

MAÍRA CRISTINA MENEZES FREIRE

HISTÓRIA EVOLUTIVA DE *Phakopsora pachyrhizi* NO BRASIL COM BASE
EM SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO ESPAÇADORA
INTERNA DO DNA RIBOSSOMAL NUCLEAR

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

MAÍRA CRISTINA MENEZES FREIRE

HISTÓRIA EVOLUTIVA DE *Phakopsora pachyrhizi* NO BRASIL COM BASE
EM SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO ESPAÇADORA
INTERNA DO DNA RIBOSSOMAL NUCLEAR

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

APROVADA: 02 de março de 2007

Prof. Marcelo Barreto da Silva
(Co-orientador)

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros

Prof. Cosme Damião Cruz

Dr^a. Eunize Maciel Zambolim

Prof. Luiz Orlando de Oliveira
(Orientador)

Dedico o presente trabalho a todos que acreditaram e permitiram que este fosse realizado. Em especial aos meus pais Ernani Campos Freire e Célia Lopes de Menezes Freire.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido tantas oportunidades.

Aos meus pais, pelo incessante incentivo, apoio e pela confiança que em mim depositaram.

Aos meus irmãos, Maria das Graças, Izabela Maria e Ernani Júnior, e ao meu cunhado Silas Pimentel, pelo carinho a mim concedido.

À minha avó por suas orações diárias.

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

À Universidade Vale do Rio Doce, e aos professores desta, em especial ao professor Marcelo Barreto.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro a esse trabalho.

Ao meu orientador, Luiz Orlando de Oliveira, pela paciência, dedicação, ensinamentos e principalmente pela confiança.

Ao Newton Piosevan, ao Álvaro Almeida, ao Ivan e todos os que me enviaram amostras.

Ao pessoal do Laboratório Biocafé, em especial à Eunize, por terem me ajudado no início desse trabalho.

Às amigas do laboratório de sequenciamento, que sempre me ensinaram, ajudaram e incentivaram em todas as etapas.

Aos colegas do laboratório de Genômica, por terem me auxiliado para o fim desse trabalho.

Aos amigos, Janaína Teixeira, Leonardo Almeida, Samuel Mazzinguy, Maria Andréia e Demerson, que em tão pouco tempo se tornaram importantíssimos.

E aos sempre amigos, Letícia Lima, Natália Reis, Isabella Gomes, Liliane Paulo, Thaísa Marques, Rosane Nalon, Suelen Cristina, Gláucia Costa, Regina Antunes, Vanessa Braga, Camila Morador, Salvador Júnior e Marcelo Magno, que mesmo de longe contribuíram para essa vitória.

BIOGRAFIA

MAÍRA CRISTINA MENEZES FREIRE, filha de Ernani Campos Freire e Célia Lopes de Menezes Freire, nasceu dia 27 de fevereiro de 1983, em Caratinga, Minas Gerais.

Em 2001, ingressou na Universidade Vale do Rio Doce (UNIVALE), Governador Valadares – MG, no curso de bacharelado em Ciências Biológicas, concluindo-o em dezembro de 2004.

Iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento, na Universidade Federal de Viçosa, em março de 2005, defendendo a dissertação no dia dois de março de 2007.

CONTEÚDO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1- INTRODUÇÃO	1
2 – OBJETIVOS	3
3 – REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 – SOJA X PHAKOPSORA PACHYRHIZI.	4
3.1.1 – <i>Expansão mundial e danos econômicos.</i>	5
3.1.2 – <i>Características</i>	7
3.1.3 – <i>Métodos de Controle e de Monitoramento.</i>	9
3.1.4 – <i>Resistência e Variabilidade</i>	11
3.2 - FILOGEOGRAFIA MOLECULAR	12
3.2.1 – <i>Análises Filogeográficas</i>	15
3.3 – REGIÃO DE ITS (ESPAÇADOR INTERNO TRANSCRITO)	16
4 - MATERIAL E MÉTODOS	19
4.2 - EXTRAÇÃO DO DNA E AMPLIFICAÇÃO POR PCR	20
4.3 – CLONAGEM DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS	23
4.4 – SEQUENCIAMENTO	24
4.5 – CAPTURA DE DADOS DO GENBANK	25
4.6 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS	26
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 – HAPLÓTIPOS DA REGIÃO DE ITS	28
5.2 – COMPARTILHAMENTO DE HAPLÓTIPOS DE ITS1	30
5.3 – COMPARTILHAMENTO DE HAPLÓTIPOS EM ITS2	33
5.4 – ESTRUTURA DE POPULAÇÕES	35
5.5 – REDES DE HAPLÓTIPOS	39
5.6 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE HAPLÓTIPOS DE ITS1	42
5.7 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE HAPLÓTIPOS DE ITS2	44
5.8 – MIGRAÇÃO HISTÓRICA E DISTRIBUIÇÃO ATUAL DA ESPÉCIE	46
6 – CONCLUSÕES	47
7 - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	48

RESUMO

FREIRE, Máira Cristina Menezes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2007. **História evolutiva de *Phakopsora pachyrhizi* no Brasil com base em seqüências de nucleotídeos da região espaçadora interna do DNA ribossomal nuclear.** Orientador: Luiz Orlando de Oliveira. Conselheiros: Marcelo Barreto da Silva e Maurílio Alves Moreira.

A soja é atacada por muitos patógenos, porém dentre todas as doenças a ferrugem asiática causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* tem sido considerada como uma das mais importantes. Os sintomas são caracterizados por minúsculos pontos mais escuros do que o tecido sadio, onde se observa uma protuberância, essa se abre em minúsculo poro, expelindo daí, os uredósporo. Plantas severamente infectadas apresentam desfolha precoce, comprometendo a formação e o enchimento de vagens e o peso final dos grãos. O método mais eficiente de controle é o emprego de variedades resistente, entretanto, a grande variabilidade patogênica tem dificultado a pesquisa de tais variedades resistentes. Esse estudo teve como objetivo investigar a distribuição espacial e temporal da atual diversidade genética de *Phakopsora pachyrhizi*, e inferir sobre as relações evolutivas entre os isolados de origem brasileira e de origem africana e asiática. Uredósporos foram coletados de 20 localidades brasileiras e de localidades na África do Sul. O DNA genômico foi extraído e amplificado por meio de PCR utilizando-se iniciadores específicos para a região de ITS do genoma nuclear de *Phakopsora pachyrhizi*. As regiões ITS1 e ITS2 foram clonadas e sequenciadas de forma independente. Foram sequenciados quatro clones de cada região ITS por amostra, com o objetivo de verificar se haveria variabilidade do patógeno dentro de uma mesma localidade. As seqüências foram alinhadas e comparadas entre si e com seqüências de isolados de *Phakopsora pachyrhizi* de diferentes países obtidas no GenBank. A seguir, o programa TCS foi utilizado para obter redes de haplótipos, uma para as seqüências de ITS1, e outra para a região de ITS2. O programa ARLEQUIN foi utilizado para conduzir a análise de variância molecular, calculando a

diversidade entre e dentro das localidades amostradas, como também para calcular a diversidade gênica e a diversidade nucleotídica. A rede, com base em sequências provenientes de ITS1, foi capaz de distinguir 21 haplótipos entre as 96 sequências, enquanto que a rede baseada em ITS2 distinguiu 17 haplótipos entre as 86 sequências, indicando que embora *P. pachyrhizi* tenha sido recentemente introduzida no Brasil, os isolados brasileiros apresentam uma grande variabilidade genética. Essa rede também mostrou que haplótipos amplamente distribuídos no Brasil também foram encontrados na África e Ásia, indicando uma relação de ancestralidade. Pela comparação das sequências, foi observada a presença de cerca de três haplótipos para cada localidade, indicando uma alta diversidade genética dentro da localidade, sendo esse indício comprovado pela análise de variância molecular. Os resultados dão suporte à hipótese de que, a origem desse fungo no Brasil tenha sido por meio de esporos trazidos, provavelmente, por correntes aéreas transoceânicas que tenham atravessado o Oceano Atlântico, vindos da África. E que essa migração ocorreu mais de uma vez.

ABSTRACT

FREIRE, Maíra Cristina Menezes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, march, 2007. **Evolutionary history of *Phakopsora pachyrhizi* in Brazil bases in nucleotide sequences of internal transcribed spacer region of nuclear ribosomal DNA.** Adviser: Luiz Orlando de Oliveira. Co-advisers: Marcelo Barreto da Silva and Maurílio Alves Moreira.

The soybean is attacked by many pathogens, spite of all the diseases the Asiatic rust caused by the fungus *Phakopsora pachyrhizi* has been considered one of the most important pathogens. The symptoms are characterized for small points darker than the healthy tissue, where it is observed a bulge, which it opens in small pore expelling some uredionospores. Hardly infected plants show premature fallen leave, compromising then the formation and filling of some string beans and also the final weight of some grains. The most effective controlling method is the use of some resistant varieties, however the pathogenic large variability has bothered the research of these resistant varieties. This research has aimed search the special and temporal distribution of the genetic diversity of the *Phakopsora pachyrhizi*, and infer about the developed relations between some Brazilian, African and Asiatic isolates. Uredionospores were collected in 20 Brazilian places and also in South African. The genomic DNA was extracted from and amplified with the PCR using specifics primers for the ITS region of the nuclear genome in the *Phakopsora pachyrhizi*. The ITS1 and ITS2 regions were cloned and sequenced of independent forms. Four clones of each ITS regions in samples were sequenced, aimed to verify whether it might have variability of the pathogens in same location. The sequences were lined up and compared each others and also with isolates sequences of the *Phakopsora pachyrhizi* from different countries in GenBank. Later, the TCS program was used to obtain haplotypes net, one for the ITS1 sequences and other for the ITS2 region. The program ARLEQUIN was used to conduct the analysis of molecular variables, calculating the diversities between and in located samples, and also to calculate the genetic and nucleotide diversity.

The net based on the ITS1 sequences, was able to distinguish 21 haplotypes between 96 sequences, while the net based on ITS2 distinguished 17 haplotypes between 86 sequences, showing that spite of *Phakopsora pachyrhizi* was recently inserted in Brazil, the Brazilian isolates show a great genetic variability. This net shows that distributed haplotypes in Brazil were also found in Africa and Asia, showing an ancestors relation. Comparing the sequences, it was observed the presence of at least three haplotypes for each location, showing a large genetic diversity among the locations, and it was proved by variability molecular analysis. The results support the hypothesis that the origin of this fungus in Brazil has been brought through spores, probably by area transportation through the Atlantic Ocean from Africa and this migration happen more than once.

1- INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é a mais importante oleaginosa cultivada no mundo e no Brasil, é também a mais importante em área plantada. O Brasil é um dos maiores produtores mundiais desta leguminosa (Balardin *et al.* 2005), e dela, direta e indiretamente, depende a estabilidade da economia nacional. Entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos em soja estão as doenças que, em geral, são de difícil controle (Carvalho Júnior & Figueiredo, 2000).

Atualmente, a importância das doenças na cultura da soja é incontestável. O dano causado pelas doenças é de significância econômica. Segundo diversos trabalhos e pesquisas, as perdas anuais devido exclusivamente a doenças superam o valor de US\$ 2 bilhões/safra. Entre as doenças, a ferrugem tem se destacado como uma das mais importantes, tendo sido, nas últimas safras, responsável por uma parcela majoritária deste montante (Balardin *et al.* 2005).

A ferrugem asiática da soja, cujo agente causador é o fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd., é encontrada em praticamente todas as regiões de produção de soja no mundo, onde perdas entre 10 a 90% são relatadas (Balardin *et al.* 2005). Segundo Yorinori *et al.* (2002), o fungo é originário da China e é facilmente disseminada pelo vento. Primeiramente, expandiu-se pela Ásia e Oceania e, em seguida, para a África, chegando à América do Sul no ano de 2001.

Com o aparecimento da ferrugem, o cultivo de soja no Brasil passou a sofrer severos prejuízos econômicos em praticamente toda a sua área de plantio. Não se conhecem variedades resistentes e nem fontes de resistência para uso imediato em programas de melhoramento. Mesmo que houvesse fontes parcialmente resistentes, a durabilidade desta resistência ainda não poderia ser avaliada com segurança, uma vez que faltam informações sobre a variabilidade do fungo nas lavouras de soja brasileira e mundial.

Para estudar a diversidade genética de muitos organismos, dentre eles os fungos, ferramentas moleculares tem sido amplamente utilizadas. Estas se baseiam na hibridização do DNA, análise de sequências de marcas gênicas, amplificação de sequências repetitivas, e a digestão por restrição de produtos da amplificação de PCR (Köllifer *et al.* 2006).

Na filogeografia, genes particulares de interesse genealógico são mapeados, o que permite a avaliação das distribuições geográficas de linhagens genealógicas, especialmente aquelas dentro e entre espécies muito próximas entre si (Avice, 2000).

2 – OBJETIVOS

O presente trabalho visou o estudo da diversidade genética e da distribuição espacial e temporal de *Phakopsora pachyrhizi* no Brasil, inferidos a partir da comparação da sequência da região do espaçador interno transcrito (ITS) do gene rDNA. Esses dados irão fornecer informações para responder algumas perguntas importantes, tais como:

- (I) a região de ITS é propícia para mostrar variação intra-específica?;
- (II) qual é o nível de diversidade genética do fungo?;
- (III) qual é a relação genealógica entre linhagens brasileiras e linhagens provenientes da África e Ásia?;
- (IV) em uma mesma localidade podem co-existir diferentes haplótipos do fungo?;
- (V) é possível formular uma hipótese a respeito da migração histórica e distribuição atual da espécie no Brasil?

Os resultados obtidos poderão ser aplicados na elaboração de novas estratégias de controle da doença e de melhoramento genético visando enfrentar, de forma racional, esta ameaça à sojicultura nacional.

3 – REVISÃO DE LITERATURA

3.1 – Soja X *Phakopsora pachyrhizi*.

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] teve sua origem na China, sendo introduzida no Brasil em 1882 como uma espécie forrageira. O seu cultivo comercial para a produção de grão foi implementado a partir dos anos 40, entretanto, foi na década de 70 que a cultura teve uma expansão marcante (França Neto, 2004). A soja é uma cultura de grande importância na dieta alimentar humana e animal, sendo considerada a mais importante fonte de proteína e óleo vegetal em razão de sua qualidade e baixo custo de produção (Alves *et al.* 2006).

O complexo soja brasileiro é hoje o maior setor exportador do País, representando mais de 10% do total das exportações. Além disso, tem a maior participação do PIB agrícola e apresenta perspectivas de crescimento contínuo. A produção da soja se concentra principalmente nas regiões Centro Oeste e Sul, produzindo 45,4% e 40,8%, respectivamente, do total da produção nacional. Já o Sudeste vem a seguir com 7,7%, o Nordeste com 5,0% e o Norte com apenas 1,1% (França Neto, 2004).

França Neto (2004) menciona que mantendo o ritmo de crescimento atual, é esperado que na safra de 2006/07, o País assumirá a liderança mundial na produção de soja, com cerca de 80 milhões de toneladas de grãos produzidos. Mas, existem restrições e limitações que poderão dificultar essa expansão no futuro, entre elas o risco de ocorrência de novas doenças, como tem ocorrido com a ferrugem asiática. A soja é atacada por muitos patógenos, porém dentre todas as doenças, a ferrugem asiática, tem sido considerada como uma das mais importantes do ponto de vista econômico e fitossanitário (Henning e Godoy, 2006).

3.1.1 – Expansão mundial e danos econômicos.

Os fungos constituem um grupo numeroso e heterogêneo de organismos eucarióticos. Enquanto alguns são utilizados na alimentação humana ou na produção de antibióticos importantes, outros são responsáveis por prejuízos anuais de bilhões de dólares decorrentes de perdas na agricultura. A capacidade dos fungos de causar doenças em plantas é um mecanismo complexo, comumente envolvendo a adesão ao hospedeiro, a germinação de esporos, a diferenciação de estruturas espaciais como apressório e haustório, a penetração, a colonização dos tecidos e a esporulação.

Duas espécies do gênero *Phakopsora* incidem na cultura da soja (Ono *et al.* 1992): *Phakopsora meibomiae* Arthur (Arthur), conhecida como ferrugem americana e *Phakopsora pachyrhizi*, conhecida como ferrugem asiática. Os sintomas das duas ferrugens são idênticos, entretanto, diferem na morfologia da télia, na agressividade, na capacidade de esporulação e na capacidade de causar danos e perdas (Zambolim, 2006). A reação em cadeia de polimerase (PCR), comprovadamente, é a maneira mais rápida de identificar e diferenciar *Phakopsora pachyrhizi* de *Phakopsora meibomiae* (Frederick *et al.* 2002).

Phakopsora meibomiae foi relatada pela primeira vez no Brasil em 1979, em Minas Gerais, por Deslandes (1979), sendo inicialmente classificada em função do hospedeiro como sendo *Phakopsora pachyrhizi*. Carvalho & Figueiredo (2000) constataram que até aquela data a única espécie presente no Brasil era *Phakopsora meibomiae*. Esta espécie é considerada menos agressiva e de ocorrência endêmica em regiões com temperaturas mais amenas (Godoy & Canteri, 2003). O fungo *Phakopsora meibomiae* raramente causa danos econômicos (Yorinori, 2004).

Phakopsora pachyrhizi é um fungo biotrófico e ocorre no hemisfério Leste desde 1902. A distribuição histórica da ferrugem pelo mundo é ilustrada na Figura 1. Na década de 90, a doença foi relatada em Uganda, Kenya e Rwanda, sendo reportada em Zimbábue, Zâmbia, em 1998, e em 2001, na África do Sul (Henning & Godoy, 2006). Foi constatada pela

primeira vez no Continente Americano, em cinco de março de 2001, na localidade de Pirapó, Paraguai (Yorinori, 2004). Supõe-se que esporos do fungo tenham atravessado o Oceano Atlântico trazidos pelo vento, vindos do Sul da África, aonde a doença já vinha causando severas perdas nos últimos anos (Yorinori, 2002).

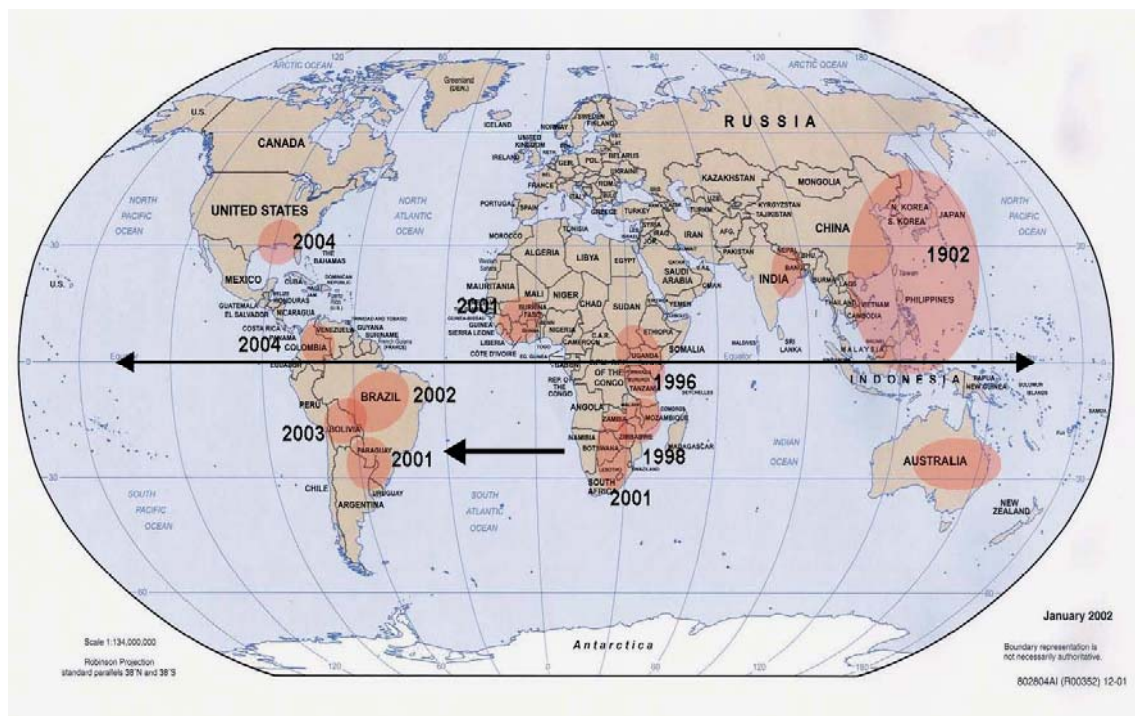


Figura 1: A distribuição mundial da ferrugem da soja (Fonte: Purdue University).

Após a primeira constatação no Paraná, em maio de 2001, a ferrugem asiática espalhou-se gradativamente por todo o Brasil, exceto Roraima, onde não havia sido constatada até a safra de 2005/2006 (Henning & Godoy, 2006). No Brasil, na safra 2001/02, a ferrugem apresentou grande expansão, atingindo oito estados (RS, SC, PR, SP, MG, MS, MT e GO) e as perdas totalizaram 125 milhões de dólares (Yorinori, 2004). Na safra 2002/03, foi identificada em praticamente todas as regiões produtoras de soja, exceto no Pará e em Roraima. Em 2003, o prejuízo devido ao ataque da ferrugem foi superior US\$ 1 bilhão (Henning & Godoy, 2006).

Ainda de acordo com Henning & Godoy (2006), na safra 2003/2004, o prejuízo da ferrugem, na lavoura, ultrapassou US\$ 2 bilhões. Nas safras

agrícolas 2004/2005 e 2005/2006, foi constatada maior severidade da doença na cultura da soja devido a condições favoráveis, como: presença de plantas que escaparam da colheita anterior; antecipação da semeadura dos plantios de verão; condições climáticas favoráveis ao fungo, e provável ocorrência de novas raças do patógeno (Raetano & Merlin, 2006).

3.1.2 – Características

Como todas as outras ferrugens, *Phakopsora pachyrhizi* é um parasita obrigatório e requer um hospedeiro para completar seu ciclo de vida. O ciclo de vida inicia-se com uredósporos oriundos de urédias, produzidas em plantas de sojas voluntárias, ou ainda, de outros campos de soja (Zambolim, 2006). Ao atingirem as folhas de soja na fase superior ou inferior, se a temperatura é favorável, eles germinam com um mínimo de seis horas de molhamento foliar. Ainda segundo Zambolim (2006), se as condições são favoráveis à infecção e colonização, os sintomas podem surgir em cinco a sete dias, e os uredósporos nas lesões de nove a doze dias após a germinação e penetração. A ferrugem é considerada uma doença policíclica, ou seja, o fungo é capaz de ter várias gerações num único ciclo do hospedeiro (Godoy & Lazzarottoda, 2005).

Os sintomas iniciam-se nas folhas inferiores da planta e são caracterizados por minúsculos pontos de cor mais escura do que o tecido sadio. As lesões possuem entre 1 e 2 mm de diâmetro, de coloração esverdeada à cinza-esverdeada (Yorinori, 2002). A doença interfere no funcionamento do tecido, provocando a queda prematura das folhas. No ponto escuro, observa-se, uma minúscula protuberância, semelhante a uma ferida por escaldadura, sendo esse o início da formação da estrutura de frutificação do fungo. Progressivamente, a protuberância adquire coloração castanho-clara a castanho-escura, abre-se em minúsculo poro, expelindo daí, os uredósporos (Yorinori, 2004) (Figura 2).



Figura 2: Superfície inferior da folha de soja, mostrando as pústulas de ferrugem da soja (fonte: Hershman, 2003).

Os uredósporos, inicialmente de coloração hialina, tornam-se bege e acumulam-se ao redor dos poros ou são carregados pelo vento (Yorinori, 2002). Segundo Zambolim (2006), as urédias produzem uredósporos durante três semanas, aproximadamente. À medida que se prossegue a esporulação e que ocorre a morte dos tecidos infectados, as manchas aumentam de tamanho (1-4mm) e adquirem coloração castanho-avermelhada (Yorinori *et al.*, 2004).

Plantas severamente infectadas apresentam desfolha precoce, comprometendo a formação e o enchimento de vagens e o peso final dos grãos. Quanto mais cedo ocorrer a desfolha, menor será o tamanho dos grãos e, conseqüentemente, maior a perda de rendimento e de qualidade. Em casos severos, quando a doença atinge a soja na fase de formação das vagens ou início da granação, pode ocorrer o aborto e queda das vagens (Yorinori, 2002).

Phakopsora pachyrhizi é usualmente descrita no que corresponderiam aos estágios II e III, do seu ciclo de vida. Nesses estágios são observados a presença de urédia e telia, respectivamente. É incerta a ocorrência de todos os estágios que normalmente ocorrem em outros fungos, de I a V. Embora telia e teliósporos possam ser formados no campo, em determinadas condições, não se sabe qual é o papel desse tipo de esporo no ciclo de vida do fungo (Zambolim, 2006).

Fatores ambientais, planta hospedeira e isolados de *Phakopsora pachyrhizi* influenciam o desenvolvimento uredial, a produção de

urediósporos, como também a formação de telia e teliósporos. Yeh (1981) menciona que a formação é afetada pela idade da planta, concentração do inóculo e temperatura. O nível do dano que a doença pode ocasionar depende do momento em que ela incide na cultura, das condições climáticas favoráveis à sua multiplicação após a constatação dos sintomas iniciais, da resistência/tolerância e do ciclo da cultivar utilizada (Godoy & Lazzarottoda, 2005).

A doença é favorecida por chuvas bem distribuídas e longos períodos de molhamento foliar. Temperaturas entre 18 a 25°C por vários dias favorecem a epidemia da doença e temperaturas variando de 15 a 29°C, podendo atingir até 32°C, produzem urédias com uredósporos (Zambolim, 2006). O período mínimo de molhamento necessário para ocorrer infecção foi estimado em seis horas, para temperaturas entre 20 a 25°C, podendo aumentar para temperaturas superiores ou inferiores (Godoy & Lazzarottoda, 2005). A precipitação tem se mostrado o fator crítico para o desenvolvimento de epidemias de ferrugem.

Os uredósporos são facilmente disseminados pelo vento, à velocidade de aproximadamente de 96 km por semana, para lavouras próximas ou a longas distâncias, não havendo barreira fitossanitária que possa impedir a sua entrada e sua disseminação nas lavouras de soja. Essa seria a única forma de disseminação, já que a doença não é transmitida pelas sementes (Yorinori, 2002). A alta correlação entre chuva e severidade final de doença pode ser explicada pela característica incomum de *Phakopsora pachyrhizi*. Os uredósporos do fungo tendem a permanecer firmemente juntos, não sendo facilmente liberados pela ação do vento, tendo as gotas de chuva então, o papel de liberar os esporos (Bergamin Filho, 2006).

3.1.3 – Métodos de Controle e de Monitoramento.

Segundo Zambolim (2006), o método mais eficiente de controle da ferrugem asiática da soja é o emprego de variedades resistentes. Entretanto,

a grande variabilidade patogênica de *Phakopsora pachyrhizi* e a escassez de fontes de resistência à doença têm dificultado a pesquisa de tais variedades resistentes.

Na ausência de cultivares resistentes, a aplicação de fungicidas é a única medida atualmente disponível para prevenir sério colapso na produção de soja. Andrade & Andrade (2006) mencionam que o controle químico tem sido a forma mais eficiente de controle, aliada a certas medidas que devem ser tomadas, desde o planejamento da safra. Godoy & Canteri (2003) afirmam que a ausência de cultivares resistentes faz com que o manejo da cultura, por meio de épocas de semeadura e aplicação de defensivos seja uma alternativa, devendo ser feito de forma racional para não inviabilizar a cultura e agredir o meio ambiente de forma indiscriminada.

A diagnose da doença consiste de uma etapa fundamental, uma vez que a ferrugem pode ser confundida com outras doenças, como mancha-parda e pústula-bacteriana, para que se possa fazer julgamento correto da primeira aplicação de fungicidas (Zambolim, 2006).

Uma ferramenta que se tem mostrado muito útil para o monitoramento da ferrugem são as chamadas “unidades de alerta”. Estas unidades se constituem de parcelas de soja com cerca de 100m² semeadas nas propriedades rurais com pelo menos 15 dias de antecedência dos primeiros cultivos comerciais, onde a doença terá a tendência de aparecer antecipadamente. Portanto, essa serviria de indicativo para necessidade de aplicação de fungicida na lavoura (Soares, 2005).

Nas últimas safras, a maior dificuldade no controle da ferrugem tem sido causada pela contínua multiplicação do fungo da ferrugem em soja irrigada na entressafra e em outras plantas hospedeiras. Elas favorecem a sobrevivência do fungo e servem de elo (“ponto verde”) entre uma safra e a seguinte, antecipando o surgimento da doença (Yorinori, 2006).

Programas têm sido desenvolvidos em todo o país no sentido de buscar mais conhecimento da doença, geração de dados, teste de opções de controle, resistência genética (Balardin, 2006). Entre esses programas estão, Syntinela (2003), Consórcio Anti-Ferrugem (2004), S.O.S. Ferrugem (2004), Mini-lab (2005) e Radar (2005).

O Sistema Alerta é uma das ferramentas do Consórcio Antiferrugem para disseminar as informações sobre a situação da doença no país. O Consórcio é coordenado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e conta com a participação de vários segmentos da cadeia produtiva da soja (Godoy, 2005). Para isso, foram credenciados 54 laboratórios em 16 estados brasileiros, formando uma rede de diagnóstico e identificação da ferrugem. As informações geradas pelos laboratórios credenciados e pelas unidades de alerta são repassadas à administração do Sistema de Alerta, página da internet administrada pela Embrapa Soja (Godoy & Lazzarottoda, 2005).

3.1.4 – Resistência e Variabilidade

A resistência genética é, economicamente, a melhor medida de controle para a doença, entretanto, nem sempre o desenvolvimento de plantas resistentes é rápido e eficiente. Nesse caso alguns fatores como a grande variabilidade do patógeno e a alta capacidade de produção de estruturas reprodutivas, dificultam ainda mais o desenvolvimento de variedades resistentes (Silva *et al.* 2006).

Quatro genes de resistência para *Phakopsora pachyrhizi*, de herança dominante independentes, já foram identificados: Rpp1, Rpp2, Rpp3, e Rpp4.

No Brasil, estudos realizados pela Embrapa Soja identificaram 11 cultivares com resistência à ferrugem, sendo essa resistência superada rapidamente com isolado do fungo proveniente de outra região (Henning e Godoy, 2006). Na safra 2001/02, materiais que haviam sido selecionados com resistência completa tiveram sua resistência superada, antes mesmo de serem comercializados (Godoy & Lazzarottoda, 2004).

Relativamente pouco é conhecido sobre a incidência de raças de *Phakopsora pachyrhizi* com diferentes virulências. Com base nos estudos realizados, parece que *Phakopsora pachyrhizi* possui múltiplos genes de

virulência, e a maioria dos isolados e/ou, populações de campo constitui, uma mistura complexa de diversas raças com múltiplos fatores de virulência (Hartman *et al.* 2004). Como mencionado por Burdon & Marshall (1981), esse patógeno tem uma ampla variedade de hospedeiros (60 espécies em 26 gêneros). Isso sugere a existência de uma grande quantidade de raças fisiológicas diferentes, cada uma especializada para uma estreita variedade de hospedeiros.

Várias raças de *Phakopsora pachyrhizi* já foram identificadas em outros países. No Japão, dezoito raças foram identificadas, em amostras coletadas em plantas de soja e hospedeiros selvagens, por diferentes níveis de resistência das plantas diferenciadoras. (Yamaoka *et al.*, 2002). No Brasil, embora não haja comprovação científica, devido à inexistência de hospedeiros diferenciadores de raças até o momento, admite-se que haja também várias raças fisiológicas do patógeno em campos de soja (Zambolim, 2006).

Outra forma de estudar a diversidade genética de um organismo seria a partir de dados moleculares. Nuntapunt *et al.* (2004) investigaram a diversidade da ferrugem da soja na Tailândia, baseados em marcadores moleculares (AFLP e RAPD, e ITS). Schuster *et al.* (2004) avaliaram a variabilidade genética existente em amostras de *Phakopsora pachyrhizi* no Brasil, utilizando a análise molecular pela técnica de RAPD.

3.2 - Filogeografia Molecular

A Biologia Comparada analisa características, procurando determinar claramente as semelhanças e diferenças entre grupos. Seu maior objetivo é compreender a origem do padrão de semelhanças e diferenças, sendo a teoria por trás dessa área da biologia, a evolução (Futuyma, 2003).

Como um campo da evolução, a biogeografia é o estudo das distribuições geográficas dos organismos. Essa ciência procura explicar como as espécies e táxons superiores são distribuídos, e porque a

composição taxonômica da biota varia de uma região para a outra (Futuyma, 2003).

Surge então a filogeografia, uma sub-disciplina da biogeografia. Ela tem se mostrado uma ferramenta poderosa para estudos evolutivos, além de permitir a detecção de áreas que apresentam indivíduos com os mesmo ou diferentes padrões genéticos (Avice, 1998). Esse termo foi introduzido para descrever geograficamente os sinais da estrutura genética dentro de uma determinada espécie. De acordo com Huang *et al.* (2004), filogeografia é um ramo da biogeografia histórica que determina a história de táxons no tempo e espaço por integrar padrões filogenéticos e geográficos.

A filogeografia pode ser definida como um campo de estudo interessado com princípios e processos que governam as distribuições geográficas de linhagens genealógicas, especialmente aquelas dentro e entre espécies muito próximas entre si (Avice, 2000). A filogeografia constitui a genealogia de população e genes, que revelam como o padrão da distribuição presente tem sido moldado por eventos geológicos ou outros fatores (Huang *et al.*, 2004).

Considerada uma ciência multidisciplinar, a filogeografia integra a genética molecular, genética de populações, etologia, demografia, filogenia, paleontologia e geologia (Avice, 2000). Essa ciência oferece maneiras de examinar a história da mudança genética entre populações, distinguindo padrões biogeográficos de variação genética causadas por fluxo gênico, daquelas provocadas por ancestrais comuns (Schaal *et al.* 1998).

Os estudos filogeográficos permitem que a dinâmica espacial e temporal de organismos estudados possa ser alcançada a partir da comparação entre a identificação da genealogia das variantes e suas distribuições geográficas (Dumolin-Lapégue *et al.* 1997). Nesses estudos, tempo e espaço são juntamente considerados eixos da filogeografia (Avice, 2000). De acordo com Templeton (2004), essa abordagem tem sido empregada com sucesso para explorar a associação entre redes de haplótipos e geografia em um grande número de espécies vegetais, animais e de microrganismos.

Segundo Nei & Kumar (2000), com a descoberta de que toda informação genética de todos os organismos está no DNA, observou-se que

é possível estudar a relação evolutiva de organismos comparando-se o DNA. O conjunto de dados moleculares a ser usado pode ser uma sequência de nucleotídeos ou de aminoácidos.

O desenvolvimento da técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR) aumentou muito a eficiência da detecção de polimorfismos no nível de DNA ou RNA (Matioli, 2004). Hillis *et al.* (1996) comentam que com o progresso das técnicas de PCR e sequenciamento, variação de sequência intraespecífica a nível de espécie, agora podem ser usadas em estudos de doenças epidemiológicas, fluxo gênico, variação geográfica e hibridização.

Amplificação e sequenciamento podem ser utilizados para caracterizar os haplótipos presentes em uma população ou espécies e para reconstruir a filogenia que os relacionam (Hillis *et al.* 1996). Essa metodologia tem várias vantagens em relação às metodologias clássicas, nas quais características morfológicas e fisiológicas são consideradas (Nei & Kumar, 2002).

A utilização de locos nucleares para estudos intraespecíficos, tem recebido menos atenção em relação ao uso do genoma mitocondrial, em animais, e cloroplastídeo, em plantas. Entretanto, estudos de sequências de introns nucleares e regiões espaçadoras dos genes rRNA (ITS e ETS) parecem promissoras para tais aplicações (Hillis *et al.* 1996).

O uso dessa genealogia gênica juntamente com a informação geográfica da população amostrada fornece um recurso para avaliar, a estrutura genética de populações, forma a base para o conhecimento da genética de populações, fornece recurso para medir fluxo gênico entre populações e para avaliar o efeito fenotípico de substituições alélicas (Hillis *et al.* 1996).

A filogeografia vem fazendo parte de alguns trabalhos, seja para fornecer suporte para decisões conservacionistas, seja para confirmar a divisão de gênero das espécies, verificar as relações filogenéticas e reconstruir a história dos possíveis eventos de dispersão, ou para inferir rotas de colonização das espécies.

3.2.1 – Análises Filogeográficas

O termo haplótipo é definido como sendo um dos vários possíveis padrões de sequência de um segmento de DNA, que difere de outros padrões alternativos por meio de mutações na sua sequência. Em estudos de filogeografia, o haplótipo é a unidade básica de análise.

Templeton *et al.* (1992) apresentaram uma explicação detalhada para a construção de redes de haplótipos usando o método da parcimônia como um modelo local finito da evolução do DNA. Este método além de estimar a rede de haplótipos, permite também estimar o número máximo de conexões parcimoniosas entre pares de sequência com 95% de probabilidade para todos os acoplamentos dos haplótipos dentro da rede.

O programa de Templeton *et al.* (1992) (TCS) tem sido extensivamente usado com dados de sítios de restrição e sequência de nucleotídeos para inferir genealogias a nível de população. O programa TCS une sequências em haplótipos e calcula as frequências dos haplótipos nas amostras. Essas frequências são usadas para estimar a relação e a ancestralidade desses haplótipos (Clement *et al.* 2000).

Templeton *et al.* (1992) formularam algumas predições com base na teoria da coalescência em relação a redes de haplótipos. Uma rede de haplótipos apresentará multifurcações, pois espera-se que haplótipos ancestrais sofram várias mutações, em tempo diferente, podendo originar vários haplótipos descendentes. É esperado que haplótipos ancestrais e haplótipos descendentes estejam presentes em uma mesma rede, visto que seria extremamente improvável que todos os indivíduos do haplótipo ancestral tenham sofrido a mesma mutação. Na formação da rede, os haplótipos de origem mais recente devem ser encontrados nas extremidades, enquanto os haplótipos ancestrais serão encontrados no interior da rede. De acordo com a distribuição geográfica, é esperado que haplótipos ancestrais se apresentem geograficamente melhor distribuídos, enquanto haplótipos recentes tenham distribuição mais restrita, visto que não teriam tido tempo suficiente para maior dispersão.

Em uma rede de haplótipos são observadas conexões entre os haplótipos, cada uma representando uma única conexão parcimoniosa, correspondendo a evento único de mutação que diferencia dois haplótipos. Nem todos haplótipos serão necessariamente amostrados em determinada investigação. Na rede, os haplótipos não amostrados e haplótipos já extintos são representados por nodos e são deduzidos entre dois pares de sequências diferentes mais próximos da rede que diferem entre si por dois ou mais eventos de mutação (Templeton *et al.* 1992).

3.3 – Região de ITS (espaçador interno transcrito)

Os genomas dos eucariotos podem apresentar grande complexidade, devido à presença de regiões espaçadoras, introns, regiões repetitivas, elementos de transposição e famílias multigênicas (Oliveira & Menck, 2004). Dentre os genes mais representativos da classe do DNA repetitivo estão os que codificam o RNA ribossômico, que constituem uma família gênica. As sequências de genes agrupados, de famílias gênicas, tendem a ser mantidas relativamente uniformes, a partir de processos coevolutivos, como a conversão gênica (Ferreira, 1996).

Os genes para RNA ribossômico (rDNA) são encontrados, em quase todos os eucariotos, em mais de 100 cópias por genoma haplóide, organizados num arranjo em tandem (Ferreira, 1996).

Três dos genes de RNA ribossomal nuclear de eucariotos estão organizados em conjuntos que inclui a pequena subunidade gênica (18S), a grande subunidade gênica (28S) e o gene 5,8S. Em adição, dois espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) se apresentam entre esses genes, um espaçador externo transcrito (ETS) na posição 5' do RNA transcrito (Palumbi, 1996) e um espaçador externo (NTS), que não é transcrito (Gorab, 2004). A Figura 3 ilustra esse cluster.

NTS	ETS	18S	ITS 1	5,8S	ITS 2	28S
-----	-----	-----	-------	------	-------	-----

Figura 3: Representação esquemática da unidade de repetição do rDNA dos eucariontes. ETS: espaçador externo; 18S: região que codifica para rRNA 18S; ITS: espaçador interno; 5,8S região que codifica para rRNA 28S; NTS: espaçador intergênico.

Vários componentes da unidade de repetição dos genes de rRNA têm sido estudados com um enfoque evolutivo, como é o caso dos genes que codificam os rRNA (18S e 28S), a região do NTS e, mais recentemente, a região que contém o ITS (Gorab, 2004).

Em geral, os genes para o rRNA são mais altamente conservados do que espaçadores transcritos, os quais, por sua vez, são mais conservados que regiões não transcritas. Assim, genes conservados são altamente similares entre táxons. Já os espaçadores transcritos apresentam baixa conservação até, dentro dos táxons (Palumbi, 1996).

Em fungos, a maioria dos estudos filogenéticos fundamentados em sequência de DNA foi baseada exclusivamente no gene ribossomal ou nas regiões espaçadoras internas transcritas (ITS) (Kausrud *et al.* 2004).

Álvarez & Wendel (2003), em seu trabalho, explicam as vantagens da utilização da região de ITS para estudos filogenéticos:

(I) herança biparental: revela casos passados de reticulação, especiação híbrida, e parentesco de poliplóides, o que não pode ser observado em genoma de organelas;

(II) universalidade: as regiões dos genes do rRNA são altamente conservadas. White *et al.* (1990), com base nessa informação, descreveram um grupo de primers que se alinham nessas regiões, sendo úteis para amplificar sequências de ITS a partir de plantas e fungos. Esses primers permitem que sequência de ITS seja mais rapidamente obtida que uma outra marca nuclear;

(III) simplicidade: devida à repetição esses são mais facilmente isolados do que locos de baixo número de cópias;

(IV) uniformidade intragenômica: famílias multigênicas podem estar sujeitos a processos de coevolução. Esse processo elimina variações da sequências dentro do genoma permitindo apenas mudanças em estado de caráter clado específico, dando forma para reconstruções filogenéticas;

(V) variabilidade intergenômica: o nível de variação da região de ITS é adequado para inferências filogenéticas em nível de espécie, gênero ou família.

(VI) baixa pressão funcional: como a região de ITS é removida durante o processamento do transcrito, ela está sujeita a baixa pressão de seleção, oferecendo preponderância de sítios de nucleotídeos que poderão evoluir essencialmente de forma neutra.

Essas vantagens explicam o fato observado por Álvarez & Wendel (2003), para os quais a grande maioria dos trabalhos de comparações em nível de gênero e abaixo desse nível, incluem dados da sequência de ITS.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Amostragem

Amostras de folhas de soja infectadas com *Phakopsora pachyrhizi* foram coletadas em campos de produção de soja de 20 localidades brasileiras. As folhas contaminadas foram embaladas e devidamente identificadas antes de serem enviadas ao laboratório de Biologia Molecular II localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, onde a pesquisa foi desenvolvida. Após o recebimento, os esporos das folhas com maior severidade de infecção foram removidos com auxílio de pincel. Das amostras que apresentavam pouca quantidade de esporos, pedaços das folhas com maior intensidade de infecção foram retirados para serem utilizados. Esses materiais foram colocados em microtubos de capacidade de 2,0ml. Em seguida, esses tubos foram identificados e o material neles contidos foi liofilizado e armazenado a -80°C.

Foram recebidas duas amostras de DNA de *Phakopsora pachyrhizi* da “Cedara Research Station” localizada em Potchefstroom, África do Sul, coletadas em dois diferentes estágios da cultura. Cada estágio foi classificado como sendo uma amostra distinta. Esse DNA foi previamente extraído na África do Sul seguindo a metodologia por nós estabelecida e que será explicada a seguir. As localidades geográficas dos locais de coleta estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1: Acessos de *Phakopsora pachyrhizi*, com seus respectivos códigos, abreviatura, latitude a longitude. A latitude e a longitude são referentes à cidade mais próxima dos pontos de coleta. (S) sul, (W) oeste, e (E) leste.

Código	Origem	Abreviação	Latitude (S)	Longitude (W)
1	África do Sul 3	AfS3-06	29°53'33"	30°28'33" (E)
2	África do Sul 4	AfS4-06	29°53'33"	30°28'33" (E)
3	Cerejeiras - RO	Cer-06	13°53'58"	59°08'51"
4	Campos de Júlio -MT	CJu-06	13°11'20"	60°48'44"
5	Alto Taquari - MT	ATa-06	18°47'39"	52°37'22"
6	Itiquira - MT	Iti-06	17°46'13"	47°06'00'
7	Palmas - TO	Pal-06	10°12'46"	48°21'37'
8	Rio Verde - GO	RVe-06	22°45'40"	47°09'15"
9	Mineiros - GO	Min-06	22°43'31"	47°38'57"
10	Chapadão do Sul - MS	CSu-06	19°20'04"	46°17'39"
11	São Gabriel do Oeste - MS	SGO-06	23°31'59"	49°14'40"
12	Guarda Mor - MG	GMo-06	18°35'34"	48°42'18"
13	Rio Paranaíba - MG	RPa-06	19°23'43"	54°33'59"
14	Tupiciguara - MG	Tup-06	17°47'53"	50°55'41"
15	Paulínia - SP	Pau-06	17°34'14"	52°32'55"
16	Piracicaba - SP	Pir-06	17°49'34"	53°16'56"
17	Taquarituba - SP	Taq-06	17°12'32"	54°09'01"
18	Londrina - PR	Lon- 06	23°08'47"	50°52'23"
19	Pitanga - PR	Pit-06	24°45'25"	51°45'39"
20	Vista Alegre - RS	VAI-06	27°22'01'	53°29'25"
21	Seberi - RS	Seb-06	27°28'41"	53°24'09"
22	Sarandi - RS	Sar-06	27°56'38"	52°55'23"

4.2 - Extração do DNA e Amplificação por PCR

O DNA genômico total foi extraído de aproximadamente 30 mg de esporos e/ou folhas infectadas, usando o protocolo de CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987), com modificações. O material foi macerado em

microtubos de capacidade de 1,5ml na presença de 600 μ l de tampão de extração CTAB: NaCl; Tris-HCl a 1M; EDTA 0,5M; CTAB 5%; e 2% de β -mercaptoetanol. O material foi homogeneizado e incubado em banho-maria a uma temperatura de 65°C, durante 15 minutos. Foram adicionados 400 μ l de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 (v:v) e em seguida os tubos foram centrifugados a 13.000rpm em centrífuga 5415D (eppendorf), por 10 minutos, para separar a fase orgânica da aquosa. Todo o sobrenadante foi transferido para microtubos de capacidade de 1,5ml, onde foram adicionados 500 μ l de isopropanol gelado por 12 horas. Em seguida os tubos foram agitados e centrifugados, para sedimentar o “pellet”. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado duas vezes com 500 μ l de etanol gelado 70%. Os tubos foram colocados em câmara de fluxo laminar, até secar o precipitado. O material foi então ressuspensionado em 30 μ l de TE (Tris-HCl a 10 mM; EDTA a 1mM, pH 8,0) contendo RNase (40 μ g/ml), e finalmente armazenado a -20°C.

Inicialmente as amplificações estavam sendo realizadas com os *primers* universais ITS4 e ITS5 de White *et al.* (1990), os mesmos *primers* utilizados para amplificar a região de ITS de isolados de *Phakopsora pachyrhizi* no trabalho de Frederick *et al.* (2002), o qual obteve fragmentos de 668pb. No entanto, esses *primers* foram capazes de amplificar não só DNA de *Phakopsora pachyrhizi*, mas também a região de ITS do genoma da soja, fornecendo amplificações de mesmo tamanho para esses dois organismos. Como o processo de obtenção de esporos também trazia material genético de soja como contaminante, não seria possível obter diferenciação eficiente da amplificação correspondente a cada um dos organismos. Portanto foi necessário desenhar iniciadores específicos para esse trabalho.

Para desenhar esses iniciadores, seqüências da região do rDNA e seus espaçadores de *Phakopsora pachyrhizi* e de *Glicine max* foram obtidas no GenBank, e em seguida alinhadas. Os iniciadores foram desenhados em regiões não conservada entre esses dois organismos, com auxílio do “Primer3 Input Program” (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>). A amplificação da região de ITS1 do genoma nuclear

foi conduzida com os pares de iniciadores ITSP5 e ITS6. Paralelamente, uma segunda reação foi conduzida com a combinação ITS 3 e ITSP3, que amplificou a região de ITS2. As posições esquemáticas da região de anelamento desses iniciadores específicos de *Phakopsora pachyrhizi* estão representadas na Figura 4.

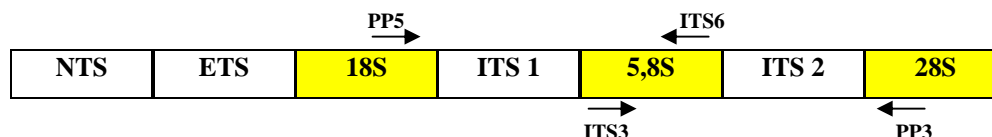


Figura 4: Representação esquemática da unidade de repetição do rDNA de *Phakopsora pachyrhizi* mostrando a região de anelamento dos primers específicos.

As amplificações foram conduzidas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), com o mesmo programa para as duas reações. As amplificações foram realizadas com um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 94°C por 1 minutos, 58°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, e 1 ciclo de extensão final de 72°C por 5 minutos.

As reações foram realizadas em um volume final de 25µl, contendo: Tris-HCl 10 mM (pH8,3); KCl 50 mM; 0,1% de tween 20; MgCl₂ a 1,5mM; cada dNTP a 0,2mM; cada iniciador a 0,5µM; 1,25µl de dimetil-sulfóxido (DMSO); 0,25U da *Taq* DNA polimerase; 9,5µl de água miliQ autoclavada e aproximadamente 60ng de DNA.

Os fragmentos amplificados foram verificados por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, contendo 0,2µg/ml de brometo de etídio. Esses fragmentos foram submetidos a uma tensão constante de 110 Volts em tampão TBE 1X (0,09M de Tris-borato e 0,002M de EDTA) por uma hora. Os fragmentos foram visualizados por meio de luz ultravioleta e suas imagens digitalizadas em um sistema de captura de imagens EagleEye II (Stratgene).

4.3 – Clonagem dos Produtos Amplificados

Os produtos de amplificação foram então clonados. Primeiramente foi feita a reação de ligação ao vetor pGEM T-Easy (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. Células de *Escherichia coli* DH5 α ultracompetentes foram transformadas por choque térmico segundo Sambrook *et al.* (1989). Para tal, 3 μ l da reação de ligação foi adicionado a 100 μ l de células ultra-competentes, que foram mantidos no gelo durante 30 minutos. Após os 30 minutos, os tubos foram incubados em banho-maria a 42°C durante 50 segundos e novamente colocados no gelo por dois minutos. Para a recuperação das células, foram adicionados 900 μ l de meio SOC (0,5% de extrato de levedura, 2% de triptona, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10mM) a 37°C e esses foram incubados em agitador a 37°C/150rpm durante uma hora. Transcorrido o tempo de crescimento, os tubos foram centrifugados em microcentrífuga 5415D (Eppendorf) a 3.500rpm durante 10 minutos. Em seguida, foram ressuspensas em 200 μ l de meio SOC, dos quais 100 μ l foram plaqueados em meio LB sólido contendo ampicilina 50 μ g/ml, 20 μ l de X-Gal 1mg e 100 μ l de IPTG 10 mM. As placas foram incubadas a 37°C por cerca de 16 horas.

Para a análise dos transformantes, colônias isoladas foram repicadas em meio sólido e analisadas por PCR. As reações foram preparadas em um volume final de 15 μ l: 1,5 μ l de tampão (KCl 0,5mM; Tris-HCl 0,2mM pH 8,0; MgCl₂ 15 μ M e 0,1% de Tween-20); cada dNTP a 0,2mM; cada iniciador a 5 μ M; 0,75 μ l de dimetil-sulfóxido (DMSO); 0,25U da *Taq* DNA polimerase; e 7,2 μ l de água ultra pura.

De cada placa contendo as colônias transformadas, foram escolhidas oito colônias brancas, as quais foram inoculadas em tubos contendo a mistura de PCR. As reações foram conduzidas em termociclador, GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), nas mesmas condições da primeira amplificação. Um período inicial de 94°C, seguida por 35 ciclos (desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 58°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 1 minuto), e um período adicional de 72°C por 5

minutos. Em seguida, os fragmentos amplificados foram verificados por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, contendo 0,2µg/ml de brometo de etídio. Os fragmentos foram visualizados por meio de luz ultravioleta e suas imagens digitalizadas em um sistema de captura de imagens EagleEye II (Stratgene).

Dos oito clones analisados por PCR, os quatro que apresentaram melhor amplificação, foram selecionados para fazer a extração do DNA plasmidial. As colônias selecionadas foram inoculadas em tubos falcon de 10ml contendo 5ml de meio LB líquido e 2,5µl de ampicilina 50µg/ml. A incubação foi feita por 16 horas a 37°C sob agitação a 180rpm. Após a incubação, as bactérias foram centrifugadas a 13.000rpm, e o DNA plasmidial contendo os fragmentos de interesse foram purificados utilizando-se o kit Wizard™ Mini Prep (Promega) conforme especificação do fabricante. Foi utilizado 1µL do DNA para dosagem em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 1X corado com brometo de etídio. A quantificação do DNA foi feita por comparação da intensidade das bandas com padrão de concentração.

4.4 – Sequenciamento

As reações de sequenciamento dos fragmentos amplificados e clonados foram realizadas pelo sequenciador automatizado, “MegaBace DNA Analysis System 500” da AMERSHAM BIOSCIENCES CORP, utilizando o iniciador universal M13 forward. O sequenciamento foi conduzido nas dependências do laboratório de Genômica, localizado no BIOAGRO (Viçosa – MG). As sequências obtidas de cada clone foram importadas para o aplicativo computacional SEQUENCHER versão 4.1.4 e submetidas a correções e edições manuais. As extremidades das sequências foram eliminadas de forma a obter uma região equivalente para todos os clones sequenciados. Finalmente, as sequências foram alinhadas com a introdução de “gaps” (quebra da continuidade da sequência de DNA), para compensar as inserções ou deleções de bases.

4.5 – Captura de dados do GenBank

Treze sequências da região do ITS de *Phakopsora pachyrhizi* foram obtidas no GenBank (*National Center for Biotechnology Information – NCBI*), oriundas do trabalho de Frederick *et al.* (2002). Essas sequências são de isolados de *Phakopsora pachyrhizi* de diferentes países, os quais são mostrados na Tabela 2.

As sequências correspondem a um fragmento compreendendo a região de ITS1, a região de 5,8S e a de ITS2, amplificadas com os *primers* ITS4 e ITS5, com tamanho final de 668 bases. Para possibilitar análises comparativas entre aquelas disponíveis no GenBank e aquelas obtidas no presente trabalho, a região de 5,8S foi excluída.

Tabela 2: Sequências obtidas no GenBank, com seus respectivos códigos das localidades (entre parênteses), abreviaturas utilizadas nesse trabalho e ano de obtenção de cada amostra.

Acessos	Abreviação	Ano
Austrália 72-1 (AF333488)	Aus721	1972
Austrália 79-1 (AF333489)	Aus791	1979
Hawaii 95 (AF333490)	Haw95	1995
Hawaii 98 (AF333491)	Haw98	1998
India 73-1 (AF333492)	Ind731	1973
Indonésia 72-1 (AF333493)	Indo721	1972
Zimbawe (AF333499)	Zimbw	2000
TM Zimbabwe (AF333500)	TM Zim	2000
Philippines 77-1 (AF333494)	Pji771	1977
Taiwan 80-1 (AF333496)	Taiw801	1980
Taiwan 80-2 (AF333497)	Taiw802	1980
Taiwan 72-1 (AF 333495)	Taiw721	1972
Thailand (AF333498)	Thail	1976

4.6 – Análises Estatísticas

Foram estimadas duas redes de haplótipos separadamente: uma com as sequências obtidas da região ITS1, e a outra com as sequências obtidas da região ITS2.

O programa TCS (versão 1.13), desenvolvido por Clement *et al.* (2000), foi utilizado para evidenciar as relações genealógicas entre as sequências obtidas. Esse programa aplica a estatística da parcimônia pelo algoritmo desenvolvido por Templeton *et al.* (1992). Na estimação da rede de haplótipos, cada uma das bases (A, T, G e C) 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.

O programa ARLEQUIN (versão 3.1) foi utilizado para estimar a estrutura genética de cada localidade amostrada, ou seja, a diversidade genética entre e dentro das localidades, pela análise de variância molecular (AMOVA). A análise de variância molecular, estima a estrutura genética usando informações do conteúdo alélico dos haplótipos, como também as suas frequências (Excoffier *et al.* 1992).

O programa ARLEQUIN foi também utilizado para calcular a diversidade gênica e a diversidade nucleotídica, de *Phakopsora pachyrhizi*, de cada localidade brasileira amostrado. A diversidade gênica (h) foi calculada por:

$$h = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k x_i^2 \right)$$

onde, x_i é a frequência na amostra do i -ésimo haplótipo, n é o número de cópias gênicas na amostra, e k é o número de haplótipos (Nei, 1987).

A diversidade nucleotídica (π) (Nei & Li 1979), definida como número médio de diferenças nucleotídicas por sítio em comparações entre pares de sequência de DNA, foi dada por:

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum_{ij} x_i x_j d_{ij}$$

onde, n é o número de sequências examinadas, x_i é a frequência do i -ésimo alelo na amostra, e d_{ij} é o número de diferenças nucleotídicas ou substituições por sítio entre os i -ésimo e j -ésimo alelos.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Haplótipos da região de ITS

As sequências de DNA da região de ITS1 do DNA genômico e *Phakopsora pachyrhizi* foram obtidos a partir de amostras oriundas de 21 localidades. Para cada localidade, cerca de quatro clones foram sequenciados. Essas sequências foram comparadas com 13 sequências obtidas no GenBank, totalizando 96 sequências. Já para a região de ITS2, 20 localidades foram amostradas, da mesma forma foi sequenciado cerca de quatro clones por localidade e essas comparadas com as sequências do GenBank, totalizando 86 sequências. Todas as sequências obtidas nesse trabalho foram provenientes de *Phakopsora pachyrhizi*, nenhuma sequência de *Phakopsora meibomiae* foi observada, revelando a prevalência da ferrugem asiática nas áreas produtoras de soja no Brasil.

Alinhamento das 96 sequências de ITS1 revelou a existência de 21 haplótipos, que foram definidos por 18 substituições de base e três indels de uma base cada. O tamanho da sequência consenso obtida para ITS1 foi de 254 bases. Por outro lado, alinhamento das 86 sequências de ITS2 mostrou 17 haplótipos, que foram definidos por 13 substituições de base e seis indels. Os tamanhos dos indels variaram entre uma e seis bases. O tamanho da sequência consenso obtida para ITS2 foi de 241 bases. A Figura 5 mostra os sítios polimórficos de ITS1, em relação à sequência do haplótipo A, e de ITS2, em relação à sequência do haplótipo A'. As sequências destes dois haplótipos (A e A') foram tomadas como sequências de referência para apontar as mutações que foram encontradas no presente estudo, uma vez que estes foram os haplótipos mais frequentes em cada uma das regiões genômicas, como será mostrado a seguir.

Os resultados indicam que as regiões de ITS1 e ITS2 foram capazes de diferenciar indivíduos de *Phakopsora pachyrhizi*, ou seja, mostraram que possuem variação intra-específica. Kausserud *et al.* (2004) mencionam que

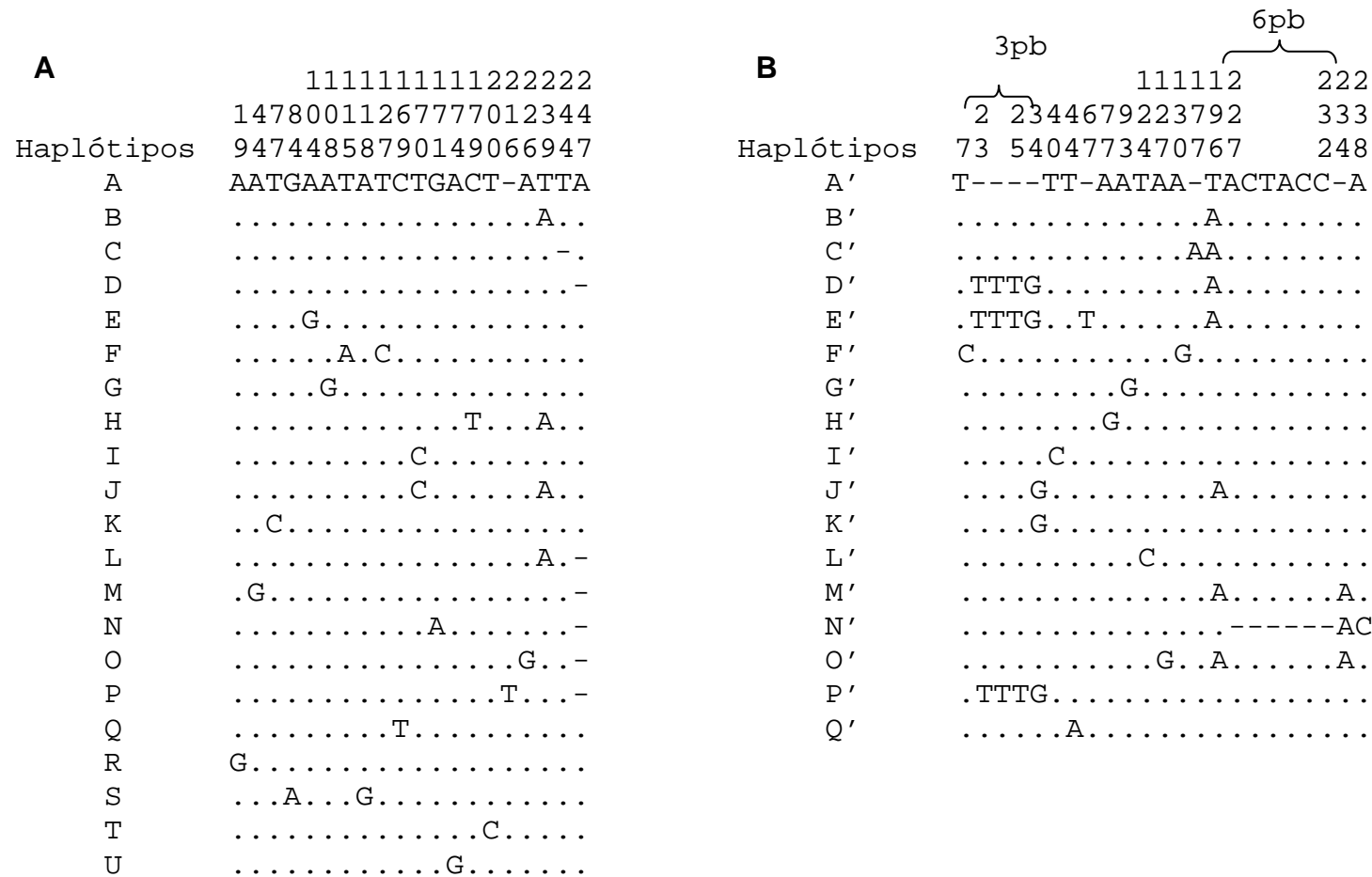


Figura 5: Sequências alinhadas das regiões de ITS1 (A) e ITS2 (B) em *Phakopsora pachyrhizi*. Somente as posições que diferem do haplótipo A em ITS1 e A' em ITS2 são demonstradas. Os números, lidos na vertical, se referem à posição da mutação. Cada ponto indica semelhança em relação à sequência do haplótipos A ou A'. Os travessões indicam “gaps” que foram introduzidos para compensar a presença de “indels”.

apesar da existência de poucos estudos filogeográficos micológicos, a região de ITS representa a marca mais comumente usada para explorar filogenia intra- e interespecífica em fungos. Como exemplo de outros Basidiomicetos que tiveram sua diversidade intra-específica estudada a partir da região de ITS estão: *Panellus stypticus*, um fungo que habita ramos mortos; *Pleorus tuberregium*, um cogumelo utilizado na alimentação humana; e *Schizophyllum commune*, um fungo que causa micose em humanos (Kausrud *et al.* 2004).

Grasso *et al.* (2006), trabalhando também com fungos patogênicos, comentam que essa ampla utilização da sequência de ITS para estudos filogenéticos entre e dentro de espécies se deve ao fato de que ITS evolui muito mais rapidamente que outras regiões. ITS pode apresentar variabilidade de sequência entre espécies dentro de um gênero ou entre isolados dentro de uma mesma espécie. Outra vantagem em se trabalhar com a região de ITS, como mencionado por Perneel *et al.* (2006), é pela sua alta repetibilidade no genoma, fornecendo maior sensibilidade em relação a um gene de cópia única.

Por outro lado, Bayon *et al.* (2006), ao estudarem a diversidade genética de *Sphaerellopsis filum*, um micoparasita de fungos, concluíram que, apesar das informações da sequência de ITS serem extremamente úteis em examinar a relação filogenética entre organismos relacionados, elas têm limitada utilidade em nível de população.

Álvarez & Wendel (2003), ao discutirem as vantagens da utilização de ITS para estudos de diversidade genética, citaram o fato que, por essa sequência ser removida durante o processamento do transcrito, essa sofre pouca pressão de seleção, evoluindo de forma neutra.

5.2 – Compartilhamento de haplótipos de ITS1

A Tabela 3 mostra a distribuição dos 21 haplótipos de ITS1 na África do Sul, nas 19 localidades brasileiras e nas 13 sequências obtidas do

GenBank. O haplótipo de maior frequência foi o haplótipo “A”, cuja sequência foi identificada em 42 das 96 sequências obtidas, e esteve presente em 27 dos 34 localidades investigadas, sendo 21 localidades amostradas para esse trabalho e 13 sequências obtidas no GenBank. As sequências dos haplótipos “B” e “D” foram obtidas 24 e 12 vezes, e estiveram presentes em 16 e seis localidades, respectivamente. Dezoito haplótipos foram *singletons*, isto é, foram identificados apenas uma única vez, e por isto, foram exclusivos da localidade.

De acordo com as predições de Templeton *et al.* (1992), é esperado que haplótipos ancestrais sejam mais frequentes e mais amplamente distribuídos. As altas frequências observadas para os haplótipos “A” e “B” podem ser interpretadas como sendo um indicativo da ancestralidade desses dois haplótipos em relação aos demais haplótipos identificados no Brasil. Os haplótipos “A” e “B”, que poderiam ser considerados ancestrais no Brasil, também são os dois haplótipos mais abundantes entre as sequências obtidas em amostras provenientes da África e Ásia. Estes resultados corroboram a hipótese de que o fungo *Phakopsora pachyrhizi* encontrado no Brasil seria descendente direto de genótipos originários do continente africano ou asiático.

A maioria das localidades brasileiras apresentou três haplótipos, sendo que pelo menos um deles é *singleton*. Nas amostras do fungo das localidades de Alto Taquari (MT) e Pitanga (PR), por exemplo, foi observada a presença de quatro haplótipos diferentes, sendo que cada localidade apresentou dois *singletons*. Já em Chapadão do Sul (MS), apenas um haplótipo foi identificado, mostrando que nesse caso não houve diversidade dentro de acesso. Na África do Sul, cada amostra representa um estágio distinto do desenvolvimento da lavoura. A amostra 1 foi coletada no início do processo de infecção e apresentou dois haplótipos, “A” e “B”. A amostra 2 foi obtida tardiamente e revelou a presença dos haplótipos “A”, “D” e “T”. De modo conjunto, estes resultados são indicativos de que possivelmente a diversidade genética de *Phakopsora pachyrhizi* deve ser bastante elevada quando analisada dentro de acesso.

5.3 – Compartilhamento de haplótipos em ITS2

A distribuição dos 17 haplótipos de ITS2 entre as 33 localidades é mostrada na Tabela 4. Dessas localidades, duas se concentram na África do Sul e 18 do Brasil. Também foram obtidas 13 sequências no GenBank. O haplótipo A', haplótipo de maior frequência, foi amostrado em 16 localidades, sendo observado em 32 das 86 sequências analisadas. O haplótipo B' foi observado em 11 localidades, D' em oito, E' em cinco, J' e M' em duas localidades cada. Os outros haplótipos foram *singletons* sendo, portanto exclusivos da localidade onde foram observados.

Da mesma forma que para ITS1, os haplótipos mais frequentes para ITS2, A' e B', podem ser interpretados como os haplótipos ancestrais em relação aos demais haplótipos observados no Brasil. No entanto, diferentemente da análise conduzida em ITS1, apenas A' foi identificado nos acessos oriundos de fora do Brasil. Já o haplótipo D', identificado em apenas um acesso no Brasil, foi o mais abundante entre as sequências obtidas em amostras provenientes da África e Ásia. Estes resultados podem ser interpretados como um indício de que *Phakopsora pachyrhizi* não tenha chegado ao Brasil uma única vez, mas pode ter tido pelo menos duas introduções independentes.

Yorinori (2004), ao estudar a variabilidade genética de *Phakopsora pachyrhizi* no Brasil, observou a ocorrência de novos isolados em regiões onde o fungo não tinha sido registrado em anos anteriores, como por exemplo em regiões do Cerrado. Ao comparar os isolados de *Phakopsora pachyrhizi*, por teste de reação, foi observada uma grande similaridade entre esses novos isolados provenientes do Cerrado e isolados do Zimbábue. A similaridade entre esses isolados fortaleceu a hipótese que novos isolados podem estar sendo continuamente trazidos pelo vento, vindos da África.

Em relação a número de haplótipos por localidade, resultados semelhantes aos de ITS1 foram observados para ITS2. A maioria das localidades brasileiras apresentou mais de um haplótipo. Sendo que, novamente, Alto Taquari (MT) e Pitanga (PR) apresentaram quatro

Tabela 4: Distribuição dos 17 haplótipos referentes a ITS2 entre as 86 sequências analisadas. N_i é o número de clones sequenciados por localidade. Hlo indica o número de haplótipos encontrado em cada localidade.

Cód.	Localidades	Haplótipos ITS2																	Hlo	
		N	A'	B'	C'	D'	E'	F'	G'	H'	I'	J'	K'	L'	M'	N'	O'	P'		Q'
1	África do Sul 1	3	2					1												2
2	África do Sul 2	3	2						1											2
3	Cerejeiras - RO	3	2	1																2
4	Campos de Júlio -MT	4	1	2						1										3
5	Alto Taquari - MT	4		1							1	1	1							4
6	Itiquira - MT	4	4																	1
7	Palmas - TO	3	1	1						1										3
8	Rio Verde - GO	4									4									1
9	Mineiros - GO	4		4																1
10	Chapadão do Sul - MS	3	1	2																2
11	São Gabriel do Oeste - MS	0																		0
12	Guarda Mor - MG	0																		0
13	Rio Paranaíba - MG	4	3														1			2
14	Tupiciguara - MG	2			2															1
15	Paulínia - SP	4	1	3																2
16	Piracicaba - SP	4	1	2															1	3
17	Taquarituba - SP	4	4																	1
18	Londrina - PR	4				2								2						2
19	Pitanga - PR	4	1	1											1	1				4
20	Vista Alegre - RS	4	3	1																2
21	Seberi - RS	4	3											1						2
22	Sarandi - RS	4	2	2																2
	GenBank	13	1			7	5													3
	Total	86	32	20	1	9	5	1	1	1	1	5	1	1	3	1	1	1	1	

haplótipos diferentes. As amostras da África do Sul, que foram obtidas da mesma localidade mas em estágio distinto do desenvolvimento da lavoura, apresentaram dois haplótipos diferentes em cada amostra. A amostra 1 apresentou os haplótipos A' e F' e amostra 2 revelou a presença dos haplótipos A' e G'. Estes resultados reforçam os indicativos da alta diversidade genética de *Phakopsora pachyrhizi* dentro de localidades.

A diversidade genética observada dentro dos acessos confirma a hipótese de Hartman *et al.* (2004), quando mencionam que a maioria dos isolados e/ou, populações de campo de *Phakopsora pachyrhizi* constituem uma mistura complexa de diversos haplótipos. Uma alta diversidade dentro de localidade também foi observada por Yamaoka *et al.* (2002), ao investigarem a diversidade genética de *Phakopsora pachyrhizi* a partir do estudo de raças. Estes autores observaram que muitas raças poderiam estar presente em um área específica e também em um mesmo cultivar em um dado campo de soja.

5.4 – Estrutura de populações

O programa ARLEQUIN (versão 3.1) foi utilizado para estimar a estrutura genética das localidades brasileiras, pela análise de variância molecular (AMOVA). A diversidade genética entre e dentro das localidades está representada na Tabela 5.

A análise de variância molecular atribuiu que a maior parte da diversidade genética estaria dentro das localidades, sendo de 88,52% para ITS1, e 71,27% para ITS2. Esse elevado valor de diversidade dentro das localidades é explicado pela alta quantidade de haplótipos encontrados em cada localidades. Como já observado, na maioria das localidades foram identificados três haplótipos diferentes, dentre os quatro clones sequenciados.

Tabela 5: Análise de variância molecular (AMOVA): variação atribuída para diferenças entre e dentro das localidades onde foram amostrados esporos *Phakopsora pachyrhizi*.

Fontes de Variação	GL	Soma dos quadrados	Componente de Variância	Varição (%)
ITS1				
Entre localidades	18	17,740	0,08457	11,48
Dentro de localidades	56	36,500	0,65179	88,52
Total	74	52,240	0,76636	
ITS2				
Entre localidades	17	19,434	0,18446	28,73
Dentro de localidades	49	22,417	0,45748	71,27
Total	66	41,851	0,64194	

Esse grau de diversidade genética poderia ser explicado pela sua ampla distribuição geográfica, e pela ampla variedade de hospedeiros. Perneel *et al.* (2006), ao investigarem a diversidade genética de *Pythium myriotylum*, causador da podridão da raiz de plantas, observaram a correlação entre mutação na região de ITS desse fungo e adaptação aos hospedeiros.

A diversidade genética entre as localidades foi de 11,48% para ITS1, e 28,73% para ITS2. Como observado nas tabelas 4 e 5, os haplótipos mais frequentes foram compartilhados por praticamente todas as localidades, explicando essa baixo valor de diversidade entre as localidades.

Esses resultados poderiam ser influenciados pelo tamanho da amostra já que, de cada localidade sequências de apenas quatro clones foram analisadas. No entanto, Wang *et al.* (2006), ao estudarem a filogenia de *Tuber indicum*, cogumelo que vive em simbiose com árvores hospedeiras, analisaram no máximo cinco indivíduos por população. Esses autores concluíram que, como as análises foram feitas em dois genes diferentes e os resultados foram congruentes, maior amostragem não afetaria nos resultados observados. Kasuga *et al.* (2003), ao investigarem a

filogeografia do fungo patogênico *Histoplasma capsulatum*, causador de micose em mamíferos, comentaram que o tamanho da amostragem não afetaria diretamente a diversidade genética observada.

Como o principal objetivo desse trabalho se refere ao estudo da história evolutiva de *Phakopsora pachyrhizi* no Brasil, o aumento desse número de sequências por localidade, não seria informativo, visto que a probabilidade de que as redes obtidas por esse trabalho sofressem alterações significativas seriam muito pequenas. De fato, poderiam ser observados novos haplótipos, e mais haplótipo por localidade, mas as conclusões em relação à história seriam a mesma.

O programa ARLEQUIN (versão 3.1) também foi utilizado para estimar a diversidade gênica e a diversidade nucleotídica das localidades amostradas no Brasil (Tabela 6). A diversidade gênica é uma medida da variabilidade genética dentro da população, a qual depende apenas das frequências alélicas. Já a diversidade nucleotídica, é usada para medir o grau de polimorfismo dentro da população (Nei & Kumar, 2000).

Como a diversidade gênica depende apenas da frequência alélica, os valores dessa diversidade resultaram em um determinado padrão, tanto para a região de ITS1, quanto para ITS2. Todas as localidades que apresentaram a mesma proporção de haplótipos, independente de qual haplótipo, tiveram o mesmo valor de diversidade gênica. Por exemplo, todas as localidades em que das quatro sequências analisadas duas eram referentes a um determinado haplótipo e as outras duas a um outro haplótipo, tiveram a diversidade gênica de 0,6667 (Tabela 6).

A diversidade gênica variou de 0 (Chapadão do Sul) a 1 (Alto Taquari). Esse valor de 0 para a diversidade gênica foi observado nas localidades onde foi identificado apenas um haplótipo, não havendo, portanto diversidade. E o valor 1 foi observado nas localidades em que todos os haplótipos foram diferentes, ou seja, alta diversidade gênica dentro da localidade.

Para calcular a diversidade nucleotídica é levado em consideração o número total de alelos, a frequência desses alelos na população, como também o número de diferenças nucleotídicas ou substituições por sítio entre os alelos (Nei & Kumar, 2000).

Tabela 6: Diversidade gênica e diversidade nucleotídica de *Phakopsora pachyrhizi* nas localidades amostradas, estimadas a partir das regiões de ITS1 e ITS2.

Código	Localidades	ITS 1		ITS 2	
		Diversidade gênica	Diversidade de nucleotídeos	Diversidade gênica	Diversidade de nucleotídeos
3	Cerejeiras	0.5000 +/- 0.2652	0.001992 +/- 0.002470	0.6667 +/- 0.3143	0.002899 +/- 0.003615
4	Campos de Júlio	0.8333 +/- 0.2224	0.006640 +/- 0.005786	0.8333 +/- 0.2224	0.005072 +/- 0.004818
5	Alto Taquari	1.0000 +/- 0.1768	0.010624 +/- 0.008461	1.0000 +/- 0.1768	0.007937 +/- 0.006776
6	Itiquira	0.8333 +/- 0.2224	0.009259 +/- 0.007545	0.0000 +/- 0.0000	0.000000 +/- 0.000000
7	Palmas	0.5000 +/- 0.2652	0.005976 +/- 0.005333	1.0000 +/- 0.2722	0.005797 +/- 0.005956
8	Rio Verde	1.0000 +/- 0.2722	0.007968 +/- 0.007512	0.0000 +/- 0.0000	0.000000 +/- 0.000000
9	Mineiros	0.5000 +/- 0.2652	0.007968 +/- 0.006684	0.0000 +/- 0.0000	0.000000 +/- 0.000000
10	Chapadão do Sul	0.0000 +/- 0.0000	0.000000 +/- 0.000000	0.6667 +/- 0.3143	0.002899 +/- 0.003615
11	São Gabriel do Oeste	0.5000 +/- 0.2652	0.001992 +/- 0.002470	-	-
12	Guarda-Mor	0.8333 +/- 0.2224	0.003984 +/- 0.003947	-	-
13	Rio Paranaíba	0.8333 +/- 0.2224	0.004648 +/- 0.004415	0.5000 +/- 0.2652	0.004310 +/- 0.004270
14	Tupiciguara	0.8333 +/- 0.2224	0.004648 +/- 0.004415	0.0000 +/- 0.0000	0.000000 +/- 0.000000
15	Paulínia	0.8333 +/- 0.2224	0.003984 +/- 0.003947	0.5000 +/- 0.2652	0.002174 +/- 0.002695
16	Piracicaba	0.5000 +/- 0.2652	0.003984 +/- 0.003947	0.8333 +/- 0.2224	0.005072 +/- 0.004818
17	Taquarituba	0.6667 +/- 0.2041	0.002656 +/- 0.002981	0.0000 +/- 0.0000	0.000000 +/- 0.000000
18	Londrina	0.8333 +/- 0.2224	0.007968 +/- 0.006684	0.6667 +/- 0.2041	0.008621 +/- 0.007232
19	Pitanga	1.0000 +/- 0.1768	0.009960 +/- 0.008019	1.0000 +/- 0.1768	0.014493 +/- 0.011157
20	Vista Alegre	0.6667 +/- 0.2041	0.002656 +/- 0.002981	0.5000 +/- 0.2652	0.002174 +/- 0.002695
21	Seberi	0.6667 +/- 0.2041	0.002656 +/- 0.002981	0.5000 +/- 0.2652	0.004348 +/- 0.004307
22	Sarandi	-	-	0.6667 +/- 0.2041	0.002899 +/- 0.003253

Para a diversidade nucleotídica, localidades que apresentaram a mesma quantidade de haplótipo não tiveram necessariamente o mesmo valor, já que essa estimativa também leva em consideração a quantidade de mutação entre esses haplótipos. Por exemplo, as localidades Palmas e São Gabriel do Oeste (ITS1) tiveram a mesma proporção de haplótipos (3:1) tendo, portanto, o mesmo valor de diversidade gênica (0,500). No entanto, a amostra de São Gabriel do Oeste teve diversidade nucleotídica de apenas 0,0019, enquanto a de Palmas teve de 0,0059 (Tabela 6). Como observado na Figura 5, entre os dois haplótipos identificados na amostra de São Gabriel do Oeste ocorreu um evento único de mutação, já os haplótipos identificados na amostra de Palmas se diferenciaram por três eventos de mutação, explicando essa diferença de diversidade nucleotídica.

Os valores de diversidade nucleotídica variaram de 0, localidades onde foi observada apenas um haplótipo, à 0,0144 em Pitanga (ITS2) e 0,0106 em Alto Taquari (ITS1). Portanto, a diversidade nucleotídica foi maior nas localidades que apresentarem maior quantidade de haplótipos e que entre esses haplótipos foi observado maior número de mutação, ou seja, maior divergência entre os nucleotídeos.

5.5 – Redes de haplótipos

A rede de haplótipos foi gerada de acordo com o método proposto por Templeton *et al.* (1992), utilizando o aplicativo computacional TCS (versão 1.13). Cada uma das quatro bases (A, T, G e C) foi considerada como um caráter, e as inserções ou deleções foram consideradas como um quinto caráter, independente do tamanho do “indel”.

Para a rede de haplótipos de ITS1 e também para ITS2, o número máximo estimado de conexões parcimoniosas entre pares de sequências, com 95% de probabilidade para todos os acoplamentos, foi de seis eventos de mutação. Esse valor indica que a divergência máxima aceitável é no máximo seis eventos de mutação para que os haplótipos sejam agrupados em uma mesma rede. Caso contrário, ou seja, esses haplótipos seriam alocados em redes diferentes. Formação de duas redes indica que os indivíduos investigados pertencem a táxons muito distintos e a formação de

uma única rede indica que se trata de táxons muito próximos ou um único táxon. Esse número máximo de conexões parcimoniosas está relacionado ao tamanho da sequência dos haplótipos, portanto quanto maior for a sequência de nucleotídeos, maior será o número máximo de conexões parcimoniosas entre dois haplótipos vizinhos.

Uma única rede contendo todos os 21 haplótipos foi obtida para a região de ITS1, a qual pode ser observada na Figura 6. Essa rede de haplótipos apresentou dois “loops” (haplótipos com mais de uma origem possível), detectando ambigüidade na origem de alguns haplótipos. O procedimento de estimação detectou cinco nodos (representados por círculos menores) nos quais, nenhuma das 96 sequências puderam ser alocadas. De acordo com Templeton (1998), esses nodos representam haplótipos intermediários, que são inferidos entre dois haplótipos vizinhos mais próximos em uma rede, e que diferem por dois ou mais eventos de mutação. Esses nodos se referem à haplótipos extintos, ou haplótipos não amostrados. As barras de conexão observadas entre dois haplótipos vizinhos representam um evento único de mutação.

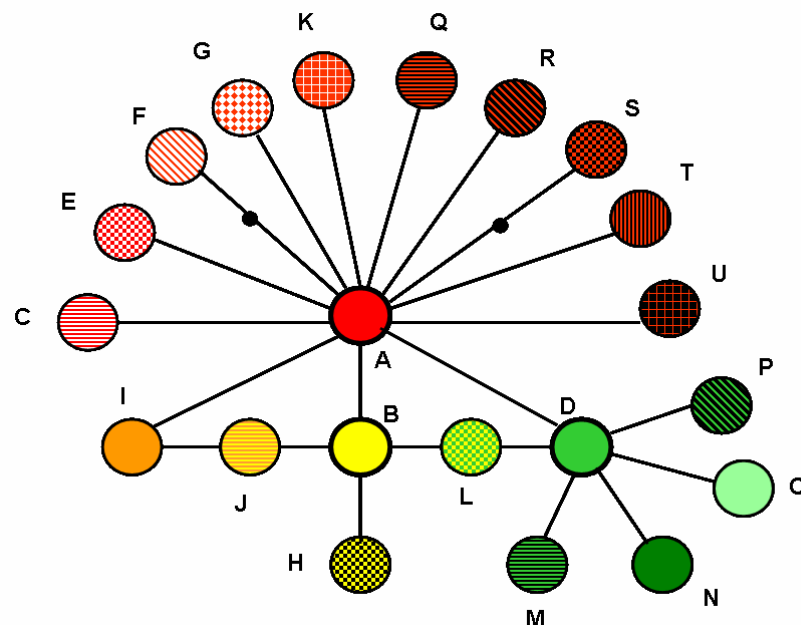


Figura 6: Rede de haplótipos baseada em sequência da região de ITS1 do genoma nuclear de *Phakopsora pachyrhizi*. A rede foi obtida pelo aplicativo computacional TCS (Clement *et al.* 2000). As letras representam os haplótipos descritos na tabela 3.

Para a região de ITS2 foi obtida uma outra rede de haplótipos, representada na Figura 7, com as 83 sequências analisadas de *Phakopsora pachyrhizi* em 17 haplótipos. Essa rede de haplótipos apresentou três “loops” mostrando novamente ambigüidade na origem de alguns haplótipos. Foi observada a presença de quatro nodos interiores (representados por círculos menores), nos quais nenhuma das 86 sequências foi alocada, sugerindo serem estes haplótipos não amostrados ou já extintos.

De acordo com as predições de Templeton *et al.* (1992), é esperado que haplótipos ancestrais ocupem o centro da rede, e que haplótipos descendentes se encontrem nas pontas da rede. Na rede obtida para ITS1, os haplótipos mais centrais foram “A” e “B”. Para a rede de ITS2 os haplótipos A’ e B’ foram os centrais. Esses haplótipos mais centrais da rede foram os mais frequentes, como já observado nas tabelas 4 e 5, reforçando o indício da ancestralidade desses haplótipos.

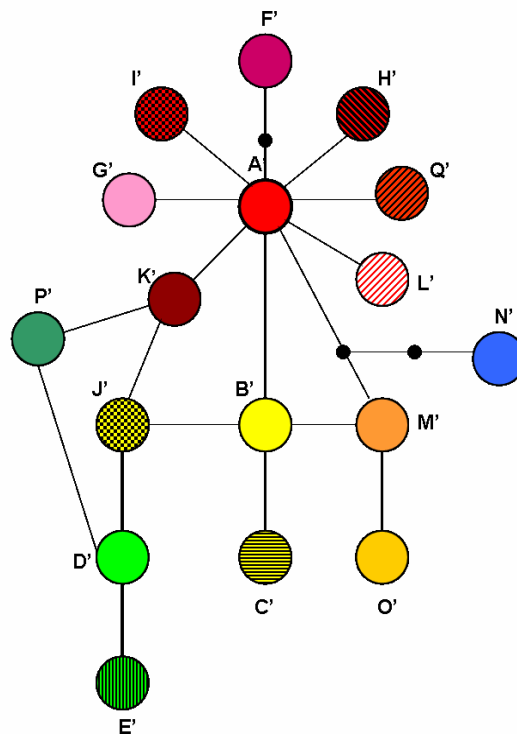


Figura 7: Rede de haplótipos baseada em sequências da região de ITS2 do genoma nuclear de *Phakopsora pachyrhizi*. A rede foi obtida pelo aplicativo computacional TCS (Clement *et al.* 2000) As letras representam os haplótipos descritos na tabela 4.

Os haplótipos mais centrais da rede apresentaram multifurcações para haplótipos que ocuparam as pontas da rede. É esperado que haplótipos centrais apresentem multifurcações, pois espera-se que estes haplótipos sofram várias mutações, em tempos diferentes, podendo originar vários haplótipos descendentes (Templeton *et al.* 1992). Os haplótipos que ocuparam as pontas da rede são os recentes, sendo esse indício reforçado pelo fato da maioria desses haplótipos terem sido *singletons*.

5.6 – Distribuição geográfica de haplótipos de ITS1

O mapa do Brasil e um mapa dos continentes mostrando a distribuição geográfica dos haplótipos de ITS1, averiguados nesse estudo, são representados na Figura 8. A Figura 8C mostra a rede de haplótipos de ITS1, utilizada como referência.

Na Figura 8A pode ser observado que os haplótipos “A” e “B” estiveram presentes em todas as localidades amostradas, sendo os haplótipos mais frequentes. O haplótipo “A” foi amostrado pela primeira vez em 1972, na Indonésia e na Austrália, já o haplótipo “B” foi amostrado na Austrália pela primeira vez, no ano de 1979. Os demais haplótipos observados neste mapa, “D” e “T”, foram observados em uma localidade da África do Sul, e que foi amostrada recentemente.

A Figura 8B mostra a distribuição geográfica dos 21 haplótipos de ITS1 nas localidades brasileiras. Nesse mapa, pode ser observado que os haplótipos “A” e “B” tiveram uma ampla distribuição geográfica, estando presentes em quase todas as localidades amostradas. O haplótipo “D” também apresentou uma ampla distribuição entre as localidades brasileiras. Já os outros haplótipos foram observados em apenas uma localidade cada. De acordo com a teoria da coalescência (Avice, 2000; Templeton *et al.* 1992) é esperado que haplótipos ancestrais se apresentem geograficamente mais espalhados, enquanto haplótipos recentes tenham uma distribuição mais restrita. Assim sendo, a distribuição observada na Figura 8 reforça os indícios já mencionados, que os haplótipos “A” e “B” provavelmente seriam

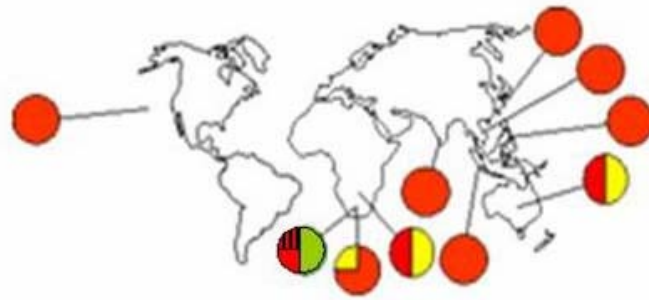
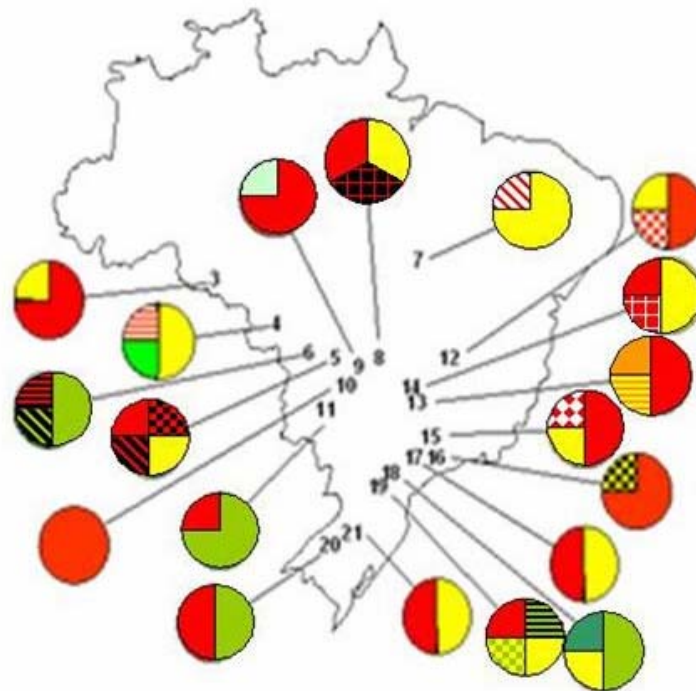
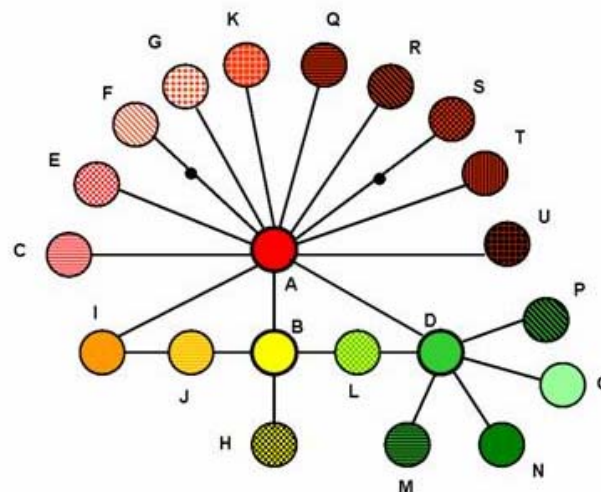
A**B****C**

Figura 8: Distribuição geográfica de 21 haplótipos de ITS1 de *Phakopsora pachyrhizi*. (A) Distribuição dos haplótipos nas localidades da África do Sul e dos obtidos no GenBank. (B) Distribuição dos haplótipos nas localidades brasileiras. (C) Rede de haplótipos de ITS1, usada como referência.

haplótipos ancestrais, e que haplótipos de distribuição mais restrita seriam haplótipos descendentes.

5.7 – Distribuição geográfica de haplótipos de ITS2

A Figura 9 mostra mapas representando a distribuição geográfica dos haplótipos de *Phakopsora pachyrhizi*, em relação a ITS2, entre as localidades amostradas. A rede de haplótipos é mostrada na Figura 9C como referência.

Como pode ser observado na Figura 9A, os haplótipos mais frequentes nas localidades África e Ásia foram D' e E'. O haplótipo E' foi observado na amostragem no ano de 1972 na Indonésia, até o ano de 1980 no Taiwan. O haplótipo D' foi observado nas amostragens desde 1972. Os haplótipos A', F' e G' foram identificados apenas na África em localidades amostradas mais recentemente (2006).

Nas localidades brasileiras (Figura 9B), os haplótipos mais frequentes foram os haplótipos A' e B', sendo identificados em praticamente todas as localidades amostradas. Esses resultados, e o fato desses dois haplótipos serem observados no centro da rede, indicam que esses são haplótipos ancestrais no Brasil. Já a distribuição observada na Figura 9A, indica que provavelmente os haplótipos mais ancestrais nestes continentes seriam os haplótipos D' e E'. Esses só teriam ocupado as pontas da rede pelo fato da amostragem nesses continentes ter sido baixa.

Como para ITS1, os haplótipos de ITS2 que ocuparam as pontas da rede apresentaram uma distribuição restrita, sendo observados em apenas uma localidade cada. Esse fato apóia o indicativo de que esses sejam haplótipos recentes, derivados do haplótipos de ampla distribuição.

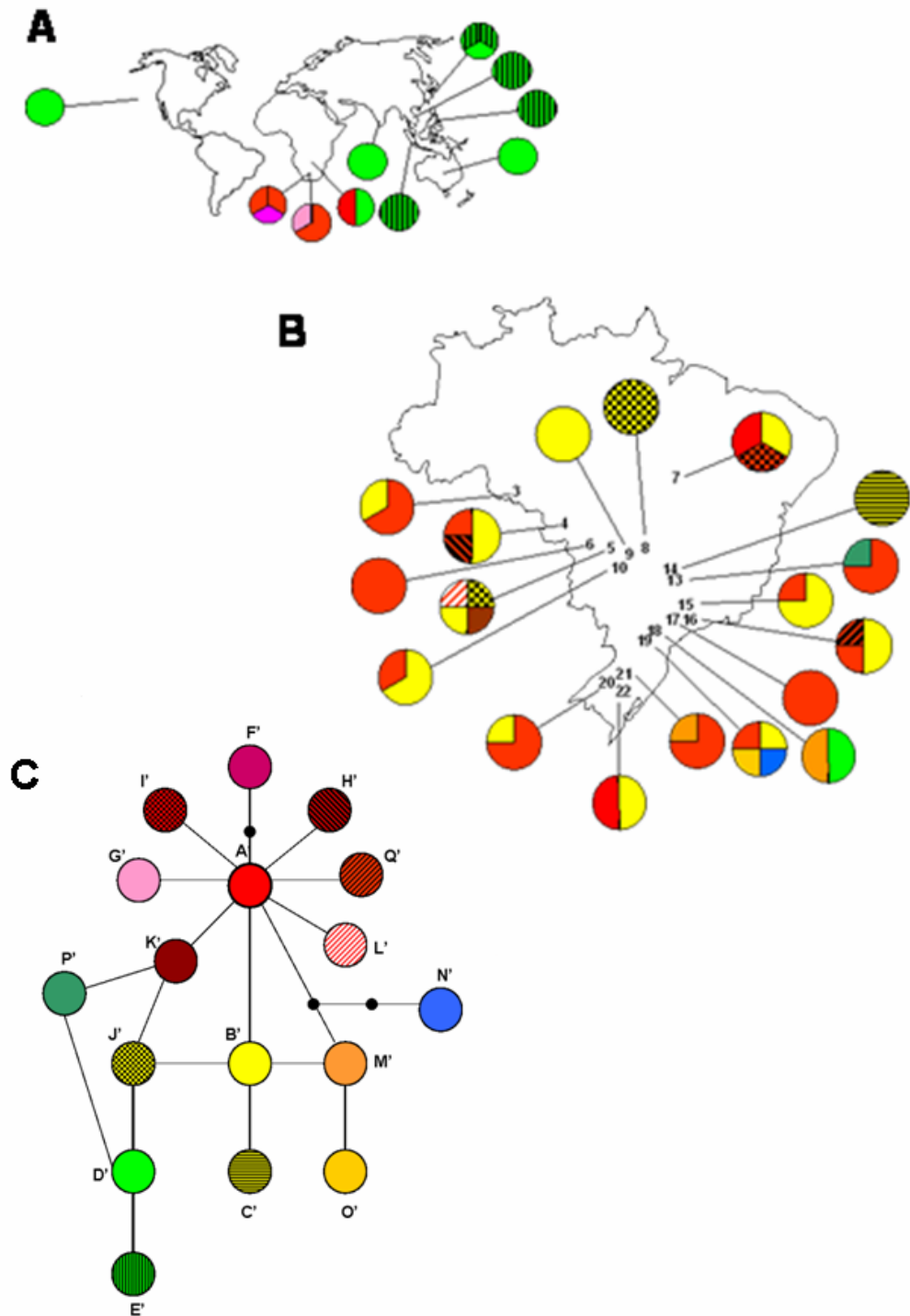


Figura 9: Distribuição geográfica de 17 haplótipos de ITS2 de *Phakopsora pachyrhizi*. (A) Distribuição dos haplótipos nas localidades da África do Sul e dos obtidos no GenBank. (B) Distribuição dos haplótipos nas localidades brasileiras. (C) Rede de haplótipos de ITS1, usada como referência.

5.8 – Migração histórica e distribuição atual da espécie

Como pôde ser observado, os haplótipos “A” e “B” de ITS1 são haplótipos ancestrais. O haplótipo “A” foi observado nas localidades amostradas desde 1972 (Indonésia), provenientes de regiões onde *Phakopsora pachyrhizi* é endêmica. Já o haplótipo “B” foi identificado na Austrália do ano de 1979. Estes haplótipos provavelmente migraram para a África e em seguida, para o Brasil sendo, portanto dois haplótipos ancestrais no Brasil. A ancestralidade desses dois haplótipos explicaria sua ampla distribuição geográfica e a elevada quantidade de haplótipos descendentes observada no Brasil. A distribuição observada do haplótipo “D” serve como um indício de que a mutação em “A” que o originou ocorreu recentemente na África, sendo disperso para o Brasil mais recentemente que “A” e “B”.

Em ITS2, o haplótipo E’ apresentou maior frequência entre as localidades amostradas anteriormente, sendo indicativo de que esse seja um haplótipo ancestral. O haplótipo D’, que também foi identificado na Ásia e Austrália, provavelmente migrou para a África sendo observada nas localidades amostradas no ano de 2000. Na África o haplótipo D’ provavelmente teria sofrido mutações originando o haplótipo A’, e esse provavelmente foi o primeiro haplótipo a chegar ao Brasil, explicando sua ampla distribuição geográfica e a alta quantidade de haplótipos descendentes. O haplótipo D’ foi observado em apenas uma localidade no Brasil, evidenciando que esse haplótipo tenha chegado recentemente no Brasil. Já o haplótipo E’ não foi identificado em nenhuma localidade amostrada recentemente. Este haplótipo provavelmente já foi extinto, ou ainda não chegou ao Brasil.

Conciliando as informações obtidas através das Figuras 7 e 8, verifica-se que os haplótipos de *Phakopsora pachyrhizi* do Brasil são diretamente derivados dos haplótipos africanos, e que a dispersão do esporos desse fungo da África para o Brasil não deve ter ocorrido uma única vez.

6 – CONCLUSÕES

✓ As sequências espaçadoras internas do gene ribossomal, ITS1 e ITS2, foram propícias para a diferenciação de *Phakopsora pachyrhizi*, entre e dentro das localidades.

✓ Embora *Phakopsora pachyrhizi* tenha sido recentemente introduzida no Brasil, amostras de localidades brasileiras, quando comparados entre si, apresentam uma grande variabilidade genética.

- Região de ITS1 foi capaz de diferenciar 21 haplótipos, dentre as 96 sequências analisadas.
- Região de ITS2 diferenciou 17 haplótipos, dentre as 86 sequências.

✓ Haplótipos mais amplamente distribuídos no Brasil também foram encontrados na África e na Ásia. Esses haplótipos possuem uma relação de ancestralidade direta em relação aos haplótipos amostrados no Brasil.

✓ DNA genômico extraído de uredósporos coletados em uma mesma localidade, em uma mesma safra, possui diferentes haplótipos que se posicionam em diferentes linhagens na rede. Este resultado é um indicativo de uma alta diversidade genética dentro das localidades. Como foi comprovada pela AMOVA, a diversidade genética foi maior dentro da que entre as localidades.

✓ Os resultados dão suporte a hipótese de que, a origem desse fungo no Brasil tenha sido por meio de esporos trazidos, provavelmente, por correntes aéreas transoceânicas que tenham atravessado o Oceano Atlântico, vindos da África. E que essa migração ocorreu mais de uma vez.

7 - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ÁLVAREZ, I.; WENDEL, J.F. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 29: 417-434.
- ALVES, S.A.M.; FURTADO, G.Q.; BERGAMIN FILHO, A. 2006. Influência das Condições Climáticas Sobre a Ferrugem da Soja. In: **Ferrugem Asiática da Soja**. Editor: Laércio Zambolim. Ed. UFV. Viçosa. cap.3, p.37-60.
- ANDRADE, P.J.M.; ANDRADE, D.F.A.A. 2006. Controle Químico da Ferrugem Asiática da Soja. In: **Ferrugem Asiática da Soja**. Editor: Laércio Zambolim. Ed. UFV. Viçosa. cap.4, p.61-72.
- AVISE, J.C. 2000. Phylogeography: the history and formation of species. Harvard Univ. Press, Cambridge.
- AVISE, J.C. 1998. The history and purview of Phylogeography: A personal reflection. **Molecular Ecology**. v.7, p.371-379.
- BALARDIN, R.S.; MENEGHETTI, R.C.; BALARDIN, C.R. 2005. Cuidado Essencial. **Soja Caderno Técnico Cultivar**. Edição Especial nº69, p.3-10.
- BALARDIN, R.S. 2006. Situação, importância e perspectivas de evolução da ferrugem asiática nos principais países produtores. In: **Anais do IV Congresso Brasileiro de Soja**. p.94-96.
- BAYON, C.; YUAN, Z.W.; RUIZ, C. LIESEBACH, M. PEI, M.H. 2006. Genetic diversity in the mycoparasite *Sphaerellopsis filum* inferred from AFLP analysis and ITS-5.8S sequences. **Mycological Research**. v110, p.1200-1206.

- BERGAMIN FILHO, A. Epidemiologia Comparativa: Ferrugem da Soja e Outras Doenças. In: **Ferrugem Asiática da Soja**. Editor: Laércio Zambolim. Ed. UFV. Viçosa. Cap.2, p.15-36.
- BONDE, M.R.; BROWN, M.F. 1980. Morphological comparison of isolates of *Phakopsora pachyrhizi* from different areas of the world. **Journal Microbiology**. v26, p.1443-1449.
- BURDON, J.J.; MARSHALL, D.R. 1981. Inter- and Intra-specific Diversity in the Disease-Response of *Glycine* Species to the Leaf-Rust Fungus *Phakopsora pachyrhizi*. **Journal of Ecology**. 81: 381-390.
- CARVALHO Jr, A.A.; FIGUEIREDO, M.B. 2000. A verdadeira identidade da ferrugem da soja no Brasil. **Summa Phytopathologica**. V26, p.197-200.
- CLEMENT, M.; POSADA D. & CRANDALL, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**. v9, p1657-1659.
- DESLANDES, J.A. 1979. Ferrugem da soja e de outras leguminosas causadas por *Phakopsora pachyrhizi* no Estado de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v.4, p.337-339.
- DIEGISSER, T.; SEITZ, A.; JOHANNESSEN, J. 2006. Phylogeographic patterns of host-race evolution in *Tephritis conura* (Diptera: Tephritidae). **Molecular Ecology**. v15, p.681-694.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, 19, p.11-15.
- DUMOLIN-LAPÉGUE, S.; DEMESURE, B.; FINESCHI, S.; CORRE, V.L.; PETIT, R.J. 1997. Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. **Genetics**. v.146, p.1475-1487.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.; QUATTRO, J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes:

- Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**. v.131, p. 479-491.
- FERREIRA, H.B. 1996. Organização Gênica de Eucariotos. In: **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto. cap.4, p.78-92.
- FRANÇA NETO, J.B. 2004. Perspectivas futuras da cultura da soja no Brasil: produção, produtividade, expansão de área. In: World Soybean Research Conference, 7., International Soybean Processing and Utilization Conference, 4.; Congresso Brasileiro de Soja, 3., Foz do Iguaçu. **Proceedings**. p.1203-1209.
- FREDERICK, R.D.; SNYDER, C.L.; PETERSON, G.L. & MORRIS, R.B. 2002. Polymerase Chain Reaction for the detection and discrimination of the soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*. **Mycology**. v92, p.217-227.
- FUTUYMA, J.D. 2003. **Biologia Evolutiva**. 2º ed. Ribeirão Preto: FUNPEC-RP.
- GODOY, C.V. 2004. Alerta máximo. In: **Grandes Culturas Cultivar**. Janeiro de 2005. Ano VI. nº 68, 38p.
- GODOY, C.V.; CANTERI, M.G. 2003. Efeitos Protetor, Curativo e Erradicante de Fungicidas no Controle Ferrugem da Soja Causada por *Phakopsora pachyrhizi*, em Casa de Vegetação. **Fitopatologia Brasileira**. v19, p.097-101.
- GODOY, C.V.; LAZZAROTTO, J.J. 2004. Ataque devastador. In: **Grandes Culturas Cultivar**. Novembro de 2004. Ano V. nº 67, p.3-10.
- GODOY, C.V. LAZZAROTTODA, J.J. 2005. Ferrugem: Escolhendo a arma. In: **Grandes Culturas Cultivar**. Janeiro de 2005. Ano VI. nº 69, p.24-25.
- GRASSO, V.; SIEROTZKI, H.; GARIBALDI, A.; GISI, U. 2006. Relatedness among agronomically important rusts based on mitochondrial cytochrome

- b* gene and ribosomal ITS sequences. **Journal Phytopathology**. v154, p.110-118.
- HARTMAN, G.L.; BONDE, M.R.; MILES, M.M.; FREDERICK, R.D. 2004. Variation of *Phakopsora pachyrhizi* isolates on soybean. In: World Soybean Research Conference, 7.; International Soybean Processing and Utilization Conference, 4.; Congresso Brasileiro de Soja, 3. Foz do Iguaçu. Proceedings... Londrina: Embrapa Soybean. p.440-446.
- HENNING, A.A.; GODOY, C.V. 2006. Situação da Ferrugem da Soja no Brasil e no Mundo. In: **Ferrugem Asiática da Soja**. Viçosa. Cap.1. p.1-14.
- HERSHMAN, D. E. 2003. Australasian soybean rust: an exotic pest threat. **Plant Pathology Factsheet**. Cooperative Extension Service, University of Kentucky, Kentucky, USA
- HILLIS, D. M.; MABLE, B.K.; LARSON, A.; DAVIS, S.K.; ZIMMER, E.A. 1996. Nucleic Acids IV: Sequencing and Cloning. In: **Molecular Systematics**. 2º ed. Sinauer Associates. cap.9, p.321-381.
- HUANG, S.F.; HWANG, S.Y.; WANG, J.C.; LIN, T.P. 2004. Phylogeography of *Trochodendron aralioides* (Trochodendraceae) in Taiwan and its adjacent areas. **Journal of Biogeography**. v31, p. 1251-1259.
- KASUGA, T.; WHITE, T.J.; KOENIG, G.. 2003. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. **Molecular Ecology**. v12, p.3383-3401.
- KAUSERUD, H.; SVEGARDEN, I.B.; DECOCK, C.; HALLENBERG, N. 2007. Hybridization among cryptic species of the cellar fungus *Coniophora puteana* (Basidiomycota). **Molecular Ecology**. v16, p.389-399.
- KAUSERUD, H.; HOGBERG, N.; KNUDSEN, H.; ELBORNES, S.A.; SCHUMACHER, T. 2004. Molecular phylogenetics suggest a North American link between the antropogenic dry rot fungus *Serpula*

- lacrymans* and its wild relative *S. himantioides*. **Molecular Ecology**. v13, p.3137-3146.
- KÖLLIKER, R.; KRAEHENBEHL, R.; BOLLER, B.; WIDMER, F. 2006. Genetic diversity and pathogenicity of the grass pathogen *Xanthomonas translucens* pv. *graminis*. **Systematics and Applied Microbiology**. V.29, p.109-119.
- MATIOLI, S. R. 2004. **Biologia Molecular e Evolução**. ED Holos, Ribeirão Preto.
- NEI, M.; Li, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. 76, p.5869-5273.
- NEI, M. 1987. **Molecular Evolutionary Genetics**. Columbia University Press, NY.
- NEI, M.; KUMAR, S. 2000. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. Oxford: University Press. 333p.
- ONO, Y.; BURITICA, P; HENNEN, J.F. 1992. Delimitation of *Phakopsora*, *Physopella*, and *Cerotelium* and their species on Leguminosae. **Mycological Research**, v.96, p.825-850.
- PALUMBI, S.R. Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction. In: **Molecular Systematics**. 2º ed. Sinauer Associates. cap.7, p.205-247.
- PERNEEL, M.; TAMBONG, J.T.; ADIOBO, A.; FLOREN, C.; SABARÍO, F.; LÉVESQUE, A.; HÖFTE, M. 2006. Intraspecific variability of *Pythium myriotylum* isolated from cocoyam and other host crops. **Mycological Research**. v.110, p.583-593.
- RAETANO, C.G.; MERLIN, A. 2006. Avanços Tecnológicos no Controle da Ferrugem da Soja. In: **Ferrugem Asiática da Soja**. Viçosa. Cap.7, p.115-138.

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. 1989. **Molecular cloning, a Laboratory Manual**. 2nd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory.
- SCHAAL, B.A.; HAYWORTH, D.A.; OLSEN, K.M.; RAUSCHER, J.T.; SMITH, W.A. Phylogeografic studies in plants: problems and prospects. **Molecular Ecology**. v.7, p.465-474.
- SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, H.D.; SILVA, J.R.C. 2006. Medidas de controle para o manejo da ferrugem asiática da soja. In: Anais do IV Congresso Brasileiro de Soja. p.109-113.
- SOARES, R.M. 2005. Disseminada mas sob controle. In: **Grandes Culturas Cultivar**. Fevereiro de 2005. nº 70, ano VII, p.32-34.
- TEMPLETON, A.R.; CRANDALL, K.A. & SING, C.F. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence. III. Cladogram estimation. **Genetics**. 132: 619-633.
- TEMPLETON, A.R. 2004. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. **Molecular Ecology**. v.13, p.789-809.
- WANG, Y.; TAN, Z.M.; ZHANG, D.C.; MURAT, C.; JEANDROZ, S.; LE TACON, F. 2006. Phylogenetic and population study of the *Tuber indicum* complex. **Mycological Research**. v110, p.1034-1045.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. A. et al. PCR Protocols, Academic Press, San Diego, CA.
- YAMAOKA, Y.; FUJIWARA, Y.; KAKISHIMA, M.; KATSUYA, K.; YAMADA, K.; HAGIWARA, H. 2002. Pathogenic races of *Phakopsora pachyrhizi* on soybean and wild host plants collected in Japan. **Journal of Genetic Plant Pathology**. v68, p.52-56.

- YEH, C.C.; SINCLAIR, J.B.; TSCHANZ, A.T. 1981. *Phakopsora pachyrhizi*: Uredial Development Uredospore Production and Factors Affecting Teliospore Formation on Soybeans. p.25-31.
- YORINORI, J.T. 2004. Country report and rust control strategies in Brazil. In: World Soybean Research Conference, 7.; International Soybean Processing and Utilization Conference, 4.; Congresso Brasileiro de Soja, 3. Foz do Igau. Proceedings... Londrina: Embrapa Soybean. p.447-455.
- YORINORI, J.T.; NUNES JÚNIOR, J.; LAZZAROTTO, J.J. 2004. **Ferrugem “asiática” da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle**. Londrina: Embrapa Soja. 36p. (Documentos, 247).
- YORINORI, J.T.; PAIVA, W.M. 2002. Ferrugem da soja: *Phakopsora pachyrhizi* Sydow. Londrina: Embrapa Soja. 1 Folder.
- YORINORI, J.T. 2006. Ferrugem “asiática” da soja: o desafio continua e como aprimorar o seu controle. In: **Anais do IV Congresso Brasileiro de Soja**. p.102-108.
- ZAMBOLIM, L. 2006. Manejo Integrado da Ferrugem Asiática da Soja. In: **Ferrugem Asiática da Soja**. Editor: Laércio Zambolim. Ed. UFV. Viçosa. Cap.5, p.73-98.