

NOVAS RAÇAS E PATÓTIPOS DE *Hemileia vastatrix* COM GENES DE VIRULÊNCIA COMPLEXOS VÊM SUPLANTANDO A RESISTÊNCIA DAS VARIEDADES DE CAFÉ*

Rosemeire Alves da Silva¹, Laercio Zambolim², Eveline Teixeira Caixeta³

*Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, Cnpq, Fapemig.

¹ Estudante de doutorado, MS, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG

² Professor, PhD, Bioagro-BioCafé, UFV, Viçosa-MG, laerciozambolim@gmail.com.

³ Pesquisadora, DSc, Embrapa Café, Bioagro/Biocafé, UFV, Viçosa-MG, eveline.caixeta@embrapa.br

RESUMO: O objetivo do trabalho foi caracterizar raças de *Hemileia vastatrix* prevalentes nas principais regiões produtoras de café do Brasil. Cinquenta e seis isolados monopustulares coletados de diferentes espécies de café, *Coffea canephora* cv. Conilon, *C. arabica* cv. Catuaí e Híbrido de Timor (*C. canephora* x *C. arabica*) foram utilizados e multiplicados em café suscetível *C. arabica* cv. Caturra. Cada isolado foi inoculado em cafeeiros que compõem a série diferenciada de raças, com três repetições. Sete raças foram identificadas, sendo cinco já descritas no Brasil e duas encontradas pela primeira vez (raças XXIX e XXX) em *C. arabica* cv. Catuaí. Não foi possível caracterizar 15 isolados em raças, por isso foram nomeados como patótipos. A série de diferenciadores não possui genes suficientes para distingui-los em raças. As raças III, XIII, XXII e XXXIII foram identificadas pela primeira vez em *C. canephora* cv. Conilon. A análise dos isolados permitiu inferir a presença de pelo menos seis novos genes na série dos diferenciadores, o que permitiu diferenciar dois isolados descritos como raça III. As informações geradas nesta pesquisa podem ampliar a compreensão da interação entre *H. vastatrix* e *C. canephora* cv. Conilon e *C. arabica* cv. Caturra. O conhecimento dos genes envolvidos no processo infeccioso ajudará na compreensão dos mecanismos moleculares que levam à suplantação da resistência por novas raças do fungo.

PALAVRAS-CHAVE: Ferrugem do cafeeiro, *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, Raças, Variabilidade.

NEW RACES AND PATHOTYPES OF *Hemileia vastatrix* WITH COMPLEX VIRULENCE GENES OVERCOMING THE RESISTANCE OF COFFEE VARIETIES

ABSTRACT: The work aimed to characterize *H. vastatrix* races prevalent in the main coffee producing regions of Brazil. Fifty six monopustular isolates collected from different coffee species, *Coffea canephora* cv. Conilon, *C. arabica* cv. Catuaí and Híbrido de Timor (*C. canephora* x *C. arabica*) were used and multiplied in susceptible coffee *C. arabica* cv. Caturra. Each isolate was inoculated in coffee plants that belongs to the differentiator series of races, with three replicates. Seven races were identified, whereas five were already described in Brazil and two found for the first time (races XXIX and XXX) in *C. arabica* cv. Catuaí. It was not possible to characterize 15 isolates into races, for this reason they were named as pathotypes. The differentiator series did not have enough genes to distinguish them into races. Races III, XIII, XXII and XXXIII was identified for the first time in *C. canephora* cv. Conilon. The analysis of the isolates allowed inferring the presence of at least six new genes in the differentiator series, which made it possible to differentiate two isolates described as race III. The information generated in this research may improve the knowledge of the interaction between *H. vastatrix* with *C. canephora* cv. Conilon and with *C. arabica* cv. Caturra.

KEY WORDS: Coffee leaf rust, *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, Races, Variability

INTRODUÇÃO

A suplantação da resistência de variedades de café a *Hemileia vastatrix*, nos campos de produção, nos últimos 10 anos vem sendo apontado como um dos grandes desafios no melhoramento visando resistência a ferrugem. A ocorrência de raças com amplo espectro de virulência, como a raça XXXVII (v2,5,6,7,9) (Cabral et al., 2009), e a alta diversidade genética das populações do patógeno (Zambolim et al. 2005) representam um grande desafio aos melhoristas. A ocorrência de raças com genes de virulência complexos na Índia mostra como é grande o potencial evolutivo das populações do fungo (Várzea & Marques, 2005; Zambolim, 2016). O Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC) caracterizou até o momento cerca de 50 raças de *H. vastatrix* (Várzea & Marques, 2005; Talhinhos et al., 2017). No Brasil, 15 dessas raças foram identificadas em *C. arabica* L. Os mecanismos que levam ao surgimento de novas raças em *H. vastatrix* considerados até o momento são as mutações (Varzea e Marques, 2005) e mais recentemente foi identificada a criptosssexualidade, um tipo inédito de reprodução sexual oculta, dentro do esporo assexual, os uredósporos de *H. vastatrix* (Carvalho et al., 2011). Até o momento, foram identificados nove genes dominantes de resistência em plantas de café de diferentes espécies, caracterizados pela sigla S_H1 a 9 (Bettencourt et al., 1988). Esses genes de resistência foram encontrados em *C. arabica* (S_H 1, 2, 4, 5), *C. canephora* (S_H 6, 7, 8 e 9) e *C. liberica* (S_H 3).

Os genes S_H 6, 7, 8 e 9 também foram encontrados em derivados do Híbrido de Timor (Bettencourt et al., 1988). Diante desses fatos, o objetivo deste trabalho foi caracterizar raças fisiológicas existentes no Brasil em variedades resistentes e suscetíveis e, entender o rápido surgimento de novas raças, que estão sendo capazes de suplantam a resistência dos cafeeiros lançadas como resistentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 56 isolados de *H. vastatrix* foram coletados em diferentes genótipos de cafeeiro (*C. arabica* cv. Catuaí e *C. canephora* cv. Conilon), em municípios dos cinco principais estados brasileiros produtores de café (MG, ES, SP, PR e BA). A amostragem consistiu de aproximadamente 20 folhas, apresentando sinais do patógeno, coletadas ao acaso, em uma mesma planta em cada propriedade. Os isolados foram inoculados em Caturra CIFC 19/1 e, após o surgimento das pústulas, foram selecionadas e multiplicadas as monópústulas de todos os isolados. Para caracterização das raças fisiológicas dos isolados de *H. vastatrix*, empregou-se a metodologia de disco de folhas (Esques, 1982). Foram utilizados 16 discos de folhas (1,5 cm de diâmetro) de cada um dos 24 clones diferenciadores de raças, de *H. vastatrix* mantidos pelo BioCafé/UFV. Cada disco de folha foi inoculado na face abaxial com uredósporos do patógeno, com o auxílio de pincel de pêlo de camelo. Após a inoculação, os discos foram colocados sobre uma tela de nylon e espuma, saturada com água, no interior de um gerbox. Os gerbox contendo os discos de folhas foram fechados e mantidos durante 48 horas a $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Em seguida, os gerbox foram transferidos para uma câmara com condições controladas de temperatura e luminosidade ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, 12 horas de luz). A caracterização fisiológica de raças foi determinada de acordo com a reação de resistência (ausência de uredósporos) ou suscetibilidade (presença de uredósporos), manifestada em cada clone diferenciador de raças. Os testes foram repetidos três vezes, em épocas diferentes do ano para a confirmação dos resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível identificar sete raças: II, III, XIII, XXII, XXIX, XXX e XXXIII de *H. vastatrix* e 15 patótipos (Hv01 a Hv015) dos 56 isolados (Tabela 1). Um isolado obtido de Catuaí foi caracterizado como pertencente a uma raça nova (XXIX), ainda não descrita; foi também encontrado pela primeira vez no Brasil, um isolado pertencente a raça XXX, em plantas de HdT. Um isolado da raça XXXIII foi encontrada em Conilon. No clone 120 de Conilon, quatro isolados foram identificados como raça XIII. Dois isolados foram caracterizados como pertencentes as raças III, um foi obtido de pústulas em folhas de HdT e o outro em Conilon. Três isolados foram caracterizados como pertencente a raça XXII, obtidos em plantas de Conilon nos clones 03 e 18. Para alguns isolados não foi possível caracterizá-los em raças usando a série diferenciadora (Tabela 1). Esses isolados foram coletados em plantas de Conilon e Catuaí. Mais de 50 raças foram descritas no mundo, sendo algumas delas com vários genes de virulência, em clones diferenciadores que possuem genes de resistência S_H1 - S_H9 (Bettencourt; Rodrigues, 1988). Entretanto, a série diferenciadora é restrita, o que impossibilitou a caracterização de patótipos com amplo espectro de virulência em raças.

No Brasil já foram caracterizadas 15 raças (Zambolim, 2016); no presente trabalho, foi identificadas as raças XXIX(5,6,7,8,9) e XXX(5,8), além de sete raças já descritas anteriormente. Os genes $v8$ e $v?$ não tinham sido relatados no Brasil (Tabela 2). Baseando-se na reação de resistência/susceptibilidade, ao inocular os isolados na série diferenciadora, foi possível detectar a presença de seis possíveis novos genes ou genes candidatos de resistência (A,B,C,D,E,F) ainda não descritos, o que não significa que não possam estar presentes em mais genótipos de café e que não existam mais genes distintos presentes nos genótipos. Segundo Barka (2017), a presença de um novo gene S_H10 , em seis clones diferenciadores (A, B, C, D, E, F), pode explicar o aumento no número de novas patótipos, não caracterizados em raças. Os clones CIFC 635/2 S12 Kaffa, S4 Agaro, CIFC 635/3 S12 Kaffa, CIFC 832/1 são os candidatos a possuírem um gene de resistência diferente dos genes A, B, C, D, E e F, podendo ser os mesmos genes ou genes diferentes (Tabela 2).

Dois isolados identificados como raça III apresentaram padrões de infecção contrastantes com genótipos que compõem a série diferenciadora, sendo estes isolados designados de 5M e 40M, que apresentaram reação diferencial para o genótipo CIFC 128/2, possuidor do gene S_H1 e mais o gene S_H10 de acordo com Barka (2017), comprovando assim que os dois isolados não correspondem a mesma raça, e sim raças diferentes. Os isolados caracterizados como novas raças, 51M e 64M, tiveram reações contrastantes com os genótipos CIFC 420/10, 7963/117, 128/3; os isolados 38M e 60M tiveram reação contrastante com genótipo CIFC 419/20, 87/1, 128/2, 7963/117; os isolados 1M e 6M contrastante com genótipo diferenciador CIFC 87/1; isolados 12M e 26M tiveram reação diferencial com o genótipo 7963/117, e os isolados 62M, 65M, 66M, 67M, 70M com reação diferencial para os genótipos CIFC 1343/269, 420/10, 419/20, 7963/117, 87/1, 128/2. Todos os isolados que compõem uma raça, que tiveram reação contrastante com genótipos da série diferenciadora, são derivados tanto de Conilon, Catuaí e HdT e independe da sua origem geográfica. O mesmo ocorreu com isolados caracterizados como patótipos distintos.

Os patótipos Hv01, Hv06, Hv07, Hv012 sugerem existência de diferenças dentro das raças, pois existem genes de resistência ainda não identificados. Quanto mais genes de resistência forem identificados no hospedeiro, maior o número de combinações dos genes de virulência serão inferidos e, mais elucidada será a determinação e a diferenciação das raças. Como até o momento, a única ferramenta utilizada para estudar a variabilidade de *H. vastatrix* é a série diferenciadora, torna-se necessário pesquisas com técnicas moleculares, visando elucidar esse patossistema tão

complexo. Com a avanço da genômica, transcriptoma e proteômica, acredita-se que em um futuro próximo, estas e outras perguntas serão respondidas. A coleção de isolados (raças) é tão importante quanto a própria série diferenciadora, pois por meio dela podemos identificar a presença de possíveis novos genes, como ocorreu nesse trabalho com a identificação de seis candidatos nos clones (A, B, C, D, E, F).

Tabela 1. Raças e patótipos de *Hemileia vastatrix* identificadas cafeeiros *C. arabica* cv. Catuaí e *C. canephora* cv. Conilon em diferentes estados do país (MG, ES, SP, PR, BA) com os respectivos genes de virulência do patógeno de resistência do hospedeiro e a frequência encontrada para cada uma das raças (patótipos). S – suscetibilidade; Espaço em branco – não infectou.

Genes de virulência inferidos	Raças Fisiológicas (Patótipos) de <i>H. vastatrix</i>	Genes de Resistência												Genes de virulência
		S _H 6	S _H 5,6,7,9	S _H 4,5	S _H 5,6,9	S _H 1,5	S _H 1,2,5	SH5,7 ou 5,7,9	S _H 1	S _H 5,8	S _H ?	S _H 5	S _H 2,5	
Coffee spp e Híbrido Interespecífico														
1343/269	420/10	110/5	419/20	87/1	1006/10	7963/117	128/2	420/2	644/18	19/1	32/1			
a	y	E	R	D	G	M	3	2	1	J	L			
v5	II										S			
v1,5	III					S					S			
v5,?	XIII									S	S			
v5,6	XXII	S									S			
v5, 6,7,8,9	XXIX	S	S						S		S			
v5,8	XXX								S		S			
v5,7,9 ou 5,7	XXXIII						S				S			
v1,5,6,7,8,9,?	Hv01	S	S		S	S		S	S	S	S		v8?	
v1,5,8,?	Hv02							S	S	S	S		v8?	
v5,6,7,9	Hv03	S					S				S			
v5,6,8	Hv04	S							S		S		v8?	
v5,6,?	Hv05	S								S	S		v?	
v1,5,6,7,9	Hv06	S	S			S					S			
v1,5,6,7,8,9	Hv07	S	S		S		S	S	S		S		v8?	
v1,5,6,?	Hv08	S				S				S	S			
v1,5,6	Hv09	S				S					S		v?	
v1,2,5,6,7,8,9,?	Hv10	S					S	S	S	S	S	S	v8?	
v1,5,6,8,?	Hv11	S						S	S	S	S		v8?	
v5,6,7,9,?	Hv12	S	S							S	S		v?	
v1,4.5,?	Hv13			S				S		S	S		v?	
v1,2,5,7,8,9,?	Hv14						S	S		S	S		v?	
v1,5,6,8,9,?	Hv015	S			S	S			S	S	S		v?	

Tabela 2. Adição do gene S_H10 , identificação de possíveis seis genes de resistência a *H. vastatrix*

Série diferenciadora	Genes (S_H1 - S_H9)	Genes de Resistência Proposto
19/1 – Matari	S_H 5	S_H 5
128/2 - Dilla & Alghe	S_H 1	$S_H1,10,F$
635/2 S 12 Kaffa	S_H 4	$S_H4,?$
63/1 – Bourbon	S_H 5	S_H 5
1343/269 - H. Timor	S_H 6	$S_H6,10,A$
32/1 - DK 1/6	SH 2,5	SH2,5
33/1 - S. 288-23	S_H 3,5	S_H 3,5
644/18 H. Kawisari	$S_H?$	SH10,
H 419/20	S_H 5,6,9	$S_H5,6,9,10,C$
H 420/2	S_H 5,8	S_H 5,8
H 420/10	S_H 5,6,7,9	$S_H5,6,7,9,10,B$
7960/15 = 7963/117 – Catimor	S_H 5,7 ou SH 5,7,9	$S_H5,7,9,D$ ou 5,7, D
829/1	$S_H?$	$S_H?$
110/5 - S 4 Agaro	S_H 4,5	S_H 4,5,?
1006/10 - KP 532 (pl 31)	S_H 1,2,5	S_H 1,2,5
H 153/2	S_H 1,3,5	S_H 1,3,5
635/3 - S 12 Kaffa	S_H 1,4,5	S_H 1,4,5, ?
H 152/3	S_H 2,4,5	S_H 2,4,5
H 151/1	S_H 3,4,5	S_H 3,4,5
HW 17/12	S_H 1,2,4,5	S_H 1,2,4,5
H 147/1	S_H 2,3,4,5	S_H 2,3,4,5
832/1 - H. Timor	S_H 6,7,8,9,?	S_H 6,7,8,9,10,?
134/4 - S 12 Kaffa	SH 1,4	SH 1,4
87/1 – Geisha	S_H 1,5	$S_H1,5,E$

Os clones em amarelo são os candidatos a possuírem um gene de resistência, diferente dos genes A, B, C, D, E e F, podendo ser o mesmo gene ou genes diferentes.

CONCLUSÃO

1 - Foi relatado pela primeira vez no Brasil as raças XXIX e XXX em *C. arabica*. Em *C. canephora* foram identificadas as raças III, XIII, XXII e XXXIII. O estudo mostra também a identificação de 15 patótipos, com genes de virulência complexos que a série diferenciadora não pode caracterizar. A série diferenciadora do CIFC não contém os genes de virulência necessários, para caracterizar os patótipos complexos de *H. vastatrix* presentes nos campos de produção de café do país.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARKA, GD. 2017. Identification, molecular characterization and differential expression studies of genes activated during *Coffea arabica* - *Hemileia vastatrix* interactions. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa.
- BETTENCOURT AJ., RODRIGUES CJ 1988. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. eds. Coffee: Agronomy. London: Elsevier Applied Science pp 285-292.
- CABRAL, PGC, ZAMBOLIM, EM, ZAMBOLIM, L., LELIS, TP, CAPUCHO, AS., CAIXETA, ET. 2009. Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. Australas Plant Dis Notes 4:129–130.
- CARVALHO, CR., FERNANDES, RC, CARVALHO, GMA, BARRETO, WB, EVANS HC. 2011. Cryptosexuality and the genetic diversity paradox in coffee rust, *Hemileia vastatrix*. Plos One 6(11): e26387
- ESKES, AB. 1982. The use of leaf disk inoculations in assessing resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). Netherlands Journal of Plant Pathology 88:127-141.
- VÁRZEA, VMP, MARQUES, DV. 2005. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E.M.; VÁRZEA, V.M.P. (Ed.). Durable resistance to coffee leaf rust. Viçosa: UFV, p.53-74.
- TALHINHAS, P., BATISTA, D., DINIZ, I., VIEIRA, A., SILVA, D. N., LOUREIRO, A., TAVARES, S., PEREIRA, A. P., AZINHEIRA, H. G., GUIMARAES, L. G.,

VARZEA, V., SILVA, M. D. C. 2017. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. Molecular plant pathology DOI: 10.1111/mpp.12512

ZAMBOLIM, L., MACIEL-ZAMBOLIM, E., VALE, FXR., PEREIRA, AA., SAKYIAMA, NS., CAIXETA, ET. 2005 Physiological races of *Hemileia vastatrix* in Brazil: physiological variability, current situation and future prospects. In: Zambolim L, Maciel-Zambolim E, Várzea VMP (eds) Durable resistance to coffee leaf rust. UFV, Viçosa, pp 53–74.

ZAMBOLIM, L. 2016. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. Trop. Plant Pathol. v.41: p.1–8.