

VANDERSON RICARDO JORGE

DIVERSIDADE MOLECULAR DE *Phakopsora pachyrhizi* EM GENÓTIPOS
DE SOJA COM DIFERENTES GENES DE RESISTÊNCIA A FERRUGEM

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento, para
obtenção de título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

J82d
2013

Jorge, Vanderson Ricardo, 1980-

Diversidade molecular de *Phakopsora pachyrhizi* em genótipos de soja com diferentes genes de resistência a ferrugem / Vanderson Ricardo Jorge. – Viçosa, MG, 2013. vi, 35f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Orientador: Luiz Orlando de Oliveira

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 32-35

1. *Phakopsora pachyrhizi*. 2. Soja - Doenças e pragas.
3. Ferrugem-da-soja. 4. Genética molecular.

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 579.59

VANDERSON RICARDO JORGE

DIVERSIDADE MOLECULAR DE *Phakopsora pachyrhizi* EM GENÓTIPOS
DE SOJA COM DIFERENTES GENES DE RESISTÊNCIA A FERRUGEM

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento, para
obtenção de título de *Magister
Scientiae*.

Aprovada: 06 de março de 2013.

Ana Paula Gomes Soares
(Coorientadora)

Olinto Liparini Pereira

Luiz Orlando de Oliveira
(Orientador)

Dedico esse trabalho aos meus pais Ozório Cezar Jorge e Maria Periotto Jorge e irmã Alessandra Vanessa Jorge, grandes incentivadores desta caminhada percorrida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre presente em minha vida e guiando meus caminhos.

Aos meus pais, pelo companherismo e estímulo, e por estarem sempre presente e acreditando em meu potencial.

A minha irmã Alessandra Vanessa Jorge, pelo apoio, pela ajuda nas noites de trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Programa de Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realização desse curso.

À Universidade Estadual de Mato Grosso, pelo afastamento concedido para a realização deste curso.

Ao meu orientador, professor Luiz Orlando de Oliveira, pela oportunidade e pelos ensinamentos.

À minha coorientadora, Ana Paula Gomes Soares, pelo auxílio e atenção dedicados.

À professora Ana Aparecida Bandini Rossi, pelo incentivo e apoio para realização deste curso.

À professora Solange Aparecida Arrolho da Silva, pelo apoio para realização deste curso.

À minha namorada Herlaine de Paula Teixeira pela paciência, ajuda e companherismo.

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular e Filogeografia, pelos momentos de alegria em meio as dificuldades, pelo companherismo e ajuda diários.

Aos meus colegas de trabalho da Universidade do estado de Mato Grosso, em especial a Tatiana e José Carlos pela amizade e incentivo.

Ao Eduardo Guillen pelo auxílio na aquisição de amostras na Argentina, pelos conselhos e amizade.

Às instituições e empresas que colaboram para realização deste trabalho: UNEMAT - Alta Floresta, Embrapa-Londrina, Embrapa - Passo Fundo, Empresa DonMario Sementes, Coodec-Cascavel e UFV.

Aos responsáveis pela casa de vegetação, Nilton Piovesan e José Carlos pelo auxílio na produção de sementes.

Enfim, a todos que de alguma forma me ajudaram nessa etapa muito importante. Muito obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. Introdução Geral	1
2. Objetivos	4
2.1. Objetivos Específicos.....	4
3. Metodologia	5
3.1. Coleta de amostras	5
3.2. Extração de DNA	5
3.3. Reações de amplificação via PCR.....	6
3.4. Clonagem dos produtos amplificados	7
3.6. Análises Estatísticas	9
4. Resultados	12
4.1. Fator de ribosilação do ADP	12
4.1.1. Análise das sequências	12
4.1.2. Relação genealógica entre os haplótipos	13
4.2. Espaçador transcrito interno	15
4.2.1. Análise das sequências	15
4.2.2. Estrutura Secundária	17
4.2.4. Curva de rarefação de Ribótipos	21
4.2.5. Associação do número de sequências de ITS ao número de ribótipos obtidos.....	22
4.2.6. Fluxo Gênico e Diferenciação Genética.....	23
5. Discussão	25
6. Conclusões	31
7. Referências Bibliográficas.....	32

RESUMO

JORGE, Vanderson Ricardo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2013. **Diversidade Molecular de *Phakopsora pachyrhizi* em genótipos de soja com diferentes genes de resistência a ferrugem.** Orientador: Luiz Orlando de Oliveira. Coorientadores: Ana Paula Gomes Soares e Ana Aparecida Bandini Rossi.

A Ferrugem Asiática da Soja é uma das principais doenças da cultura da soja causando grandes danos econômicos para o agronegócio. Genes para resistência à ferrugem tem sido relatados, porém a resistência conferida aos cultivares ainda é parcial. O objetivo da pesquisa foi avaliar a diversidade do fungo *P. pachyrhizi* a partir de amostras ambientais originadas de experimentos cultivados com genótipos suscetíveis e genótipos com gene para resistência à ferrugem. As regiões gênicas do espaçador transcrito interno (ITS) e o gene para o Fator de ribosilação do ADP foram amplificadas, clonadas e sequenciadas. As sequências obtidas foram reunidas em bancos de dados para ambas as regiões em estudo. Os resultados das análises evidenciaram a presença de 6 haplótipos para a região de ADP e 14 ribótipos para a região de ITS, estando distribuídos de modo semelhante entre os genótipos de soja com diferentes níveis de resistência. Análises de estrutura de populações demonstram que a variabilidade genética para *P. pachyrhizi* concentra-se nas populações dentro de uma mesma localidade, não havendo diferenças significantes entre localidades avaliadas. A presença de genes que conferem resistência à alguns genótipos não influenciou na distribuição de ribótipos para os locais em estudo. A similaridade entre diferentes localidades amostradas, e diferente genótipos indicam um intenso fluxo gênico que pode ser resultado da dispersão de esporos a longa distância pelo vento.

ABSTRACT

JORGE, Vanderson Ricardo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2013. **Molecular diversity of *Phakopsora pachyrhizi* in soybean genotypes with different rust resistance genes.** Adviser: Luiz Orlando de Oliveira. Co-advisers: Ana Paula Gomes Soares and Ana Aparecida Bandini Rossi.

The Asian Soybean Rust is a major disease of soybean causing enormous economic damage to agribusiness. Rust resistance genes have been reported, but the resistance of the cultivars is still partial. The objective of the research was to assess the diversity of the fungus *P. pachyrhizi* from environmental samples originating from experiments cultivated with susceptible genotypes and genotypes with rust resistance gene. The gene regions of internal transcribed spacer (ITS) and the gene for Factor ADP ribosylation were amplified, cloned and sequenced. The sequences obtained were assembled into databases for both regions under study. The results of the analysis revealed the presence of six haplotypes for the region of ADP and 14 ribotypes for the ITS region, being similarly distributed among soybean genotypes with different tolerance levels. Population structure analysis demonstrate that genetic variability for *P. pachyrhizi* focuses on populations within the same location, with no significant differences between evaluated locations. The presence of genes which grant resistance to some genotypes did not affect the distribution of ribotypes to the locations under consideration. The similarity between different location samples and different genotypes indicate an intense gene flow than can be result of a long distance spore dispersion by the wind.

1. Introdução Geral

Diversas culturas sofrem com os prejuízos econômicos causados pela ação de fungos fitopatogênicos. A agricultura extensiva e a ampla distribuição de grandes culturas, bem como o modo de dispersão de fungos fitopatogênicos facilitam a sobrevivência e propagação desses nos campos de cultivo ao redor do mundo.

A soja é uma leguminosa pertencente a família Fabaceae, originária da China, que chegou às Américas no início do século XIX. Esta leguminosa, possui papel fundamental para a alimentação da população mundial, sendo utilizada desde a preparação de alimentos, fabricação de rações, óleos, farinha, solventes, biodiesel e outros. Segundo TIAN et al. (2010) soja é uma das sementes de leguminosas mais importantes economicamente, fornecendo a maioria das proteínas vegetais, e mais de um quarto da comida mundial e da ração animal.

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de soja, tendo como principais regiões produtoras o Sul e Centro-Oeste do país. 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 (MAPA, 2013). Na safra 2010/2011 a cultura ocupou uma área de 24,2 milhões de hectares, o que totalizou uma produção de 75 milhões de toneladas com uma produtividade média de 3.106 kg por hectare (EMBRAPA, 2013).

A ferrugem da soja é causada por duas espécies de fungos - *Phakopsora pachyrhizi* (Syd. & P. Syd) e *P. meibomiae* (Arthur) Arthur. A primeira espécie de origem asiática é conhecida por causar maiores danos, devastando campos de plantio em alguns países produtores, e resultando em enormes prejuízos econômicos. Atualmente a ferrugem asiática da soja é a doença que promove maior dano a cultura da soja no mundo.

O fungo *P. pachyrhizi* tem dispersão pelo vento, fazendo com que seus esporos sejam dispersos por longas distâncias, possibilitando a sua introdução em novas áreas e intenso fluxo gênico. Essa via de dispersão é especialmente relevante para fungos biotróficos obrigatórios, nos quais um processo de extinção e colonização pode estar constantemente ocorrendo (BROWN; HOVMOLLER, 2002).

O ciclo de vida do fungo da ferrugem tende a ser complexo, envolvendo diferentes tipos de esporos (GOELLNER et al., 2010). *P. pachyrhizi* possui reprodução assexuada, contudo diversos estudos relatam alta variabilidade para este fungo (FREIRE et al., 2008; BARNES et al., 2009; TWIZEYIMANA et al., 2011; FREIRE et al., 2012; ZHANG et al., 2012).

O desenvolvimento e emprego de cultivares resistentes à doença é uma das principais estratégias para controle da doença. Os cultivares de soja utilizados comercialmente não são plenamente resistentes à *P. pachyrhizi* (HARTMAN et al., 2005). Entre os principais genes conhecidos que conferem resistência à ferrugem asiática da soja estão os genes *Rpp1* (CHENG; CHAN, 1968; HIDAYAT; SOMAATMADJA, 1977; MCLEAN; BYTH, 1980; HARTWIG; BROMFIELD, 1983), *Rpp1b* (RAY et al., 2009), *Rpp2* (BROMFIELD; HARTWIG, 1980); *Rpp3* (BROMFIELD; MELCHING, 1982), *Rpp4* (HARTWIG, 1986); *Rpp5* (GARCIA et al., 2008) e *Rpp6* (LI et al., 2012).

Estudos com *P. pachyrhizi* são realizados a partir de amostras ambientais. Por serem amostras ambientais, cada amostra coletada é composta por diversos indivíduos, dificultando a geração de dados individuais. Essas amostras de campo de *P. pachyrhizi* tipicamente consistem de um *pool* de diferentes isolados. Nestas circunstâncias, clonagem bacteriana de produtos de PCR antes do sequenciamento é obrigatória, dado que o sequenciamento direto de produtos de PCR produz frequentemente cromatogramas com resultados inelegíveis (FREIRE et al., 2012).

Estudos para detectar variação genética de *P. pachyrhizi* têm sido realizados a partir de análises de polimorfismo de regiões espaçadoras transcritas internas de DNA nuclear (ITS), as quais têm demonstrado ser uma ferramenta muito interessante para campos de pesquisa como a Filogenia e Filogeografia. A região ITS de DNA ribossomal nuclear (nrDNA), a qual inclui dois espaçadores (ITS1 e ITS2) e o gene interveniente 5.8S, constitui uma família de genes multicópia. O alinhamento de sequências de ITS de *P. pachyrhizi* demonstra que sítios polimórficos estão distribuídos de maneira não uniforme ao longo da região ITS (FREIRE et al., 2012).

Os espaçadores internos apesar de serem eliminados pelo processamento do rRNA, são necessários para formar estruturas secundárias funcionais, que contém sítios de ligação para proteínas nucleares requeridas para biogênese do ribossomo e correto processamento do rRNA (HILLIS; DIXON, 1991; NAZAR, 2004; MULLINEUX; HAUSNER, 2009; FREIRE et al., 2012).

O estudo da estrutura secundária fornece informações úteis para estudo de diversidade genética em amostras ambientais. Análises estruturais podem ajudar a distinguir cópias de nrDNA funcionais de não funcionais, ou pseudogenes (QUEIROZ et al., 2011; FREIRE et al., 2012).

O gene para fator de ribosilação do ADP possui polimorfismos a nível de sequência, sendo viável para detectar variação genética de *P. pachyrhizi* como demonstrado no trabalho de ZHANG et al. (2012).

O presente estudo de diversidade de *P. pachyrhizi* tem por objetivo avaliar o nível de variabilidade genética de populações de *P. pachyrhizi* estimada pelo sequenciamento de duas regiões gênicas nucleares (fator de ribosilação do ADP e ITS), em 10 genótipos de soja com diferentes genes de resistência à ferrugem asiática em diferentes regiões produtoras no Brasil em dois anos agrícolas, com a finalidade de um melhor entendimento da biologia de populações de *P. pachyrhizi*.

2. Objetivo

Esse estudo tem como objetivo avaliar o nível de variabilidade genética de populações de *P. pachyrhizi* a partir de dados moleculares, utilizando 10 genótipos de soja com diferentes genes de resistência à ferrugem em diferentes regiões produtoras de soja no Brasil.

2.1. Objetivos Específicos

A partir das análises, informações serão fornecidas no intuito de responder às seguintes questões:

Qual o nível da variabilidade genética de isolados *P. pachyrhizi* em diferentes localidades no Brasil, baseado no polimorfismo das regiões de fator de ribosilação do ADP e ITS de genótipos de soja suscetíveis e genótipos com gene de resistência?

Como haplótipos de *P. pachyrhizi* estão distribuídos nas regiões amostradas e entre genótipos de soja com diferentes genes de resistência à ferrugem?

Existe variabilidade genética para *P. pachyrhizi* dentro de uma mesma localidade e entre localidades com e sem cultivo comercial de soja?

Populações de *P. pachyrhizi* identificadas a partir de genótipos com gene de resistência são semelhantes às identificadas em genótipos suscetíveis?

O caráter resistência de alguns genótipos atua de alguma maneira para a diversidade das populações de *P. pachyrhizi*?

A variabilidade genética de *P. pachyrhizi* é compartilhada entre Brasil e Argentina?

Qual o número de clones obtidos por clonagem bacteriana são necessários para estimar a diversidade genética de uma população *P. pachyrhizi* a partir de amostras ambientais?

3. Metodologia

3.1. Coleta de amostras

As amostras de folhas de soja infectadas com *P. pachyrhizi* foram coletadas em campos de cultivo em diferentes localidades na Argentina através de colaboração do Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias - CNIA - INTA. No Brasil as folhas foram obtidas a partir de experimentos implantados em diferentes localidades em dois anos agrícolas 2009/2010 e 2011/2012. Os experimentos foram implantados nos municípios de Cascavel e Londrina no estado do Paraná e no município de Viçosa no estado de Minas Gerais, por meio de parceria com instituições (Coodec - Cascavel, Embrapa soja - Londrina, BIOAGRO-UFV - Viçosa). Dez genótipos diferentes de soja com diferentes genes de resistência à ferrugem asiática: PI 200492, PI 230970, PI 462312 e PI 459025, os quais possuem os genes de resistência *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3* e *Rpp4* respectivamente, BRS 134, FT 17, FT 2, IAC 1, BRS MS Bacuri e CD 208, os quais não possuem quaisquer gene de resistência conhecido foram cultivados em parcelas com duas repetições, e livre de controle para ferrugem.

As amostras de folhas de soja infectadas com *P. pachyrhizi* foram coletadas nos campos de cultivo da Argentina e nos experimentos do Brasil, e enviadas ao Laboratório Biologia Molecular e Filogeografia do Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG. Os esporos presentes nas folhas infectadas foram removidos com auxílio de sistema de sucção conectado a uma bomba de vácuo. As amostras cujas folhas apresentaram pouca quantidade de esporos, tiveram retirada a parte da folha com presença de pústulas da ferrugem para serem utilizados. Os esporos e tecidos foliares com pústulas foram colocados em microtubos, liofilizados e armazenados a -80 °C.

3.2. Extração de DNA

Foi extraído DNA de 56 amostras brasileiras, sendo 30 referentes ao ano agrícola 2009/2010, e 26 do ano agrícola 2011/2012 e 12 amostras argentinas. O DNA genômico total foi extraído a partir de aproximadamente

30 mg de esporos e/ou folhas infectadas, usando o protocolo de CTAB descrito por DOYLE e DOYLE (1987), com modificações, como descrito por FREIRE et al. (2008).

O material foi macerado em microtubos de capacidade de 1,5 mL na presença de 600 µL de tampão de extração CTAB: NaCl; Tris – HCl 1M; EDTA 0,5 M; CTAB 5% (m/v); β-mercaptoetanol. O material foi homogeneizado e incubado a 65 °C durante 15 minutos. Logo após foi adicionado 400 µL de clorofórmio álcool-isoamílico 24:1 (v/v), em seguida os tubos passaram por centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos, para separar a fase orgânica da aquosa. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para novos microtubos, com adição de 500 µL de isopropanol gelado. Os tubos passaram por agitação e centrifugação para sedimentar o precipitado, o qual foi lavado com etanol 70% (v/v) e em seguida colocado para secar em câmara de fluxo laminar. O material foi então ressuspenso em TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0) e RNase 40 µg/mL, e finalmente armazenado a -20 °C.

3.3. Reações de amplificação via PCR

Duas regiões do genoma nuclear foram selecionadas para amplificação: o gene que codifica para o fator de ribosilação do ADP; e as regiões espaçadoras internas (ITS) mais a região de 5.8S do DNA ribossomal nuclear. Os genes para amplificação e análise foram escolhidos com base na viabilidade para amplificação e nível de polimorfismo conforme descrito por FREIRE (2011). As amplificações foram conduzidas em termociclador Eppendorf vapo.protect (AG 22331 Hamburg, Alemanha).

A amplificação da região ITS foi realizada com os *primers* específicos para *P. pachyrhizi*, ITSP5 e ITSP3 (FREIRE et al., 2008). As amplificações do gene fator de ribosilação do ADP foram conduzidas com combinação de *primers* DN739857F2 e DN739857R5b (FREIRE, 2011). As amplificações foram realizadas com o mesmo programa para as duas regiões gênicas, com um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por cinco minutos; seguidos por 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos para anelamento dos *primers*, 72 °C por 45 segundos para extensão; e um ciclo de extensão final de 72 °C por cinco minutos. As

reações para amplificação foram preparadas para um volume final de 20 μL : 4 μL do tampão 5x *Phusion HF Buffer* (1,5 mM de MgCl_2); 1 μL de cada *primer* a 10 μM ; 0,2 μL de dNTPs a 10 mM; 2,0 μL de DNA; 0,2 μL de *Phusion High Fidelity DNA Polimerase*; e água ultra pura autoclavada para completar o volume. Para as amostras da localidade Londrina, ano 2010, foi utilizado *Platinum Taq DNA polimerase*.

Após cada amplificação, o produto de PCR foi purificado utilizando o *kit de purificação Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System* conforme recomendação do fabricante. Em seguida, foram adicionados 0,2 μL da enzima *Taq DNA polimerase* (Phoentria) em cada reação e essas foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. A adição de *Taq DNA polimerase* teve finalidade a adição de adenina no final de cada fita amplificada para facilitar a reação de ligação no plasmídeo pGEM-T *Easy* (PROMEGA). Os fragmentos amplificados foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,0 % (m/v), visualizados por meio de luz ultravioleta, e suas imagens digitalizadas em um sistema captura de imagens.

3.4. Clonagem dos produtos amplificados

Após amplificação por PCR, os fragmentos de DNA foram clonados para separar diferentes isolados. A clonagem foi realizada utilizando o vetor pGEM-T *Easy* (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, foi realizada a transformação por choque térmico, utilizando células DH5 α ultracompetentes de *Escherichia coli*. Tubos com 100 μL de células competentes receberam 5 μL de reação de ligação, e foram mantidos no gelo por 30 minutos. Em seguida os tubos foram incubados em banho-maria a 42 °C durante 50 segundos e novamente colocados em gelo por dois minutos para a recuperação das células. Para crescimento foram adicionados a cada tubo 900 μL de meio SOC (0,5% (m/v) de extrato de levedura; 2% (m/v) de triptona; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; MgCl_2 10 mM; MgSO_4 10 mM) e esses incubados em agitador a 37 °C e 150 rpm durante uma hora. Após término do período de crescimento, os tubos foram centrifugados a 3.500 rpm por 10 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 150 μL de meio SOC, e desses 120 μL foram plaqueados com duas repetições em placas de Petri (90 x 15 mm). As placas foram preparadas

anteriormente com meio LB sólido contendo ampicilina 50 µg/mL e X-Gal 25 µg/mL. Em seguida as culturas foram incubadas a 37 °C por aproximadamente de 16 horas.

Para as análises dos transformantes, colônias brancas isoladas foram repicadas em meio sólido e analisadas por PCR de colônia para avaliar quais colônias apresentavam o inserto de interesse. As reações foram preparadas para um volume final de 20 µL: 2 µL do tampão 10x IB Buffer (15 mM de MgCl₂); 0,75 µL de cada *primer* a 10 µM; 0,2 µL de dNTPs 10 mM; 2,0 µL de DNA; 0,2 µL de *Taq* DNA Polimerase (Phoneutria); e água ultra pura autoclavada para completar o volume. As reações de PCR de colônia foram conduzidas com *primers* específicos e nas mesmas condições da primeira amplificação. As regiões de ITS foram amplificadas com os *primers* ITSP5 e ITSP3, e o gene de fator de ribosilação do ADP com os *primers* ADP3F e ADP2R. As sequências de cada *primer*, assim como a temperatura de anelamento encontram-se na Tabela 1. Em seguida, os fragmentos foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,0 % (m/v) e visualizados por meio de luz ultravioleta e suas imagens digitalizadas em um sistema de captura de imagens.

Tabela 1: Relação dos *primers* utilizados para a amplificação das duas regiões gênicas de *P. pachyrhizi*.

	<i>Primer</i>	Sequência	T _m (°C)
ITS	ITSP5	5` GCAACGGCACTTTACTGGCTC 3`	59,1
	ITSP3	5` GTTCAGTGGGTAGTCTCACCTGATT 3`	58
ADP	DN739857F2	5` AGCAGACCCAACCCATCGATAT 3`	58,2
	DN73985R5b	5` AGTCCACCACAAAGATGATTCCCT 3`	58,2
	ADP3F	5` GATATCTCCCTCTCCCTCTC 3`	52,8
	ADP2R	5` ATGATTCCCTGAGTGTTTTG 3`	50,4

As colônias que apresentaram as melhores amplificações foram selecionadas para fazer a extração de DNA plasmidial. As colônias selecionadas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio LB líquido com 2,5 µL de ampicilina 50 µg/mL. Os tubos contendo meio LB e bactérias foram incubados por 14 horas a 37 °C sob agitação de 180 rpm. O DNA plasmidial de colônias avaliadas positivamente foi extraído utilizando o *Kit Wizard Mini Prep* (Promega) de acordo com recomendações do

fabricante, quantificado com Nano-Drop (Thermo-Scientific) e encaminhado para sequenciamento.

3.5. Sequenciamento e comparação das sequências

O sequenciamento das amostras foi realizado pela empresa MacroGen-Korea, e conduzido com o *primer* universal M13 pUCF (5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3'). Para o ITS foi sequenciada a região completa (ITS1, 5.8S, ITS2). Para o gene fator de ribosilação do ADP foram sequenciadas apenas parte do gene, envolvendo regiões de introns e exons. Foram sequenciados em média oito clones originados a partir de cada genótipo amostrado para ITS e ADP. As sequências obtidas foram alinhadas e submetidas a correções e edições manuais no aplicativo computacional SEQUENCHER versão 4.8 (SEQUENCHER®). Os *primers* foram também alinhados às regiões gênicas correspondentes e utilizados como referência para a eliminação das extremidades das sequências. No alinhamento foi necessária a introdução de “*gaps*” para compensar as inserções ou deleções de bases. A comparação das sequências, e a análise do cromatograma de cada uma delas permitiu a realização das correções necessárias e a identificação das mutações.

As autapomorfias, presença de um caractere derivado em uma única sequência do conjunto de dados, foram removidas, pois eram suspeitas de terem sido originadas de erro de incorporação da DNA polimerase. As autapomorfias são altamente informativas na análise de rede, se mantidas no conjunto de dados poderiam alterar índices de diversidade haplotípica e nucleotídica.

3.6. Análises Estatísticas

Os bancos de dados preparados para cada região gênica foram analisados no programa DNAsp v5 (LIBRADO; ROZAS, 2009). Esse programa forneceu dados básicos de cada alinhamento, como: número de sequências analisadas, tamanho das sequências, número de *gaps* e a posição deles na sequência, número de sítios polimórficos e posição na sequência, número de sítios polimórficos informativos, números de

singletons, conteúdo GC, número de haplótipos, diversidade nucleotídica e diversidade haplotípica. O nível de fluxo gênico e de diferenciação entre as populações de *P. pachyrhizi* organizados por localidade foi obtido com base no cálculo de F_{ST} , realizado no programa DNAsp.

O teste de associação de qui quadrado (χ^2) foi realizado no software (PREACHER, 2001) com a finalidade de avaliar a quantidade e distribuição dos haplótipos. O teste comparou as proporções de ribótipos totais e frequentes originados de genótipos suscetíveis e de genótipos portadores de gene para resistência a fim de avaliar se as proporções observadas demonstram ou não diferenças significativas.

A estrutura secundária para os ribótipos de ITS1 e 5,8S, e a energia livre mínima associada (DG) foi estimada pelo programa MFOLD 3.2 - RNAfolding (MATHEWS et al., 1999; ZUKER, 2003). A estrutura secundária de para a região de ITS2 e a energia livre mínima associada foi prevista por modelagem de homologia utilizando a estrutura secundária proposta para *P. pachyrhizi* (acesso 170674463) obtido de ITS2 Database II (SELIG et al., 2008). A modelagem de homologia foi realizada para verificar se as características estruturais foram mantidas para os ribótipos de ITS2. As estruturas secundárias foram montadas e editadas com software VARNA (DARTY et al., 2009). A estrutura apresentada foi estimada para o ribótipo mais frequente no estudo.

O programa TCS 1.21 (CLEMENT et al., 2000) foi utilizado para evidenciar a relação genealógica entre os haplótipos obtidos. Foi estimada uma rede de haplótipos para cada uma das regiões gênicas. Esse programa produz a partir de um conjunto de dados árvores e redes evolucionárias. Para estimar a rede de haplótipos, cada uma das bases (A, G, C e T) foi considerada como um caráter, e as inserções ou deleções (*indels*) foram consideradas como um quinto caráter, independente do seu tamanho. O número máximo de conexões parcimoniosas entre as sequências foi estimado com 95% de probabilidade para todos os acoplamentos dos haplótipos dentro da rede.

Teste a nível populacional foram realizados no programa ARLEQUIN versão 3.1 (EXCOFFIER et al., 2005). Foram calculados índices da

diversidade molecular; testes da estrutura genética da população: análise da variância molecular (AMOVA); e análise de diferenciação das populações.

Com o objetivo de estimar a riqueza de ribótipos por localidade, uma curva de rarefação relacionando número sequências e número de ribótipos foi construída utilizando o programa EstimateS, versão 8.2 (COLWELL et al., 2012) para obter índices baseados em dados de amostragem.

4. Resultados

4.1. Fator de ribosilação do ADP

4.1.1. Análise das sequências

Foram obtidas um total de 91 sequências para o Fator de Ribosilação do ADP para as localidades de Cascavel e Viçosa. Destas sequências, 50 foram provenientes de genótipos suscetíveis à ferrugem asiática e 41 oriundas de genótipos que possuem gene para resistência. As sequências após alinhamento e edição resultaram em um fragmento consenso de 679 bases.

A análise das 91 sequências permitiu a identificação de quatro sítios polimórficos, apresentando uma diversidade haplotípica de 0,581, que corresponde a diversidade entre as duas localidades analisadas.

Dentre o total de sequências obtidas, 43 sequências foram identificadas em Cascavel, sendo 19 provenientes de genótipos resistentes e 24 de genótipos suscetíveis. As amostras da localidade Viçosa somaram 48 sequências, possuindo 22 sequências a partir de genótipos resistentes e 26 de genótipos suscetíveis.

Um total de 6 haplótipos foram obtidos a partir da análise das mutações do conjunto de sequências. Os Haplótipos 1 e 2 foram os mais frequentes para o conjunto de amostras analisadas, sendo o haplótipo 1 o mais frequente nas duas localidades. O haplótipo 2 foi mais frequente na localidade Viçosa (Figura 1).

Hap	(C+V)	(C/V)	(S/R)	
1	47	28/19	20/27	G T A T
2	36	13/23	24/12	. A G .
3	3	00/03	03/00	. A G C
4	2	01/01	00/03	T . . C
5	2	00/02	02/00	T . . .
6	1	01/00	01/00	. . G .

Figura 1: Alinhamento dos sítios variáveis a partir de 91 sequências de ADP definindo 06 haplótipos de *P. pachyrhizi*. C+V indica a frequência de haplótipos obtidos nas localidades Cascavel (C) e Viçosa (V). C/V representam o número total de haplótipos de cada localidade. S e R referem-se ao número de haplótipos originados a partir de genótipos de soja suscetíveis e resistentes à ferrugem respectivamente. Cada sequência possui 679 bases. Pontos indicam similaridade com o haplótipo 1. Números ao alto indicam a posição do nucleotídeo na sequência de referência.

O haplótipo 4 demonstrou distribuição semelhante para as duas localidades. Os haplótipos 03 e 05 foram exclusivos da localidade Viçosa, porém com baixa frequência e o haplótipo 6 foi exclusivo para a localidade Cascavel.

4.1.2. Relação genealógica entre os haplótipos

Uma rede de haplótipos foi estimada a partir dos 06 haplótipos do gene para fator de ribosilação do ADP de *P. pachyrhizi* para entender quais as relações genealógicas existentes. A rede de haplótipos para a região de ADP está representada na Figura 2.

Observa-se por meio da rede uma divisão em dois grupos (Cascavel/Viçosa), com a rede apresentando um haplótipo principal (1) com maior frequência e predominante em Cascavel e o haplótipo (2) com frequência um pouco menor, e significativamente presente nas amostras de Viçosa.

Os haplótipos (03, 04 e 05) surgem com menor frequência, ocupando posição periférica na rede, com distribuição quase restrita a localidade Viçosa, característica que sugere origem recente desses haplótipos.

Os haplótipos frequentes 1 e 2 ocupam posição central na rede, estando conectados pelo haplótipo intermediário 6 (Figura 2), e apresentam-se geograficamente espalhados, condição que aponta para ancestralidade em relação aos demais haplótipos da rede.

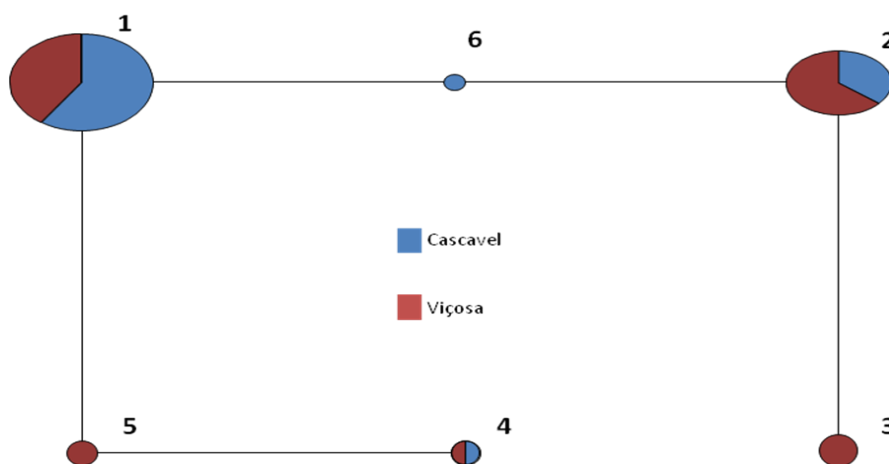


Figura 2: Rede de haplótipos para a região de ADP de *P. pachyrhizi*. Cada círculo representa um haplótipo; número ao lado do círculo indica o haplótipo; o tamanho dos círculos tem relação com a frequência dos haplótipos; círculos coloridos são haplótipos frequentes ($N > 2$); partição dos círculos revela a frequência do haplótipo por localidade; Cada linha representa um passo de mutação.

A rede de haplótipos quando estimada com base na frequência de sequências provenientes de genótipos suscetíveis e resistentes apresenta uma distribuição semelhante (Figura 3). O compartilhamento de haplótipos entre os diferentes genótipos indica a presença de intenso fluxo gênico entre as populações, bem com a ausência de seleção mesmo na presença de genes que conferem resistência à ferrugem para alguns genótipos.

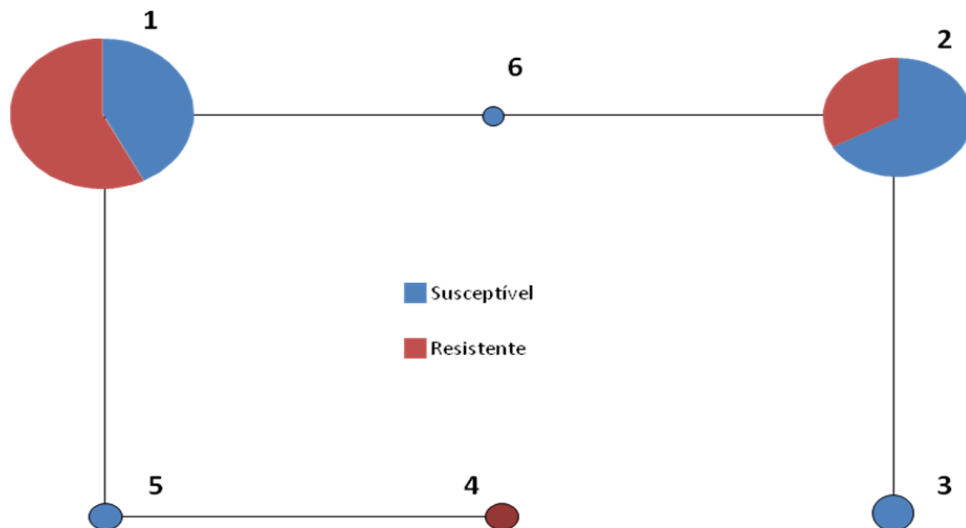


Figura 3: Rede de haplótipos para a região de ADP de *P. pachyrhizi* com base no padrão susceptibilidade e resistência. Cada círculo representa um haplótipo; número ao lado do círculo indica o haplótipo; o tamanho dos círculos tem relação com a frequência dos haplótipos; partição dos círculos revela a frequência do haplótipo por localidade; Cada linha representa um passo de mutação.

Com o objetivo de avaliar a quantidade e distribuição dos haplótipos o teste de associação de qui quadrado (χ^2), com grau de liberdade igual a 1 (GL=1), relacionando o número de sequências ao número de haplótipos encontrados nos genótipos de soja suscetíveis e resistentes foi realizado para as amostras de cada localidade e para as localidades em conjunto, Cascavel e Viçosa (C+V).

A frequência de haplótipos totais e frequentes foi muito similar para ambos os genótipos, não apresentando diferença significativa entre genótipos de soja suscetíveis e genótipos com gene que confere resistência à ferrugem em ambas as localidades analisadas e também quando avaliadas em conjunto (Tabela 2).

Tabela 2: Teste de associação de qui-quadrado (χ^2) entre número de sequências de ADP e haplótipos encontrados em variedades de soja suscetíveis (S) e resistentes (R) à ferrugem nas localidades de Cascavel e Viçosa. Seq (Número de Sequências), Hap total (haplótipo total), Hap freq (haplótipos frequentes)¹.

	CAS		Valor P	VIC		Valor P	CAS+VIC		Valor P
	S	R		S	R		S	R	
Seq	24	19		26	22		50	41	
Hap total	3	3	0,79 ^{ns}	4	3	0,88 ^{ns}	5	3	0,68 ^{ns}
Hap freq	2	2	0,82 ^{ns}	3	2	0,80 ^{ns}	4	3	0,91 ^{ns}

GL=1; (¹) haplótipos com número de ocorrência maior que 1; ^{ns} = não significativo.

4.2. Espaçador transcrito interno

4.2.1. Análise das sequências

O sequenciamento de 437 clones para a região de ITS provenientes de dois anos agrícolas resultou em 212 sequências referentes ao ano agrícola 2009/2010 e 225 referentes ao ano agrícola 2011/2012 em três localidades no Brasil. Foram sequenciados também 49 clones oriundos de amostras da Argentina resultando em 49 sequências.

No estudo foram analisadas 486 sequências que após alinhamento e edição resultaram em um fragmento consenso de 564 bases. A análise das 437 sequências do Brasil permitiram a identificação de 7 substituições de base e cinco *indels*, dois com dois e um com três e dois com um par de bases.

Um total de 14 ribótipos foram obtidos a partir da análise das mutações de 437 sequências originadas do experimento do Brasil, sendo 245 sequências provenientes de genótipos suscetíveis a ferrugem asiática e 192 de genótipos com gene para resistência, apresentando uma diversidade haplotípica de 0,615, que corresponde a diversidade entre os locais amostrados. Um total de oito sítios polimórficos foram detectados nas sequências de ITS de amostras brasileiras (Figura 4).

Dentre as localidades amostradas, 172 sequências foram identificadas em Cascavel, sendo 98 de genótipos suscetíveis e 74 provenientes de genótipos resistentes.

As amostras para Londrina somaram 113 sequências, com obtidas 60 a partir de genótipos suscetíveis e 53 de genótipos resistentes. Viçosa apresentou 152 sequências, 87 de genótipos suscetíveis e 65 de genótipos resistentes.

O Ribótipo 1 foi o mais frequente para as amostras analisadas, sendo o mais frequente nas três localidades, nos dois anos agrícolas do Brasil e nas amostras da Argentina. O ribótipo 1 foi identificado em 258 sequências do Brasil e em 35 sequências da Argentina.

Os ribótipos 02, 03, 04, 05 e 06 com 70, 41, 39, 21 e 13 sequências respectivamente apresentaram distribuição semelhante para as três localidades em estudo.

Os ribótipos 07, 08, 09, 11, 12, 13 e 14 foram exclusivos de Londrina, contudo apresentaram baixa frequência. O ribótipo 10 foi único para Viçosa.

Rib	(C+L+V)	(C/L/V)	(S/R)	
				3pb ┌───┐ 51113 33355
				20287 88845
				5058 02999
01	258	121/48/89	145/113	ATAT---T-TT
02	70	20/25/17	37/25	...ATTT.GA.
03	41	16/10/15	21/20A.
04	39	09/12/14	22/13TTT.GA.
05	21	04/04/12	10/10TTT.G..
06	13	02/06/04	7/5	...A.....
07	02	00/02/00	1/1C...
08	01	00/01/00	1/0	G-.ATTT.GA.
09	01	00/01/00	0/1	..G.....
10	01	00/00/01	0/1G..
11	01	00/01/00	0/1	G..A....GA-
12	01	00/01/00	0/1	..GATTT.GA.
13	01	00/01/00	1/0	...A....GA.
14	01	00/01/00	0/1	.-.....A.

Figura 4: Alinhamento dos sítios variáveis a partir de 437 sequências de ITS do Brasil definindo 14 ribótipos de *P. pachyrhizi*. C+L+V indica a frequência de ribótipos obtidos nas três localidades Cascavel (C), Londrina (L) e Viçosa (V). C/L/V representam o número total de ribótipos de cada localidade. S e R referem-se ao número de ribótipos originados a partir de genótipos de soja suscetíveis e resistentes à ferrugem respectivamente. Cada sequência possui 564 bases. Pontos indicam similaridade com o ribótipo 1 e hífens indicam presença de *gaps*. Números ao alto indicam a posição do nucleotídeo na sequência de referência.

4.2.2. Estrutura Secundária

A estimativa da estrutura secundária de ITS de *P. pachyrhizi* foi feita separadamente para as regiões de ITS1, 5.8S e ITS2, utilizando o ribótipo 1 como sequência de referência. Os resultados da comparação dos 14 ribótipos com a sequência de referência evidenciaram os pontos de mutação por substituição, deleção e inserção de bases.

A região de ITS 1 apresentou 03 substituições de bases, compostas por 02 transversões e 01 transição, duas inserções e uma deleção de bases distribuídas ao longo da estrutura (Figura 5).

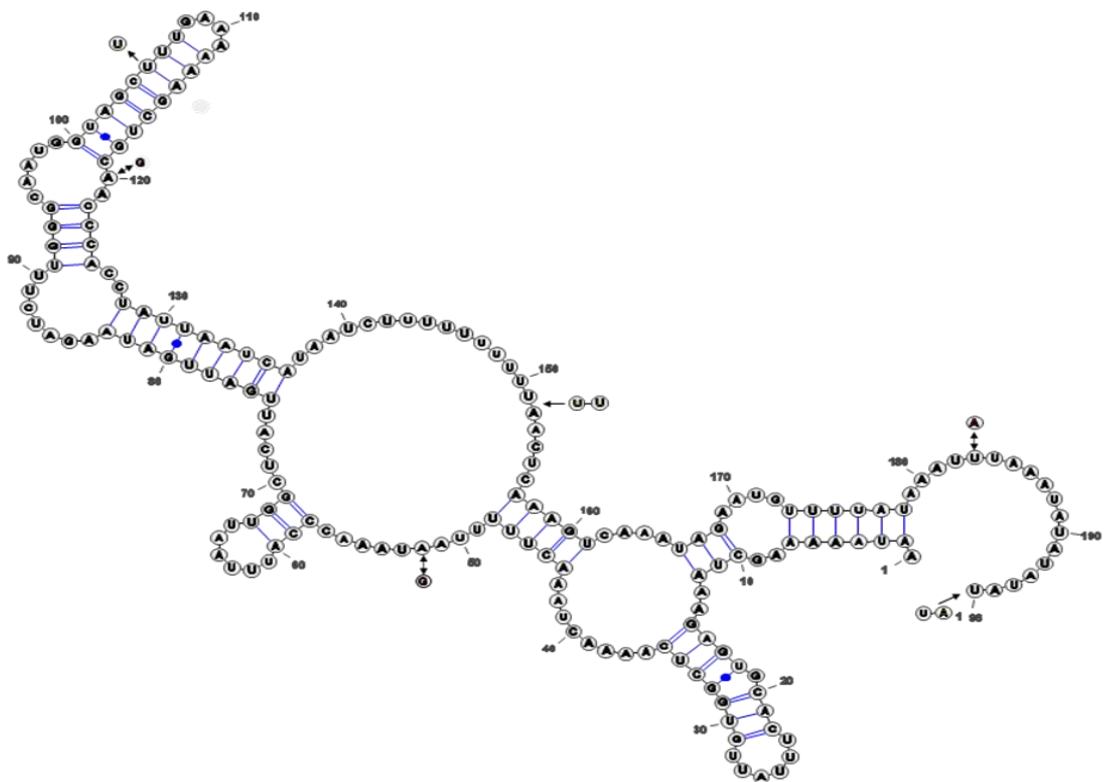


Figura 5: Estrutura Secundária de ITS1 de *P. pachyrhizi*. O ribótipo 1 foi utilizado com referência. Bases indicadas por seta de dupla direção indicam pontos de substituição de base. Bases sinalizadas por setas de sentido único indicam pontos de inserção ou deleção de bases.

O gene 5.8S manteve-se inteiramente conservado para todas as sequências analisadas neste estudo. A comparação dos 14 ribótipos para a região de ITS2 com a sequência de referência revelou a presença de pontos de mutação por substituição, deleção e inserção de bases (Figura 6).

A região de ITS2 apresentou 02 substituições de bases, compostas por 01 transversão e 01 transição, três inserções e uma deleção de bases distribuídas ao longo da estrutura.

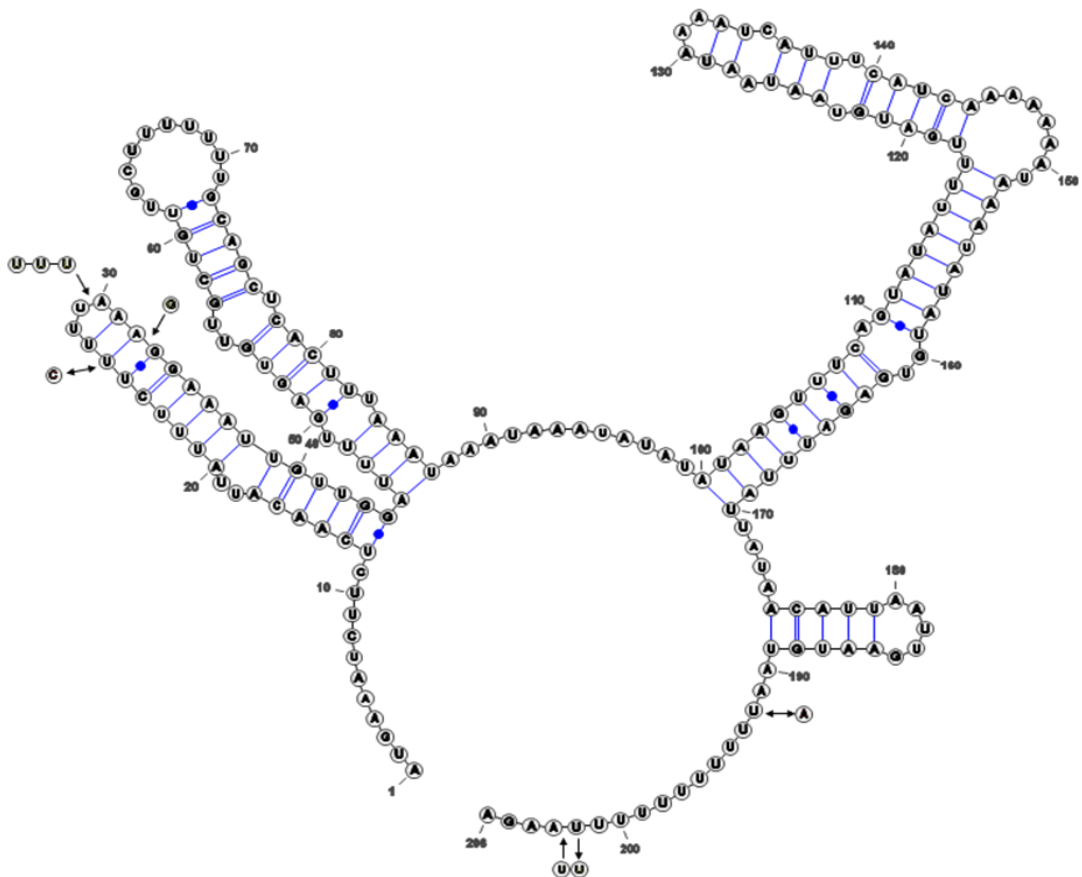


Figura 6: Estrutura Secundária de ITS2 de *P. pachyrhizi*. O ribótipo 1 foi utilizado com referência. Bases indicadas por seta de dupla direção indicam pontos de substituição de base. Bases sinalizadas por setas de sentido único indicam pontos de inserção ou deleção de bases.

4.2.3. Relação genealógica entre os ribótipos

Uma rede de ribótipos foi estimada abrangendo os 14 ribótipos de ITS de *P. pachyrhizi* para entender quais as relações genealógicas existentes (Figura 7). Os ribótipos surgem distribuídos de forma semelhante para os três locais e dois anos amostrados. A rede apresenta um ribótipo principal (1) com maior frequência e cinco ribótipos (2, 3, 4 e 5) com menor frequência, ocupando posição central na rede, característica que sugere ancestralidade desses ribótipos.

O ribótipo 10 com apenas uma sequência surge ligando o ribótipo 1 e o ribótipo 5. Os ribótipos *singletons* (7, 8, 9, 12, 13 e 14) e o ribótipo 6 foram identificados nas extremidades da rede. A posição ocupada por esses ribótipos servem como indicativo que esses são derivados dos ribótipos que ocupam posições centrais na rede e que são de origem mais recente em relação aos demais ribótipos.

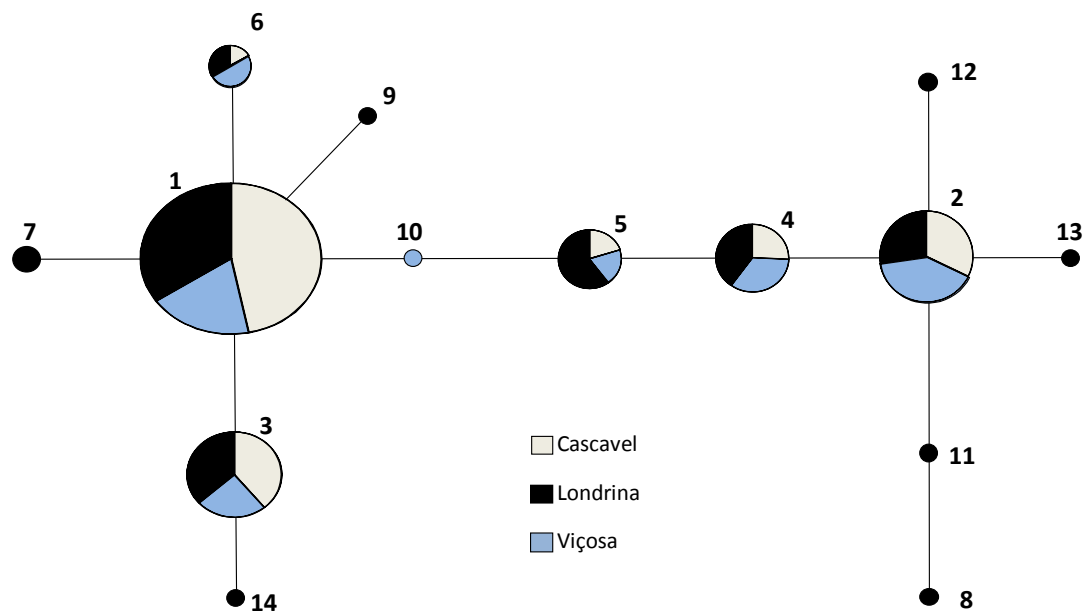


Figura 7: Rede de ribótipos para a região de ITS de *P. pachyrhizi*. Cada círculo representa um ribótipo; número ao lado do círculo indica o ribótipo; o tamanho dos círculos tem relação com a frequência dos ribótipos; círculos coloridos são ribótipos frequentes ($N > 2$); partição dos círculos revela a frequência do ribótipo por localidade; círculos pretos são *singletons* ($N = 1$). Cada linha representa um passo de mutação.

Com intuito de investigar melhor a diversidade de *P. pachyrhizi*, 49 seqüências de amostras de campo da Argentina foram incorporadas as análises para comparar as amostras do Brasil com o material vindo da Argentina.

A rede de ribótipos manteve-se inalterada após a inclusão de seqüências da Argentina, demonstrando um compartilhamento dos ribótipos mais frequentes e conseqüente presença de fluxo gênico entre populações dos dois países (dados não mostrados).

Analisando a distribuição de ribótipos de *P. pachyrhizi* por ano amostrado, observamos uma distribuição muito similar dos ribótipos nos dois anos agrícolas. Todos os *singletons* de ponta presentes na rede são originários de amostras do ano 2010 e localidade Londrina. O ribótipo 7 também pertence as amostras de Londrina, 2010 (Figura 8).

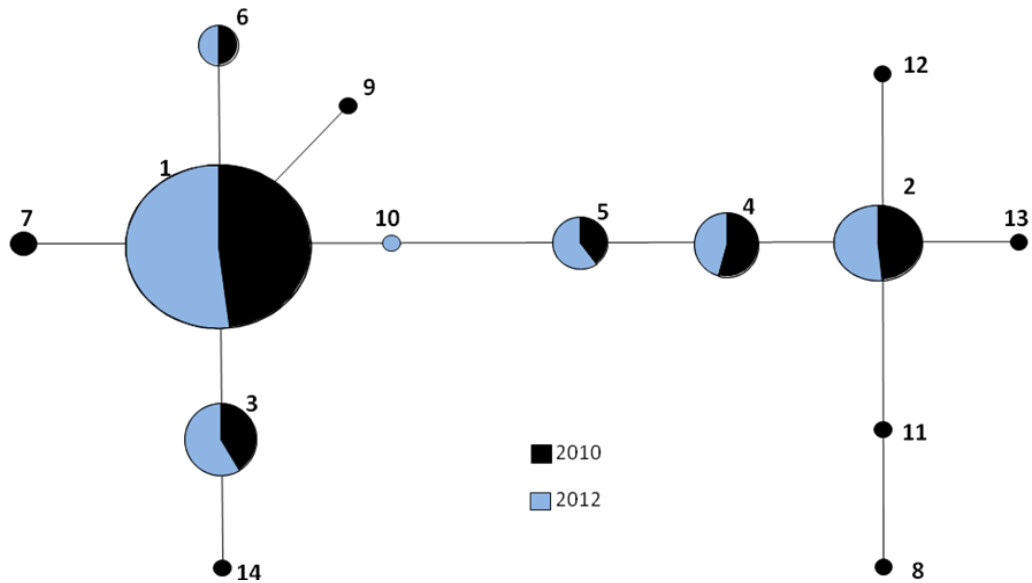


Figura 8: Rede de ribótipos para a região de ITS de *P. pachyrhizi*. Cada círculo representa um ribótipo; número ao lado do círculo indica o ribótipo; o tamanho dos círculos tem relação com a frequência dos ribótipos; círculos coloridos são ribótipos frequentes ($N > 2$); partição dos círculos revela a frequência do ribótipo por localidade; círculos pretos são *singletons* ($N = 1$). Cada linha representa um passo de mutação.

A rede de ribótipos quando estimada com base na frequência de sequências provenientes de genótipos suscetíveis e resistentes apresenta uma distribuição ligeiramente maior de suscetíveis. Aspecto provavelmente decorrente de um maior número de sequências originadas a partir de genótipos suscetíveis à ferrugem.

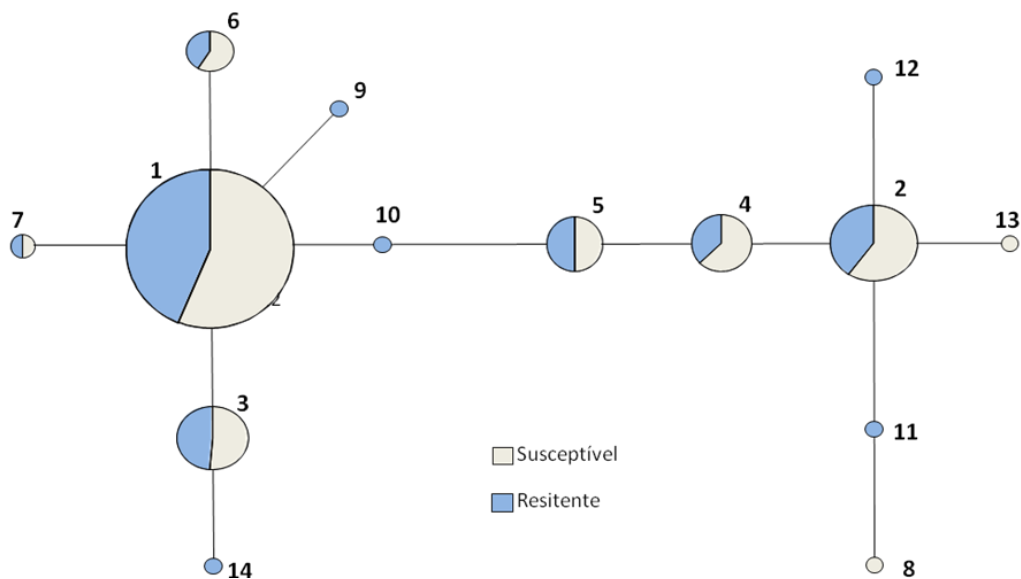


Figura 9: Rede de ribótipos para a região de ITS de *P. pachyrhizi*. Cada círculo representa um ribótipo; número ao lado do círculo indica o ribótipo; o tamanho dos círculos tem relação com a frequência dos ribótipos; círculos coloridos são ribótipos frequentes ($N > 2$); partição dos círculos revela a frequência do ribótipo por localidade; círculos pretos são *singletons* ($N = 1$). Cada linha representa um passo de mutação.

4.2.4. Curva de Rarefação de Ribótipos

Estudos de diversidade de fauna ou flora necessitam amostrar um número de indivíduos que seja representativo na população avaliada, porém existe grande dificuldade em definir um valor representativo, pois muitas vezes a diversidade aumenta proporcionalmente ao tamanho da amostra.

A figura 10 mostra que o número de ribótipos presentes na maioria dos locais e anos agrícolas amostrados apresentam distribuição semelhantes na curva de rarefação. Entretanto, a curva para amostras do local Londrina e ano 2010 apresenta distribuição diferente, com número de ribótipos predominantemente superior.

A inclinação das curvas apresentada no gráfico indica que o ponto de saturação para o número de ribótipos está próximo, exceto para a localidade Londrina 2010. A assíntota para ribótipos de *P. pachyrhizi* deve ser atingida entre 6 e 8 ribótipos.

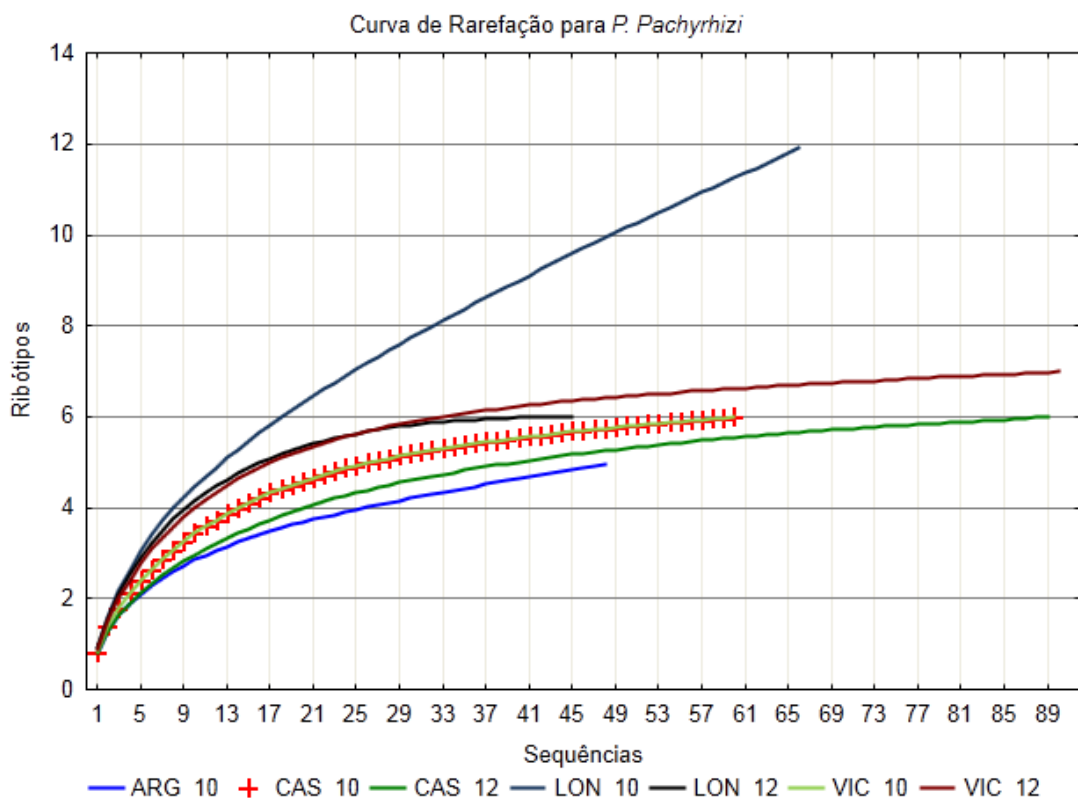


Figura 10: Curva de rarefação relacionando número de sequências de ITS com o número de ribótipos de *P. pachyrhizi* amostradas a partir de 10 genótipos de soja em três localidades e dois anos agrícolas no Brasil e amostras da Argentina, estimadas por EstimateS usando o método de Coleman.

Verifica-se por meio da figura 10 que com 20 sequências pode ser obtida em torno de 80 % da variação numa localidade. A localidade Cascavel apresentou uma sobreposição nos dois anos avaliados demonstrando que a assíntota pode ser atingida entre 60 e 70 sequências aproximadamente.

4.2.5. Associação do número de sequências de ITS ao número de ribótipos obtidos

O teste de associação de qui quadrado (χ^2) com grau de liberdade igual a 1 (GL=1) foi realizado para as amostras de cada localidade e para o conjunto de localidades, Cascavel, Londrina e Viçosa (C+L+V) relacionando o número de sequências ao número de ribótipos encontrados nos genótipos de soja suscetíveis e resistentes.

Conforme a Tabela 3 o número de ribótipos total e frequentes (frequência maior que 1 para as amostragens) foram iguais para todas as localidades, não apresentando diferença significativa entre genótipos de soja suscetíveis e genótipos com gene que confere resistência à ferrugem em nenhuma das localidades avaliadas. Quando os locais foram analisados conjuntamente o resultando também não foi significativo para genótipos suscetíveis e resistentes.

Tabela 3: Teste de associação de qui-quadrado (χ^2) entre número de sequências de ITS e ribótipos encontrados em variedades de soja suscetíveis (S) e resistentes (R) à ferrugem nas localidades de Cascavel, Londrina e Viçosa. Seq (Número de Sequências), Rib total (ribótipos total), Rib freq (ribótipos frequentes)¹.

	Cascavel		Valor P	Londrina		Valor P	Viçosa		Valor P	C+L+V		Valor P
	S	R		S	R		S	R		S	R	
Seq	98	74		60	53		87	65		245	192	
Rib total	5	6	0,46 ^{ns}	9	9	0,81 ^{ns}	6	7	0,44 ^{ns}	9	12	0,23 ^{ns}
Rib freq	5	5	0,67 ^{ns}	6	5	0,93 ^{ns}	6	6	0,63 ^{ns}	6	6	0,68 ^{ns}

GL=1, ¹ ribótipos com número de ocorrência maior que 1, ^{ns} não significativo.

4.2.6. Fluxo Gênico e Diferenciação Genética

O valor de F_{ST} foi calculado para as populações aos pares com base o nível de compartilhamento de ribótipos de ITS de *P. pachyrhizi*. F_{ST} quantifica a diferenciação genética entre populações indicando o nível de fluxo gênico entre as diferentes localidades. Analisando os dois anos amostrados foi identificado um baixo valor de F_{ST} (-0,00364). Este baixo valor aponta para uma uniformidade entre os anos amostrados, não havendo diferença na variabilidade genética nas populações do fungo.

Quando comparamos as localidades amostradas, observamos um baixo valor de F_{ST} para todos os conjuntos (Tabela 4). Índice que confirma a distribuição de ribótipos de maneira semelhantes entre localidades e anos, indicando um baixo nível de diferenciação mesmo entre populações. Até mesmo localidades como Londrina e Viçosa que estão distantes geograficamente apresentam baixos níveis de diferenciação.

Tabela 4: Valores de F_{ST} entre pares de populações, tendo como base o nível de compartilhamento de ribótipos de ITS.

F_{ST}	Londrina	Viçosa	Argentina
Cascavel	0,08022	0,00809	-0,00334
Londrina		0,03547	0,03958
Viçosa			-0,00932

Ao comparar as localidades do Brasil com a população formada por amostras da Argentina novamente os valores para F_{ST} permanecem baixos, demonstrando um grande fluxo gênico e variabilidade reduzida entre os locais.

A análise de variância molecular para os conjuntos de dados de sequências foi realizada com auxílio do programa Arlequin versão 3.1 (EXCOFFIER et al., 2005) (Tabela 5). Para melhor visualização os dados foram analisados em grupos com dois níveis hierárquicos: primeiro grupo, avaliamos a estrutura formada entre localidades amostradas e dentro de cada local; segundo grupo, foi analisado os níveis para anos agrícolas individualmente e em conjunto; e o terceiro grupo, os dois níveis hierárquicos

foram formados por populações oriundas de genótipos suscetíveis e resistentes agrupados bem como cada categoria isoladamente.

Tabela 5: Cálculo da análise da variância molecular (AMOVA) de populações de *P. pachyrhizi* com base no ITS, feito pelo programa Arlequin versão 3.1 (EXCOFFIER et al., 2005).

Fonte de Variação	GL	Soma dos quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem de Variação
Análise para locais				
Entre locais	3	11,490	0,02657 va	3,37
Entre pop. dentro de locais	482	367,542	0,76270 vb	96,63
Total	485	379,062	0,37375	
Análise para anos				
Entre anos	1	0,165	-0,00286 va	-0,36
Entre pop. dentro de anos	435	343,070	0,78867 vb	100,36
Total	436	343,236	0,78581	
Análise para tipo de genótipo				
Entre genótipos	1	0,223	-0,00263 va	-0,33
Dentro de genótipos	435	343,236	0,78854 vb	100,33
Total	436	343,013	0,7859	

Observamos na Tabela 5 que os locais não apresentam diferenciação, estando quase toda a variação observada dentro das populações de locais (96,63%). A análise para o fator ano também indica que as populações não diferiram de um ano agrícola para outro estando toda a variação existente dentro de cada ano (100,36%). O mesmo padrão de variação surge quando grupos suscetíveis e resistentes são comparados, com a variação permanecendo totalmente compartilhada dentro de cada população (100,33%). A análise dos três agrupamentos aponta para grande fluxo gênico entre as populações de estudo, até mesmo quando comparamos com dados de amostras distintas da Argentina.

5. Discussão

Um dos objetivos deste estudo foi examinar a diversidade molecular de *P. pachyrhizi* utilizando genótipos de soja suscetíveis e genótipos que apresentam gene que confere resistência à ferrugem asiática da soja. O alinhamento das sequências de três localidades no Brasil e o compartilhamento de ribótipos indicou pouca variação entre as populações das diferentes localidades analisadas apontando para um alto fluxo gênico, apesar de alguns genótipos ter apresentado maior frequência. A presença de alguns genótipos com grande frequência e amplamente distribuídos pelos campos de cultivo do Brasil também foi relatado no estudo de FREIRE et al. (2008). O conhecimento dos patótipos dominantes em uma região e se eles predominam ou mudam ao longo do tempo pode permitir a implantação de cultivares com resistência específica aos patótipos predominantes de *P. pachyrhizi* (TWIZEYIMANA et al., 2011).

Os valores de diversidade haplotípica para ambas as regiões (ITS e fator de Ribosilação do ADP) avaliadas são muito semelhantes. A diversidade haplotípica é definida como a probabilidade de encontrar dois haplótipos diferentes, quando retiramos aleatoriamente dois haplótipos de uma amostra. Mesmo utilizando genótipos que possuem gene que confere resistência à ferrugem a variabilidade genética permaneceu alta como indica o índice de diversidade haplotípica. O valor de diversidade haplotípica corresponde à diversidade gênica média, a qual é uma medida da variabilidade genética da população em estudo (FREIRE, 2011).

Apesar de ser um fungo que possui reprodução assexuada (GOELLNER et al., 2010), estudos anteriores como TWIZEYIMANA et al. (2011) na Nigéria empregando estudo com SSR, ZHANG et al. (2012) e FREIRE et al. (2008) utilizando a região de ITS para amostras de campo nos Estados Unidos e Brasil respectivamente, relatam grande diversidade para *P. pachyrhizi*.

O vento é o principal agente para dispersão de esporos de *P. pachyrhizi* (ISARD et al., 2005). A dispersão de esporos pelo vento pode ser fator determinante para o alto nível de fluxo gênico encontrado, mesmo utilizando práticas de manejo como vazios sanitários ou controle químico

novos ciclos de reinfecção podem ocorrer, uma vez que os esporos podem ser conduzidos por centenas ou milhares de quilômetros. *Phakopsora pachyrhizi* produz uredinosporos dicarióticos em grande quantidade, os quais são dispersos pelo vento, podendo ocorrer várias infecções durante o período de cultivo (BROMFIELD, 1984). A homogeneidade das grandes culturas utilizadas na agricultura moderna aumenta o risco de doenças, pois a estreita base genética de alguns cultivares facilita o ataque de patógenos. O fungo que causa a ferrugem asiática possui características que facilitam a conquista de novas áreas como adaptações para dispersão de longa distância e especificidade pelo hospedeiro.

A dispersão pelo vento é uma estratégia utilizada por grande número de patógenos que contribui para a sobrevivência desses organismos. A necessidade de controle dessas doenças tem sido o principal estímulo para as atuais pesquisas sobre a teoria de dispersão de longa distância (LDD), e os fungos ilustram algumas das impressionantes consequências da LDD (BROWN; HOVMOLLER, 2002).

A diversidade encontrada para *P. pachyrhizi* pode ser decorrente de eventos de mutação e/ou recombinação. A recombinação durante a mitose pode ocorrer originando parte da variação encontrada. Segundo HASTINGS (1992) a recombinação mitótica ocorre espontaneamente em uma taxa baixa. Processos raros, como eventos de recombinação entre partes de um cromossomo e eventos de recombinação entre cromossomos não homólogos podem ocorrer no núcleo de fungos haplóides, bem como em núcleos diploides durante a meiose (LAMB, 2003).

Assim como para a ferrugem asiática da soja, a resistência para a ferrugem da folha do café é rapidamente superada por *Hemileia vastatrix* Berk & Broome, espécie de fungo que causa a ferrugem do cafeeiro. O trabalho de CARVALHO et al. (2011) analisando dados obtidos a partir do estudo de citometria de imagem do conteúdo de DNA nuclear comprovou a ocorrência de meiose em uredinósporos, o que pode explicar o surgimento de novas raças da ferrugem do cafeeiro decorrentes de eventos de recombinação.

A rede de ribótipos estimada para os dois anos amostrados, para locais e para diferentes genótipos (suscetíveis/resistentes) apresentaram

pouca variação. Os resultados também foram muito semelhantes até mesmo para a localidade Viçosa, caracterizada por estar distante de regiões produtoras de soja no Brasil. A estrutura também se manteve quando o grupo de sequências originadas das amostras da Argentina foi adicionado à rede, com presença de ribótipos principais com maior e frequência e demais ribótipos de baixa frequência, indicando grande dispersão do fungo entre as regiões brasileiras e a Argentina.

A análise de estrutura secundária dos espaçadores internos revelou que as mutações ocorreram em motivos não conservados da estrutura, geralmente em *loops*, o que sugere que estas mutações não exercem papel de interferência na conformação da estrutura e consequente atividade de transcrição. Os espaçadores são necessários para formar uma estrutura secundária, a qual possui sítios de reconhecimento requeridos pelas proteínas para correto processamento do rRNA (FREIRE et al., 2012).

A presença de mutações em pontos que alterem a conformação estrutural pode ser atribuída a erros de processividade da DNA polimerase, pois sugere a ocorrência de polimorfismo artificial, que pode inviabilizar a função da estrutura, e neste caso provavelmente seriam eliminadas por seleção. Para as análises do banco de dados do nosso estudo, sequências que diferiram do conjunto de dados por uma única base apenas foram retiradas, devido a possibilidade de erro introduzido pela DNA polimerase. Essas sequências podem ser rejeitadas nas análises estatísticas com o objetivo de reduzir os efeitos de erros experimentais decorrentes de incorporação errônea da DNA polimerase durante a PCR ou clonagem bacteriana (QUEIROZ et al., 2011; FREIRE et al., 2012).

Evidências desses erros puderam ser observados nas amostras da localidade Londrina e ano agrícola 2010/2011 amplificadas com *Platinum Taq* DNA polimerase. Um grande número de polimorfismos únicos em diferentes clones distribuíram pontos de mutação ao longo de toda a sequência consenso. Os polimorfismos surgiram uniformemente, espalhando mutações até mesmo para o gene 5.8S que possui sequência extremamente conservada.

A riqueza de espécies ou biodiversidade pode ser descrita como a quantidade de espécies presentes numa localidade ou área. A curva do

coletor ou curva de acumulação de espécies é utilizada em áreas como a ecologia e levantamento florestal com o objetivo de encontrar um valor ou número que demonstre o quanto de diversidade do local em estudo foi amostrada em uma coleta de dados.

A curva de acumulação de espécies ou curva do coletor é uma representação gráfica do número cumulativo de espécies amostradas, dentro de uma área definida, como uma função de um esforço amostral (COLWELL; CODDINGTON, 1994).

Para estimar a diversidade de comunidades com diferentes tamanhos amostrais faz-se uso da técnica de Rarefação, que consiste em calcular o número esperado de espécies em cada amostra para um tamanho de amostra padrão.

Segundo GOTELLI e COLWELL (2001) uma curva de rarefação de espécies é produzida por várias reamostragens aleatórias de um conjunto de indivíduos ou amostras, plotando a média do número de espécies representadas.

A partir do conhecimento do número esperado de espécies com base num conjunto de indivíduos podemos obter uma importante ferramenta para direcionar futuros estudos com *P. pachyrhizi*. Com a finalidade de obter uma curva de rarefação, o número de sequências de ITS foi relacionado com o número de ribótipos presentes em cada ano e localidade com um intervalo de confiança de 95%.

A curva de rarefação para o conjunto de dados em nosso estudo indica que com 20 sequências obtidas por clonagem bacteriana podemos obter em torno de 80 % da variação independente da localidade, pois como demonstrado anteriormente os ribótipos mais frequentes estão compartilhados nas diferentes localidades. Locais onde a amostragem foi maior nos dois anos, como na localidade Cascavel, a curva de rarefação deve estabilizar entre 6 e 8 ribótipos. Estes números são muito importantes para direcionar futuros trabalhos com *P. pachyrhizi*, possibilitando melhor gerenciamento de esforços para coleta e produção de dados. Alternativamente, a curva para a localidade Londrina 2010 demonstra um padrão diferente das demais, havendo uma ascensão da curva (Figura 10). Segundo GOTELLI e COLWELL (2001) quanto maior o número de espécies

raras no conjunto de dados, o mais provável é que outras espécies estejam presentes e que estas não foram representadas no conjunto de dados. Possivelmente o resultado para a amostra Londrina 2010 foi ocasionado pelo uso de uma DNA polimerase com uma taxa de erro significativa.

A taxa média de erros de incorporação para *Taq* DNA polimerase descrita no trabalho de CLINE et al. (1996) no qual várias DNA polimerases foram analisadas foi de $8,0 \times 10^{-6}$.

Os erros incorporados pela *Taq* DNA polimerase para a localidade Londrina geraram novos polimorfismos, todos de baixa frequência e posicionados na extremidade da rede, fatores que indicam possibilidade de erros de amplificação na obtenção das sequências. A fidelidade de *Phusion High Fidelity* DNA polimerase relatada pelo fornecedor é 50 vezes maior que a da *Taq* DNA polimerase, reduzindo a probabilidade da presença de erros.

O uso de DNA polimerases de alta fidelidade em reações em cadeia da polimerase (PCR) é essencial para reduzir a introdução de erros de amplificação em produtos de PCR que serão clonados, sequenciados e expressados (CLINE et al., 1996).

O conhecimento da estrutura genética de *P. pachyrhizi* e variabilidade genética de suas populações pode auxiliar em programas e estratégias de controle deste fungo, bem com fornecer informações importantes para o desenvolvimento de cultivares de soja mais resistentes ao patógeno. Para TWIZEYIMANA et al. (2011) tal informação permitiria a seleção precoce de linhas melhoradas contra uma gama de genótipos de organismos patogênicos que refletem a diversidade genética da população de *P. pachyrhizi* em uma determinada área.

Nossos resultados demonstram por meio da AMOVA que não houve diferença entre as populações de *P. pachyrhizi* amostradas, os ribótipos de maior frequência aparecem distribuídos por todas as localidades amostradas no Brasil e também para a Argentina. A avaliação desses dados demonstrou que não há variação entre os locais de coleta, estando toda a variação genética dentro de populações (100%), mesmo quando diferentes grupos hierárquicos foram analisados. Os baixos valores de F_{ST} também apontam baixa diferenciação entre populações. Estruturação semelhante foi

encontrada nos trabalhos de FREIRE et al. (2008) e FREIRE (2011) analisando populações de campo de *P. pachyrhizi*.

Esses dados demonstram que o fator resistência não tem sido determinante para na distribuição dos diferentes ribótipos do patógeno, bem como reforçam a teoria de intenso fluxo gênico, proporcionado principalmente pela ação do vento que dispersa os esporos a longas distâncias, contribuindo para a estruturação das populações de *P. pachyrhizi*.

6. Conclusões

O fungo *P. pachyrhizi* apresenta grande variabilidade genética, mesmo quando amostrado em localidades isoladas das áreas de cultivo comercial.

Os ribótipos de *P. pachyrhizi* estão distribuídos de forma semelhante em diferentes regiões e entre genótipos de soja suscetíveis e portadores de gene para resistência.

A variabilidade genética para *P. pachyrhizi* concentra-se dentro de uma mesma localidade, não havendo diferenças significantes entre localidades.

As populações de *P. pachyrhizi* identificadas a partir de genótipos suscetíveis e genótipos com gene de resistência são similares com base nas regiões gênicas avaliadas.

O caráter resistência de alguns genótipos parece não ter exercido nenhum tipo de pressão de seleção nas populações de *P. pachyrhizi* neste estudo.

As populações de *P. pachyrhizi* do Brasil e da Argentina compartilham mesma variabilidade genética.

Um total de 20 sequências obtidas por clonagem bacteriana pode revelar aproximadamente 80% da diversidade genética de uma população a partir de amostras ambientais de *P. pachyrhizi*.

7. Referências Bibliográficas

BARNES, C. W.; SZABO, L. J.; BOWERSOX, V. C. Identifying and quantifying *Phakopsora pachyrhizi* spores in Rain. **Phytopathology**, v. 99, n. 4, p. 328-338, 2009.

BROMFIELD, K. R. **Soybean rust**. St. Paul, MN: American Phytopathological Society, 1984.

BROMFIELD, K. R.; HARTWIG, E. E. Resistance to Soybean Rust and Mode of Inheritance. **Crop Science**, v. 20, n. 2, p. 254-255, 1980.

BROMFIELD, K. R.; MELCHING, J. S. Sources of Specific Resistance to Soybean Rust. **Phytopathology**, v. 72, n. 6, p. 706-706, 1982.

BROWN, J. K.; HOVMOLLER, M. S. Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. **Science**, v. 297, n. 5581, p. 537-541, 2002.

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, n. 11, 2011.

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

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 10, p. 1657-1660, 2000.

CLINE, J.; BRAMAN, J. C.; HOGREFE, H. H. PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 18, p. 3546-3551, 1996.

COLWELL, R. K.; CHAO, A.; GOTELLI, N. J.; LIN, S.-Y.; MAO, C. X.; CHAZDON, R. L.; LONGINO, J. T. Models and estimators linking individual-based and sample-based rarefaction, extrapolation and comparison of assemblages. **Journal of Plant Ecology**, v. 5, n. 1, p. 3-21, 2012.

COLWELL, R. K.; CODDINGTON, J. A. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v. 345, n. 1311, p. 101-118, 1994.

DARTY, K.; DENISE, A.; PONTY, Y. VARNA: Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure. **Bioinformatics**, v. 25, n. 15, p. 1974-1975, 2009.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

EMBRAPA. **Empresa brasileira de pesquisa agropecuária**. Disponível em: < <http://www.cnpso.embrapa.br/index> >. Acesso em: 26/02/2013.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, L. G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.

FREIRE, M. C. M. **Filogeografia Molecular de *Phakopsora pachyrhizi* com base em dados de sequenciamento de regiões gênicas do DNA nuclear**. 2011. 54 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

FREIRE, M. C. M.; DA SILVA, M. R.; ZHANG, X. C.; ALMEIDA, A. M. R.; STACEY, G.; DE OLIVEIRA, L. O. Nucleotide polymorphism in the 5.8S nrDNA gene and internal transcribed spacers in *Phakopsora pachyrhizi* viewed from structural models. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 2, p. 95-100, 2012.

FREIRE, M. C. M.; OLIVEIRA, L. O.; ALMEIDA, A. M. R.; SCHUSTER, I.; MOREIRA, M. A.; LIEBENBERG, M. M.; MIENIE, C. M. S. Evolutionary history of *Pakopsora 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, n. 4, p. 920-931, 2008.

GARCIA, A.; CALVO, E. S.; KIIHL, R. A. D.; HARADA, A.; HIROMOTO, D. M.; VIEIRA, L. G. E. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, n. 4, p. 545-553, 2008.

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

GOTELLI, N. J.; COLWELL, R. K. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. **Ecology Letters**, v. 4, n. 4, p. 379-391, 2001.

HARTMAN, G. L.; MILES, M. R.; FREDERICK, R. D. Breeding for resistance to soybean rust. **Plant Disease**, v. 89, n. 6, p. 664-666, 2005.

HARTWIG, E. E. Identification of a fourth major gene conferring to rust in soybeans. **Crop Science**, v. 26, p. 1135-1136, 1986.

HARTWIG, E. E.; BROMFIELD, K. R. Relationships among 3 genes conferring specific resistance to rust in soybeans. **Crop Science**, v. 23, p. 237-239, 1983.

HASTINGS, P. J. Mechanism and control of recombination in fungi. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 284, n. 1, p. 97-110, 1992.

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

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA - Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. **Quarterly Review of Biology**, v. 66, n. 4, p. 411-453, 1991.

ISARD, S. A.; GAGE, S. H.; COMTOIS, P.; RUSSO, J. M. Principles of the atmospheric pathway for invasive species applied to soybean rust. **Bioscience**, v. 55, n. 10, p. 851-861, 2005.

LAMB, B. Meiotic Recombination in Fungi: Mechanisms and Controls of Crossing-over and Gene Conversion. In: DILIP, K. A. e GEORGE, G. K. (Eds.). **Applied Mycology and Biotechnology**. Elsevier, v. Volume 3, 2003. p. 15-41.

LI, S. X.; SMITH, J. R.; RAY, J. D.; FREDERICK, R. D. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 125, n. 1, p. 133-142, 2012.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451-1452, 2009.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja> >. Acesso em: 27/02/2013.

MATHEWS, D. H.; SABINA, J.; ZUKER, M.; TURNER, D. H. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. **Journal of Molecular Biology**, v. 288, n. 5, p. 911-940, 1999.

MCLEAN, R. J.; BYTH, D. E. Inheritance of Resistance to Rust (*Phakopsora-Pachyrhizi*) in Soybeans. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 31, n. 5, p. 951-956, 1980.

MULLINEUX, T.; HAUSNER, G. Evolution of rDNA ITS1 and ITS2 sequences and RNA secondary structures within members of the fungal genera *Grosmannia* and *Leptographium*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 11, p. 855-867, 2009.

NAZAR, R. N. Ribosomal RNA processing and ribosome biogenesis in eukaryotes. **Iubmb Life**, v. 56, n. 8, p. 457-465, 2004.

PREACHER, K. J. **Calculation for the chi-square test: An interactive calculation tool for chi-square tests of goodness of fit and independence.**, Disponível em: < <http://quantpsy.org> >. Acesso em: 22/02/2013.

QUEIROZ, C. S.; BATISTA, F. R. C.; OLIVEIRA, L. O. Evolution of the 5.8S nrDNA gene and internal transcribed spacers in *Carapichea ipecacuanha*

(Rubiaceae) within a phylogeographic context. **Mol Phylogenet Evol**, v. 59, n. 2, p. 293-302, 2011.

RAY, J. D.; MOREL, W.; SMITH, J. R.; FREDERICK, R. D.; MILES, M. R. Genetics and mapping of adult plant rust resistance in soybean PI 587886 and PI 587880A. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 119, n. 2, p. 271-280, 2009.

SELIG, C.; WOLF, M.; MULLER, T.; DANDEKAR, T.; SCHULTZ, J. The ITS2 database II: homology modelling RNA structure for molecular systematics. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. D377-D380, 2008.

SEQUENCHER®. **Sequence Analysis Software**. version 4.1.4. Gene Codes Corporation. Ann Arbor, MI, USA. Disponível em: <<http://www.genecodes.com>>.

TIAN, Z.; WANG, X.; LEE, R.; LI, Y.; SPECHT, J. E.; NELSON, R. L.; MCCLEAN, P. E.; QIU, L.; MA, J. Artificial selection for determinate growth habit in soybean. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 19, p. 8563-8568, 2010.

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**, v. 60, p. 10, 2011.

ZHANG, X. C.; FREIRE, M. C. M.; LE, M. H.; DE OLIVEIRA, L. O.; PITKIN, J. W.; SEGERS, G.; CONCIBIDO, V. C.; BAILEY, G. J.; HARTMAN, G. L.; UPCHURCH, G.; PEDLEY, K. F.; STACEY, G. <Genetics Diversity and origins of *Phakopsora pachyrhizi* Isolates in the United States>. **Asian Journal of Plant Pathology**, 2012.

ZUKER, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3406-3415, 2003.