



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO
FIT 798 – SEMINÁRIOS EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

Prelecionista: Guilherme Mendes de Almeida Carvalho

Orientador: Prof. Carlos Roberto de Carvalho

Determinação do conteúdo de DNA nuclear e da relação AT/CG do fungo da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) por citometria de fluxo

O fungo *Hemileia vastatrix* representa um grande problema nos sistemas produtivos do cafeeiro. Apesar dos intensos esforços no desenvolvimento de variedades resistentes à doença, a resistência é vencida com relativa rapidez, provavelmente em razão da ampla diversidade genética desse patógeno. Ferramentas moleculares são extensivamente usadas com o objetivo de caracterizar o genoma, tanto de espécies de fungos, como de populações e raças dentro dessas espécies. As informações acerca do conteúdo de DNA nuclear e do percentual de bases são essenciais para a condução de pesquisas taxonômicas, evolutivas e filogenéticas com base molecular. A citometria de fluxo (CF) é comumente utilizada para estimar o valor C em fungos. Entretanto, o uso dessa técnica na determinação da composição de bases nesse grupo de organismos ainda é restrito. Apesar de ser um patógeno importante na cultura do café, *H. vastatrix* não apresenta na literatura valores para o seu tamanho de genoma e sua composição de bases. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e padronizar uma metodologia de CF adaptada ao uso de urediniósporos, a fim de estimar o conteúdo de DNA nuclear e o percentual de pares de bases do fungo da ferrugem do café. Esporos do fungo foram coletados de pústulas previamente selecionadas em folhas de cafeeiro, naturalmente infectadas. Para o isolamento nuclear dos esporos foi realizado tratamento mecânico com o uso de Grinder[®] em tampão OTTO. Folhas jovens de tomate (*Solanum lycopersicum*, 2C = 2,0 pg e AT = 64,5%), cultivadas em casa de vegetação, foram utilizadas como padrão pseudo-interno, sendo a suspensão nuclear obtida pelo procedimento de *chopping*. Para a determinação do conteúdo de DNA nuclear e da composição de bases, as suspensões foram coradas com iodeto de propídeo e DAPI, respectivamente. A partir da análise dos histogramas gerados por CF, o valor C

e o percentual de pares de bases estimado para *H. vastatrix* foi de 0,75 pg (=733,5 Mpb), AT = 65,6% e CG = 34,4%. Os histogramas gerados tiveram coeficientes de variação menores que 5%, o que é recomendado para esse tipo de análise. O valor C determinado para a espécie representa o maior tamanho de genoma dentro do grupo Pucciniales. Isso corrobora com a evidência de que a adaptação das espécies de fungos à condição de biotróficos obrigatórios resulta na expansão do genoma devido à proliferação de elementos transponíveis. Além disso, a composição de bases de AT = 65,4% e CG = 34,6% sugere uma alta taxa de DNA repetitivo, que é composta de regiões ricas em AT. A metodologia desenvolvida nesse trabalho possibilitou a determinação do valor C absoluto e da composição de bases do fungo da ferrugem do cafeeiro pela primeira vez. Além disso, essa metodologia tem potencial para ser aplicada a outros fungos causadores de ferrugem com tipos de esporos similares.

Referências Bibliográficas

Carvalho, C.R.; Fernandes, R.C.; Carvalho, G.M.A.; Barreto, R.W.; Evans, H.C. Cryptosexuality and the Genetic Diversity Paradox in Coffee Rust, *Hemileia vastatrix*. **PLoS ONE**, v.6, p.e26387, 2011.

D'Hondt, L.; Höfte, M.; Van Bockstaele, E.; Leus, L. Applications of flow cytometry in plant pathology for genome size determination, detection and physiological status. **Molecular Plant Pathology**, v.12, p.815-828, 2011.

Duplessis, S.; Cuomo, C.A.; Lin, Y.-C.; Aerts, A.; Tisserant, E.; Veneault-Fourrey, C.; Joly, D.L.; Hacquard, S.; Amselem, J. et al. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.22, p.8921-8922, 2011.

Kullman, B. Application of flow cytometry for measurement of nuclear DNA content in fungi. **Folia Cryptogamica Estonica**, v.36, p.31-46, 2000.

Kullman, B.; Tamm, H.; Kullman, K. Fungal Genome Size Database (2005). Disponível em: <http://www.zbi.ee/fungal-genomesize>. Acesso: 20 dez. 2012.