dos fragmentos que não eram comuns a todas as seqüências. O *software* TCS Versão 1.13 (Clemente *et al.*, 2000) foi utilizado para evidenciar as relações de parentescos entre as seqüências por meio da construção de uma rede de haplótipos. O programa ARLEQUIN Versão 3.1(Excoffier *et al.*, 2006) foi utilizado para estimar a diversidade entre e dentro das populações, pela análise de variância molecular (AMOVA). Este programa também foi utilizado para calcular a diversidade genética e a diversidade nucleotídica de *H. vastatrix* em cada população analisada.

Resultados e discussão:

Foram obtidas 82 seqüências de ITS de *Hemileia vastatrix* das 15 populações analisadas. O alinhamento destas 82 seqüências indicou a existência de 68 haplótipos, que foram definidos por 63 substituições de base e 5 *indels* de 1 pb cada. A região do ITS mostrou que há variação intra-específica em *Hemileia vastatrix*. Entre os 68 haplótipos obtidos, 64 foram exclusivos, isto é, cada um deles foi detectado em uma única lavoura, dois haplótipos (1 e 2) foram compartilhados entre lavouras distintas e dois haplótipos (19 e 29) foram exclusivos, mas detectados duas vezes na mesma lavoura (Tabela 1).

Foi obtida uma rede única contendo todos os 68 haplótipos (Figura 1). Os 67 nodos (representados por círculos menores) são haplótipos intermediários que se encontram extintos ou que não foram amostrados por estarem numa frequência muito baixa. A rede de haplótipos apresentou 2 *loops*, o que representa ambigüidade (homoplasia) na origem de alguns haplótipos. As barras de conexão entre dois haplótipos vizinhos representam um evento único de mutação. De acordo com a Teoria da Coalescência, na formação da rede, os haplótipos de origem mais recente devem ser encontrados nas pontas, enquanto os haplótipos ancestrais no interior da rede. Em relação a distribuição geográfica, é esperado que os haplótipos ancestrais se apresentem geograficamente melhor distribuídos, enquanto que, os recentes permaneçam restritos por não terem tido tempo suficiente para uma maior dispersão. Assim, as posições de centralidade na rede dos haplótipos 1, 2 e 21 (Figura 1) podem ser tomadas como um indicativo de ancestralidade destes haplótipos, enquanto que os 65 restantes seriam haplótipos de origem recente, uma vez que ocupam as extremidades da rede.

A análise de variância molecular (AMOVA) realizada pelo programa ARLEQUIN (versão 3.1) estimou que 9,7% da diversidade de *H. vastatrix* ocorreu entre lavouras e 90,3% dentro da lavoura (Tabela 2). Estes resultados são de grande utilidade para estudos de amostragem populacional de *H. vastatrix*. Um maior número de genótipos deve ser amostrado dentro das populações, uma vez que a diversidade genética é muito maior dentro das populações. A diversidade gênica variou de 0,7000 em acessos de menor variabilidade a 1,000 nos de máxima variabilidade enquanto que a diversidade nucleotídica foi de 0,002099 a 0,006646.

Conclusões

- A região do ITS mostrou que existe variação intra-específica em *Hemileia vastatrix*.
- A região ITS de *H. vastatrix* é altamente variável.
- A maioria dos haplótipos está restrita a uma única população.
- Populações caracterizadas como raças fisiológicas e populações de lavouras cafeeiras possuem seqüências com níveis similares de diversidade genética e nucleotídica.
- A diversidade genética dentro das lavouras é mais elevada do que entre elas.

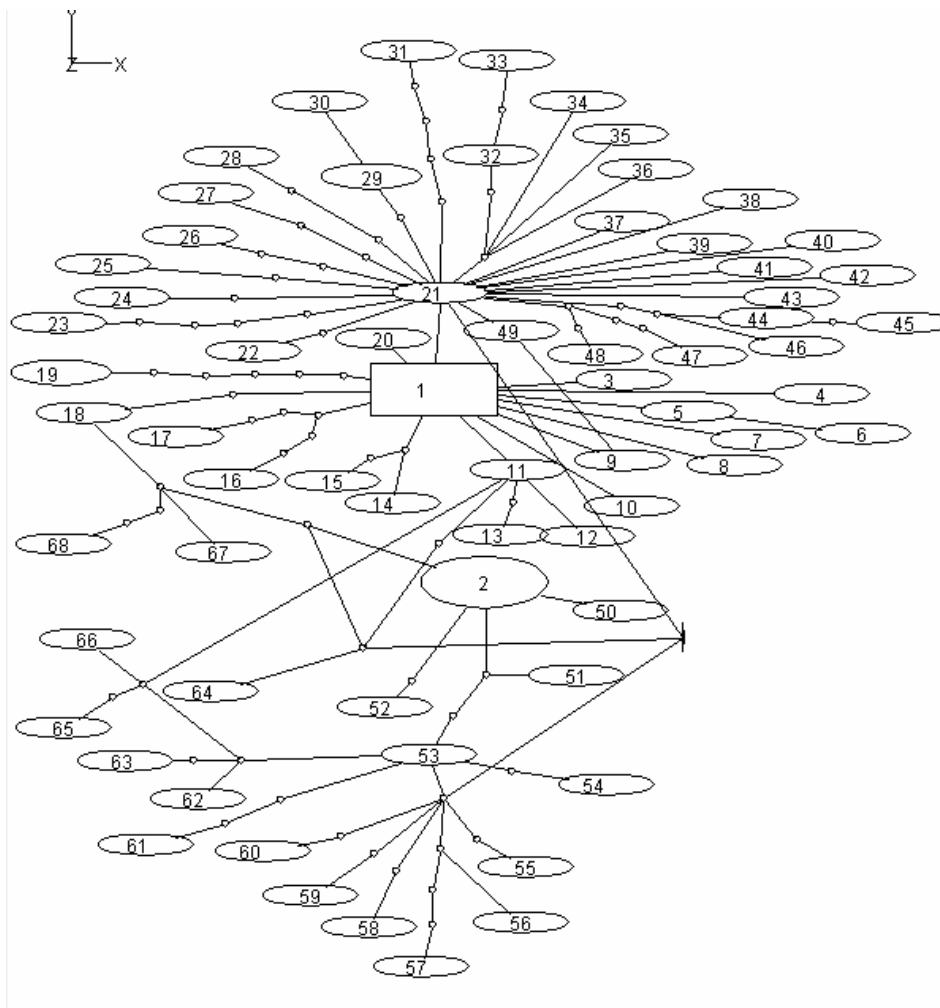


Figura 1: Rede de haplótipos construída com a região ITS do genoma nuclear de *Hemileia vastatrix*. A rede foi obtida pelo aplicativo computacional TCS (Clemente *et al.* 2000). Os números representam os haplótipos descritos na Tabela 1.

Tabela 2: Análise de variância molecular (AMOVA): variação atribuída para as diferenças entre e dentre populações de *H. vastatrix*

Fontes de Variação	GL	Soma dos quadrados	Componente de Variação	Variância (%)
Entre populações	14	55,567	0,26890	9,7
Dentro de populações	67	167,750	2,50372	90,3
Total	81	223,317	2,77263	

Tabela 3: Diversidade genética e nucleotídica de *H. vastatrix* nas localidades amostradas, estimadas a partir da região ITS, pelo programa ARLEQUIN (versão 3.1).

Populações de <i>H.vastatrix</i>	Diversidade Gênica	Diversidade nucleotídica
B1 - Raça II-CIFC/Oeiras/Portugal	0,9000	0,005456
B2 - Raça II - BioCafê/Viçosa - MG	1,0000	0,005421
B3 Raça II-CIFC/Oeiras/Portugal	1,0000	0,005456
B4 - Raça I - BioCafê/Viçosa - MG	0,9524	0,005996
B5 - Raça III - BioCafê/Viçosa - MG	1,0000	0,004722
I1 - População de Piranga - MG	0,9524	0,004097
I2- População de Araponga - MG	1,0000	0,005456
I3 - População de Mariana - MG	1,0000	0,002099
I4 - População de Ervália - MG	0,7000	0,003778
I5 - População de Patrocínio - MG	1,0000	0,004722
I6 - População de Senhora de Oliveira - MG	1,0000	0,006296
I7 - População de São Sebastião do Paraíso - MG	0,9333	0,007835
I8 - População de Capinópolis - MG	1,0000	0,006646
I9 - População de Venda nova dos Imigrantes - ES	0,9524	0,005996
I10 - População de Coimbra - MG	0,9524	0,003498

Referencias Bibliográficas:

- Clement, M.; Posada, D.; Crandall, K.A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular. Ecology**, v.9, n.10, p.1657-1659, 2000.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. Arlequin. An Integrated software package for population genetics data analysis. URL: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>, 2006.
- D'Oliveira, A.J. As ferrugens do cafeeiro. **Ver. Café Port.** 1:4, p.5-13; v.2, n.6, p.5-15; v.2, n.7, p.9-17; v.2, n.8, p.5-22; v.4, n.16, p.5-15, 1954-57.
- Gouveia, M.M.C., Ribeiro, A., Várzea, V.M.P., Rodrigues Jr. C.J. Genetic diversity in *Hemileia vastatrix* based on RAPD markers. **Mycologia**, v.97, n.2, p.396-404, 2005.
- Grube, M., Kroken, S. Molecular approaches and the concept of species and species complexes in lichenized fungi. **Mycological Research**, v.104, n.11, p.1284-1294, 2000.
- Nandris, D., Kohler, F., Fernandez, D., Lashermes, P., Rodrigues JR., C.J., Pellegrini, P.F. **Coffee pathosystems modeling: 2. Assessment pathogen biodiversities**. In: International Congress of Plant Pathology, 7, Edinburgh, Scotland, 9-16 de agosto de 1998. Proceedings... 1988.
- Raeder, U., Broda, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letter of Applied Microbiology**, v.1, p.17-20, 1985.
- Rodrigues Jr., C.J.; Varzea, V.M.P., Silva, M.C., Guerra-Guimarães, L., Rocheta, M., Marques, D.V. **Recent advances on coffee leaf rust**. In: International Scientific Symposium on Coffee, 2000. Bangalore, Índia, Central Coffee Research Institute. Proceedings ... Coffee Board, 2000. p179-193.
- White, T.J.; Bruns, T., Lee, S.; Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M.A. et al. PCR Protocols, Academic Press, San Diego, CA.
- Várzea, V. M. P., Marques, D. V. Population variability of *Hemileia vastatrix* VS. Coffee durable resistance. In: Zambolim, L., Zambolim, E. M. *et al.*(eds). **Durable resistance to coffee leaf rust**. Viçosa: UFV, 2005, p.53-74.