



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PARANÁ

CAMPUS LUIZ MENEGHEL

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

GABRIELA RASTELLI BERMEJO

**Diversidade genética de isolados brasileiros de
Phakopsora pachyrhizi (Sydow & Sydow)**

**BANDEIRANTES, PR – BRASIL
2016**

GABRIELA RASTELLI BERMEJO

**Diversidade genética de isolados brasileiros de
Phakopsora pachyrhizi (Sydow & Sydow)**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Norte do Paraná, como parte das exigências do Programa de Mestrado em Agronomia para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mayra Costa da Cruz
Gallo de Carvalho

**BANDEIRANTES, PR – BRASIL
2016**

B516d

Bermejo, Gabriela Rastelli
Diversidade genética de isolados brasileiros de *Phakopsora pachyrhizi*
(Sydow & Sydow)/ Gabriela Rastelli Bermejo; orientação Mayra Costa da Cruz
Gallo de Carvalho. – Bandeirantes: Universidade Estadual do Norte do
Paraná, 2016.
37 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual do Norte do
Paraná – UENP, Bandeirantes, 2016.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Mayra Costa da Cruz Gallo de Carvalho

Inclui bibliografia

Agronomia - Soja 2. Soja - Ferrugem asiática 3 AFLP, SSR I. Título. II.
Carvalho, Mayra Costa da Cruz Gallo de.

CDD – 630

CDU - 633

GABRIELA RASTELLI BERMEJO

**Diversidade genética de isolados brasileiros de
Phakopsora pachyrhizi (Sydow & Sydow)**

Dissertação apresentada ao Programa
de Mestrado em Agronomia da
Universidade Estadual do Norte do
Paraná, *Campus* Luiz Meneghel.

Aprovada em: 30/03/2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Mayra Costa da Cruz Gallo de Carvalho

UENP

Prof. Dr. Sandremir de Carvalho

UENP

Dr^a. Adriana Polizel

TMG

Prof. Dr. Leopoldo Sussumo Matsumoto

UENP

Dr^a. Francismar C. M. Guimarães

EMBRA-SOJA

Prof^a. Dr^a. Mayra Costa da Cruz Gallo de Carvalho
Orientadora

Universidade Estadual do Norte do Paraná,
Campus Luiz Meneghel

Aos meus pais, Roberto Bermejo e Maria de Lourdes Rastelli Bermejo.

A minha família e amigos.

Dedico com muito amor.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Norte do Paraná, pela oportunidade concedida à realização deste curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa-Soja e a pesquisadora doutora Francismar Corrêa Marcelino-Guimarães pela disponibilização de materiais para a realização deste trabalho.

A Prof. Dra. Mayra Costa da Cruz Gallo de Carvalho pela orientação, dedicação, amizade, compreensão e pelos ensinamentos transmitidos durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sandremir de Carvalho pela ajuda inestimável no desenvolvimento da pesquisa, pela disponibilização do seu laboratório e pela amizade.

A todos do laboratório de Biotecnologia, em especial, a Fernanda Castanho que contribuiu com a parte prática deste trabalho.

Aos meus pais e minha família pelo apoio incondicional e principalmente por não me deixarem desistir em meio às dificuldades encontradas durante a realização da pesquisa.

As minhas amigas, que sempre estiveram ao meu lado me incentivando a seguir em frente: Dinha, Dani, Karol, Fer, Fran, Dri, Nathi, Carol e Leticia.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada

RESUMO

BERMEJO, Gabriela Rastelli. Diversidade genética de isolados brasileiros de *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow & Sydow). Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Estadual do Norte do Paraná, Bandeirantes, 2016.

A ferrugem asiática da soja (FAS) causada pelo fungo biotrófico obrigatório *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd., é uma das principais doenças que acomete a cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merr.], causando perdas na sua produção em diversas áreas produtoras do mundo. A resistência específica ao fungo *P. pachyrhizi* foi encontrada, até o momento, em seis loci, denominados *Rpp1*, *Rpp1b*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4*, *Rpp5* e *Rpp6*. No entanto, esse locus não confere resistência completa ao patógeno, dificultando a criação de uma cultivar eficiente. Sendo assim, o conhecimento sobre a variabilidade genética existente nas populações de *P. pachyrhizi* e de isolados são fundamentais para que programas de melhoramento genético possam realizar um planejamento estratégico eficiente contra o fungo causador da ferrugem asiática da soja. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi ampliar análises iniciadas por Darben et al. (2012), a partir do uso de marcadores dominantes e co-dominantes para estimar a diversidade molecular entre os isolados monouredinais de *P. pachyrhizi* bem como para uma população de esporos do fungo. Após sucessivos ciclos de cultura monouredinial em folha destacada, foram obtidos DNA de 6 isolados monouredinais e de uma população, coletados em regiões produtoras de soja no país. A amplificação dos sete pares de *primers* AFLP revelou uma diversidade genética média entre pares de 21,88%-77,98% (Nei), sendo a maior diversidade encontrada entre o isolado LLRV212 (MT) e a população (PR). A maior similaridade encontrada foi de 80,35% entre os isolados LCA4A12 (MG) e LLRV212 (MT). O Isolado LGO112 (GO) apresentou 30 marcas únicas e não se agrupou no cluster formado pelos demais. Em termos de seleção de inóculo, os dados moleculares indicaram esse material como um importante material a ser considerado para análise fenotípica de virulência e agressividade. Os cinco *primers* SSR amplificados não apresentaram polimorfismo. É possível sugerir

que ao menos cinco dos sete materiais testados representem fontes de inóculos geneticamente distintas. Será agora fundamental observar se a variação molecular corresponde em algum grau a variação fenotípica observada na resposta de plantas diferenciadoras de soja diante dos diferentes materiais do fungo.

Palavras-chave: AFLP, SSR, ferrugem asiática da soja, variabilidade genética

ABSTRACT

BERMEJO, Gabriela Rastelli. **Genetic diversity of Brazilian isolates of *Phakopsora pachyrhizi***. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Estadual do Norte do Paraná, Bandeirantes, 2016.

Asian soybean rust (ASR) caused by obligate biotrophic fungus *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd., Is a major disease that affects the culture of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.], Causing losses in production in many producing areas of the world. The specific resistance to *P. pachyrhizi* fungus was found, so far, in six locus, called Rpp1, Rpp1b, Rpp2, Rpp3, Rpp4, Rpp5 and Rpp6. However this locus does not confer full resistance to the pathogen, hindering the development of effective cultivars. Therefore, knowledge of the genetic variability in populations of *P. pachyrhizi* and isolates are essential for breeding programs can perform an efficient strategic planning against the fungus that causes Asian soybean rust. Therefore, the objective of this study was to extend analysis initiated by Darben et al. (2012), from the use of dominant and co-dominant markers to estimate the molecular diversity between monourediniais isolates of *P. pachyrhizi* and to a population of spores of the fungus. After successive cycles monouredinial culture in a separate leaves were obtained DNA six isolated monourediniais and one population collected in soybean producing regions in the country. The amplification seven pairs of AFLP primers showed an average genetic diversity was between pairs from 21.88% -77.98% (NIS), the greater diversity in pairs found between the isolated LLRV212 (MT) and the population (PR). The highest similarity was found between 80.35% LCA4A12 isolated (MG) and LLRV212 (MT). The Isolated LGO 112 (GO) presented 30 unique brands and not clumped together in the cluster formed by the other. In terms of inoculum selection, molecular results indicated this material as a major material to be considered for virulence phenotype analysis and aggressiveness. The five amplified SSR primers showed no polymorphism. It is possible to suggest that at least five of the seven tested materials represent sources of genetically distinct inoculations. It will now be essential to observe the molecular variation corresponds to some degree the phenotypic variation

observed in soybean plants differentiated response on the different materials of the fungus.

Keywords: AFLP, SSR, Asian soybean rust, genetic variability

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. A cultura da soja e sua importância econômica.....	3
2.2. A Ferrugem asiática da soja (FAS)	4
2.2.1. Ciclo biológico do fungo <i>P. pachyrhizi</i>	6
2.2.2. Sintomatologia.....	8
2.2.3. Variabilidade genética do fungo <i>P. pachyrhiz</i>	11
2.3. Ferramentas moleculares no estudo da diversidade genética de fitopatógenos....	12
2.3.1. ITS (Internal transcribed spacer).....	13
2.3.2. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	14
2.3.3. SSR (Simple Sequence Repeats ou Microsatélites).....	15
2.3.4. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).....	16
3. JUSTIFICATIVA.....	18
4. OBJETIVOS.....	19
4.1 Objetivos gerais.....	19
4.2. Objetivos específicos.....	19
5. ARTIGO.....	20
5.1. Introdução.....	20
5.2. Material e Métodos.....	21
5.2.1. Material biológico.....	21
5.2.3. Reações de AFLP e SSR.....	23
5.3. Resultados e Discussão.....	25
6. REFERÊNCIAS.....	30

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Origem e difusão geográfica da soja.....	3
FIGURA 2 - Desenvolvimento de <i>P. pachyrhizi</i> durante interação patógeno e planta hospedeira.....	7
FIGURA 3 - Sintomas na face abaxial de folhas de soja infectadas pelo fungo <i>P. pachyrhizi</i>	8
Figura 4 - Agrupamento dos seis isolados monouredinais testados e da população de <i>P. pachyrhizi</i>	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Focos da FAS no Brasil na safra 2015/2016.....5

Tabela 2 - Identificação, áreas e período de coleta dos esporos de *P. pachyrhizi* que deram origem aos isolados monouredinais.....22

Tabela 3 - Testes realizados com os *primers* SSR (ANDERSON et al., 2008).....24

Tabela 4 - Condições ideais de amplificação para cinco dos *primers* SSR desenvolvidos por ANDERSON et al., (2008).....28

1. INTRODUÇÃO

Não seria exagero dizer que o Brasil é “movido a soja” (*Glycine max* (L.) Merrill). Uma atividade que, em seus diversos elos da cadeia produtiva, assegura faturamento de R\$ 100 bilhões, como foi a projeção para 2015 e a maior receita na exportação, tendo atingido US\$ 31,4 bilhões em 2014, não pode ser nada menos que o motor do desenvolvimento nacional (SANTOS et al. 2015).

Dentro do complexo de doenças que atacam as lavouras comerciais de soja, o maior potencial destrutivo vem sendo atribuído à ferrugem asiática da soja (FAS), causada pelo fungo biotrófico obrigatório *Phakopsora pachyrhizi*, que foi eleita como uma das duas doenças que devem ter tratamento prioritário segundo a Defesa Vegetal no Brasil, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); a outra é o mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), ambas integram a lista das oito principais pragas agrícolas do País. Motivos não faltam para isso, os prejuízos causados pela FAS chegam a bilhões de dólares apenas no Brasil, enquanto o mofo branco aumenta sua incidência e se torna mais difícil de ser controlado a cada safra (SANTOS et al. 2015; HARTMAN et al., 2005)

Uma das melhores estratégias para o controle de doenças e pragas é o manejo integrado, sendo o uso de cultivares resistentes ou tolerantes essencial para o sucesso a longo prazo. Essa solução facilita o manejo e reduz os custos, além de minimizar a agressão ao ambiente. As cultivares resistentes normalmente são desenvolvidas pela transferência de alelos de resistência de fontes exóticas, muitas vezes não adaptadas, para cultivares elite. Devido à coevolução entre hospedeiro e patógeno e o consequente surgimento de novas raças, cultivares resistentes necessitam ser continuamente desenvolvidos (ALZATE-MARIN et al., 2005).

Foram mapeados em soja, seis *loci* para resistência ao fungo *P. pachyrhizi*, denominados *Rpp1*, *Rpp1b*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4*, *Rpp5* e *Rpp6*, (BROMFIELD e HARTWIG, 1980; MCLEAN e BYTH, 1980; HARTWIG e BROMFIELD, 1983; HARTWIG, 1986; GARCIA et al., 2008; LI et al., 2012; KIN et al. 2012). Porém estudos mostram que houve a quebra de resistência de alguns desses *loci* como o *Rpp1*, *Rpp2* e *Rpp3* (YORINORI et al., 2005;

YORINORI, 2008; YAMANAKA et al., 2010) e nenhum deles é capaz de conferir resistência ampla a FAS.

Nesse sentido, os programas de melhoramento que visam a geração de cultivares resistentes a FAS têm buscado por estratégias que ampliem o espectro de resistência aos diferentes patótipos do fungo principalmente através da piramidação de *loci* de resistência (KELL Y et al. ,2003), busca por fontes de resistência horizontal e transgenia, nesse último caso explorando a resistência não hospedeira (TSCHANZ; WANG, 1985). Parte fundamental do sucesso desses programas reside no uso de fontes de inóculo representativas da diversidade local com espectro de virulência e agressividade conhecidos. Para tanto, a geração e uso de materiais uniformes geneticamente, ou seja, isolados de *P. pachyrhizi* é uma etapa crucial nesse processo. O uso de tais materiais permitem melhor compreensão da biologia do patógeno, do processo de infecção e dos genes envolvidos na interação *P. pachyrhizi*-hospedeiro. O conhecimento da variabilidade genética existente nas populações e isolados do patógeno associado ao conhecimento da virulência e agressividade são necessários para que os programas de melhoramento genético possam ser realizados considerando a seleção eficaz de inóculos como parte do planejamento estratégico. Vários tipos de marcadores moleculares estão disponíveis para estudos de diversidade genética, sendo os mais utilizados o RAPD, o AFLP, os microssatélites (SSR - "Simple Sequence Repeats") (EMBRAPA, 2000); e ainda os SNPs associados a regiões gênicas específicas tais como ITS (Internal transcribed spacer) (FUNGARO, 2000).

Em 2012, a embrapa-soja iniciou o desenvolvimento de isolados monouredinais do *P. pachyrhizi* a partir de populações coletadas em diferentes regiões produtoras de soja do Brasil, os quais foram apenas parcialmente utilizados na análise de diversidade de regiões ITS (Darben 2012). Sendo assim, a presente dissertação objetivou ampliar tais análises a partir do uso de marcadores dominantes e co-dominantes para estimar a diversidade molecular entre os isolados monouredinais de *P. pachyrhizi* bem como para uma população de esporos do fungo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da soja e sua importância econômica

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) tem como origem o continente asiático, foi introduzida no Brasil por Gustavo D'Utra, na Bahia em 1882, sem sucesso (Figura 1). Em São Paulo, foi cultivada pela primeira vez por Daffert, em 1892, no Instituto Agrônomo de Campinas. Em 1914, no estado do Rio Grande do Sul, foi cultivada e estudada pelo Prof. E. Craig, nesse Estado, a cultura apresentou evolução mais consistente e, em 1949, cerca de 18 mil toneladas constituíram a primeira exportação brasileira de soja. O Estado do Paraná, grande produtor dessa leguminosa, iniciou seu cultivo em 1954 (CÂMARA, 2011).

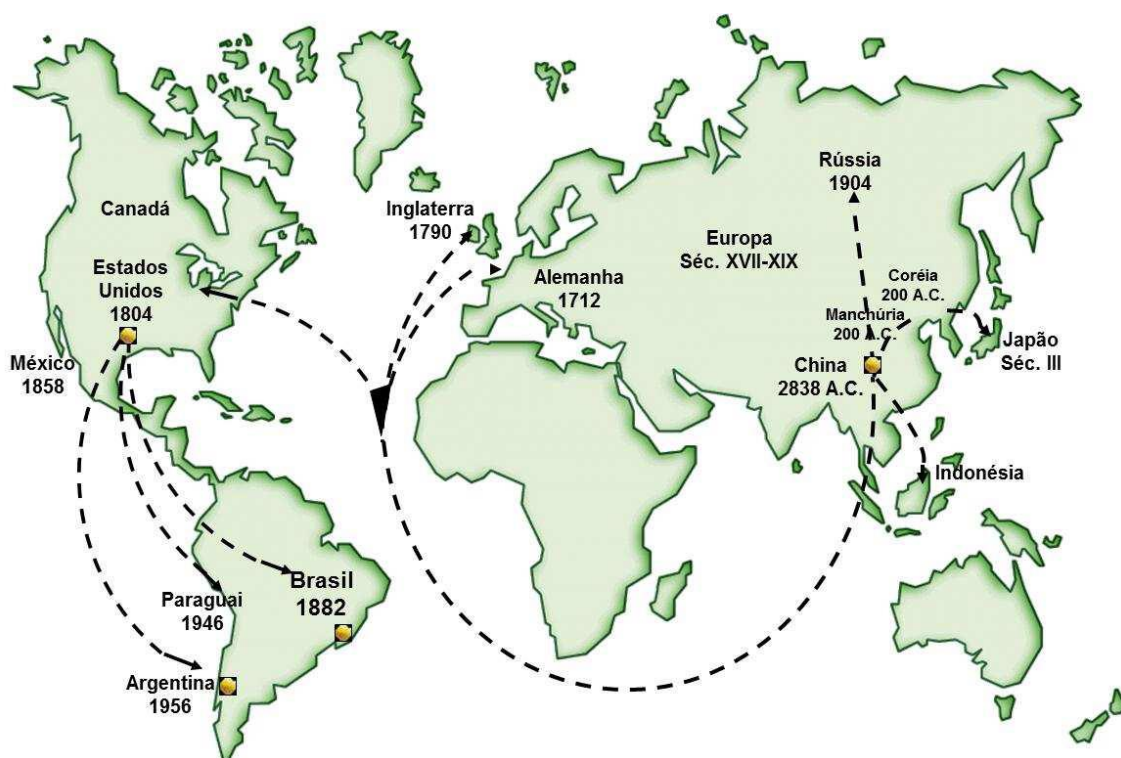


Figura 1. Origem e difusão geográfica da soja.
(Fonte: Bonetti, 1977).

Atualmente, a soja é cultivada, praticamente, em todo território nacional, desde as altas latitudes gaúchas até as baixas latitudes equatoriais tropicais, apresentando em algumas regiões brasileiras, produtividades médias

superiores à média obtida pela soja norte-americana. Neste aspecto, merece destaque o estado do Mato Grosso, onde o uso de cultivares devidamente adaptados à esta região, condições climáticas ideais, adequada construção da fertilidade do solo, adubação equilibrada e práticas de manejo contribuem com a alta produtividade de grãos (CÂMARA, 2011).

A soja é a cultura agrícola brasileira que mais cresceu nas últimas três décadas e corresponde a 49% da área plantada em grãos do país. O aumento da produtividade está associado aos avanços tecnológicos, ao manejo e eficiência dos produtores. (MAPA, 2016).

É a leguminosa mais importante na economia mundial. Seus grãos são muito usados na produção de óleo vegetal, rações para alimentação animal, indústria química e de alimentos. Recentemente, vem crescendo também o uso como fonte alternativa de biocombustível (COSTA NETO; ROSSI, 2000).

A safra brasileira de soja 2014/2015 alcançou 96,24 milhões de toneladas, com mais um recorde sobre os números passados. O aumento é de 11,8%, com relação a safra de 2013/14 (CONAB, 2015). No entanto, segundo os mais recentes estudos da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), para a safra 2015/2016 espera-se uma produção brasileira com média de 102,5 milhões de toneladas de grãos. (CONAB 2016).

2.2. A Ferrugem asiática da soja (FAS)

A ferrugem asiática da soja (FAS) é uma doença foliar severa causada pelo fungo biotrófico obrigatório *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow. O termo biotrófico define os parasitas que dependem nutricionalmente dos tecidos vivos do hospedeiro, ou seja, da célula viva, de onde extraem os nutrientes essenciais a suas atividades vitais, apresentando assim menor número de oportunidades ou mecanismos para sobrevivência do que os necrotróficos. Sendo assim, a natureza biotrófica de *P. pachyrhizi* dificulta sua manipulação *in vitro* e para fins de pesquisa, a manutenção e multiplicação do patógeno são realizadas por meio de sucessivas inoculações em plantas de soja, ou ainda, em folhas destacadas mantidas em placa de petri contendo meio ágar-água (REIS et al., 2006; ZAMBOLIM, 2006; VOEGLE et al., 2009; TWEZEYIMANA et al., 2010).

O patógeno foi descrito pela primeira vez no Japão, em 1902 (HENNING, 1903), sendo que em 1914 já havia se disseminado para diversos países do sudeste da Ásia. No continente americano foi reportada pela primeira vez no ano 1976 em Porto Rico (VAKILI; BROMFIELD, 1976). No continente africano foi registrada pela primeira vez em Togo em 1980 (MAWUENA, 1982). Em 2001, foi encontrada na África do Sul e na Nigéria (AKINSANMI et al., 2001). O primeiro registro no Brasil ocorreu em 2001, no estado do Paraná, logo após ter sido identificado no Paraguai (YORINORI et al., 2004). Atualmente a doença está presente em todas as principais regiões onde a soja é cultivada (SCHNEIDER et al., 2005).

A importância da FAS pode ser avaliada pela sua rápida expansão nas regiões produtoras de soja no Brasil, por seus danos e pelo montante de perdas que tem provocado. Na safra 2014/15 foi identificada em três estados brasileiros: Paraná, São Paulo e Mato Grosso (YORINORI et al., 2005; EMBRAPA 2014). Na safra 2015/2016 a FAS já foi identificada em nove estados brasileiros: Paraná, São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Santa Catarina, Minas Gerais, Tocantins e Rio Grande do Sul (Tabela 1) (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM 2016).

Tabela 1. Focos da FAS no Brasil na safra 2015/2016.

Ferrugem em números no Brasil – Safra 2015/2016									
UF	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Total
GO								13	13
MG					1		1	1	3
MS						3	10	16	29
MT				2		3		2	7
PR				13		20	81	7	121
RS		4	9	6	9	3	29	49	109
SC			1			3	1		5
SP				2	1	8	2		13
TO		1							1
Total	0	5	10	23	11	40	124	88	301

(Fonte: Consórcio Antiferrugem, 2016).

Em condições ambientais favoráveis, a doença pode causar perdas que variam de 10% a 80% (EMBRAPA 2004). As estratégias de manejo recomendadas no Brasil para a FAS incluem: a utilização de cultivares de ciclo precoce e semeaduras no início da época recomendada, a eliminação de plantas de soja voluntárias e a ausência de cultivo de soja na entressafra por meio do vazio sanitário, o monitoramento da lavoura desde o início do desenvolvimento da cultura, a utilização de fungicidas no aparecimento dos sintomas ou preventivamente e a utilização de cultivares resistentes, quando disponíveis (EMBRAPA, 2011).

No Brasil na safra 2011/12 foram disponibilizadas a classe produtora, cinco variedades de soja resistentes ao fungo *P. pachyrhizi* pela empresa Tropical Melhoramento e Genética por meio da Tecnologia Inox, das quais duas cultivares são convencionais (TMG 801 e TMG 803), e duas são transgênicas (TMG 7161RR, TMG 7188RR). Uma terceira variedade resistente convencional (BRSGO 7560) foi obtida mediante parceria entre a Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (Embrapa Soja) Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Seagro) do estado de Goiás e com o Centro Tecnológico para Pesquisas Agropecuária (CTPA) (FREITAS, 2011). Porém, essas variedades não possuem resistência ampla ao patógeno sendo o uso de fungicidas necessário embora o número de aplicações seja bem menor, diminuindo assim os custos de produção.

O principal dano ocasionado pela ferrugem asiática da soja é a desfolha precoce da planta, que impede a completa formação dos grãos, com consequente redução da produtividade. O custo da ferrugem envolve as aplicações de fungicidas e as perdas pela doença, cerca de US\$ 2 bilhões são gastos por ano (EMBRAPA, 2014).

2.2.1. Ciclo biológico do fungo *P. pachyrhizi*

O ciclo de vida do patógeno inicia-se quando uredósporos, disseminados pelo vento, água ou outras fontes de dispersão atingem as folhas de soja na face superior ou inferior. Os uredósporos são ovóides a elípticos, de coloração

hialina a castanho-amarelado (BROMFIELD, 1984) e possuem a capacidade de germinar entre temperaturas de 7 a 28°C na ausência do hospedeiro (MARCHETTI, et al. 1976)

Para que ocorra a germinação dos uredósporos, o fungo precisa de molhamento (água livre ou orvalho) e temperatura favorável. Marchetti et al. (1976) observaram que a melhor temperatura para o desenvolvimento do fungo está entre 15 e 25°C. No mínimo seis horas de molhamento foliar parecem ser necessárias para promover a infecção, sendo que taxas de infecções máximas ocorrem entre 10 a 12 h de molhamento. Com as condições adequadas ocorrerá o desenvolvimento do tubo germinativo, a partir do qual, surgirá o apressório que dará origem às hifas e culminará na formação do haustório, estabelecendo assim a relação patógeno-hospedeiro. (Figura 2).

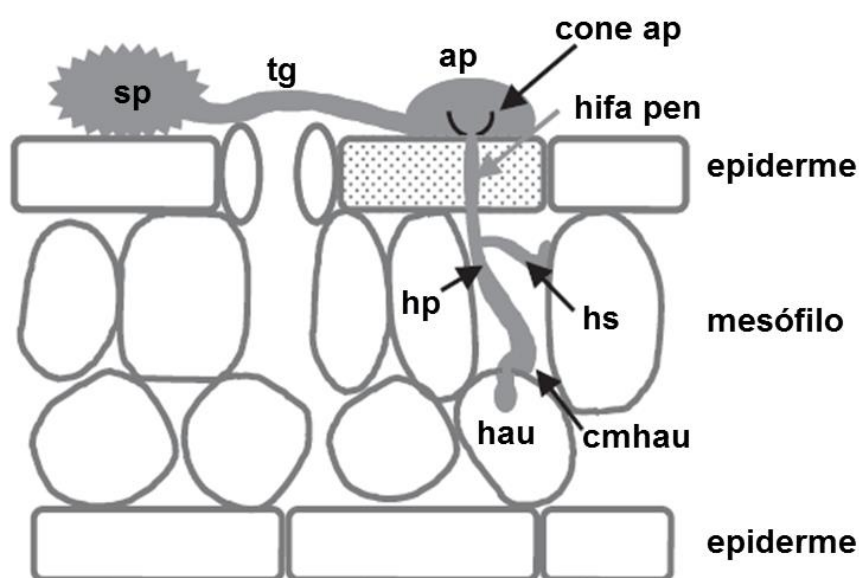


Figura 2 - Desenvolvimento de *P. pachyrhizi* durante interação patógeno e planta hospedeira. Os uredósporos (sp) germinam dando origem ao tubo germinativo (tg) que desenvolve um apressório (ap). No seu interior ocorre a formação do cone apressorial (cone ap) seguido pelo desenvolvimento da hifa de penetração (hifa pen). A hifa de penetração alcança o espaço intercelular dando origem a hifa primária (hp) a qual se ramifica em hifas secundárias (hs). A célula mãe do haustório (cmhau) origina o primeiro haustório que invade a célula do mesófilo estabelecendo a interação com o hospedeiro. Adaptado de Goellner et al. (2010).

A ação da doença sobre uma lavoura de soja está relacionada com o desenvolvimento das urédias, que após certo tempo liberam uredósporos, através de um poro central localizado na elevação do tecido epidérmico (REIS

e BRESOLIN, 2004). Os uredósporos são facilmente disseminados através do vento, na mesma planta, para lavouras próximas ou a longas distâncias. Vários ciclos de esporulação podem ocorrer em uma planta suscetível a FAS.

2.2.2. Sintomatologia

A ferrugem asiática pode surgir em qualquer momento do ciclo fenológico da cultura, porém tem surgido de forma mais frequente em plantas próximas ou em plena floração (AZEVEDO et al., 2007).

Os sintomas iniciam-se nas folhas inferiores da planta e se caracterizam por pontos minúsculos (1 a 2 mm) mais escuros que o tecido sadio, apresentando saliências na face adaxial das folhas. Com o desenvolvimento da doença, as lesões tendem a apresentar um formato angular e podem atingir 2 a 5 mm de diâmetro, podendo aparecer em pecíolos, vagens e caules, porém, são mais comuns na superfície foliar, onde podem ocupar extensas áreas (SINCLAIR e HARTMAN, 1999).

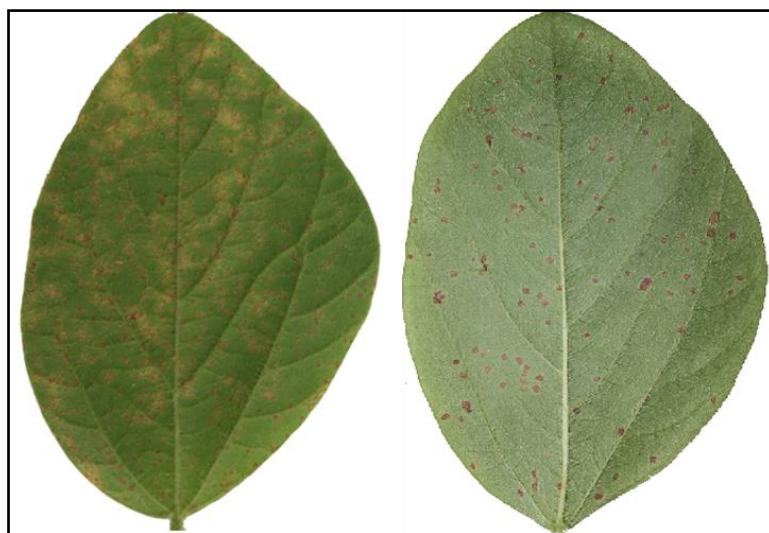


Figura 3 - Sintomas na face abaxial de folhas de soja infectadas pelo fungo *P. pachyrhizi*. A esquerda lesões castanho-claro (TAN) que caracterizam a suscetibilidade, e a direita lesões RB castanho-avermelhada associadas a resistência. Fonte: Luana Mieke Darben, 2012.

A infecção pelo fungo *P. pachyrhizi* causa rápida clorose e queda prematura das folhas, comprometendo a plena formação dos grãos. Quanto mais cedo ocorrer a desfolha, menor será o tamanho dos grãos e, acarretando a diminuição do rendimento e na qualidade. Dependendo da severidade da infestação, em alguns casos, quando a doença atinge a fase de formação das vagens ou no início da granação, pode causar o aborto e queda das vagens (HENNING e GODOY, 2006).

Três tipos de reações são associadas a interação planta-patógeno sendo: resposta imune (IR), sem lesões visíveis; reação de resistência ou resistência incompleta que apresentam lesões marrom-avermelhadas (reação tipo RB, reddish-brown) caracterizadas pela formação de urédias com nenhum ou poucos esporos; e lesões amareladas (reação tipo TAN), característica de genótipos suscetíveis e apresentam mais urédias e maior nível de esporulação que lesões RB (MILES et al., 2011).

Porém, autores sugerem que o tipo de reação deve ser quantitativamente mensurado, por meio da determinação do número e tamanho das urédias e que a análise quantitativa pode detectar a resistência conferida por genes dominantes e também a resistência parcial à ferrugem asiática da soja (HARTMAN et al., 2005; MILES et al., 2011). Yamanaka et al. (2010) sugerem que critérios como: frequência de lesões com urédias, número de urédias por lesão, frequência de urédias abertas e o nível de esporulação podem ser úteis para distinguir resistência de suscetibilidade na interação soja-*P. pachyrhizi*.

O locus de resistência *Rpp1* foi identificado em uma introdução de planta (PI) 200492, conferindo uma resposta imune ao isolado monospórico Q-1 proveniente da Austrália. O *Rpp2* foi caracterizado na PI 230970, o gene *Rpp3* na PI462313 e o *Rpp4* identificado na PI 459025. O quinto gene controlando a resistência a *P. pachyrhizi*, *Rpp5*, foi identificado no Brasil, utilizando-se uma coleção de esporos do patógeno, e caracterizou-se como um alelo recessivo na PI200456 e dominante nos acessos PI200487, PI200526 e PI471904 (GARCIA et al., 2008; HARTMAN et al., 2011). Recentemente, Li et al. (2012) propuseram que a resistência apresentada pela PI567102B aos isolados

MS06-1 e LA04-1, coletados respectivamente em Mississippi e Luisiana, era conferida pelo *loci Rpp6*. No entanto, os locus são considerados raça-específicos e conferem resistência a um conjunto limitado de isolados do patógeno (LI, 2009; YAMANAKA et al., 2011)

Juntas, as análises genéticas e moleculares sugerem que vários alelos ou genes estreitamente ligados governam a resistência a ferrugem da soja (GARCIA et al., 2008). McLean e Byth, em 1976, divulgaram a primeira evidência de raças fisiológicas de *P. pachyrhizi* em genótipos de soja na Austrália. A raça 1 mostrou-se virulenta na cultivar Williams e avirulenta no acesso PI200492, por outro lado a raça 2 foi virulenta para ambos os genótipos (HARTMAN et al., 2005).

No Brasil, em 2001, quando a ferrugem asiática da soja foi observada pela primeira vez no país, todos os quatro *loci* de resistência conhecidos (*Rpp1-Rpp4*) eram eficazes contra a doença. No entanto, no ano seguinte, somente genótipos que apresentavam os *locus Rpp2* e *Rpp4* foram resistentes. A quebra da resistência dos *locus Rpp1* e *Rpp3* evidência uma mudança na estrutura de raças de *P. pachyrhizi* (YORINORI et al., 2005; YORINORI, 2008). Análises mais recentes de duas populações do fungo *P. pachyrhizi* provenientes do Brasil (BRP-1 e BRP-2) mostraram que somente a PI459025 (*Rpp4*) e a cultivar Shiranui (*Rpp5*) foram resistentes às duas populações brasileiras, indicando que apenas dois dos cinco loci principais, quando utilizados separadamente, sem piramidação, poderiam ainda servir como fonte de resistência às populações de *P. pachyrhizi* do Brasil atualmente (YAMANAKA et al., 2010). Ainda, a piramidação de genes de resistência pode vir a influenciar na determinação de resistência mesmo para *locus* que separadamente desempenham resposta de suscetibilidade (YAMANAKA et al., 2013).

Os fatos supracitados demonstram a alta capacidade do fungo *P. pachyrhizi* em quebrar resistências qualitativas, por isso, a melhor estratégia de manejo da doença é o uso de variedades com mais de uma fonte de resistência (piramidação de genes), aliada a outras estratégias de controle, visando aumentar a longevidade das variedades resistentes (UNFRIED et al.,

2010). Por isso, tem sido difícil encontrar genótipos resistentes às ferrugens, pois os poucos materiais catalogados como resistentes, tem resistência vertical ou monogênica, carecendo de resistência horizontal ou poligênica, devido à variabilidade das ferrugens (VAN DER PLANK, 1968)

O estudo da diversidade genética de isolados de FAS ainda é inicial. No Brasil, isolados da ferrugem da soja foram inicialmente produzidos a partir de coletas de uma única urédia (monouredinial) a partir de 2012, sendo sua diversidade patogênica e molecular inicialmente investigada pelo uso de regiões ITS (DARBEN, 2012). O conhecimento do espectro de virulência e variabilidade do patógeno é fundamental para que programas de melhoramento genético possam realizar um planejamento, priorizando a obtenção de cultivares que apresentem uma ampla resistência aos isolados de determinada região, por exemplo, pela piramidação de genes (PAUL e HARTMAN, 2009).

2.2.3. Variabilidade genética do fungo *P. pachyrhizi*

A diversidade genética expressa a diferença entre diversidade e frequências alélicas nas populações. O seu estudo tem importância fundamental na escolha de cultivares a serem utilizadas como genitores (FALCONER, 1981) bem como no material do patógeno a ser utilizado no desafio das progênes.

O conhecimento da variabilidade genética existente no patógeno é essencial para que os programas de melhoramento genético possam realizar seu planejamento estratégico, uma vez que a chance de quebra de resistência, em variedades desenvolvidas contendo apenas um gene de resistência vertical, é maior na medida em que a variabilidade do patógeno aumenta (TSCHURTSCHENTHALER et al., 2012).

A variabilidade apresentada pelas populações de *P. pachyrhizi* tem sido identificada ao longo dos anos em vários estudos, sugerindo que este patógeno possui múltiplos genes de vir/avr (FREIRE, 2007). Mecanismos como a mutação, recombinação sexual, parassexualidade, heterocariose, herança citoplasmática e a ação de transposons são importantes na geração de

variabilidade em fungos fitopatogênicos e influenciam, no potencial de adaptação desses organismos aos genes de resistência do hospedeiro (CASELA, 2005). No entanto, para o fungo *P. pachyrhizi* a reprodução sexual nunca foi descrita (RUPE; SCONYERS 2008).

Akamatsu et al., (2013) analisaram fenotipicamente 59 populações do fungo da ferrugem asiática da soja, coletadas em diferentes safras (2007/2008-2009/20010) no Brasil, Argentina e Paraguai. O estudo mostrou uma variação patogênica substancial entre as populações avaliadas. Dentre todas as populações, somente duas do Paraguai, mostraram um perfil de patogenicidade idênticos. A patogenicidade das populações de *P. pachyrhizi* com a mesma origem geográfica variou entre as três safras e foi detectada dentro de cada país bem como entre os países. Na América do Sul, não existiu correlação entre a patogenicidade apresentada pelo fungo *P. pachyrhizi* com a origem geográfica das populações

2.3. Ferramentas moleculares no estudo da diversidade genética de fitopatógenos

As técnicas moleculares baseadas na análise de fragmentos de DNA possibilitam a rápida detecção de marcadores moleculares no estudo de aspectos básicos de genética, bem como em programas de melhoramento genético, quer para caracteres qualitativos, quer quantitativos, enquanto os marcadores morfológicos variam conforme as condições ambientais, apresentando limitações quanto ao seu uso eficiente. Sendo assim, nos últimos anos têm aumentado a aplicação de marcadores moleculares na detecção da variabilidade genética (EMBRAPA, 2000). Ainda, a ausência de conhecimento sobre o genoma e os genes de avirulência do *P. pachyrhizi* tornam o uso de marcadores moleculares uma importante estratégia na avaliação da diversidade.

Diversas técnicas estão disponíveis para verificar a variabilidade em sequências de DNA e têm sido aplicadas nas análises de genes específicos, para gerar mapas genéticos e auxiliar no desenvolvimento de tecnologias de transferência de genes (MONDINI et al., 2009). Para o estudo de fungos, as

técnicas mais utilizadas são: ITS (Internal transcribed spacer), RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) (WHITE et al., 1990; STRINGARI, 2009; SHIMOMOTO et al., 2011).

2.3.1. ITS (Internal transcribed spacer)

As regiões ITS do DNA ribossomal são relativamente curtas (500 a 800pb), flanqueadas por segmentos conservados e aparecerem repetidamente no genoma, o que facilita sua amplificação e sequenciamento. Essas regiões evoluem rapidamente, sendo assim, são apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie. (FUNGARO, 2000). A diversidade genética de 15 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* coletados em diferentes locais no Estado de Pernambuco e no Amazonas foi avaliada por meio de marcadores RAPD e pela análise da sequência da região ITS. Sete iniciadores de sequências arbitrárias foram utilizados gerando bandas polimórficas que permitiram a separação dos isolados de *C. gloeosporioides* em três grupos distintos. Já a amplificação dos produtos das regiões ITS1 e ITS4 também mostrou polimorfismo quando digeridos com as enzimas de restrição *HaeIII* e *MspI*. Estes dois tipos de marcadores moleculares foram capazes de diferenciar isolados de *C. gloeosporioides* coletados no Estado do Amazonas dos coletados em Pernambuco. No entanto, não houve uma relação entre os grupos de isolados baseados nos marcadores moleculares com o grau de patogenicidade dos isolados testados (VILA NOVA et al., 2011).

Darben et al 2012, analisaram a variabilidade genética e fenotípica de 27 isolados monouredinias de *P. pachyrhizi* oriundos de populações do fungo coletados no Brasil através de análises das sequências das regiões ITS1 e ITS2. Os resultados mostraram a formação de 16 haplótipos diferentes para ITS1 e 8 para a ITS2, concluindo assim que as análises dessas regiões foram eficientes na diferenciação intraespecífica de isolados de *P. pachyrhizi*. Os critérios utilizados para análise fenotípica dos seis isolados monouredinais de *P. pachyrhizi* permitiram diferenciar cada isolado como um patótipo/raça

diferente, indicando a diversidade de padrões de virulência existentes nos campos de soja do Brasil.

Em outro estudo, Freire et al. (2008) analisaram 133 sequências da região ITS1 e da região ITS2 de *P. pachyrhizi*, coletadas a partir de folhas infectadas com fungo em 26 campos de soja no Brasil e em um campo na África do Sul durante a safra 2005/2006. Pode-se observar que o comprimento da região ITS1 variou de 251-252pb e da região ITS2 variou de 229-240pb. Com relação ao número de haplótipos identificados foi identificada existência de 27 haplótipos distintos definidos por 24 substituições de base e quatro indels de uma base para a região ITS1 e 19 haplótipos, que consistiam de 10 substituições de bases e sete *indels*, para a região ITS2.

2.3.2. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Os marcadores RAPD, podem gerar grande quantidade de polimorfismo de fragmentos de DNA, espalhados por todo o genoma usando *primers* escolhidos ao acaso, ao contrário dos RFLPs e daqueles obtidos com PCR, são baseados na amplificação do DNA, não requerendo conhecimento na sequência do DNA-alvo, nem a seleção cuidadosa de sondas. A grande vantagem da técnica de marcadores RAPD está na sua capacidade de detectar polimorfismo de modo simples e rápido permitindo assim, que possam ser usados como fingerprinting, distinguindo divergências mínimas entre espécies ou clones ou dentro destes (EMBRAPA, 2000).

Marcadores do tipo RAPD foram utilizados na análise genética de 20 isolados de *Fusarium graminearum* obtidos em diferentes locais do Rio Grande do Sul, 174 perfis foram amplificados, e desses 102 foram polimórficos (58,62%). Com os resultados moleculares obtidos foi possível diferenciar os 20 isolados de *Fusarium* em dois grupos distintos com similaridade superior a 76%. Essa variação genotípica revelada em isolados de *Fusarium* é um indicativo da habilidade de adaptação do fungo a diferentes condições no seu ciclo de vida, condicionado pelas variações do clima e pelas práticas culturais adotadas pelos agricultores. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que

o polimorfismo produzido pelos marcadores RAPD pode ser empregado na identificação genótipos de *F. graminearum*, bem como para acessar a variação genética dentro de coleções e populações (BRANCÃO et al., 2008).

Mann et al. (2002) testaram marcadores bioquímicos e moleculares de DNA/RAPD, visando a identificação e diferenciação do complexo *Colletotrichum*. Foram usados dez isolados, sendo três classificados como causadores de antracnose e sete de ramulose, pelo teste de patogenicidade. No entanto, os marcadores bioquímicos não se mostraram eficientes para a distinção dos isolados causadores da ramulose e da antracnose. Na análise de RAPD, por outro lado, os marcadores foram eficientes na diferenciação dos dois grupos de fungos que apresentaram similaridade de apenas 51,7%, confirmando a potencialidade da técnica para diferenciar tais fungos.

Faleiro et al. (2004) analisaram a diversidade genética entre 22 isolados das três principais espécies do gênero *Phytophthora spp.* causadoras da podridão-parda do cacaueiro (*Theobroma cacao*) no Brasil, utilizando sete *primers* de marcadores moleculares RAPD. As distâncias genéticas e análises de agrupamento realizadas permitiram uma diferenciação clara dos isolados de cada espécie e mostraram diferentes níveis de diversidade intra-específica. Os resultados evidenciaram o potencial dos marcadores RAPD como uma ferramenta auxiliar na classificação dos isolados e, também, em estudos de diversidade genética intra-específica

2.3.3. SSR (Simple Sequence Repeats ou Microssatélites)

São marcadores mais polimórficos que os RAPD, constituídos por um a seis nucleotídeos que se repetem de forma justaposta, ou seja, uma após a outra. As sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites geralmente são conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo a amplificação do DNA repetitivo via PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando oligonucleotídeos específicos. Geralmente, os microssatélites identificam um único loco no genoma e, por sua alta taxa de mutação, são freqüentemente multialélicos, além de segregarem de modo co-dominante.

Esses marcadores necessitam da construção de biblioteca genômica enriquecida para seqüências microssatélites, sequenciamento desses clones e desenho dos *primers* (CAIXETA et al. 2009; EMBRAPA, 2000).

Anderson et al, (2008) utilizando ferramentas de bio-informática identificaram *loci* SSR utilizando informações disponíveis no GenBank para *P. pachyrhizi*, 24 *loci* identificados foram selecionados para posterior caracterização. Os *primers* foram desenhados e inicialmente avaliados usando DNA genômico obtidos a partir de um único isolado de *P. pachyrhizi* como molde. Dos 24 *loci* SSR 22 foram eficientes e utilizados em diferentes estudos. Tschurtschenthaler et al. (2012) analisaram a variabilidade genética de dez populações de *Phakopsora pachyrhizi* coletadas em diferentes regiões do Brasil, utilizando 17 pares de iniciadores microssatélites descritos por Anderson et al. 2008 para análise da variabilidade genética entre essas populações, 16 amplificaram (94,11%) e apenas 7 (43,75%) foram polimórficos.

Bux et al. (2012) analisaram 55 isolados (46 do Paquistão e 9 dos EUA) de Puccinia striiformis f.sp. tritici, agente causal da ferrugem do colmo em trigo, quanto a variação genética, por meio de 10 marcadores microssatélites e um marcador STS (Sítios Marcados por Sequências). Com base nos resultados obtidos, concluíram que a diversidade molecular não estava fortemente relacionada com a virulência dos isolados.

2.3.4. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Marcadores AFLP encontram-se distribuídos por todo o genoma de procariotos e eucariotos. Esta técnica consiste primeiramente na clivagem do DNA genômico do indivíduo usando duas enzimas de restrição, seguida do emprego de adaptadores específicos, que são ligados aos terminais dos fragmentos de DNA que foram clivados. Após, são feitas as amplificações via PCR dos fragmentos do DNA. Apesar de ser um marcador dominante, são capazes de analisar o maior número de locos em um único gel (EMBRAPA, 2000)

Buttow et al. (2010) usando marcador molecular AFLP, caracterizaram 46 indivíduos de *Butia capitata*. As bandas polimórficas amplificadas pelas

quatro combinações de primers geraram um total de 214 fragmentos e, destes, 199 (93,5%) foram polimórficos, as análises mostraram que a variação genética entre as regiões não foi significativa, indicando que não ocorre subdivisão de populações em função da região geográfica. Os marcadores AFLP foram eficientes para caracterizar a variabilidade genética em populações de *Butia capitata*.

Rocha et al. (2015) analisaram 23 amostras de *P. pachyrhizi* coletadas em diferentes países (Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai) utilizando marcadores AFLP. Foram utilizadas 34 combinações de *primers*, as quais geraram 1919 marcas, sendo que 77% apresentava polimorfismo e revelaram uma alta diversidade genética. O que é surpreendente para uma espécie que parece ser mantida apenas assexuadamente. A maior diversidade genética foi encontrada no Paraguai em 2009, enquanto a menor foi detectada no Uruguai, no mesmo ano.

Naruzawa et al. (2011) ao estudar a variabilidade genética entre isolados de *P. xanthii* com três marcadores molecular AFLP, verificaram alta variabilidade entre isolados, com similaridade genética máxima de 69% e similaridade mínima de 23%. Mostrando que os isolados tem composição genética heterogênea.

3. JUSTIFICATIVA

A ferrugem asiática da soja possui alto potencial destrutivo das lavouras, causando grandes perdas de produtividade, aumento nos custos de produção com consequente diminuição do lucro.

O conhecimento da variabilidade genética existente nas populações e isolados de *P. pachyrhizi*, são necessários, para que os programas de melhoramento genético possam ser realizados, considerando a seleção de inóculos como parte do planejamento estratégico, para que os genótipos amplamente resistentes possam ser selecionados, aumentando assim a probabilidade de desenvolvimento de uma cultivar com tolerância completa ao patógeno.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos gerais

Analisar a diversidade genética de seis isolados monouredinais e de uma população de *P. pachyrhizi* oriundos de diversas regiões do Brasil

4.2. Objetivos específicos

Acessar a variabilidade genética de seis isolados monouredinais e de uma população de *P. pachyrhizi* utilizando marcadores moleculares AFLP.

Acessar a variabilidade genética de seis isolados monouredinais e de uma população de *P. pachyrhizi* utilizando marcadores moleculares SSR.



5. ARTIGO

5.1. INTRODUÇÃO

A ferrugem asiática da soja [*Glycine max* (L.) Merr.], (FAS), causada pelo fungo biotrófico obrigatório *Phakopsora pachyrhizi* (Syd. & Syd) é uma das doenças mais severas que ameaçam a cultura no Brasil. A FAS foi observada pela primeira vez no Brasil na safra de 2001/02 afetando 60% das áreas de plantio (YORINORI, 2008). A expansão do fungo no Brasil está associada ao clima favorável e à extensão da cultura da soja. Diferentemente dos Estados Unidos, onde a neve quebra o ciclo de pragas no inverno, o clima não tem grande oscilação no Brasil, e o fungo sobrevive em hospedeiros de uma para outra temporada (SANTOS et al. 2015).

As plantas de soja são suscetíveis ao fungo em todos os estádios de desenvolvimento, e as perdas podem ser de até 80% (HARTMAN et al., 1991; KAWUKI et al., 2003; YORINORI, 2006). Para o controle da FAS, os pesquisadores sugerem que o produtor associe práticas de manejo da cultura e de combate ao fungo. Entre elas estão a obediência ao vazio sanitário, a época de plantio, optar por variedades tolerantes ao fungo, monitorar a lavoura e, por fim, diante do problema, utilizar os fungicidas registrados, se possível com rotação do ingrediente ativo (SANTOS et al. 2015). Entretanto, o uso de cultivares resistentes seria o método mais eficiente para o controle da doença a longo prazo, além de ser o mais adequado para a conservação ambiental. Contudo, até o momento, não estão disponíveis cultivares com resistência completa ao patógeno (HARTMAN et al., 2005). Os programas de melhoramento tem focado na piramidação dos *loci* de resistência a FAS *Rpp1* – *Rpp6* (CHENG e CHAN, 1968; HIDAYAT e SOMAATMADJA, 1977; MCLEAN e BYTH, 1980; HARTWIG e BROMFIELD, 1982; HIDAYAT e SOMAATMADJA, 1977; SINGH e THAPLIYAL 1977; BROMFIELD e HARTWIG, 1980; HARTWIG, 1986; GARCIA et al., 2008 e LI et al., 2012) mas a resistência ampla a doença ainda não foi alcançada. Paralelamente, os estudos que visam a obtenção de isolados do patógeno, bem como, a caracterização de sua

variabilidade genética tem como foco a identificação de fontes eficientes para maximizar a virulência e agressividade do fungo usado como inóculo, ampliando a possibilidade de seleção dos genótipos mais amplamente resistentes. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética de uma população e de isolados monouredinais do fungo *Phakopsora pachyrhizi* produzidos a partir de diferentes regiões produtoras de soja no Brasil, por meio de marcadores moleculares AFLP e SSR. As análises com os marcadores moleculares AFLP revelaram uma alta diversidade genética entre os isolados e a população, enquanto os marcadores SSR não apresentaram polimorfismo. Futuramente análises fenotípicas serão realizadas com base nos resultados moleculares, afim de, relacionar a patogenicidade desses isolados com as análises genéticas.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Material Biológico

Esporos dos seis isolados monouredinais e da população do fungo *P. pachyrhizi* (Darben, 2012) usados no presente trabalho (Tabela 2) foram cedidos pela Embrapa Soja bem como as sementes da variedade de soja suscetível a FAS, BRS154. As sementes foram plantadas em vasos de 5L contendo solo previamente preparado. Em cada vaso foram semeadas cinco sementes para a germinação e desenvolvimento das plantas as quais foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas manualmente quando necessário.

Tabela 2 – Identificação, áreas e período de coleta dos esporos de *P. pachyrhizi* que deram origem aos isolados monouredinais.

ISOLADOS	Localização	Data de coleta
LPF0411	Passo Fundo- RS	2007-2010
LCA4A12	Conceição das Alagoas- MG	17/02/2012
LLRV212	Lucas do Rio Verde-MT	12/03/2012
LLRV312	Lucas do Rio Verde-MT	12/03/2012
LGO112	Goiânia-GO	05/04/2012
LCV112	Campo Verde-MT	2007-2008
POPULAÇÃO	Londrina-PR	12/03/2014

Os isolados monouredinais foram multiplicados a fim de se obter quantidade suficiente de esporos para extração de DNA. Para tanto, folhas sadias do genótipo suscetível BRS154 foram destacadas, lavadas e transferidas individualmente, com a face abaxial voltada para cima, para placas de petri contendo meio ágar-água 1%. Os esporos foram transferidos com uma alça de platina, para as folhas, várias vezes, com o objetivo de gerar o maior número possível de lesões a partir das quais novos inóculos fossem obtidos. As folhas inoculadas foram mantidos em câmara de crescimento, ficando no escuro nas primeiras 12 horas para facilitar a infecção pelo fungo e posteriormente em fotoperíodo de 16/8 horas e temperatura de aproximadamente 24°C. Após 15 dias, os novos esporos foram diretamente repassados para novas folhas sadias dando continuidade a multiplicação. A cada ciclo de multiplicação, parte dos esporos produzidos eram coletados com o auxílio de um pincel, colocados em microtubos e armazenados no freezer a -80 até que a quantidade de 1,2mg fosse atingida para a extração de DNA genômico.

5.2.3 Reações de AFLP e SSR

Para extração do DNA genômico, uma suspensão de esporos contendo 1000µL de água e 1,2mg de cada isolado puro e da população, foi incubada em microtubos de 1,5mL, por aproximadamente 16 horas a 21°C, no escuro para permitir a germinação dos esporos e multiplicação celular. Após esse período, as amostras foram centrifugados por cinco minutos a 12.000rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi utilizado para a extração do DNA seguindo protocolo descrito por Dellaporta et al. (1983), com modificações. Ao precipitado foi adicionado Terra Diatomácea (Celite 545) para facilitar o processo de maceração dos esporos, podendo assim iniciar o processo de extração. As amostras de DNA total obtidas foram incubadas a 37°C por pelo menos 30 minutos em 30µL de tampão TE (1M Tris HCl; 0,5M EDTA) acrescido de RNase A (40µg/mL) e então armazenadas em freezer - 20°C. A quantidade e integridade do DNA foram avaliadas em espectrofotômetro Genova-Jenway e gel de agarose 0,8%. Com esse protocolo foi obtida uma concentração média de 500ng/µL de DNA.

As reações de AFLP foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Vos et al. (1995) e modificado por Reck et al. (2011), utilizando 700ng/µL de DNA. Foram testadas quinze combinações de *primers* e as enzimas de restrição *EcoRI/MseI*. Dessas, sete combinações de *primers* geraram polimorfismo satisfatório para as análises de variabilidade genética. As sequencias dos *primers* seletivos aplicados foram: (P1) *EcoRI* +AAG / *MseI* +GT; (P2) *EcoRI* +AAG / *MseI* +CAA; (P3) *EcoRI* +AA / *MseI* +GT ; (P4) *EcoRI* +AA / *MseI* +TT; (P5) *EcoRI* +AA / *MseI* +CAA; (P6) *EcoRI* +AAG / *MseI* +CA; e (P7) *EcoRI* +AAG / *MseI* +GC.

Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% (29:1 acrilamida: bis-acrilamida) durante 5h30 a 200V e corado com nitrato de prata 20%. Somente as bandas que apresentaram constância e nitidez nos géis foram utilizadas na construção da matriz binária de dados. O programa computacional TFPGA 1.3 (MILLER, 1997) foi utilizado para as análises ao qual se emprega a correção de frequências alélicas para

marcadores dominantes (LYNCH e MILLIGAN, 1994). Com ele, foi calculada a distância e a identidade genética de Nei (1978), a heterozigose média e a proporção de locos polimórficos (P) com 95% de probabilidade. A análise de agrupamento das amostras foi realizada pelo método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages), que considera a média dos valores de distância, utilizando o coeficiente de Nei (1978). O teste de Mantel foi realizado para análise da correlação da distância genética e geográfica entre as amostras utilizadas.

Os *primers* de microssatélite desenvolvidos por Anderson et al. (2008), foram amplificados utilizando 4,5µL do mix GoTaq® Green Master Mix 2x, quantidade de *primer* variando de acordo com o indicado pelo autor, DNA na concentração de 75-150 ng/ µL e água. Foram realizados testes de temperaturas e de concentração de DNA (Tabela 3). A otimização desses *primers* foi necessária devido as dificuldades encontradas em amplifica-los seguindo a metodologia descrita pelo autor.

Tabela 3. Testes realizados com os *primers* SSR (ANDERSON et al., 2008)

<i>Locus</i>	Sequência do Primer (5'–3')	Testes de temperatura	Testes de DNA ng/µL
PP002	F: CCTCTGTCCCAAACATAAGC R: CTAGGTTCCAAGCTGTATTTTC	65°, 66° e 67°	75, 100 e 150
PP003	F: GGCTCAGTCAAAGCATCCTC R: ATCAATTCTGGCCTGGTGAG	63°, 64° e 65°	75 e 100
PP004	F: ACTGTTCGGTTCGGTTTCAG R: CTTGGTTAAATGCCAAGCTTG	65°, 66° e 67°	75 e 100
PP006	F: ACCCTGCCACTGGTAAGAGA R: TCCAAGACCCGTAGATGGTC	64°, 65° e 66°	75 e 100
PP007	F:GGTTGATGTTAAGATGGGTTGG R: CCTAGACTGTCAGGGTGAGAG	65°, 66°, 67° e 68°	75 e 100
PP008	F:GAACCTGTTCTGGGCTGCTTTAGG R: GTAGCTTCTAATCTCAGGCGTC	66°, 67° e 68°	75 e 100
PP009	F: GGA CTCTAGAACTGTGCACTAG R: GGTACTGTATGACCCTGCCTG	65°, 66°, 67° e 68°	75 e 100
PP010	F: CTGAGTGAAATCACGCTGAGA	65°, 66° e	75, 100

	R:GGCAGGTGATTTCGTAGAGTCTAC	67°	e 125
PP011	F: GACCCTTGTGACAGCTGATTG R: GAGTCAGCCTAAGCTCAGCCAC	65°, 66° e 67°	75 e 100
PP012	F: TGTAGCCACCTTGAATCAG R: GTTGCCAAAAAGTGGGGTGAG	63°, 64° e 65°	75 e 100
PP014	F: CAGCGATCAGGTTTCAGAAATC R: CCATCAGAGTTGTTGGCTCTC	65°, 66° e 67°	75, 100 e 125
PP015	F: CAACCACGTGCACAACTATTC R: CCACCTCCTTTGAATCCTCA	65°, 66° e 67°	75 e 100
PP016	F: CAGGAAGACTCCAGAACTGTGC R: CCAAGGACACTTCTAGTCCTTC	65°, 67°, 68° e 69	75 e 100
PP017	F: CGAGCCATTGCCCAAGTTTG R: CAGTTAGATGAGCCTGAGGAC	65°, 66°, 67° e 68°	75 e 100
PP018	F: GGTCTGATCTAACAGGATCCAG R: GTTGTTGGAATCGGGTAGAGG	65°, 66° e 67°	75 e 100
PP019	F: CCAAGTGCTGCAAATCAAGC R: GCTCTAACTAGAGCCCTTGTG	67°, 68° e 69	75 e 100
PP020	F:CTTGAACAGAGTCATTATTTCTC R:CACCCTCATGTGCTTCTTAATTC	67°, 68° e 69	75 e 100
PP021	F: CAACGGCAAAAGACCTAGGTAC R: GCGCAGCCCTAACTACAATAC	65°, 66° e 67°	75, 100 e 125
PP022	F: CAGCAGGTTAGTTCTGCACAGC R: TGGGTCATCAGAGCTTTCAG	67°, 68° e 69	75 e 100

As amplificações foram realizadas para cada *primer* em termociclador programado para etapa inicial de desnaturação a 95°C, por 30 segundos, seguida de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 64–69 °C por 30 segundos, 72 °C por 60 segundos e fase final de extensão a 72°C, por 10 min. Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% (29:1 acrilamida: bis-acrilamida) durante 6h a 120V e corado com nitrato de prata 20%.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os sete pares de *primers* de AFLP utilizados revelaram um total de 239 marcas das quais 196 foram polimórficas (82,01%).

A diversidade genética entre pares variou de 21,88%-77,98% (Nei), sendo a maior diversidade em pares encontrada entre o isolado LLRV212 (MT) e a população (PR). A maior similaridade encontrada foi de 80,35% entre os isolados LCA4A12 (MG) e LLRV212 (MT).

Resultados similares foram encontrados por Rocha et al. (2015). Os autores utilizaram 34 pares de iniciadores AFLP e analisaram 23 amostras de *P. pachyrhizi* coletadas em diferentes países (Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai) utilizando marcadores AFLP. Foram utilizadas 34 combinações de *primers*, as quais geraram 1919 marcas, sendo que 77% apresentava polimorfismo e revelaram uma alta diversidade genética. O que é surpreendente para uma espécie que parece ser mantida apenas assexuadamente. A maior diversidade genética encontrada foi no Paraguai e a menor no Uruguai, ambas no ano de 2009.

A elevada diversidade genética encontrada não era, a princípio, um resultado esperado uma vez que o fungo se reproduz de forma assexual (TWIZEYIMANA et al., 2011), entretanto, Freire et al. (2008), ao utilizar dados de sequências de regiões ITS, concluíram que há diferentes introduções do fungo *P. pachyrhizi* no Brasil, o que justificaria a variabilidade encontrada no patógeno. Ainda, é interessante notar que a maior similaridade entre isolados não foi observada entre aqueles produzidos a partir de uma mesma região agrícola (LLRV 212, LLRV312 E LCV112) o que pode ser melhor exemplificado pela ausência de correlação entre a distância genética e geográfica obtida 0,0506.

Bentes e Costa Neto (2011) analisaram a variabilidade genética de 20 isolados do fungo *Colletotrichum guaranicola* (Albuq.) provenientes de diferentes localidades produtoras de guaraná no Amazonas, utilizando dois nucleotídeos seletivos em três combinações diferentes de *primers* de marcadores moleculares AFLP, obtiveram 97 marcas polimórficas. O coeficiente de variação genética entre os isolados foi de 0,0216 e a similaridade genética entre todos os indivíduos foi de 94,95% indicando que os isolados pertencem à mesma espécie. A similaridade genética variou de acordo com a procedência dos isolados, demonstrando uma variação intra-específica, sendo que, isolados de mesma procedência foram distribuídos em diferentes grupos e subgrupos, evidenciando a variabilidade genética existente entre

isolados provenientes da mesma localidade. Levando em consideração que a antracnose é uma doença endêmica em áreas de cultivo de guaranazeiro no Amazonas, onde múltiplas infecções ocorrem constantemente, resultando em alta taxa de reprodução do patógeno, o que pode favorecer a ocorrência de variantes dentro da espécie.

Peres et al. (2003) estudaram 8 isolados de cada uma das três espécies (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Phoma caricae-papayae* e *Fusarium solani*) mais incidentes de fungos associados à podridão peduncular do mamão (*Carica papaya* L.), através de 8 primers de marcadores moleculares AFLP. As análises de AFLP geraram um total de 339 marcas polimórficas. O par de isolados mais divergente de *C. gloeosporioides* apresentou similaridade de 34%, sendo procedentes de uma mesma região, enquanto o par de isolados de *F. solani* mais divergente apresentou similaridade de 24%, sendo também de mesma procedência. O isolado mais divergente de *P. caricae-papayae* apresentou 36% de similaridade com os demais isolados, sendo de procedência distinta dos demais. Uma alta variabilidade genética foi encontrada entre isolados de *P. caricae-papayae* e *C. gloeosporioides*, e moderada variabilidade para isolados de *F. solani*. Assim como no presente trabalho, a variabilidade genética foi acessada por meio de marcadores AFLP e não houve correlação entre procedência dos isolados e similaridade genética entre os mesmos, inferindo-se que nem sempre isolados de mesma procedência são mais similares.

A análise de agrupamento dos isolados com base nas distâncias genéticas (Figura 4) mostrou a formação de três grupos, sendo que o Isolado LGO112 (GO) apresentou 30 marcas únicas e não se agrupou no cluster formado pelos demais. Em termos de seleção de inóculo, os dados moleculares indicaram esse material como um importante material a ser considerado para análise fenotípica de virulência e agressividade.

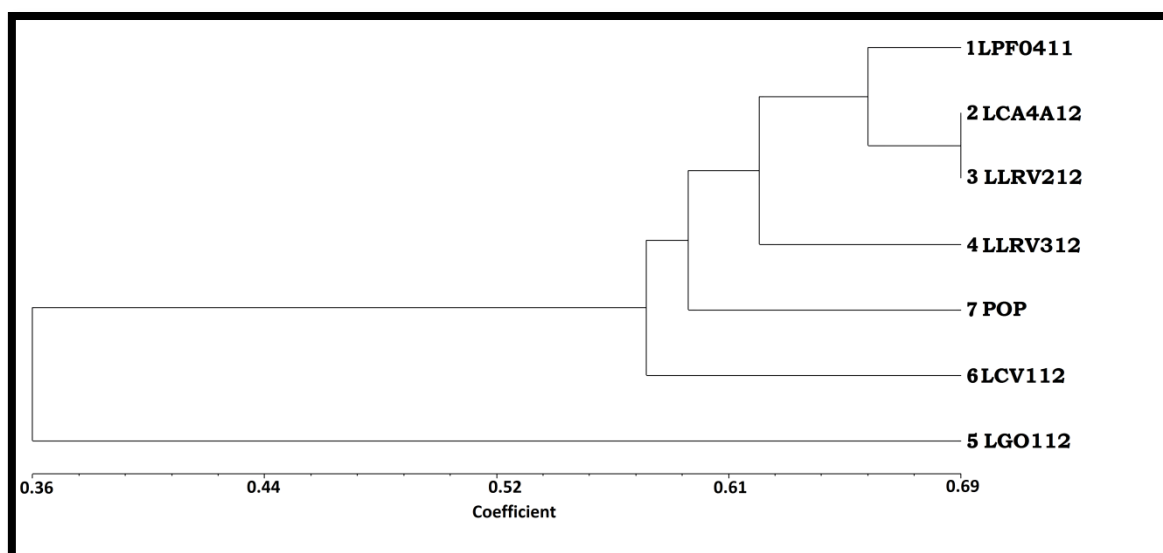


Figura 4. Agrupamento dos seis isolados monoureidiais testados e da população de *P. pachyrhizi*. Este dendograma foi gerado por meio do método UPMGA a partir da matriz binária construída para um total de 339 marcadores AFLP.

De outra forma, obteve-se sucesso na amplificação de apenas cinco dos 19 primers SSR desenvolvidos por Anderson et al. (2008) (Tabela 4). Em seu trabalho, os autores relatam o desenvolvimento de 22 primers SSR para *phakopsora* dos quais 19 foram polimórficos nas populações testadas, o que não corrobora com os resultados obtidos. No entanto, ressalta-se que os materiais testados pelos autores foram isolados a partir de 13 diferentes países e não de localidades próximas em um mesmo país.

Tabela 4. Condições ideais de amplificação para cinco dos *primers* SSR desenvolvidos por ANDERSON et al., (2008).

Locus	Sequência do Primer (5'–3')	Temperatura ideal	Quantidade de DNA ng/μL
PP007	F:GGTTGATGTTAAGATGGGTTGG R: CCTAGACTGTCAGGGTGAGAG	65°	75
PP008	F:GAACCTGTTCTGGGCTGCTTTAGG R: GTAGCTTCTAATCTCAGGCGTC	66°	75
PP016	F: CAGGAAGACTCCAGAACTGTGC R: CCAAGGACACTTCTAGTCCTTC	65°	75
PP017	F: CGAGCCATTGCCCAAGTTTG R: CAGTTAGATGAGCCTGAGGAC	65°	75
PP018	F: GGTCTGATCTAACAGGATCCAG R: GTTGTGGAATCGGGTAGAGG	65°	75

Os cinco *primers* amplificados, entretanto, não geraram polimorfismo. De forma semelhante, um baixo polimorfismo foi encontrado por Tschurtschenthaler et al.(2012) que analisaram a variabilidade genética de dez populações de *Phakopsora pachyrhizi* coletadas em diferentes regiões do Brasil. Dos 17 pares de iniciadores microssatélites utilizados para análise da variabilidade genética entre essas populações, 16 amplificaram (94,11%) e apenas 7 (43,75%) foram polimórficos.

Embora a quantidade de informação gerada a partir dos marcadores microssatélites no presente trabalho tenha sido restrita, é possível observar que não observou-se polimorfismo com esses marcadores enquanto o polimorfismo acessado por meio dos marcadores AFLP foi de 82% na mesma amostra. Possivelmente, a ausência de reprodução sexuada com permuta em *P. pachyrhizi* possa estar representando um fator importante na redução do polimorfismo microssatélite, ao passo que o polimorfismo AFLP possa ser menos influenciado pela ausência de permuta. Ainda, as diferentes regiões produtoras no Brasil, fazem parte da mesma cadeia produtiva, sendo esperado o intercâmbio de alelos. De forma geral pelos dados aqui revelados é possível sugerir que ao menos cinco dos sete materiais testados representem fontes de inóculos geneticamente distintas. Será agora fundamental observar se a variação molecular corresponde em algum grau a variação fenotípica observada na resposta de plantas diferenciadoras de soja diante dos diferentes materiais do fungo. Certamente o conhecimento da variação genética em materiais brasileiros de *P. pachyrhizi*, e de como essa variação está distribuída entre populações e isolados é um importante fator para a compreensão da biologia de populações desse fungo. Além disso, a associação desta informação a avaliação do espectro de virulência e agressividade desses materiais permitirá a seleção de fontes de inóculo valiosas aos programas de melhoramento da resistência a FAS na soja.

6. REFERÊNCIAS

- ANDERSON, S.J.; STONE, C.L.; POSADA-BUITRAGO, M.L.; BOORE, J.L.; NEELAM, B.A.; STEPHENS, R.M.; LUSTER, D.G.; FREDERICK, R.D.; PEDLEY, K.F. Development of simple sequence repeat markers for the soybean rust fungus, *Phakopsora pachyrhizi*. **Molecular Ecology Resources**, v.8, p.1310-1312, 2008.
- AKAMATSU, H.; YAMANAKA, N.; YAMAOKA, Y.; Soares, R.M.; MOREL, W.; IVANONICH, A.J.G.; BOGADO, A.N.; KATO, M.; YORINORI, J.T.; SUENAGA, K. Pathogenic diversity of soybean rust in Argentina, Brazil, and Paraguay. **Journal of General Plant Pathology**, 79:28-40, 2013.
- AKINSANMI, O. A.; LADIPO J. L.; OYEKAN P. O. First report of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Nigeria. **Plant Disease** 85(1):97, 2001
- ALZATE-MARIN, A L.; CERVIGNI, G. D. L.; MOREIRA, M. A; (2005) Markerassisted selection in the development of disease resistant plants, with emphasis on common bean and soybean. *Fitopatologia brasileira*. v.30, no.4, p.333-342.
- AZEVEDO, L.A.S.; JULIATTI, F.C.; BARRETO, M.. Resistência de genótipos de soja à *Phakopsora pachyrhizi*. **Summa phytopathologica**, 33:252-257, 2007.
- BENTES J. L. S.; COSTA NETO P. Q. Variabilidade genética de *Colletotrichum guaranicola* usando marcadores AFLP. **Acta Amazonica**, vol. 41(2), p. 251 – 256, 2011.
- BONETTI, L. P. Distribuição da soja no mundo. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. **A soja no Brasil**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, p. 1-6, 1977.
- BRANCÃO, M.F.; BIANCHI, V.J.; de FARIAS, C.R.J.; dos SANTOS, J.; ROSSETO, E.A. Caracterização genética de *Fusarium graminearum* schwabe através de técnicas moleculares. **Revista Brasileira de Agrociência**, 14:67-76, 2008.
- BROMFIELD, K.R. Soybean Rust- Monograph, n° 11, The American Phytopathological Society, St Paul, MN, USA, 1984.
- BROMFIELD, K.R.; HARTWIG, E.E. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. **Crop Science**, 20:254–255, 1980.
- BUTTOW M. V., CASTRO C. M., SCHWARTZ E., TONIETTO A., BARBIERI R. L. **Caracterização molecular de populações de *butia capitata* (arecaceae) do sul do brasil através de marcadores AFLP¹**. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v. 32, n. 1, p. 230-239, Março 2010.
- BUX, H.; RASHEED, A.; MANGRIO, S.M.; ABRO, S.A.; SHAH, S.J.A.; ASHRAF, M.; CHEN, S. Comparative virulence and molecular diversity of stripe rust (*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*) collections from Pakistan and United States. **International Journal of Agriculture & Biology**, 14: 851–860, 2012.
- CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Eds). **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa-MG: Editora Folha de Viçosa, 2009. p.11-94.

CÂMARA G. M. S. **Introdução ao agronegócio soja**. Disponível em <http://www.lpv.esalq.usp.br/lpv584/584%20Soja%2001%20%20Apostila%20Tto%20%20Agronegocio%20Soja%202011.pdf>. Piracicaba: O Autor, 28p. 2011.

CASELA, R.C., Variabilidade genética de patógenos e resistência de cultivares. In: VIII SEMINÁRIO NACIONAL DE MILHO SAFRINHA. Assis, 2005. Anais... Campinas: Instituto Agrônomo, p.189-194, 2005.

CHENG, Y.W.; CHAN, K.L. The breeding of rust resistant soybean Tainung 3. **Journal of Taiwan Agricultural Research**, v.17, p.30-34, 1968.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Safra 2014/2015 Décimo segundo levantamento**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_09_11_10_42_03_boletim_gaos_setembro_2015.pdf. Acesso em: Janeiro 2016.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Safra 2015/2016 Quarto levantamento**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_01_12_09_00_46_boletim_gaos_janeiro_2016.pdf. Acesso em: 19 janeiro 2016.

CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM. **Parceria público privada no combate à ferrugem asiática da soja**. Disponível em: http://www.consorcioantiferrugem.net/portal/?page_id=698. Acesso em: 19 de janeiro, 2016.

COSTA NETO, P. R. & ROSSI, L. F. S. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em fritura. **Química Nova**, v.23, p. 4, 2000.

DARBEN L. M. **Obtenção e caracterização molecular e fenotípica de isolados monouredinais de *Phakopsora pachyrhizi* coletados em diferentes regiões do Brasil**. Maringá. Universidade Estadual de Maringá. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) p.81, 2012.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS. J. B. A plant minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, 1:19-20, 1983.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Ferrugem da soja é identificada em três estados brasileiros**, 2014. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2334519/ferrugem-da-soja-e-identificada-em-tres-estados-brasileiros>. Acesso em: 17 Janeiro 2016

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologias de produção de soja - Região Central do Brasil 2012 e 2013**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 261 p. (Sistemas de Produção / Embrapa Soja, ISSN 2176-2902; n.15)

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil, 2004**. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>. Acesso em: 17 Janeiro 2016

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal 2000**. Disponível em:

<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPT-2010/40621/1/p-do03.pdf>.

Embrapa Trigo. Acesso em: 22 Janeiro 2016

FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa, Editora UFV, p. 287, 1987.

FALEIRO, F.G., LUZ, E.D.M.N., CERQUEIRA, A.O., ROCHA, C.S.S., DANTAS NETO, A., FLORES, A.B., BAHIA, R.C.S. & FALEIRO, A.S.G. Caracterização e diversidade genética de isolados de *Phytophthora* spp. do cacaueiro com base em marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira** 29:303-306. 2004.

FREIRE, M.C.M.; OLIVEIRA, L.O. de; ALMEIDA, A.M.R. de; SCHUSTER, I.; MOREIRA, M.A.; LIEBENBERG, M.M.; MIENIE, C.M.S. Evolutionary history of *Phakopsora pachyrhizi* (the Asian soybean rust) in Brazil based on nucleotide sequences of the internal transcribed spacer region of the nuclear ribosomal DNA. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p.920-931, 2008.

FREIRE, M.C.M. **História evolutiva de *Phakopsora pachyrhizi* no Brasil com base em sequências de nucleotídeos da região espaçadora interna do DNA ribossomal nuclear**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 64p. Dissertação (Mestre em Genética e Melhoramento).

FREITAS, M.C.M. A cultura da soja no Brasil: o crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. **Enciclopédia Biosfera**, 7:1-12, 2011.

FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia. Diagnóstico e análise de variabilidade. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, 14:12-16, 2000.

GARCIA, A.; CALVO, E.S.; SOUZA KIIHL, R.A.; HARADA, A.; HIROMOTO, D.M.; VIEIRA, L.G. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, 117:545–553, 2008.

GOELLNER, K.; LOEHRER, M.; LANGENBACH, C.; CONRATH, U.; KOCH E.; SCHAFFRATH, U. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Molecular Plant Pathology**, v.11, n.2, p.169–177, 2010.

HARTMAN, G.L.; HILL, C.B.; TWIZEYIMANA, M.; MILES, M.R.; BANDYOPADHYAY, R. Interaction of soybean and *Phakopsora pachyrhizi*, the cause of soybean rust. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, 6:1-13, 2011.

HARTMAN, G.L.; MILES, M.R.; FREDERICK, R.D. Breeding for Resistance to Soybean Rust. **Plant Disease**, 89:664-666, 2005.

HARTMAN, G.L.; WANG, T.C.; TSCHANZ, A.T. Soybean rust development and quantitative relationship between rust severity and soybean yield. **Plant Disease**, v.75, p.596-600, 1991.

HARTWIG, E.E. Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean rust. **Crop Science**, 26: 1135–1136, 1986.

HARTWIG, E.E.; BROMFIELD, K.R. Relationships among three genes conferring specific resistance to rust in soybeans. **Crop Science**, 23: 237–239, 1983.

HENNING, A. A.; GODOY, C. V. **Situação da ferrugem da soja no Brasil e no mundo**. In: Zambolim, L. Ferrugem Asiática da Soja, Viçosa, MG, Ed. UFV, p. 1-14, 2006.

HENNINGS, V.P. A few new Japanese Uredinaceae. **Hedwigia**, 42:107-108, 1903.

HIDAYAT, O.O.; SOMAATMADJA, S. Screening of soybean breeding lines for resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow). **Soybean Rust Newsletter**, v.1, p.9-22, 1977.

KAWUKI, R.S.; ADIPALA, E.; TUKAMUHABWA, P. Yield loss associated with soya bean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in Uganda. **Journal of Phytopathology**, v.151, p.7-12, 2003.

KELL Y, J.D., GEPTS, P., MIKLAS, P.N., COYNE, D.P. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. *Field Crops Research*. v.82 p.135-154, 2003

KIM K. S.; UNFRIED J.R.; HYTEN D. L.; FREDERICK R. D.; HARTMAN G. L.; NELSON R. L.; SONG Q.; DIERS B. W.; Molecular mapping of soybean rust resistance in soybean accession PI561356 and SNP haplotype analysis of the *Rpp1* region in diverse germplasm. *Theoretical and Applied Genetics* **125**, 1339–1352, 2012

LI, S.; SMITH, J.R.; RAY, J.D.; FREDERICK, R.D. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI567102B. **Theoretical Applied Genetics**, 125:133-142, 2012.

LI, S. Reaction of soybean rust-resistance lines identified in Paraguay to Mississippi isolates of *Phakopsora pachyrhizi*. **Crop Science**, 49:887-894, 2009.

MANN R. S.; SALGADO K. C. C.; VIEIRA M. G. G. C. MACHADO J. C. Variabilidade genética de isolados do complexo *colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro, por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas. **Fitopatol. bras.** 27(1), jan - fev 2002.

MAPA- **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**
www.agricultura.gov.br/vegetal/mercado-interno. [Acesso: 12 de janeiro 2016](#)

[MARCHETTI, M.A.; MELCHING, J.S.; BROMFIELD, K.R. The effects of temperature and dew period on germination and infection by uredospores of *Phakopsora pachyrhizi*. *Phytopatology*, Saint Paul, v. 66, p. 461-463, 1976.](#)

MAWUENA, G. Preliminary observations on soybean rust incidence in Togo. **Soybean Rust Newsletter** 5: 20–21, 1982.

MCLEAN, R.J.; BYTH, D.E. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybeans. **Australian Journal of Agricultural Research**, 31:951–956, 1980.

MONDINI, L.; NOORANI, A.; PAGNOTTA, M.A. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. **Diversity**, 1:19-35, 2009.

MILLER, M.P. (1997) Tools for population genetic analyses (TFPGA): a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Ver. 1.3. Available via <http://bioweb.usu.edu/mpmbio>.

MILES, M. R.; BONDE, M. R.; NESTER, S. E.; BERNER, D. K.; FREDERICK, R. D.; HARTMAN, G. L. Characterizing resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in soybean. **Plant Disease**, v.95, p.577-581, 2011.

NARUZAWA, E.S.; DALLA VALE, R.K.; SILVA, C.M.; CAMARGO, L.E.A.. Estudo da diversidade genética de *Podosphaera xanthii* através de marcadores AFLP e seqüências ITS. **Summa Phytopathologica**, v.37, n.2, p.94-100, 2011.

NEI, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, 89, 583– 590.

PAUL, C.; HARTMAN, G.L. Sources of soybean rust resistance challenged with single-spored isolates of *Phakopsora pachyrhizi*. **Crop Science**, n. 49, p. 1781-1785, 2009.

PERES A. P.; SILVA-MANN R.; VIEIRA M. das G. G. C.; MACHADO J. C. Variabilidade morfo cultural e genética de fungos associados à podridão peduncular do mamão. **Ciênc. agrotec.**, Lavras. V.27, n.5, p.1053-1062, set./out., 2003

RECK M.; L. M BENICIO; E. A RUAS; L. A RODRIGUES; P. M RUAS; M. A ORTIZ; S. TALAVERA; E. URTUBEY; T. F. STUESSY; WEISS-SCHNEEWEISS, H. Karyotype and AFLP data reveal the phylogenetic position of the Brazilian endemic *Hypochoeris catharinensis* (Asteraceae). **Plant Syst Evol**, v.296, p. 231-243. 2011.

REIS, E. M., A. C. R. BRESOLIN, E M. CARMONA. **Doenças da soja I: Ferrugem asiática**. Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo. 2006.

REIS, E. M.; BRESOLIN, A. C. Ferrugem da Soja: Revisão e aspectos técnicos. In: Fercelini, C. A.; Reis, E. M; Gassen, F.; Yorinori, J. T.; Hoffmann, L.;Costamilan, L.; Silva, O. C. da; Balardin, R.; Casa, R.T. **Doenças na Cultura da Soja**. Passo Fundo, RS, Ed. Aldeia Norte, p. 55 – 70, 2004.

ROCHA, C. M. L.; VELLICCE, G. R.; GARCÍA, M. G.; PARDO, E. M.; RACEDO, J.; PERERA, M. F.; LUCÍA, A.; GILLI, J.R; BOGADO, N.; BONNECARRÈRE, V.; GERMAN, S.; MARCELINO, F.; LEDESMA, F.; REZNIKOV, S.; PLOPER, L. D.; WELIN, B.;CASTAGNARO, A. P. Use of AFLP markers to estimate molecular diversity of *Phakopsora pachyrhizi*. **Electronic Journal of Biotechnology**, vol. 18, núm. 6, p. 439-444, 2015.

RUPE, J. AND L. SCONYERS. Ferrugem asiática da soja, Ferrugem da soja. Portuguese translation by Rubens Cherubini Alves and Emerson M. Del Ponte, 2008. **The Plant Health Instructor**. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-1015-01

SANTOS C. E., et al. **Anuário brasileiro da soja 2015**. Santa Cruz do Sul : Editora Gazeta Santa Cruz, P. 120, 2015

SCHNEIDER, R.W.; HOLLIER, C.A.; WHITAM, H.K.; PALM, M.E.; MCKEMY, J.M.; HERNANDEZ, J.R.; LEVY, L.; DEVRIES-PATERSON, R. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the continental United States. **Plant Disease**, 89:774, 2005.

SHIMOMOTO, Y.; SATO, T., HOJO, H.; MORITA, Y.; TAKEUCHI, S.; MIZUMOTO, H.; KIBA, A.; HIKICHI, Y. Pathogenic and genetic variation among isolates of *Corynespora cassiicola* in Japan. **Plant Pathology**, 60:253-260, 2011.

SINCLAIR, J.B.; HARTMAN, G. L. Soybean rust. In: HARTMAN,G.L; SINCLAIR, J.B.;RUPE, J.C. (Ed.) Compendium of soybean diseases. 4 th ed. St. Paul: **American Phytopathological Society**,p.3-4, 1999.

SINGH, B.B.; THAPLIYAL, P.N. Breeding for resistance to soybean rust in India. In: FORD, R.E.; SINCLAIR, J.B. (Ed.). **Rust of soybean**: the problem and research needs. Urbana: University of Illinois, p.62-65. (INTSOY. Series, 12), 1977.

STRINGARY, D. **Sistemática e diversidade genética de isolados de *Guignardia spp.* e *Phyllosticta sp.* nos Estados do Paraná e São Paulo**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 93p. Tese (Doutorado em Genética), 2009.

TSCHANZ, A.T. & WANG, T.C. Interrelationship between soybean development, resistance, and *Phakopsora pachyrhizi*. Anais, Fifth International Congress of the Society for the Advanced of Breeding Research in Asia and Oceania, Bangkok, Thailand. pp.14-20. 1985.

TSCHURTSCHENTHALER, N. N.; VIEIRA E. S. N.; NORA T. D.; SCHUSTER I. Variabilidade genética de *Phakopsora pachyrhizi* avaliada por meio de marcadores microssatélites. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.47, n.2, p.181-186, fev. 2012.

TWIZEYIMANA M.; OJIAMBO P.S.; HAUDENSHIELD J.S., CAETANO-ANOLLÉS G.; PEDLEY K.F.; BANDYOPADHYAY R.; HARTMAN G.L. Genetic structure and diversity of *Phakopsora pachyrhizi* isolates from soybean. **Plant Pathology**:1-11, 2011.

TWIZEYIMANA, M.; HARTMAN, G.L. Culturing *Phakopsora pachyrhizi* on detached leaves and urediniospore survival at different temperatures and relative humidities **Plant Disease**, 94:1453-1460, 2010.

TWIZEYIMANA, M.; OJIAMBO, P.S.; IKOTUN, T.; LADIPO, J.L.; HARTMAN, G.L.; BANDYOPADHYAY, R. Evaluation of soybean germplasm for resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Nigeria. **Plant Disease**, v.92, p.947-952, 2008.

UNFRIED, J.R.; KIIHL, R.A.S.; CALVO, E.S.; TAKEDA, C.; NOUCHI, A.; OTUBO, S.; SIQUERI, F. Genética e Melhoramento para resistência à ferrugem asiática da soja. In: **Ata da XXXI Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil**. Londrina-PR: Embrapa Soja, p.130-140, 2010.

VAKILI, N. G. AND K. R. BROMFIELD. *Phakopsora* rust on soybean and other legumes in Puerto Rico. **Plant Disease** 60:995-999, 1976.

VAN DER PLANK, J. E. **Disease Resistance in Plants** (1th Ed.). Academic Press, New York e London. 1968

VILA NOVA, M.X.; BORGES, L.R.; de SOUSA, A.C.B.; BRASILEIRO. B.T.R.V.; LIMA, E.A.L.A.; da COSTA, A.F.; de OLIVEIRA, N.T. Pathogenicity for onion and genetic diversity of isolates of the pathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* (Phyllachoraceae) from the State of Pernambuco, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, 10:311-320, 2011.

VOEGELE, R.T.; HAHN, M.; MENDGEN, K. **The Uredinales: cytology, biochemistry and molecular biology**. In: Deising, H. & Essey, K. *The Mycota*, p. 69-98, 2009.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HORNES, M.; FRITJERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

WHITE, T.J.; ARNHEIM, N.; ERLICH, H.A. The polymerase chain reaction. **Trends in Genetics**, v.5, p.185-189, 1990

YAMANAKA, NAOKI et al. **Resistance to Asian soybean rust in soybean lines with the pyramided three Rpp genes**. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.*, Mar 2013, vol.13, no.1, p.75-82. ISSN 1984-7033

YAMANAKA, N.; LEMOS, N.G.; AKAMATSU, H.; YAMAOKA, Y.; SILVA, D.C.G.; PASSIANOTO, A.L.L.; ABDELNOOR, R.V.; SOARES, R.M.; SUENAGA, K. Soybean breeding materials useful for resistance to soybean rust in Brazil. **Japan Agricultural Research Quarterly**, 45:385-395, 2011.

YAMANAKA, N.; YAMAOKA, Y.; KATO, M.; LEMOS, N.G.; PASSIANOTTO, A.L.L.; SANTOS, J.V.M.; BENITEZ, E.R.; ABDELNOOR, R.V.; SOARES, R.M.; SUENAGA, K. Development of classification criteria for resistance to soybean rust and differences in virulence among Japanese and Brazilian rust populations. **Tropical Plant Pathology**, 35:153–162, 2010.

YORINORI, J.T. Soybean germplasms with resistance and tolerance to Asian rust and screening methods. **JIRCAS Working Report**, 58:70, 2008.

YORINORI, J.T. **Ferrugem “asiática” da soja: o desafio o continua e como aprimorar o seu controle**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 4., 2006, Londrina. Anais. Londrina: Embrapa Soja, p.102-108, 2006

YORINORI, J.T.; PAIVA, W.M.; FREDERICK, R.D.; COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLLI, P.F.; HARTMAN, G.E.; GODOY, C.V.; NUNES, J., JR. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, 89:675-677, 2005.

YORINORI, J.T.; JUNIOR, J.N.; LAZZAROTTO, J.J. **Ferrugem “asiática” da soja no Brasil: evolução, importância, economia e controle**. Documentos 247, 36p, 2004.

ZAMBOLIM, L. **Ferrugem asiática soja**. Viçosa MG: Suprema, 2006, 140p.