

SIRLAINE ALBINO PAES

**VARIABILIDADE FISIOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS  
DE *PHAKOPSORA PACHYRHIZI***

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Paes, Sirlaine Albino, 1978-  
P126v Variabilidade fisiológica e molecular de isolados de  
2015 *Phakopsora Pachyrhizi* / Sirlaine Albino Paes. – Viçosa, MG,  
2015.  
xiv, 54f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.46-52.

1. Soja - Doenças e pragas. 2. Ferrugem asiática. 3. Fungos.  
4. *Phakopsora pachyrhizi*. 5. Biologia Molecular. 6. Marcadores  
genéticos. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Fitopatologia. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia.  
II. Título.

CDD 22. ed. 579.592

SIRLAINE ALBINO PAES

**VARIABILIDADE FISIOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS  
DE *PHAKOPSORA PACHYRHIZI***

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

APROVADA: 24 de fevereiro de 2015.

---

Gleiber Quintão Furtado

---

Wanderlei Dias Guerra

---

Sérgio Hermínio Brommonschenkel  
(Orientador)

*Dedico e ofereço com muito amor  
A minha família, por todos os momentos de ausência e  
por acreditarem na realização deste trabalho.*

**“NENHUM VENTO SOPRA A FAVOR DE QUEM  
NÃO SABE PARA ONDE IR”.**

*Sêneca, século 4 AC*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a DEUS, âncora da minha existência, pela renovação das minhas forças e por estar sempre presente em minha vida, guiando meus caminhos e oferecendo tudo que é de meu merecimento.

À minha família, fonte de maior alegria, que sempre estiveram ao meu lado compartilhando as nossas conquistas. Devo tudo a vocês! Mesmo “perto de casa”, a distância se tornava infinita diante da minha dedicação para com este trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (Bioagro), e principalmente ao Departamento e Programa de Pós-graduação em Fitopatologia da UFV pela oportunidade de aperfeiçoamento proporcionado à minha formação acadêmica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa desse estudo.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia da UFV, pela dedicação ao curso, os meus sinceros agradecimentos com elevada estima e consideração. Em especial ao meu orientador Professor Dr. Sérgio Hermínio Brommonshenkel, pela oportunidade, confiança, ensinamentos e prestatividade. Em resumo, uma pessoa que enriqueceu minha formação acadêmica durante o tempo que passei junto ao Laboratório de Genômica.

Ao pesquisador Dr. Wanderlei Dias Guerra, pela atenção e colaboração na condução dos trabalhos, que foram de vital importância na realização da pesquisa e Professor Dr. Gleiber Quintão Furtado pelas sugestões e ensinamentos; em especial, a ambos pela participação na banca examinadora e conhecimento transmitido, que muito contribuíram para o meu crescimento profissional.

Ao “Gigante Laboratório de Genômica”, pelos momentos de alegrias em meio às dificuldades. Dizer simplesmente a vocês: obrigada, é muito pouco diante do compromisso e disposição durante a condução desse trabalho. Em tão pouco tempo vocês se tornaram importantíssimos para esta vitória e sempre serão garantia de boas lembranças.

Aos maravilhosos amigos que conquistei durante este início da pós-graduação, por vivermos este período de nossas vidas juntos compartilhando os conhecimentos e amadurecendo o aprendizado. Amizade para toda a vida!

Aos amigos de longa data que estiveram ao meu lado e todos os outros verdadeiros amigos que estão por esse Brasil e, que mesmo longe são especiais em meu coração.

A todos os meus colegas Fitopatologistas, pelo convívio, amizade e apoio quando necessário. Uma palavra de carinho é sempre bem-vinda.

Enfim, a todos que contribuíram para a concretização da trajetória na qual trilharei e ainda aqueles que um dia disseram: no final tudo dará certo.

*Meus sinceros agradecimentos e eterno reconhecimento.*

## **BIOGRAFIA**

SIRLAINE ALBINO PAES, filha de Helvécio Paes de Oliveira e Maria do Rosário Albino Paes, nasceu em Viçosa, no estado de Minas Gerais, Brasil. Desde então, adotou Porto Firme – MG como cidade do coração.

Em maio de 2006 iniciou o curso de Bacharel em Economia Doméstica na Universidade Federal de Viçosa – UFV, em Viçosa, Minas Gerais e, em 2008, transferiu-se para o curso de Agronomia, nessa mesma instituição.

Durante todo o período da graduação foi estagiária e bolsista de iniciação científica no Laboratório de Associações Micorrízicas do Departamento de Microbiologia, sob a orientação da Professora Dra. Maria Catarina Megumi Kasuya. Neste laboratório acompanhou e desenvolveu projetos nas linhas de pesquisa destoxificação biológica da torta de pinhão manso e degradação de plástico biodegradável por fungos ligninocelulolíticos. Graduiu-se em Agronomia em maio de 2013.

Ainda na Universidade Federal de Viçosa - UFV, em abril de 2013 iniciou o curso de Pós-graduação em Fitopatologia no nível do mestrado, sob a orientação do Professor Dr. Sérgio Hermínio Brommonschenkel, submetendo-se à defesa da dissertação em 24 de fevereiro de 2015.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	x
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xiii
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 - A cultura da soja.....	3
2.2 – A ferrugem asiática da soja .....	5
2.3 – Resistência da soja a <i>P. pachyrhizi</i> .....	7
2.4 – Variabilidade em <i>P. pachyrhizi</i> .....	9
2.5 - Critérios de classificação da resistência de soja a <i>P. pachyrhizi</i> ..	11
2.6 – Marcadores Microsatélites (SSR) .....	12
3 - MATERIAL E MÉTODOS .....	13
3.1 - Obtenção e processamento das amostras .....	13
3.2 - Multiplicação das populações de <i>P. pachyrhizi</i> .....	14
3.3 - Seleção dos isolados monolesionais de <i>P. pachyrhizi</i> .....	15
3.4 - Multiplicação dos isolados monolesionais de <i>P. pachyrhizi</i> .....	15
3.5 - Avaliação da variabilidade fisiológica dos isolados monolesionais de <i>P. pachyrhizi</i> .....	16
3.5.1 - Série diferenciadora de soja.....	16
3.5.2 – Resistência dos genótipos de soja e virulência dos isolados monolesionais de <i>P. pachyrhizi</i> .....	17
3.6 - Análise da variabilidade molecular com a utilização de marcadores microsatélites .....	20
3.6.1 - Extração de DNA.....	20
3.6.2 - Análise dos marcadores microsatélites .....	22

4 - RESULTADOS .....	24
4.1 – Obtenção dos isolados monolesionais de <i>P. pachyrhizi</i> .....	24
4.2 - Variabilidade fisiológica dos isolados monolesionais de <i>P. pachyrhizi</i> .....	26
4.2.1 - Tipo de reação e intensidade relativa de esporulação .....	26
4.2.2 - Agressividade e virulência dos isolados monolesionais de <i>P. pachyrhizi</i> .....	30
4.3 - Variabilidade molecular dos isolados monolesionais de <i>P. pachyrhizi</i> com a utilização de marcadores microsatélites .....	36
5 – DISCUSSÃO .....	41
6 - CONCLUSÕES .....	44
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45
ANEXO .....	53

## LISTA DE FIGURAS

MATERIAL E MÉTODOS	PÁGINA
1. Localização geográfica das amostras utilizadas para obter os isolados monolesionais de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> . O ponto de coleta das amostras RS 16 e RS 17 são próximos. Dados não mostrados para amostras sem coordenadas. Círculos azuis e losango vermelho: amostras safra 2013/2014. Quadrados amarelos: soja guaxa. Círculos verdes: soja do cultivo da segunda safra.	14
<b>RESULTADOS</b>	
2. Fenótipos representativos observados em folíolos dos genótipos de soja PI 587905 ( <i>Rpp1?</i> ) (A), PI 471904 ( <i>Rpp5</i> ) (B) e PI 200492 ( <i>Rpp1</i> ) (C) aos quinze dias após a inoculação com $1,0 \times 10^4$ uredósporos/mL do isolado monolesional RS16-2 de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> . A: reação de hipersensibilidade tipo “fleck”. B: lesões castanho-avermelhadas (RB-“redishbrown”) com pouca esporulação. C: lesões castanho-claras (TAN) com pouca necrose e esporulação abundante. Lesões representativas observadas na face abaxial são indicadas pelas setas.	26
3. Eletroferograma mostrando o tamanho dos fragmentos gerados pela amplificação do loco PP016 dos isolados monolesionais de <i>P. pachyrhizi</i> obtidos a partir das amostras coletadas na safra 2013/2014 dos estados produtores de soja: Rio Grande do Sul (RS 17-1), Goiás (GO 16-2 e GO 17-12), Mato Grosso (MT 60-2), Minas Gerais (MG 19-1). PPUFV02: isolado padrão. Análise dos <i>amplicons</i> evidenciada no sequenciador automático ABI 3100.	39
4. Eletroferograma mostrando o tamanho dos fragmentos gerados pela amplificação do Loco PP009 dos isolados monolesionais de <i>P. pachyrhizi</i> obtidos a partir das amostras coletadas na safra 2013/2014 dos estados produtores de soja: Mato Grosso (MT 20-5, MT 22-2, MT 25-1, MT 60-2), Rio Grande do Sul (RS 02-3) e Paraná (PR 08-4). Análise dos <i>amplicons</i> evidenciada no sequenciador automático ABI 3100.	39
5. Eletroferograma mostrando o tamanho dos fragmentos gerados pela amplificação do Loco PP009 dos isolados monolesionais de <i>P. pachyrhizi</i> obtidos a partir das amostras coletadas do cultivo da segunda safra e de plantas guaxas em 2014 no estado do Mato Grosso (MT 116-2, MT 118-1, MT	40

117-1, MT 98-2). PPUFV02: isolado padrão. Análise dos *amplicons* evidenciada no sequenciador automático ABI 3100.

6. Eletroferograma mostrando o tamanho dos fragmentos gerados pela amplificação do Loco PP009 dos isolados monolesionais de *P. pachyrhizi* e populações de uredósporos correspondentes obtidos a partir das amostras coletadas na safra 2013/2014 dos estados produtores de soja: Minas Gerais (MG 14-1/MG 14), Mato Grosso (MT 22-2/MT 22) e Rio Grande do Sul (RS 02-3/RS 02). Análise dos *amplicons* evidenciada no sequenciador automático ABI 3100.

40

## LISTA DE TABELAS

MATERIAL E MÉTODOS	PÁGINA
1. Genótipos de soja utilizados na avaliação da virulência dos isolados monolesionais de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> .	17
2. Critérios para a classificação da virulência dos isolados monolesionais de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> .	20
3. Critérios de classificação dos fenótipos dos genótipos de soja de acordo com os parâmetros “%LU”, “NoU” e “SL”. Os valores foram calculados a partir de 30 lesões selecionadas ao acaso.	20
4. Critérios para a classificação da resistência dos genótipos de soja aos isolados monolesionais de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> .	20
<b>RESULTADOS</b>	
5. Identificação dos isolados monolesionais de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> , obtidos de amostras de folhas infectadas de soja coletadas nas principais regiões produtoras de soja do Brasil e outros diversos locais durante o ano de 2014, utilizados para as análises da variabilidade fisiológica e molecular.	25
6. Tipos de reação e intensidade relativa de esporulação em folíolos destacados dos genótipos de soja aos 15-17 dias após inoculação com os isolados monolesionais de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> sob condições de laboratório.	28
7. Reações de resistência e de suscetibilidade em folíolos destacados dos genótipos de soja aos 15-17 dias após inoculação com isolados monolesionais de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> sob condições de laboratório.	33
8. Reações de resistência e de suscetibilidade para a classificação da virulência dos isolados monolesionais de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em folíolos destacados dos genótipos de soja aos 15-17 dias após inoculação com sob condições de laboratório.	34
9. Classificação dicotômica da virulência dos isolados monolesionais de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> .	35
10. Tamanho em pares de bases dos locos microssatélites dos isolados monolesionais de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> , populações de uredósporos e amostras de tecido infectado amplificados com 18 oligonucleotídeos espécie-específicos.	37

## RESUMO

PAES, Sirlaine Albino, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Variabilidade fisiológica e molecular de isolados de *Phakopsora pachyrhizi***. Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

A ferrugem asiática da soja causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* é a principal doença da cultura da soja no Brasil. Visando entender a dinâmica da doença no campo e fornecer subsídios para programas de melhoramento visando resistência à doença e estudos de clonagem e caracterização de genes de avirulência do patógeno, esse trabalho teve por objetivo estudar a variabilidade fisiológica e molecular de isolados de *P. pachyrhizi* coletados em diferentes regiões brasileiras produtoras de soja. Durante os meses de janeiro a setembro de 2014, coletou-se 199 amostras de folhas com sintomas da doença. Deste total, 138 amostras foram recuperadas por meio da inoculação de uredósporos em folíolos destacados. No total, 68 isolados monolesionais de *P. pachyrhizi* foram multiplicados e armazenados em freezer -80°C e 113 isolados estão sendo multiplicados em folíolos destacados. Dentre os isolados multiplicados, 26 foram utilizados neste estudo. Estes isolados são representativos de 24 locais geograficamente distintos, em 6 Estados localizados em três regiões brasileiras: Centro-Oeste, Sudeste e Sul. Apenas o isolado DF 01-1 tem origem no Distrito Federal. Para avaliação da variabilidade fisiológica foi utilizado um conjunto de variedades diferenciadoras de soja, que incluiu oito genótipos com genes de resistência *Rpp1 a 6*, dois genótipos com genes *R* desconhecidos e a cultivar Conquista, suscetível. Para a análise molecular, o DNA genômico foi extraído a partir de esporos congelados dos isolados monolesionais, de uredósporos coletados diretamente das amostras e de tecido infectado. Foi utilizado um conjunto de 18 pares de oligonucleotídeos que amplificam locos microssatélites previamente caracterizados. Três tipos de reação ocorreram nas variedades diferenciadoras de soja em resposta à infecção pelos isolados monolesionais de *P. pachyrhizi*: reação de hipersensibilidade caracterizada por imunidade com *flecks* necróticos (IF), lesões vermelho-castanhas (RB)

e lesões TAN, típicas de reação de suscetibilidade. Todos os isolados produziram lesão TAN com abundante esporulação na cultivar Conquista e nos acessos PI 200492 (*Rpp1*) e PI 462312 (*Rpp3*); lesão RB nos genótipos PI 230970 (*Rpp2*), PI 459025 (*Rpp4*), PI471904 (*Rpp5*), PI 567102B (*Rpp6*) e PI 594767-A (*Rpp1?*), e reação de imunidade com *flecks* necróticos nos acessos PI 587880-A (*Rpp1?*), PI 587905 (*Rpp1?*) e PI 587886 (*Rpp1?*). Os isolados diferiram quanto ao nível de esporulação observado nos genótipos PI 230970 (*Rpp2*), PI 459025 (*Rpp4*), PI471904 (*Rpp5*) e PI 567102B (*Rpp6*). Observou-se ausência de variabilidade molecular nos locos microssatélites analisados, o que pode ser indicativo de um efeito fundador recorrente na população do patógeno, em razão de seleção imposta pelo uso intensivo de fungicidas e da prática do vazio sanitário. Todavia, essa hipótese deverá ser confirmada por uma análise englobando todos os isolados obtidos e novas amostras coletadas na safra 2014/2015.

## ABSTRACT

PAES, Sirlaine Albino, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Physiological and molecular variability of *Phakopsora pachyrhizi* isolates**. Advisor: Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Asian soybean rust, caused by the fungus *Phakopsora pachyrhizi*, is the main soybean disease in Brazil. Aiming to understand the dynamics of the disease in the field and to contribute to breeding programs aiming disease resistance and to studies of characterization of avirulence genes from the pathogen, the objective of this work was to study the physiological and molecular variability of *P. pachyrhizi* isolates collected in different soybean producing regions in Brazil. Between January and September of 2014, 199 samples of leaves showing symptoms of the disease were collected. One hundred thirty-eight populations were recovered from these samples through inoculation of detached leaves with urediniospores. A total of 68 single-lesion *P. pachyrhizi* isolates were multiplied and stored in a freezer at -80°C and 113 isolates are currently being multiplied on detached leaves. Twenty-six out of the total multiplied isolates were used in this study, which are representative of 24 distinct geographic sites, located in six states corresponding to three major soybean production regions: midwest, southeast and south. The isolate DF 01-1 originated from the Distrito Federal. To evaluate physiological variability, a set of differential soybean varieties was used, including eight genotypes carrying the *Rpp-1* to -6 resistance genes, two genotypes with uncharacterized resistance genes and the susceptible cultivar Conquista. For the molecular analysis, genomic DNA was extracted directly from frozen spores collected from single-lesion isolates, from urediniospores collected directly from collected leaf samples and from infected leaves. A set of 18 oligonucleotide pairs was used to amplify microsatellite loci previously characterized. Three types of reactions occurred on differential soybean varieties in response to infection by single-lesion *P. pachyrhizi* isolates: hypersensitive reaction, characterized by immune necrotic flecks (IF), red-brown (RB) lesions, and TAN lesions, typical of a susceptible reaction. All isolates produced TAN lesions with

abundant sporulation on cultivar Conquista and on accessions PI 200492 (*Rpp1*) and PI 462312 (*Rpp3*); RB lesions on genotypes PI 230970 (*Rpp2*), PI459025 (*Rpp4*), PI471904 (*Rpp5*), PI 567102B (*Rpp6*) and PI 594767-A (*Rpp1?*); and immune reaction with necrotic flecks on accessions PI 587880-A (*Rpp1?*), PI 587905 (*Rpp1?*) and PI 587886 (*Rpp1?*). There were differences among isolates in the level of sporulation on genotypes PI 230970 (*Rpp2*), PI 459025 (*Rpp4*), PI471904 (*Rpp5*) and PI 567102B (*Rpp6*). Absence of molecular variability in the analyzed microsatellite loci was observed, which could be indicative of recent and recurrent founder effects in the pathogen population as a consequence of the selection pressure by the use of fungicides and the host-free period, a period of 60 to 90 days from July to September during which farmers are restricted from planting soybean (so-called *vazio sanitário*). This hypothesis needs to be confirmed by a more comprehensive analysis using all isolates collected so far, as well as additional samples collected during the 2014/2015 season.

## 1 - INTRODUÇÃO

Desde o início do cultivo da soja no Brasil, grandes avanços tecnológicos foram direcionados para a expansão da cultura da soja. Atualmente o Brasil destaca-se como o segundo maior produtor mundial de soja, com estimativas de produção, na safra 2014/2015, de 95,5 milhões de toneladas (Conab, 2015). Esses avanços se refletiram no aumento da produtividade e na área plantada com o grão, que seria maior caso não ocorressem problemas como a falta de chuva e doenças.

A ocorrência de pragas em soja tem aumentado nos últimos anos, provocando grandes perdas em plantios comerciais. Problemas com doenças economicamente importantes normalmente ocorrem do meio para o final do ciclo da cultura, e dentre estas se destaca a ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, que se inicia no início da fase reprodutiva.

A ferrugem asiática da soja foi identificada pela primeira vez no Brasil em 2001 no Estado do Paraná e atualmente é endêmica nas principais regiões produtoras de soja do país, representando uma grande ameaça para a sojicultura (Henning & Godoy, 2006). As estimativas de perdas são normalmente elevadas, variando muito em função do clima predominante em cada região produtora e das medidas de manejo adotadas.

A ferrugem da soja é uma doença policíclica, pois múltiplos ciclos de infecção ocorrem em um único ciclo do hospedeiro. *Phakopsora pachyrhizi* é um fungo biotrófico necessitando continuamente de um hospedeiro vivo para sobreviver na natureza e até mesmo para ser multiplicado em condições controladas. A permanência do patógeno no ambiente é favorecida pelo cultivo da soja na entressafra, pela presença de plantas guaxas e por hospedeiros alternativos. Estas condições permitem que seja contínua a presença do inóculo no campo, de onde posteriormente, é disseminado pelo vento a curtas e longas distâncias para as lavouras comerciais.

Os uredósporos, produzidos em grande quantidade no interior de urédias globosas são considerados os únicos propágulos funcionais de *P. pachyrhizi*, sendo os responsáveis pela fase epidêmica da doença nos

trópicos. Considerando a ausência de reprodução sexuada, na prática, *P. pachyrhizi* funcionaria como uma espécie clonal. Apesar disso, há vários relatos da emergência de raças para *P. pachyrhizi* que suplantam a resistência de variedades de soja supostamente resistentes à doença.

Uma das dificuldades para o controle de *P. pachyrhizi* é sua variabilidade genética (Akamatsu et al., 2013). Quando se desenvolve uma variedade de soja resistente à ferrugem asiática da soja, o fungo evolui e surge geneticamente renovado. Esta curta durabilidade dos genes de resistência é reflexo da variabilidade patogênica na população do patógeno.

O conhecimento da variabilidade genética em *P. pachyrhizi* é de grande importância para a realização de estudos genéticos e desenvolvimento de programas de melhoramento genético visando variedades com resistência durável.

No Brasil, em função da introdução recente do patógeno, um estudo completo de variabilidade ainda não foi realizado. Portanto, os objetivos deste trabalho foram avaliar a variabilidade fisiológica dos isolados monolesionais de *P. pachyrhizi* em acessos de soja que contem diferentes genes de resistência e caracterizar a variabilidade molecular destes isolados utilizando marcadores microssatélites.

## 2- REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 - A cultura da soja

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill], pertencente à família Fabaceae, se firmou como um dos principais produtos da agricultura nacional a partir do cultivo comercial para a produção do grão nos anos 40 e, principalmente, após a expansão da cultura na década de 70, tornando-se, em curto período de tempo, um dos principais produtos da exploração agrícola (Lazzarotto & Hirakuri, 2010).

Nas últimas três décadas, a soja foi a cultura agrícola brasileira que mais cresceu, e dela, direta e indiretamente, depende a estabilidade da economia nacional. O aprimoramento do sistema de produção através da adaptação das condições de solo do cerrado e cultivares ao clima tropical, permitiram a expansão da cultura para a região Centro-Oeste (EMBRAPA, 2015). Os avanços tecnológicos possibilitaram o progresso alcançado pela cultura no agronegócio brasileiro, culminando com o aumento da qualidade de vida e elevação do Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) do Brasil Central (FAO, 2015).

No Brasil, um dos maiores produtores mundiais da leguminosa, a produção da safra atual atingirá em 2015 um patamar na ordem de 95,5 milhões de toneladas, recorde global superando em 10,8% a produção de 2013/14 (USDA, 2015). Esse aumento deve-se principalmente à expansão da área plantada, que saltou de 30,17 milhões de hectares semeados na safra passada para 31,70 milhões de hectares (CONAB, 2015) e à expectativa de aumento na produtividade para as regiões produtoras do país, principalmente no Estado do Mato Grosso e Paraná (USDA, 2015). Apenas Roraima, Pará e o Distrito Federal devem manter a área plantada na safra passada (CONAB, 2015). Alterações na produtividade poderão ocorrer ao longo do desenvolvimento da cultura, em função das condições climáticas e fitossanitárias.

Atualmente, por ser uma valiosa fonte de proteína na dieta alimentar humana e animal, bem como matéria prima para extração de óleo vegetal (Alves et al., 2006), a soja *in natura* e seus subprodutos lideram o ranking

no mercado externo, que é o principal gerador de divisas cambiais (MAPA, 2015). Com a estabilização econômica e o preço da *commodity* em alta, o complexo soja despontou e hoje é responsável por cerca de 14,5 milhões de toneladas do total das exportações agrícolas brasileiras (USDA, 2015).

A longevidade desse êxito, porém, depende da estabilidade da cultura e, conseqüentemente da produção do grão. Mas, existem restrições e limitações que poderão afetar o equilíbrio da sojicultura, entre elas o risco de ocorrência de novas doenças e a instabilidade das condições climáticas. Existem diversos fatores, bióticos e abióticos, que afetam a cultura e prejudicam o seu potencial produtivo, dentre os quais as doenças se destacam como o principal limitante para os sucessivos incrementos na produtividade (EMBRAPA, 2015).

A ocorrência de doenças em soja tem aumentado nos últimos anos, provocando enormes perdas em plantios comerciais (Yorinori et al., 2005). A cultura da soja é afetada por várias doenças, porém, a ferrugem asiática tem sido considerada como uma das mais importantes do ponto de vista econômico e fitossanitário (Henning e Godoy, 2006).

A soja é a espécie de importância econômica mais afetada pela ferrugem asiática da soja, uma doença foliar que está disseminada no mundo (Bromfield, 1984). Essa doença causa grandes perdas em muitos países, principalmente no continente asiático (Bromfield & Hartwig, 1980; Hartman et al., 2005), e está causando perdas também no Brasil que variam de 5-95% (Sinclair e Hartman, 1999; Yorinori et al., 2005).

Os impactos globais da doença sobre a soja, se devem à comum ocorrência e ampla distribuição nos principais países produtores (Isard et al., 2005) e à rápida redução na área foliar verde e desfolha prematura, correlacionando com as perdas na produção e resultando em prejuízos econômicos para os sojicultores e para as agroindústrias que processam a matéria-prima (Hartman et al., 1991).

A forma de controle ambientalmente sustentável e econômica para ferrugem da soja é o desenvolvimento de cultivares resistentes ou tolerantes (Garcia et al., 2008). Todavia, o controle químico com fungicidas

dos grupos dos triazóis, estrobilurinas e carboxamidas, isoladamente ou em mistura, é o principal método de controle da doença (Soares et al., 2009; Godoy & Canteri, 2003). No Brasil, o vazio sanitário é uma medida de controle muito importante para o manejo da ferrugem asiática da soja, pois visa redução do inóculo inicial do patógeno e o atraso do início da epidemia no cultivo seguinte da soja. Esta estratégia se trata da proibição por lei do cultivo da soja no período da entressafra, exceto em caso de cultivo para pesquisa científica e experimentos, com prévia autorização dos órgãos de defesa sanitária (Consórcio antiferrugem, 2015).

## **2.2 – A ferrugem asiática da soja**

A ferrugem asiática da soja pode ser causada por duas espécies fúngicas, *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & P. Sydow e *P. meibomiae* (Arthur) Arthur, que diferem genética e patologicamente (Goellner et al., 2010). *P. pachyrhizi* causa maiores danos, devastando campos de produção e resultando em enormes prejuízos, principalmente quando as condições ambientais são favoráveis à multiplicação do patógeno (Hartman et al., 1991; Yorinori et al., 2005). *P. meibomiae* é uma espécie latino-americana menos agressiva do que *P. pachyrhizi* (Bonde et al., 2006), de ocorrência endêmica em regiões com temperatura amena e umidade relativa elevada (Godoy & Canteri, 2003) e raramente causa danos econômicos no rendimento da soja (Yorinori, 2005).

Os fungos causadores de ferrugem, *P. pachyrhizi* e *P. meibomiae*, têm uma ampla gama de hospedeiros, que é incomum para outros patógenos causadores de ferrugem (Bonde et al.; 2008). No campo, a infecção do tecido foliar por *P. pachyrhizi* foi relatada para 31 espécies de 17 gêneros de plantas leguminosas, e 60 espécies em outros gêneros sob condições controladas (Goellner et al., 2010). Por outro lado, *P. meibomiae* infecta 42 espécies de 19 gêneros de leguminosas, e 18 espécies adicionais, após inoculação artificial, apresentaram sintomas típicos da doença com produção das estruturas reprodutivas (Sinclair & Hartman, 1999).

O agente causal da ferrugem asiática da soja foi classificado na Ásia, em 1902, como *P. pachyrhizi* (Hennings, 1903). Desde a sua primeira constatação, este fungo foi relatado em outros países do Oriente e do Ocidente ao longo do último século (Yorinori, 2005). A primeira ocorrência da doença no Continente Americano foi relatada em 1976 (Vakili & Bromfield, 1976) e, desde então, tem sido observada no Brasil, Colômbia e Costa Rica (Bromfield, 1984).

*Phakopsora pachyrhizi* tornou-se uma ameaça para a produção de soja brasileira em 2001, quando foi constatado pela primeira vez no oeste e norte do Paraná e gradativamente espalhou-se por todo o Brasil (Henning & Godoy, 2006) causando danos que chegaram a 100% em áreas não protegidas (Andrade et al., 2002). Nos Estados Unidos a doença foi relatada em 2004 (Schneider et al., 2005; Stokstad, 2004), porém a disseminação dentro do continente foi limitada, devido principalmente à baixa disponibilidade de inóculo e condições climáticas desfavoráveis (Christiano & Scherm, 2007; Zhang et al., 2012).

Como todas as outras ferrugens, *P. pachyrhizi* é um patógeno biotrófico. Produz, assexuadamente, uredósporos dicarióticos dentro de urédias globososas em soja e outros hospedeiros (Ono et al., 1992). Na natureza, os uredósporos são os esporos predominantes responsáveis pela incremento da doença no campo (Bromfield, 1984). Os estádios espermogonial e aecial são desconhecidos no ciclo de vida desse fungo (Vittal et al., 2012; Zhang et al., 2012). Télia e teliósporos ocorrem em diferentes hospedeiros, incluindo a soja, mas a germinação dos teliósporos na natureza não foi relatada (Bromfield, 1984). O processo de infecção basidial é desconhecido, gerando dúvidas quanto à alternância de hospedeiro (Goellner et al., 2010). No entanto, a germinação de teliósporos e a formação de basidiósporos podem ser induzidos em condições de laboratório (Saksirirat e Hoppe, 1991).

Os eventos da reprodução sexuada, cariogamia e recombinação genética, não ocorrem no estágio uredinial, no entanto diversos estudos

relatam variação patogênica em *P. pachyrhizi* (Freire et al., 2008; Barnes et al., 2009; Twizeyimana et al., 2011; Zhang et al., 2012).

O diagnóstico da doença requer a observação dos sintomas caracterizados por pequenos pontos na superfície adaxial, mais escuros do que o tecido sadio da folha, com correspondente protuberância na superfície abaxial, onde observa-se uma pequena elevação, no centro ou bordos das lesões, constituída pela cutícula que recobre a massa de uredósporos produzida no interior de urédias globosas (Alexopoulos et al., 1996). Ao romper a cutícula, forma-se um poro por onde saem os uredósporos. Inicialmente de coloração hialina, os uredósporos tornam-se bege e acumulam-se ao redor dos poros ou são dispersos pelo vento (Yorinori, 2005).

A ferrugem asiática da soja é uma doença policíclica, pois múltiplos ciclos de infecção podem ocorrer em um único ciclo do hospedeiro (Godoy & Lazzarottoda, 2005), garantindo a disseminação dos uredósporos dentro da mesma área de cultivo da soja e áreas adjacentes às lavouras (Brow & Hovmoller, 2002). Na ausência de plantas de soja infectadas, a introdução do patógeno em áreas isentas da doença, ocorre a partir de hospedeiros alternativos ou plantas voluntárias, fontes potenciais de uredósporos para o reinício da doença (Bromfield, 1984). A contínua multiplicação e permanência dos uredósporos nestas plantas favorecem a sobrevivência do fungo e servem de elo entre uma safra e a seguinte, antecipando o surgimento da doença (Yorinori, 2005).

### **2.3 – Resistência da soja a *P. pachyrhizi***

O plantio de cultivares de sojas resistentes à ferrugem asiática é recomendado para o manejo da doença por ser a melhor alternativa para reduzir os custos de produção e impacto ambiental causado pelo controle químico (Hartman et al., 2005).

No patossistema soja-*P. pachyrhizi* já foram descritos seis genes dominantes (*Rpp*: resistência a *P. pachyrhizi*), nomeados *Rpp1* a *Rpp6* (Bromfield, 1984; Bromfield & Hartwig, 1980; Hartwig & Bromfield, 1983;

Hartwig, 1986; Garcia et al., 2008; Li et al., 2012), que conferem resistência a isolados específicos (Garcia et al., 2008).

Existem vários relatos da ineficácia dos genes *Rpp* quando inoculados com isolados de *P. pachyrhizi* de diferentes continentes (Bonde et al., 2006; Paul & Hartman, 2009; Pham et al., 2009). No Brasil, a resistência de genótipos com os genes *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3* e *Rpp4*, foi eficaz até o primeiro relato da introdução do patógeno. Na safra 2001/2002, os materiais selecionados tiveram sua resistência suplantada antes de serem comercializados (Godoy & Lazzarottoda, 2005).

A plasticidade genética das populações de *P. pachyrhizi* tem resultado em indivíduos mais virulentos capazes de suplantam a resistência conferida pelos genes *Rpp* (Hartman, 1992; Yorinori, 2005). Ao longo dos anos, *P. pachyrhizi* tem coevoluído com o hospedeiro, o que pode justificar a variabilidade encontrada na natureza e a baixa eficiência dos genes *R* (Yamaoka et al., 2002; Oliveira et al., 2005). No entanto, acessos de soja têm sido identificados por apresentarem resistência incompleta, expressada por número e tamanho reduzido de urédias, baixa intensidade de esporulação, longo período latente e outros componentes relacionados que reduzem a reprodução do fungo (Hartman et al., 2005).

Os estudos para resistência têm sido conduzidos com base na avaliação do tipo de reação à infecção por isolados de *P. pachyrhizi*. Dois tipos de reações resistentes em soja têm sido relatados: reação imune caracterizada por interação incompatível, sem sintoma visível da doença (Bromfield, 1984; Pham et al., 2009) e lesões castanho-avermelhado (RB) (Bromfield, 1984). As lesões RB são acompanhadas de formação de urédias, com pouca ou nenhuma esporulação (Miles et al., 2011). Em contraste, a interação compatível é caracterizada por lesões castanho-clara (TAN) com mais urédias e esporulação do que nas interações com lesões RB (Goellner et al., 2010).

Apesar das diferenças fenotípicas, nenhum cultivar comercial de soja apresenta resistência a todos os isolados de *P. pachyrhizi* (Hartman et al., 2005). Todos os genes conhecidos têm sido relatados ineficazes quando

desafiados com isolados específicos de *P. pachyrhizi* provenientes de diferentes áreas de cultivo (Yamanaka, et al., 2010; Twizeyimana & Hartman, 2012).

#### **2.4 – Variabilidade em *P. pachyrhizi***

Termos como raças e tipos de virulência foram utilizados para descrever a variabilidade patogênica de diversos agentes causais de doenças em plantas. A virulência é definida como "a capacidade genética de uma determinada raça do patógeno em suplantar a resistência genética do hospedeiro, a qual é eficaz contra outras raças do patógeno, e causar uma interação compatível" (Parlevliet, 1979; Shaner et al., 1992).

Os fungos fitopatogênicos possuem vários mecanismos através dos quais a variabilidade genética pode ser gerada, incluindo recombinação sexual, migração, mutação e hibridação somática (McDonald et al., 1989; Burdon & Silk 1997). Entre estes, a mutação, hibridação somática e a migração são os prováveis mecanismos geradores de variabilidade genética em *P. pachyrhizi* (Twizeyimana et al., 2011).

O grau que a mutação contribui para a diversidade das populações é afetado pela taxa de mutação e tamanho da população do patógeno (Burdon, 1993). Outros eventos mutacionais podem envolver a instabilidade cromossômica, inserções ou transposições de sequências, que por sua vez podem ter efeitos sobre a variabilidade fenotípica de patógenos (Zolan, 1995).

A hibridação somática envolve uma série de eventos como, a anastomose de hifas, que pode ser seguida por heterocariose, fusão nuclear, recombinação e o rearranjo de cromossomos os quais culminam com ciclo parassexual (Park et al, 1999). Nos fungos causadores de ferrugem, anastomose de hifas foi relatada em *Puccinia graminis* (Manners & Bampton, 1957), *P. recondita* (Barr et al., 1964), *P. striiformis* (Little & Manners, 1969), e adicionalmente caracterizada em *P. triticina* (Wang & McCallum, 2009). Este fenômeno pode ocorrer em *P. pachyrhizi* durante a reprodução assexuada (Bromfield 1984). Vittal et al. (2012) descreveu a

primeira evidência da anastomose de tubos germinativos e migração nuclear entre conídios de *P. pachyrhizi*.

A variabilidade genética em populações de *P. pachyrhizi* tem sido estudada em diferentes regiões do mundo (Yamaoka et al., 2002; Bonde et al., 2006; Soares et al., 2009). O primeiro relato de variabilidade para este patógeno ocorreu em 1966 (Lin, 1966), quando isolados de Taiwan produziram diferentes tipos de lesões em folhas de outras espécies de plantas leguminosas (Twizeyimana & Hartman, 2012). Desde então, diversos trabalhos relatam a existência de variabilidade genética em populações de *P. pachyrhizi* (Sinclair & Hartman, 1999; Yamaoka et al., 2002; Bonde et al., 2006; Freire et al., 2008).

Na Austrália duas raças foram identificadas a partir de isolados obtidos de materiais utilizados como fonte de resistência à ferrugem da soja (McLean & Byth, 1980). No Japão, foram relatadas 18 raças em *Pueraria lobata* e *Glycine soja* e nove raças em plantas de soja (Yamaoka et al., 2002). No Brasil, admite-se que haja várias raças fisiológicas de *P. pachyrhizi* no cultivo da soja (Zambolim, 2006), dada a ampla gama de hospedeiros do patógeno (Goellner et al., 2010).

A maioria dos estudos de variabilidade dos isolados de *P. pachyrhizi* tem-se baseado exclusivamente nas diferenças qualitativas na virulência (Bonde et al., 2006; Bromfield et al., 1980; Sinclair & Hartman, 1999; Yamaoka et al., 2002). No entanto, as reações de resistência intermediárias são difíceis de serem caracterizadas com base apenas na designação do tipo de lesão em 'TAN' ou 'RB', e uma abordagem quantitativa é necessária para avaliar a virulência de diferentes isolados (Bonde et al., 2006).

O conhecimento da variabilidade genética do patógeno é importante para o planejamento estratégico dos programas de melhoramento visando resistência à ferrugem da soja, pois quanto maior a variabilidade do patógeno, maior é a sua capacidade de suplantar a resistência de cultivares resistentes (Tschurtschenthaler et al., 2012).

## **2.5 - Critérios de classificação da resistência de soja a *P. pachyrhizi***

A resistência de soja a *P. pachyrhizi* tem sido caracterizada por meio da descrição visual de sintomas e sinais observados em resposta à infecção (Vittal et al., 2014). As respostas frequentemente descritas incluem a reação de imunidade, sem lesões visíveis, indicando interação patógeno-hospedeiro incompatível; lesões castanho-avermelhada (RB-“redishbrown”) sem esporulação (resistência completa); lesões RB com diferentes níveis de esporulação (resistência incompleta); lesões de cor castanho-clara (TAN) com esporulação limitada (resistência parcial) e lesões TAN com produção abundante de uredósporos (reação suscetível) (Miles et al., 2011; Paul et al., 2011).

A classificação do tipo de lesão com base na cor tem sido utilizada para caracterizar a virulência de isolados de *P. pachyrhizi* (Bromfield, 1984). Todavia, a variação na cor da lesão entre as variedades torna difícil agrupar o fenótipo do isolado em um número limitado de tipos de lesão, como RB (resistente) e TAN (suscetível) (Kato & Yorinori, 2008).

Segundo Yamanaka et al. (2010) a cor da lesão não é um bom parâmetro indicativo de resistência, pois os genes de resistência dominante *Rpp* podem contribuir para o escurecimento da cor da lesão em casa de vegetação ou condições de câmara de crescimento (Yamanaka et al., 2008). Assim, Yamanaka et al. (2013) utilizaram parâmetros adicionais para diferenciar o fenótipo resistente e suscetível com base na frequência de lesões contendo urédias (%LU), número de urédias por lesão (NoU), frequência de urédias abertas (%OU) e nível de esporulação (SL). O NoU e o SL são parâmetros desejáveis para avaliar a patogenicidade de isolados de *P. pachyrhizi* (Akamatsu et al., 2013). O SL, NoU e %LU são utilizados para a classificação da resistência de genótipos de soja derivada de genes dominantes e da resistência parcial à ferrugem, os quais são representados por valores numéricos. Portanto, são considerados mais adequados devido à objetividade (Bonde et al., 2006).

## 2.6 – Marcadores Microssatélites (SSR)

Atualmente, diversas técnicas de biologia molecular são utilizadas no estudo da variabilidade genética dos diferentes organismos (Giraud et al., 2008). Os microssatélites são marcadores genéticos que fornecem um elevado nível de informação por loco, permitindo identificar perfis de polimorfismo característicos de cada indivíduo (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

No genoma dos organismos eucariontes existem muitas sequências curtas e repetidas constituídas de um a seis nucleotídeos, denominadas de microssatélites ou *Simple Sequence Repeat* (SSR) (Tautz & Renz, 1984; Ferreira & Grattapaglia, 1996). As sequências de DNA que flanqueiam essas regiões são conservadas dentro e entre espécies e muitas vezes entre gêneros, permitindo a seleção de oligonucleotídeos específicos e complementar a estas sequências para a amplificação dos SSRs via PCR (reação em cadeia da polimerase) (Caixeta et al., 2009).

O polimorfismo nos locos microssatélites é oriundo do *crossing-over* desigual, como também por inserções e deleções de nucleotídeos, que geram variações no número de repetições das sequências simples dos microssatélites (Caixeta et al., 2009). A detecção dos marcadores microssatélites tem sido feita utilizando oligonucleotídeos marcados com fluorescência e eletroforese capilar em sequenciador automático de DNA (Oliveira, 2009). A automação desta análise permite distinguir alelos que variam em uma única unidade repetitiva, o que aumenta a precisão dos dados moleculares e reprodutibilidade dos resultados (Oliveira, 2009).

Pouco se sabe a respeito da variabilidade genética nas populações de *P. pachyrhizi*, devido principalmente a inexistência de marcadores moleculares apropriados (Twizeyimana et al., 2011). O desenvolvimento de locos microssatélites altamente polimórficos no genoma de *P. pachyrhizi* oferece o potencial de análise e classificação de isolados de acordo com a origem geográfica, hospedeiro e patogenicidade, através dos quais é possível o estudo da variabilidade molecular deste fungo (Anderson et al., 2008).

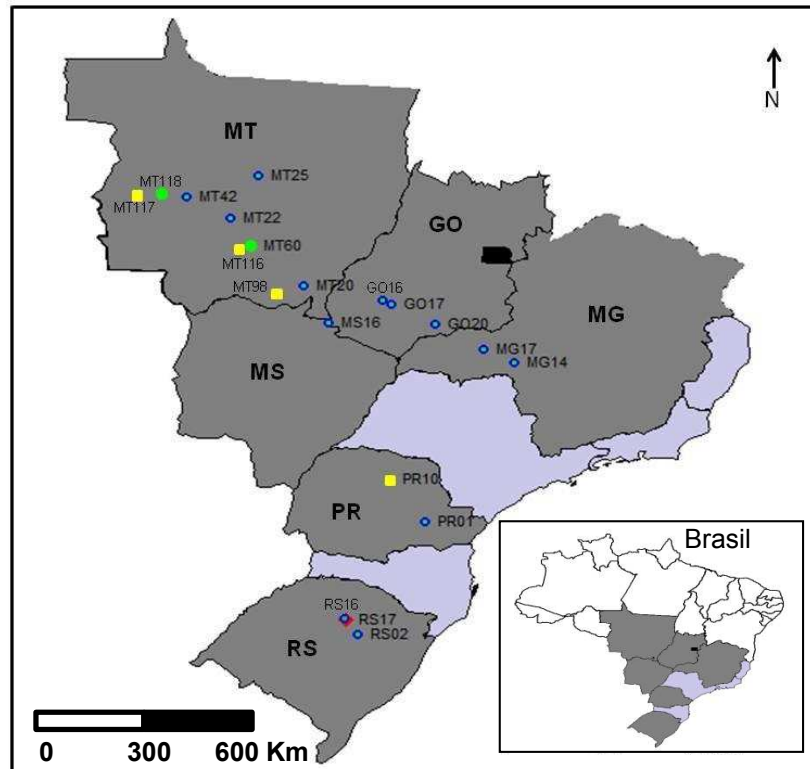
### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 - Obtenção e processamento das amostras

Populações de uredósporos de *P. pachyrhizi* foram obtidas diretamente de folhas de soja com sintomas da ferrugem da soja, oriundas de campos comerciais em final de ciclo, do cultivo da segunda safra e de plantas guaxas em estágios diferentes de crescimento. As amostras foram coletadas durante o ano de 2014 nos principais Estados produtores de soja do Brasil: Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul (Figura 1). Dados do ponto de coleta foram obtidos por meio do Sistema de Posicionamento Global (GPS). As folhas foram coletadas e acondicionadas em sacos plásticos individuais contendo papel umedecido e transportadas em caixas térmicas para o Laboratório de Genética e Genômica de Interação Planta Patógeno/Departamento de Fitopatologia/Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária - BIOAGRO/Universidade Federal de Viçosa - UFV.

Para recuperar o patógeno a partir do material coletado em campo, trifólios das amostras foram analisados sob o microscópio estereoscópico, e folíolos com pústulas esporulantes foram selecionados. As amostras com urédias fechadas ou abertas, mas sem esporulação ativa, foram dispostas em bandejas de acrílico (240 x 240 x 20 mm) contendo papel Germtest dobrado e umedecido com água deionizada para induzir a esporulação em condições de câmara úmida. Após 24-48h, os folíolos foram novamente avaliados sob microscópio estereoscópico para verificar a ocorrência de esporulação.

Amostras com esporulação abundante foram submetidas à coleta imediata dos uredósporos com o auxílio do coletor de esporos a vácuo acoplado a um compressor (Modelo 089/CAL – Fanem). Os uredósporos coletados em tubo eppendorf (1,5 mL) foram armazenados diretamente em freezer a -80°C.



**Figura 1:** Localização geográfica das amostras utilizadas para obter os isolados monolesionais de *Phakopsora pachyrhizi*. O ponto de coleta das amostras RS 16 e RS 17 são próximos. Dados não mostrados para amostras sem coordenadas. Círculos azuis e losango vermelho: amostras safra 2013/2014. Quadrados amarelos: soja guaxa. Círculos verdes: soja do cultivo da segunda safra.

### 3.2 - Multiplicação das populações de *P. pachyrhizi*

Para multiplicação dos uredósporos das populações obtidas foram utilizados folíolos da cultivar Conquista oriundos de plantas cultivadas em casa de vegetação no estágio fenológico V3-V4 (Fehr et al., 1977). Os folíolos destacados foram acondicionados em placa de Petri (150 x 15 mm) contendo um disco de papel filtro esterilizado e umedecido com água deionizada. Sobre os folíolos foram distribuídos 200 µL de solução Tween 20 (0,01%). Lesões com urédias ativas foram selecionadas aleatoriamente e a área ao seu redor recortada com lâmina de bisturi esterilizada. Esses esporos foram usados para inocular a superfície abaxial dos folíolos. Imediatamente à inoculação, as placas foram incubadas a 22 ± 2°C no escuro e após 24h transferidas para câmara de crescimento com 12h de iluminação suplementar por dia a partir de lâmpadas LED. Os folíolos foram

mantidos nessa condição por 15-20 dias. Durante este período o papel de filtro e o algodão, colocado sobre a base do pecíolo para evitar desidratação dos folíolos, foram umedecidos com água deionizada.

### **3.3 - Seleção dos isolados monolesionais de *P. pachyrhizi***

O estudo da variabilidade do patógeno foi realizado através da obtenção de isolados monolesionais a partir de cada amostra ambiental. Para isso, três lesões individualizadas obtidas nos folíolos inoculados na fase de multiplicação da população de *P. pachyrhizi* foram recortadas e o fragmento transferido para gotas de solução Tween 20 (0,01%) adicionadas sobre a superfície abaxial de outro folíolo em áreas equidistantes. A distribuição dos uredósporos foi feita entre as nervuras secundárias próximas à base e ao ápice foliar utilizando pincéis com cerdas macias. Após 15 dias de cultivo, as áreas com esporulação foram cortadas e separadas. Os uredósporos de cada fragmento foram transferidos para a superfície abaxial de um folíolo de soja e originaram um isolado monolesional. O método do cultivo do patógeno em folíolos de soja destacados descrito anteriormente, proposto pelo Comitê de Ação a Resistência a Fungicidas - FRAC (Scherb & Mehl, 2006), com modificação adaptadas para as condições do presente estudo foi utilizado para a obtenção e manutenção dos isolados monolesionais em laboratório.

### **3.4 - Multiplicação dos isolados monolesionais de *P. pachyrhizi***

Para aumentar o inóculo, os isolados foram inicialmente multiplicados pelo método da cultura de folíolos destacados (Scherb & Mehl, 2006), conforme descrito no item 3.3.

A segunda etapa de multiplicação dos isolados monolesionais foi conduzida em plantas da cultivar Conquista. Para isso, os isolados que apresentavam maior taxa de infecção foram selecionados. Após o período latente, os uredósporos foram coletados e utilizados para preparar a suspensão de esporos. As plantas foram inoculadas nos estádios fenológico V3-V4 (Fehr et al., 1977) e todos os trifólios jovens e completamente expandidos foram aspergidos, na face abaxial, com a

suspensão de esporos através de um atomizador de ar direto com capacidade para 0,5 L, adaptado para menor volume de suspensão. Em seguida, as plantas foram acondicionadas em câmara de nevoeiro a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , na ausência de luz, por 24 horas, com turnos de molhamento por aspersão de 5 segundos a cada 10 minutos. Após esse período, para evitar contaminação cruzada de uredósporos, as plantas inoculadas com cada isolado foram mantidas em compartimentos individuais sob condições de casa de vegetação ou câmaras de crescimento a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas, por aproximadamente 30-35 dias. Durante este tempo e após o aparecimento abundante dos uredósporos, em intervalos de 2 ou 3 dias, os esporos foram colhidos por meio de um dispositivo de coleta de esporos a vácuo acoplado a um compressor (Modelo 089/CAL – Fanem) e armazenados diretamente em freezer a  $-80^\circ\text{C}$ . A multiplicação dos uredósporos, em plantas, foi repetida duas vezes para a obtenção de esporos em quantidade suficiente para utilização nos experimentos subsequentes.

### **3.5 - Avaliação da variabilidade fisiológica dos isolados monolesionais de *P. pachyrhizi***

#### **3.5.1 - Série diferenciadora de soja**

Uma série diferenciadora composta por um cultivar suscetível, oito genótipos com genes *R* caracterizados para a resistência à ferrugem asiática da soja e dois genótipos com genes *R* desconhecidos foi utilizada nos experimentos (Tabela 1). Sementes dos 11 genótipos foram depositadas sobre papel filtro, umedecido com água deionizada e contidos em placa de Petri (150 x 15 mm), para a embebição e indução da pré-germinação. As placas assim preparadas permaneceram no escuro por 3-4 dias e periodicamente o papel filtro foi levemente molhado. Após a completa emissão da radícula as plântulas foram transferidas para vasos plásticos com capacidade para 1L, contendo substrato TropstratoHT® (Vida Verde). A adubação foi realizada de acordo com a recomendação da cultura e a irrigação efetuada duas vezes ao dia.

**Tabela 1:** Genótipos de soja utilizados na avaliação da virulência dos isolados monolesionais de *Phakopsora pachyrhizi*

Genótipos	Gene de resistência	Fonte	Referências
PI 200492	<i>Rpp 1</i>	EMBRAPA	Hartwing & Bromfield, 1983
PI 230970	<i>Rpp 2</i>	EMBRAPA	Hartwing & Bromfield, 1983
PI 462312	<i>Rpp 3</i>	EMBRAPA	Hartwing & Bromfield, 1983
PI 459025	<i>Rpp 4</i>	EMBRAPA	Hartwing, 1986
PI 471904	<i>Rpp 5</i>		
PI 567102B*	<i>Rpp 6</i>		Li et al., 2012
PI 587880A	<i>Rpp1?</i>	EMBRAPA	Ray et al., 2009
PI 587905	<i>Rpp1?</i>	EMBRAPA	Miles et al., 2006
PI 594767A	<i>Rpp1?</i>	EMBRAPA	Miles et al., 2006
PI 587886	<i>Rpp1?</i>	EMBRAPA	Ray et al., 2009

\*Recentemente adicionado aos genótipos da série diferenciadora

O crescimento vegetativo dos genótipos foi acompanhado e no estágio de desenvolvimento V2-V3 (Fehr et al., 1977) folíolos de cada genótipo foram destacados e acondicionados em bandejas de acrílico (240 x 240 x 20 mm) contendo duas folhas de papel filtro esterilizado e umedecido com água deionizada. Imediatamente após a secção dos folíolos, foi colocado um pedaço de algodão umedecido sobre a base do pecíolo. Para a inoculação dos folíolos foram utilizados os esporos recém-coletados dos isolados monolesionais. As inoculações foram realizadas com um pulverizador manual, usando uma suspensão acrescida de Tween 20 (0,01%) e ajustada para  $1,0 \times 10^4$  uredósporos/mL. Em seguida as bandejas foram mantidas no escuro, a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , durante 24h, sendo posteriormente transferidas para a câmara de crescimento com 12h de iluminação suplementar por dia a partir de lâmpadas LED, onde permaneceram por 15-17 dias. Como controle suscetível, em todas as inoculações foram incluídos folíolos da cultivar Conquista. Foram utilizadas pelo menos duas repetições/genótipo inoculado.

### 3.5.2 – Resistência dos genótipos de soja e virulência dos isolados monolesionais de *P. pachyrhizi*

O isolado monopustular PPUFV02 de *P. pachyrhizi* derivado de folhas de soja com sintomas de ferrugem da soja coletadas no Campo Experimental da Agronomia da Universidade Federal de Viçosa, em

Viçosa-MG e cultivado no Laboratório de Genômica-UFV foi incluído no presente estudo como um isolado padrão para fins de comparação com os isolados obtidos recentemente.

A caracterização da reação apresentada por cada genótipo de soja foi realizada levando-se em consideração o tipo e cor das lesões, presença ou ausência de esporos e intensidade relativa de esporulação. Todas as avaliações qualitativas foram efetuadas sem o auxílio de instrumentos ópticos.

O tipo de lesão foi caracterizado de acordo com a metodologia descrita por Bromfield (1984). Assim, lesões de coloração castanho-clara e com pouca necrose foram denominadas de “TAN”, lesões de coloração castanho-avermelhada e com necrose extensa de RB - “redishbrown” e a reação de hipersensibilidade tipo “*fleck*” necrótico foram denominadas por “IF”.

A intensidade relativa de esporulação foi avaliada por meio de uma escala de notas (Yamanaka et al., 2010) onde notas de 0 a 3 são atribuídas para a quantidade de uredósporos produzidos, sendo 0 = esporulação não observada, 1 = pouca esporulação, 2 = moderada esporulação, 3 = esporulação abundante. Também foi avaliada a presença ou ausência de lesões com e sem esporos.

Nos mesmos folíolos, a cor da lesão foi classificada com base em seis categorias seguindo a metodologia de Kato e Yorinori (2008). As lesões que apresentavam cor muito escura e cor muito clara foi atribuída a nota 1 e 6, respectivamente. Notas intermediárias foram dadas às lesões diferenciadas dos dois extremos do padrão de cores. Para facilitar a observação da cor da lesão, os uredósporos foram removidos utilizando um pincel com cerdas macias.

Para determinar as características que permitem classificar as diferenças de virulência dos isolados monolesionais de *P. pachyrhizi* e a reação dos genótipos quanto à resistência a ferrugem da soja, imediatamente após a avaliação qualitativa a área foliar foi dividida em três subáreas seguindo a nervura principal até a metade do folíolo e a partir

deste ponto as nervuras secundárias. De cada subárea, 10 lesões foram selecionadas aleatoriamente com caneta hidrográfica sem o auxílio de instrumentos ópticos, de modo a reduzir a subjetividade e erro do parâmetro avaliado.

Na avaliação quantitativa foram utilizados três parâmetros correlacionados: nível de esporulação (SL), número de urédias por lesão (NoU) e frequência de lesões com urédias (%LU) (Yamanaka et al., 2010). Aos 15-17 dias após a inoculação os parâmetros “SL” e “NoU” foram determinados sob o microscópio estereoscópico. Os dados coletados a partir de 30 lesões para cada genótipo de soja foram anotados em planilha do Microsoft Office Excel. A virulência dos isolados e a resistência dos genótipos foram avaliados usando o mesmo protocolo, bem como, a mesma série diferenciadora (Tabela 1).

O nível de esporulação (SL) em cada genótipo de soja foi classificado com base em uma escala de notas (Yamanaka et al., 2010). A seguir, os esporos foram removidos com o auxílio de um pincel para a contagem do número de urédias abertas e fechadas (NoU). Com os dados de “SL” e “NoU” foram efetuados os cálculos para verificar a frequência de lesões com urédias.

Os critérios presença ou ausência de lesões, “SL” relativo e “NoU”, estabelecidos por Akamatsu et al. (2013), foram utilizados para definir o fenótipo dos genótipos de soja quando inoculados com os isolados monolesionais de *P. pachyrhizi* (Tabela 2). A partir da categoria apresentada por cada genótipo de soja foi realizada a classificação dicotômica (virulento/avirulento) dos isolados monolesionais (Tabela 2).

A classificação do fenótipo dos genótipos de soja, com base nos valores “SL”, “NoU” e “%LU”, em resistente e suscetível foi realizada conforme os critérios da Tabela 3, propostos por Yamanaka et al. (2010). A classificação da resistência dos genótipos de soja foi feita de acordo com os critérios apresentados na Tabela 4, conforme proposição de Yamanaka et al. (2010).

**Tabela 2:** Critérios para a classificação da virulência dos isolados monolesionais de *Phakopsora pachyrhizi*

Lesões	Critérios		Categorias	Classificação
	SL relativo	NoU		
-	-	-	Imune	Avirulento
+	0 ou 1	$x < 1,5$	Resistente	Avirulento
+	2 ou 3	$x < 1,5$	Intermediária	Virulento
+	0 ou 1	$1,5 \leq x$	Intermediária	Virulento
+	2 ou 3	$1,5 \leq x$	Suscetível	Virulento

**Tabela 3:** Critérios de classificação dos fenótipos dos genótipos de soja de acordo com os parâmetros “%LU”, “NoU” e “SL”. Os valores foram calculados a partir de 30 lesões selecionadas ao acaso

Critérios	Fenótipo Resistente	Fenótipo Suscetível
% LU	$0,0 \leq x < 70,0$	$70,0 \leq x \leq 100,0$
NoU	$0,0 \leq x < 2,0$	$2,0 \leq x$
SL	$0,0 \leq x < 2,0$	$2,0 \leq x \leq 3,0$

**Tabela 4:** Critérios para a classificação da resistência dos genótipos de soja aos isolados monolesionais de *Phakopsora pachyrhizi*

Critérios	Classificação
Não tem lesões	Imune
Lesões demonstrando o fenótipo resistente para todos os três parâmetros e sem urédias	Altamente resistente
Lesões demonstrando o fenótipo resistente para todos os três parâmetros e com urédias	Resistente
Lesões demonstrando o fenótipo resistente para um dos três parâmetros	Levemente resistente
Lesões demonstrando o fenótipo suscetível para todos os três parâmetros	Suscetível

### 3.6 - Análise da variabilidade molecular com a utilização de marcadores microssatélites

#### 3.6.1 - Extração de DNA

A extração de DNA genômico total foi realizada conforme o protocolo descrito por Maia et al. (2013), com modificações para as condições do presente estudo.

Os DNAs dos isolados monolesionais de *P. pachyrhizi* e de algumas amostras representativas de população de uredósporos foram extraídos a

partir de 200  $\mu$ L de uredósporos secos previamente armazenados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Os esporos foram triturados em nitrogênio líquido, contidos em gral de porcelana previamente autoclavados e, transferidos para tubos falcon de 15 mL, onde foi adicionado tampão de extração [200 mM Tris-HCl (pH 8,0), 250 mM NaCl, 50 mM EDTA e 2% (p/v) SDS] aquecido em banho-maria a  $65^{\circ}\text{C}$ . O macerado foi ressuspensão manualmente até a completa homogeneização. A seguir, os tubos foram mantidos a  $65^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos e, vertidos em intervalos de 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (v/v) e após várias inversões os tubos foram incubados no gelo por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Cuidadosamente, o sobrenadante foi transferido para tubos novos, onde foi adicionado igual volume de isopropanol. A mistura foi homogeneizada por inversão e incubada à temperatura ambiente por 10 minutos. Os tubos foram novamente centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e o sobrenadante descartado. Os *pellets* de DNA foram lavados com etanol 70% por duas vezes e, após cada lavagem os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Para retirar o máximo de etanol os tubos foram rapidamente centrifugados e o restante de sobrenadante retirado com a pipeta. Os *pellets* foram secos em câmara de fluxo laminar durante 60 minutos e ressuspensos em TE [10mM Tris-HCl (pH 8,0) e 1 mM EDTA] acrescido de RNase (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Os tubos foram incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos e o conteúdo homogeneizado em intervalos de 5 minutos. A suspensão foi transferida para tubos eppendorf (1,5 mL) que foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Foi realizada também a extração de DNA de populações de uredósporos de *P. pachyrhizi* correspondente a alguns dos isolados utilizados neste estudo. Três dessas populações foram formadas de uredósporos e a extração de DNA foi realizada conforme o protocolo descrito anteriormente. Para quatro populações efetuou-se a extração de

DNA a partir do tecido foliar infectado. Esta extração de DNA foi realizada conforme o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987).

Para ambos procedimentos, a qualidade e integridade dos DNAs genômico foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), seguida de coloração com brometo de etídio e visualização em fotodocumentador de luz ultravioleta. A imagem foi digitalizada em um sistema de captura de imagens.

A estimativa da concentração foi feita com base no marcador fago  $\lambda$  *lambda* (200 ng/ $\mu$ L). Em seguida, os DNAs foram diluídos para a concentração de 50 ng/ $\mu$ L e armazenados em freezer a -20°C.

### **3.6.2 - Análise dos marcadores microssatélites**

Os oligonucleotídeos espécie-específicos utilizados neste trabalho (Anderson et al., 2008) estão apresentados na Tabela 1 (Apêndice) com adaptações para as condições do presente estudo.

As amplificações foram realizadas em Termociclador Eppendorf, seguindo as condições de termociclagem: ciclo inicial de desnaturação a 95°C, por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C, por 30 segundos, com temperatura de 65 ou 68°C para anelamento dos *primers*, por 1 minuto e 30 segundos, 72°C por, 30 segundos para extensão e uma etapa final de 30 minutos a 60°C. A temperatura de anelamento foi dependente do oligonucleotídeo utilizado para o preparo da reação (Tabela 1 - Apêndice).

As reações de PCR foram preparadas conforme o Kit Qiagen (Type-it® Microsatellite PCR Kit (2000)): MM (5,0  $\mu$ L), oligonucleotídeos marcados com fluorescência (0,25  $\mu$ L, 0,5  $\mu$ L ou 0,75  $\mu$ L), 50 ng de DNA, e água ultrapura autoclavada para completar o volume final em 10  $\mu$ L. O total de 18 pares de *primers* foi testado com todos os isolados monolesionais de *P. pachyrhizi* para verificar se existe polimorfismo nos locos amplificados.

Os fragmentos amplificados dos SSRs foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) e corados com brometo de etídio para constatar a presença dos *amplicons*, sendo o tamanho dos fragmentos estimado por comparação com marcador de peso molecular conhecido. A visualização dos *amplicons* foi realizada em fotodocumentador sob luz

ultravioleta, e suas imagens digitalizadas em um sistema de captura de imagens.

Confirmada a amplificação, a análise do tamanho dos alelos foi realizada por meio de eletroforese capilar no seqüenciador automático ABI 3100. Os fragmentos foram identificados através de corantes acoplados a cada par de *primers*, para a coleta de dados sob um filtro virtual D usando o DataCollection (ABI). O tamanho dos fragmentos amplificados em pares de bases foi estimado usando o programa GeneMapper versão 3.5.

## 4 - RESULTADOS

### 4.1 – Obtenção dos isolados monolesionais de *P. pachyrhizi*

Durante os meses de janeiro a setembro de 2014, coletou-se 199 amostras de folhas de soja infectadas com populações de *P. pachyrhizi* nas principais regiões produtoras de soja e em outros diversos locais do Brasil. Deste total, 138 amostras foram recuperadas na fase de multiplicação da população do patógeno e destas, foram obtidos 400 isolados monolesionais.

No total, 68 isolados monolesionais de *P. pachyrhizi* foram multiplicados e armazenados diretamente no freezer -80°C e 113 isolados estão em cultivo pelo método da cultura de folíolos destacados em condições de laboratório. Dentre os isolados multiplicados, 26 foram utilizados para a classificação da reação de resistência dos genótipos de soja e estudos da virulência. Estes mesmos isolados foram caracterizados quanto a variabilidade molecular por meio de marcadores microssatélites.

Os isolados monolesionais de *P. pachyrhizi* utilizados neste estudo são representativos de 24 locais geograficamente distintos, em seis Estados localizados em três regiões brasileiras: Centro-Oeste, Sudeste e Sul. Apenas um isolado DF 01-1 tem origem no Distrito Federal. Dois isolados de Minas Gerais (MG 19-1 e MG 19-2) e do Mato Grosso (MT 117-1 e MT 117-2) foram obtidos da mesma amostra. Mais da metade dos isolados (54%) foram obtidos de amostras ambientais coletadas na região Centro-Oeste, enquanto 22% e 20% são provenientes das regiões Sul e Sudeste, respectivamente, e 4% tem origem no Distrito Federal. A percentagem de isolados oriundos das amostras coletadas durante a safra 2013/2014 de soja corresponde a 73% dos hospedeiros, 19% são de plantas guaxas e 8% do cultivo da segunda safra (Tabela 5).

**Tabela 5:** Identificação dos isolados monolesionais de *Phakopsora pachyrhizi*, obtidos de amostras de folhas infectadas de soja coletadas nas principais regiões produtoras de soja do Brasil e outros diversos locais durante o ano de 2014, utilizados para as análises da variabilidade fisiológica e molecular

N°	Isolados <sup>a</sup>	Origem	Regiões	Ano	Hospedeiros	Coordenadas	
						Latitude	Longitude
1	MG 14-1	Araxá, Minas Gerais (MG)	Sudeste	2014	Soja	19° 36' 46.908" S	47° 11' 53.880" O
2	MG 17-1	Uberlândia, Minas Gerais (MG)	Sudeste	2014	Soja	19° 7' 59.880" S	48° 10' 25.932" O
3	MG 18-1	Uberlândia, Minas Gerais (MG)	Sudeste	2014	Soja	-	-
4	MG 19-1 <sup>b</sup>	Uberlândia, Minas Gerais (MG)	Sudeste	2014	Soja	-	-
5	MG 19-2 <sup>c</sup>	Uberlândia, Minas Gerais (MG)	Sudeste	2014	Soja	-	-
6	PR 01-3	Ponta Grossa, Paraná (PR)	Sul	2014	Soja	25° 15' 16.200" S	50° 0' 58.104" O
7	PR 08-4	Tibagi, Paraná (PR)	Sul	2014	Soja	-	-
8	PR 10-1	Londrina, Paraná (PR)	Sul	2014	Soja Guaxa	23° 45' 55.310" S	51° 8' 43.620" O
9	RS 02-3	Marques de Souza, Rio Grande do Sul (RS)	Sul	2014	Soja	29° 15' 3.816" S	52° 9' 42.804" O
10	RS 16-2	Soledade, Rio Grande do Sul (RS)	Sul	2014	Soja	28° 40' 55.740" S	52° 35' 41.172" O
11	RS 17-1	Soledade, Rio Grande do Sul (RS)	Sul	2014	Soja	28° 42' 21.888" S	52° 34' 31.080" O
12	GO 16-2	Montividiu, Goiás (GO)	Centro-Oeste	2014	Soja	17° 23' 10.539" S	51° 22' 1.024" O
13	GO 17-12	Rio Verde, Goiás (GO)	Centro-Oeste	2014	Soja	17° 33' 0.720" S	51° 5' 57.444" O
14	GO 20-1	Itumbiara, Goiás (GO)	Centro-Oeste	2014	Soja	18° 14' 19.752" S	49° 42' 48.600" O
15	MS 16-1	Costa Rica, Mato Grosso do Sul (MS)	Centro-Oeste	2014	Soja	18° 12' 45.972" S	53° 7' 16.536" O
16	MT 20-5	Alto Garças, Mato Grosso (MT)	Centro-Oeste	2014	Soja	16° 52' 2.136" S	53° 53' 28.752" O
17	MT 22-2	Diamantino, Mato Grosso (MT)	Centro-Oeste	2014	Soja	14° 28' 16.284" S	56° 14' 31.560" O
18	MT 25-1	Sorriso, Mato Grosso (MT)	Centro-Oeste	2014	Soja	13° 0' 09.756" S	55° 22' 9.660" O
19	MT 42-2	Campo Novo do Parecis, Mato Grosso (MT)	Centro-Oeste	2014	Soja	13° 43' 54.500" S	57° 38' 2.600" O
20	MT 60-2	Chapada dos Guimarães, Mato Grosso (MT)	Centro-Oeste	2014	Soja Safrinha	15° 28' 14.360" S	55° 35' 26.760" O
21	MT 98-2	Itiquira, Mato Grosso (MT)	Centro-Oeste	2014	Soja Guaxa	17° 12' 36.910" S	54° 45' 35.800" O
22	MT 116-2	Cuiabá, Mato Grosso (MT)	Centro-Oeste	2014	Soja Guaxa	15° 42' 5.170" S	55° 51' 17.250" O
23	MT 117-1 <sup>d</sup>	Campos de Júlio, Mato Grosso (MT)	Centro-Oeste	2014	Soja Guaxa	13° 42' 10.110" S	59° 15' 45.830" O
24	MT 117-2 <sup>e</sup>	Campos de Júlio, Mato Grosso (MT)	Centro-Oeste	2014	Soja Guaxa	13° 42' 10.110" S	59° 15' 45.830" O
25	MT 118-1	Sapezal, Mato Grosso (MT)	Centro-Oeste	2014	Soja Safrinha	13° 35' 20.710" S	58° 33' 19.790" O
26	DF 01-1	Brasília, Distrito Federal (DF)	Centro-Oeste	2014	Soja	-	-

<sup>a</sup>Identificação dos isolados em três partes: (i) origem da amostra (MG = Minas Gerais, PR = Paraná, RS = Rio Grande do Sul, GO = Goiás, MS = Mato Grosso do Sul, MT = Mato Grosso, DF = Distrito Federal); (ii) número de localização das amostras e (iii) número do isolamento monolesional.

<sup>b,c</sup>Isolados monolesionais obtidos da mesma amostra ambiental coletada em Minas Gerais.

<sup>d,e</sup>Isolados monolesionais obtidos da mesma amostra ambiental coletada no Mato Grosso.

## 4.2 - Variabilidade fisiológica dos isolados monolesionais de *P. pachyrhizi*

### 4.2.1 - Tipo de reação e intensidade relativa de esporulação

Três tipos diferentes de reação ocorreram nos genótipos inoculados em resposta à infecção pelos isolados monolesionais de *P. pachyrhizi*: reação de hipersensibilidade caracterizada por lesões necróticas pequenas, denominada imunidade com *flecks* (IF), reação de resistência com lesões de coloração castanho-avermelhada (RB-“redishbrown”) e necrose extensa e reação de suscetibilidade com lesões esporulantes de coloração castanho-claro (TAN) (Figura 2).



**Figura 2:** Fenótipos representativos observados em folíolos dos genótipos de soja PI 587905 (*Rpp1?*) (A), PI 471904 (*Rpp5*) (B) e PI 200492 (*Rpp1*) (C) aos quinze dias após a inoculação com  $1,0 \times 10^4$  uredósporos/mL do isolado monolesional RS16-2 de *Phakopsora pachyrhizi*. A: reação de hipersensibilidade tipo “fleck”. B: lesões castanho-avermelhadas (RB-“redishbrown”) com pouca esporulação. C: lesões castanho-claras (TAN) com pouca necrose e esporulação abundante. Lesões representativas observadas na face abaxial são indicadas pelas setas.

A cultivar Conquista e os genótipos PI 200492 (*Rpp1*) e PI 462312 (*Rpp3*) apresentaram lesão TAN com abundante esporulação em resposta a inoculação com todos os isolados. Os genótipos PI 230970 (*Rpp2*), PI 459025 (*Rpp4*), PI471904 (*Rpp5*), PI 567102B (*Rpp6*) e PI 594767-A (*Rpp1?*) apresentaram lesão RB, enquanto reação de imunidade com *flecks* necróticos foi observada nos genótipos PI 587880-A (*Rpp1?*), PI 587905 (*Rpp1?*) e PI 587886 (*Rpp1?*) para todos os isolados (Tabela 6). Dependendo do isolado, diferentes níveis de esporulação foram observados nos genótipos PI 230970 (*Rpp2*), PI 459025 (*Rpp4*), PI471904 (*Rpp5*) e PI 567102B (*Rpp6*) (Tabela 6). Já em PI 594767-A (*Rpp1?*)

observou-se somente lesões RB sem esporulação para todos os isolados (Tabela 6).

Os genótipos de soja PI 230970 (*Rpp2*), PI 459025 (*Rpp4*), PI471904 (*Rpp5*) e PI 567102B (*Rpp6*) responderam diferentemente aos isolados dos Estados de Minas Gerais, Paraná e Mato Grosso quanto à intensidade de esporulação. Enquanto no PI 459025 o tipo de lesão foi constante para todos os isolados, exceto o isolado MG 17-1, diferenças na esporulação em PI 459025 (*Rpp4*), PI471904 (*Rpp5*) e PI 567102B (*Rpp6*) foram observadas para os isolados do Rio Grande do Sul. PI 459025 (*Rpp4*) apresentou lesões TAN quando inoculado com RS 16-2. Para os isolados do Estado de Goiás verificaram-se diferenças somente na intensidade de esporulação apresentada pelos acessos PI 230970 (*Rpp2*), PI471904 (*Rpp5*) e PI 567102B (*Rpp6*) (Tabela 6).

Os isolados monolesionais MG 18-1 e MT 116-2 foram os que produziram maior quantidade de uredósporos em todos os genótipos, exceto em PI471904 (*Rpp5*), onde se observou menor intensidade de esporulação (Tabela 6). O isolado PR01-3 apresentou o mesmo perfil fenotípico do isolado padrão PPUFV02 para o tipo de lesão, bem como intensidade de esporulação. Perfil semelhante também foi observado entre os isolados GO 16-2, GO 17-12 e MT 118-1, os quais produziram grande quantidade de uredósporos no genótipo PI 567102B (*Rpp6*). Os isolados MT 20-5, MT 60-2 e DF 01-1 apresentaram o mesmo tipo de lesão e intensidade de esporulação. Para estes isolados não observou-se esporulação em PI471904 (*Rpp5*), distinguindo-se dos isolados RS 17-1 e MS 16-1, que apresentaram esporulação. Por outro lado, os isolados MG 14-1 e MG 19-1 se diferenciaram dos isolados RS 17-1 e MS 16-1 por produzirem abundante esporulação no genótipo acesso PI 567102B (*Rpp6*). Apenas o isolado MT 22-2 produziu lesão RB no genótipo PI 462312 (*Rpp3*). Os demais isolados se diferenciaram no tipo de lesão ou na intensidade de esporulação para um mesmo genótipo (Tabela 6).

**Tabela 6:** Tipos de reação e intensidade relativa de esporulação em folíolos destacados dos genótipos de soja aos 15-17 dias após inoculação com os isolados monolesionais de *Phakopsora pachyrhizi* sob condições de laboratório

Genótipos	Isolados <sup>a</sup>											
	Padrão	Região Sudeste					Região Sul					
		Minas Gerais (MG)					Paraná (PR)			Rio Grande do Sul (RS)		
	PPUFV02	MG 14-1	MG 17-1	MG 18-1	MG 19-1	MG 19-2	PR 01-3	PR 08-4	PR 10-1	RS 02-3	RS 16-2	RS 17-1
PI 200492 ( <i>Rpp1</i> )	TAN/3 <sup>b</sup>	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3
PI 230970 ( <i>Rpp2</i> )	RB/3	RB/3	RB/2	RB/3	RB/3	RB/1	RB/3	RB/2	RB/3	RB/3	RB/3	RB/3
PI 462312 ( <i>Rpp3</i> )	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3
PI 459025 ( <i>Rpp4</i> )	RB/3	RB/3	TAN/3	RB/3	RB/3	RB/3	RB/3	RB/1	RB/1	RB/2	TAN/3	RB/3
PI471904 ( <i>Rpp5</i> )	RB/0	RB/1	RB/1	RB/2	RB/1	RB/1	RB/0	RB/1	RB/0	RB/0	RB/1	RB/1
PI 567102B ( <i>Rpp6</i> )	RB/0	RB/3	RB/3	RB/3	RB/3	RB/2	RB/0	RB/2	RB/0	RB/1	RB/1	RB/1
PI 587880-A ( <i>Rpp1?</i> )	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF
PI 587905 ( <i>Rpp1?</i> )	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF
PI 594767-A ( <i>Rpp1?</i> )	RB/0	RB/0	RB/0	RB/0	RB/0	RB/0	RB/0	RB/0	RB/0	RB/0	RB/0	RB/0
PI 587886 ( <i>Rpp1?</i> )	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF
Controle	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3

Continua...

<sup>a</sup>Identificação dos isolados em três partes: (i) origem da amostra (MG = Minas Gerais, PR = Paraná, RS = Rio Grande do Sul, GO = Goiás, MS = Mato Grosso do Sul, MT = Mato Grosso, DF = Distrito Federal); (ii) número de localização das amostras e (iii) número do isolamento monolesional.

<sup>b</sup>Intensidade relativa de esporulação para os tipos de lesões IF, RB e TAN foi avaliada utilizando uma escala de notas de 0 a 3, onde 0 = esporulação não observada, 1 = pouca esporulação, 2 = moderada esporulação, 3 = esporulação abundante (Yamanaka et al., 2010). As avaliações foram efetuadas sem o auxílio de instrumentos ópticos.

IF = imunidade com *flecks* necróticos, RB = lesões castanho-avermelhado, TAN = lesões castanho-clara.

Tabela 6 (Continuação)

Genótipos	Isolados <sup>a</sup>														
	Região Centro-Oeste														DF <sup>d</sup>
	Goiás (GO)			MS <sup>c</sup>	Mato Grosso (MT)										
	GO 16-2	GO 17-12	GO 20-1	MS 16-1	MT 20-5	MT 22-2	MT 25-1	MT 42-2	MT 60-2	MT 98-2	MT 116-2	MT117-1	MT117-2	MT118-1	
PI 200492 ( <i>Rpp1</i> )	TAN/3 <sup>b</sup>	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3
PI 230970 ( <i>Rpp2</i> )	RB/3	RB/3	RB/1	RB/3	RB/3	RB/1	RB/3	RB/3	RB/3	RB/2	RB/3	RB/1	RB/2	RB/3	RB/3
PI 462312 ( <i>Rpp3</i> )	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	RB/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3
PI 459025 ( <i>Rpp4</i> )	RB/3	RB/3	RB/3	RB/3	RB/3	RB/3	RB/1	RB/1	RB/3	RB/3	RB/3	RB/3	RB/3	RB/3	RB/3
PI471904 ( <i>Rpp5</i> )	RB/1	RB/1	RB/0	RB/1	RB/0	RB/1	RB/0	RB/1	RB/0	RB/1	RB/2	RB/2	RB/1	RB/1	RB/0
PI 567102B ( <i>Rpp6</i> )	RB/3	RB/3	RB/1	RB/1	RB/1	RB/1	RB/2	RB/1	RB/1	RB/3	RB/3	RB/3	RB/2	RB/3	RB/1
PI 587880-A ( <i>Rpp1?</i> )	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF
PI 587905 ( <i>Rpp1?</i> )	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF
PI 594767-A ( <i>Rpp1?</i> )	IF	RB/0	RB/0	RB/0	RB/0	RB/0	RB/0	RB/0	RB/0	RB/0	RB/0	RB/0	RB/0	RB/0	RB/0
PI 587886 ( <i>Rpp1?</i> )	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF	IF
Controle	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3	TAN/3

<sup>a</sup>Identificação dos isolados em três partes: (i) origem da amostra (MG = Minas Gerais, PR = Paraná, RS = Rio Grande do Sul, GO = Goiás, MS = Mato Grosso do Sul, MT = Mato Grosso, DF = Distrito Federal); (ii) número de localização das amostras e (iii) número do isolamento monolesional.

<sup>b</sup>Intensidade relativa de esporulação para os tipos de lesões IF, RB e TAN foi avaliada utilizando uma escala de notas de 0 a 3, onde 0 = esporulação não observada, 1 = pouca esporulação, 2 = moderada esporulação, 3 = esporulação abundante (Yamanaka et al., 2010). As avaliações foram efetuadas sem o auxílio de instrumentos ópticos.

<sup>c</sup>MS: Mato Grosso do Sul

<sup>d</sup>DF: Distrito Federal

IF = imunidade com *flecks* necróticos, RB = lesões castanho-avermelhado, TAN = lesões castanho-clara.

#### **4.2.2 - Agressividade e virulência dos isolados monolesionais de *P. pachyrhizi***

Os genótipos PI 471904 e PI 567102B, com genes de resistência recentemente identificados, *Rpp5* e *Rpp6*, respectivamente, apresentaram diferentes classes de resistência quando confrontados com todos os isolados monolesionais de *P. pachyrhizi*. As interações dos isolados de *P. pachyrhizi* com o genótipo PI 471904, que contém o gene *Rpp5*, foi classificada em três categorias. O fenótipo altamente resistente foi observado para seis isolados, PR 01-3 e RS 02-3, ambos da região Sul e, GO 20-1, MT 20-5, MT 25-1 e MT 60-2 da região Centro-Oeste. Fenótipo resistente foi verificado em oito interações distribuídas em quatro Estados, com os isolados PR 08-4 e PR 10-1 do Paraná, isolado RS 17-1 oriundo do Rio Grande do Sul, isolado GO 17-12 de Goiás e isolados MT 22-2 e MT 42-2 provenientes do Mato Grosso e para os isolados do Mato Grosso do Sul e Distrito Federal. Ao contrário do observado para os isolados do Paraná, o fenótipo levemente resistente foi observado para todos os isolados de Minas Gerais, o qual também foi verificado para cinco isolados do Mato Grosso, um isolado de Goiás e Rio Grande do Sul (Tabela 7).

A maior variação na classificação dos genótipos de soja foi observada para PI 567102B (*Rpp6*), o qual apresentou quatro categorias diferentes quando contrastado com todos os isolados. Apenas o isolado PR 01-3 induziu fenótipo altamente resistente, classificação também verificada para o isolado padrão PPUFV02. Fenótipo resistente foi induzido por dois isolados da região Sul e a seis isolados da região Centro-Oeste e, levemente resistente por sete isolados das diferentes regiões geográficas e pelo isolado do Distrito Federal. Suscetibilidade foi verificada a três isolados da região Sudeste e cinco isolados da região Centro-Oeste (Tabela 7).

Todos os isolados monolesionais de *P. pachyrhizi* induziram fenótipo de suscetibilidade em PI 200492 (*Rpp1*), PI 462312 (*Rpp3*) e na cultivar Conquista, introduzida neste estudo como padrão de suscetibilidade. Cinco isolados, sendo um do Paraná (PR 08-4) e Goiás (GO 20-1), e três do Mato Grosso (MT 22-2, MT 116-2 e MT 117-1) induziram fenótipo levemente

resistente no genótipo PI 230970 (*Rpp2*), enquanto um isolado de Minas Gerais (MG 19-1), dois isolados do Rio Grande do Sul (RS 02-3 e RS 17-1) e três isolados do Mato Grosso (MT 22-2, MT 25-1 e MT 42-2) induziram o mesmo fenótipo no genótipo PI 459025 (*Rpp4*). Por outro lado, todos os isolados de *P. pachyrhizi* não causaram sintomas nos genótipos PI 587880-A, PI 587905 e PI 587886, sendo o fenótipo da interação classificado como imune (Tabela 7).

Os isolados de Minas Gerais tenderam a ter o mesmo padrão fenotípico, porém diferenças foram observadas para os isolados MG 14-1 e MG 19-1. Três isolados, MG 17-1, MG 18-1 e MG 20-1 tiveram a mesma resposta para todos os genótipos de soja, enquanto o isolado MG 14-1 apresentou o mesmo comportamento que dois isolados do Mato Grosso, MT 117-2 e MT 118-1, e um isolado do Rio Grande do Sul, RS 16-2. Para os isolados do Paraná, Rio Grande do Sul e Goiás observou-se nítidas diferenças de comportamento. Apenas os isolado PR 10-1 e RS 17-1 tiveram o mesmo perfil dos isolados MS 16-1 e MT 42-2, respectivamente. Para os isolados do Mato Grosso obtidos de amostras coletadas de plantas guaxas verificou-se a mesmo perfil, este comportamento foi semelhante aos isolados de Minas Gerais. Dentre estes, os isolados MT 116-2 e MT 117-1, e também os isolados MT 117-2 e MT 118-1 apresentaram o mesmo perfil. Com exceção do isolado MT 42-2, os demais isolados do Mato Grosso tiveram perfil único (Tabela 7).

Nas interações dos isolados monolesionais de *P. pachyrhizi* com os genótipos que contém os genes *Rpp1-6*, verificou-se diferença na agressividade. Os isolados de Uberlândia-MG e o isolado de Itiquira-MT foram mais agressivos do que os isolados dos demais municípios. Apenas dois tipos de resposta foram obtidas para estes isolados, sendo os genótipos classificados como levemente resistente ou suscetível. Para as demais localidades verificou-se que os genótipos selecionados diferiram na sua reação aos isolados e apresentaram diferentes níveis de resistência (Tabela 7).

Para melhor visualizar a virulência dos isolados, adotou-se uma classificação dicotômica. Classificou-se como avirulentos (AVR) os isolados que induziram reações imune e resistente; e como virulentos (VIR), os isolados que induziram reações intermediária ou suscetível (Tabela 8 e 9). Com base nesta classificação, verificou-se que todos os isolados analisados foram virulentos nos genótipos PI 200492 (*Rpp1*), PI 230970 (*Rpp2*), PI 462312 (*Rpp3*) e PI 459025 (*Rpp4*), e avirulentos em PI 587880-A (*Rpp1?*), PI 587905 (*Rpp1?*) e PI 587886 (*Rpp1?*), PI 594767-A (*Rpp1?*) e PI 587886 (*Rpp1*). Fenótipos de virulência ou avirulência foram observados em PI471904 (*Rpp5*) e PI 567102B (*Rpp6*), dependendo do isolado analisado (Tabela 9).

**Tabela 7:** Reações de resistência e de suscetibilidade em folíolos destacados dos genótipos de soja aos 15-17 dias após inoculação com isolados monolesionais de *Phakopsora pachyrhizi* sob condições de laboratório

Região	Sudeste						Sul						Centro-Oeste												DF <sup>c</sup>			
	Minas Gerais (MG)						Paraná (PR)			Rio Grande do Sul (RS)			Goiás (GO)			MS <sup>b</sup>	Mato Grosso (MT)											
	UFV 02 <sup>d</sup>	MG 14-1	MG 17-1	MG 18-1	MG 19-1	MG 20-1	PR 01-3	PR 08-4	PR 10-1	RS 02-3	RS 16-2	RS 17-1	GO 16-2	GO 17-12	GO 20-1	MS 16-1	MT 20-5	MT 22-2	MT 25-1	MT 42-2	MT 60-2	MT 98-2	MT 116-2	MT 117-1		MT 117-2	MT 118-1	DF 01-1
Genótipos	PI 200492 (Rpp1)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
	PI 230970 (Rpp2)	S	S	S	S	S	S	LR	S	S	S	S	S	S	LR	S	S	LR	S	S	S	S	LR	LR	S	S	S	
	PI 462312 (Rpp3)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
	PI 459025 (Rpp4)	S	S	S	S	LR	S	S	S	S	LR	S	LR	S	S	S	S	LR	LR	LR	S	S	S	S	S	S	S	
	PI471904 (Rpp5)	AR	LR	LR	LR	LR	LR	AR	R	R	AR	LR	R	LR	R	AR	R	AR	R	AR	R	AR	LR	LR	LR	LR	R	
	PI 567102B (Rpp6)	AR	LR	S	S	LR	S	AR	LR	R	LR	LR	R	R	S	R	LR	R	S	R	LR	S	S	S	LR	LR	LR	
	PI 587880-A (Rpp1?)	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	
	PI 587905 (Rpp1?)	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	
	PI 594767-A (Rpp1?)	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	
	PI 587886 (Rpp1?)	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	
Controle	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		

<sup>a</sup>Identificação dos isolados em três partes: (i) origem da amostra (MG = Minas Gerais, PR = Paraná, RS = Rio Grande do Sul, GO = Goiás, MS = Mato Grosso do Sul, MT = Mato Grosso, DF = Distrito Federal); (ii) número de localização das amostras e (iii) número do isolamento monolesional.

<sup>b</sup>MS = Mato Grosso do Sul

<sup>c</sup>DF = Distrito Federal

<sup>d</sup>Isolado monopustular padrão PPUFV02

IM = imune, AR = altamente resistente, R = resistente, LR = levemente resistente, S = suscetível

**Tabela 8:** Reações de resistência e de suscetibilidade para a classificação da virulência dos isolados monolesionais de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos destacados dos genótipos de soja aos 15-17 dias após inoculação com sob condições de laboratório

Região	Sudeste						Sul						Centro-Oeste												DF <sup>c</sup>		
	Minas Gerais (MG)						Paraná (PR)			Rio Grande do Sul (RS)			Goiás (GO)			MS <sup>b</sup>	Mato Grosso (MT)										
	UFV 02 <sup>d</sup>	MG 14-1	MG 17-1	MG 18-1	MG 19-1	MG 20-1	PR 01-3	PR 08-4	PR 10-1	RS 02-3	RS 16-2	RS 17-1	GO 16-2	GO 17-12	GO 20-1	MS 16-1	MT 20-5	MT 22-2	MT 25-1	MT 42-2	MT 60-2	MT 98-2	MT 116-2	MT 117-1		MT 117-2	MT 118-1
Genótipos	PI 200492 ( <i>Rpp1</i> )	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	PI 230970 ( <i>Rpp2</i> )	S	S	S	S	S	IT	S	S	S	S	S	S	S	IT	S	S	IT	S	S	S	S	S	IT	S	S	S
	PI 462312 ( <i>Rpp3</i> )	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	PI 459025 ( <i>Rpp4</i> )	S	S	S	S	S	S	S	IT	S	S	S	S	S	S	S	S	IT	IT	S	S	S	S	S	S	S	S
	PI471904 ( <i>Rpp5</i> )	R	R	IT	S	IT	IT	R	R	R	R	IT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	IT	S	S	IT	IT	R
	PI 567102B ( <i>Rpp6</i> )	R	S	S	S	S	S	R	S	R	IT	IT	R	IT	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	IT
	PI 587880-A ( <i>Rpp1?</i> )	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM
	PI 587905 ( <i>Rpp1?</i> )	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM
	PI 594767-A ( <i>Rpp1?</i> )	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	PI 587886 ( <i>Rpp1?</i> )	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM	IM
Controle	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	

<sup>a</sup>Identificação dos isolados em três partes: (i) origem da amostra (MG = Minas Gerais, PR = Paraná, RS = Rio Grande do Sul, GO = Goiás, MS = Mato Grosso do Sul, MT = Mato Grosso, DF = Distrito Federal); (ii) número de localização das amostras e (iii) número do isolamento monolesional.

<sup>b</sup>MS = Mato Grosso do Sul

<sup>c</sup>DF = Distrito Federal

<sup>d</sup>Isolado monopustular padrão PPUFV02

IM = imune, R = resistente, IT = intermediária, S = suscetível

**Tabela 9:** Classificação dicotômica da virulência dos isolados monolesionais de *Phakopsora pachyrhizi*

Região	Sudeste						Sul						Centro-Oeste											DF <sup>c</sup>			
	Minas Gerais (MG)						Paraná (PR)			Rio Grande do Sul (RS)			Goiás (GO)			MS <sup>b</sup>	Mato Grosso (MT)										
	UFV 02 <sup>d</sup>	MG 14-1	MG 17-1	MG 18-1	MG 19-1	MG 20-1	PR 01-3	PR 08-4	PR 10-1	RS 02-3	RS 16-2	RS 17-1	GO 16-2	GO 17-12	GO 20-1	MS 16-1	MT 20-5	MT 22-2	MT 25-1	MT 42-2	MT 60-2	MT 98-2	MT 116-2		MT 117-1	MT 117-2	MT 118-1
Genótipos	PI 200492 (Rpp1)	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR
	PI 230970 (Rpp2)	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR
	PI 462312 (Rpp3)	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR
	PI 459025 (Rpp4)	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR
	PI471904 (Rpp5)	AVR	AVR	VIR	VIR	VIR	VIR	AVR	AVR	AVR	AVR	VIR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	VIR	VIR	VIR	VIR	AVR
	PI 567102B (Rpp6)	AVR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	AVR	VIR	AVR	VIR	VIR	AVR	VIR	VIR	AVR	AVR	AVR	VIR	AVR	AVR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR
	PI 587880-A (Rpp1?)	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR
	PI 587905 (Rpp1?)	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR
	PI 594767-A (Rpp1?)	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR
	PI 587886 (Rpp1?)	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR	AVR
Controle	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	VIR	

<sup>a</sup>Identificação dos isolados em três partes: (i) origem da amostra (MG = Minas Gerais, PR = Paraná, RS = Rio Grande do Sul, GO = Goiás, MS = Mato Grosso do Sul, MT = Mato Grosso, DF = Distrito Federal); (ii) número de localização das amostras e (iii) número do isolamento monolesional.

<sup>b</sup>MS = Mato Grosso do Sul

<sup>c</sup>DF = Distrito Federal

<sup>d</sup>Isolado monopustular padrão PPUFV02

AVR = avirulento, VIR = virulento

### **4.3 - Variabilidade molecular dos isolados monolesionais de *P. pachyrhizi* com a utilização de marcadores microssatélites**

Os 18 marcadores microssatélites foram analisados em um isolado padrão PPUFV02 de *P. pachyrhizi*, em 26 isolados monolesionais de *P. pachyrhizi*, três populações de uredósporos e em quatro amostras de tecido infectado. Observou-se 100% de amplificação dos locos microssatélites do isolado padrão PPUFV02 de *P. pachyrhizi*, em 93% dos isolados monolesionais de *P. pachyrhizi*, 94% das populações de uredósporos e 96% com as amostras de tecido infectado. Do total de locos microssatélites amostrados, somente 6% não apresentaram amplificação (Tabela 10).

Para os locos microssatélites analisados dos isolados monolesionais, populações de uredósporos e tecido infectado observou-se em cada eletroferograma apenas um pico, que representa o tamanho em pares de bases dos *amplicons* obtidos na PCR com os oligonucleotídeos espécie-específicos. Todos os picos considerados apresentavam-se agudos e com alta intensidade, evidenciando a especificidade da amplificação (Figuras 3-6).

Observou-se pouca variabilidade no tamanho em pares de bases do fragmento amplificado em função da variação no número de repetições no loco microssatélite (Tabela 10). A variabilidade observada na maioria dos locos analisados refere-se à variações inferiores à esperada em decorrência de alterações nos números de repetições característicos dos locos microssatélites analisados.

O tamanho dos locos microssatélites dos isolados monolesionais de *P. pachyrhizi* não diferiu do isolado padrão PPUFV02 (Figura 3). Entre os isolados das regiões geográficas e para os isolados obtidos de amostras do cultivo da segunda safra e das plantas guaxas também não foi observada variação (Figuras 3-5). A ausência de variabilidade entre as amplificações obtidas das populações de uredósporos e das amostras de tecido infectado correspondentes, indica que contaminações não ocorreram durante o processo de isolamento dos isolados monolesionais ou que o processo de seleção pode ter sido responsável pela homogeneidade genética observada (Figura 6 e Tabela 10).

**Tabela 10:** Tamanho em pares de bases dos locos microssatélites dos isolados monolesionais de *Phakopsora pachyrhizi*, populações de uredósporos e amostras de tecido infectado amplificadas com 18 oligonucleotídeos espécie-específicos

Isolados <sup>a</sup>	Locos microssatélites (Tamanho esperado)																	
	PP002 (200-223)	PP003 (186-196)	PP006 (159-179)	PP007 (331-333)	PP009 (336-342)	PP010 (205-281)	PP011 (242-256)	PP012 (253-255)	PP014 (279-293)	PP015 (462-471)	PP016 (320-348)	PP017 (208-216)	PP018 (124-144)	PP019 (194-198)	PP021 (335-338)	PP022 (157-163)	PP023 (194-209)	PP024 (139-145)
	(AT) <sub>16</sub>	(AT) <sub>15</sub>	(AGA) <sub>13</sub>	(AG) <sub>15</sub>	(TTA) <sub>10</sub>	(TGT) <sub>21</sub>	(TC) <sub>14</sub>	(AT) <sub>12</sub>	(CT) <sub>17</sub>	(TC) <sub>12</sub>	<sup>b</sup>	(TA) <sub>11</sub>	(TGA) <sub>11</sub>	(TA) <sub>9</sub>	(TA) <sub>12</sub>	(TA) <sub>17</sub>	(TCA) <sub>8</sub>	(AT) <sub>6</sub>
PPUFV02	215	188	177	335	339	227	239	256	280	460	349	210	125	184	332	155	214	138
MG 14*	215	188	178	336	339	226	239	256	279	459	349	211	125	185	333	155	215	ND
MG 14-1	215	188	177	336	339	226	239	255	279	460	349	210	125	184	332	154	214	138
MG 17-1	215	189	177	337	339	226	239	256	279	459	349	209	125	184	333	ND	215	ND
MG 18**	215	188	178	335	339	227	240	256	280	459	349	211	125	185	333	155	215	139
MG 18-1	215	188	178	337	339	227	240	256	279	459	348	211	125	185	333	155	215	ND
MG 19-1	215	189	178	336	339	227	240	256	280	460	349	210	125	184	332	155	214	139
MG 19-2	ND	188	177	335	339	226	239	256	279	460	ND	ND	125	184	332	155	214	138
PR 01-3	215	188	178	ND	340	227	241	255	281	460	349	211	ND	184	333	ND	ND	ND
PR 08**	215	189	178	336	ND	226	240	256	279	459	349	210	126	185	333	155	215	ND
PR 08-4	215	188	177	336	339	226	239	255	279	460	349	210	125	184	332	154	214	138
PR 10-1	217	188	177	ND	339	226	239	256	280	460	ND	210	125	184	333	ND	216	137
RS 02*	215	188	179	336	339	226	240	256	280	460	349	ND	125	185	333	155	215	138
RS 02-3	215	188	178	336	339	226	239	255	279	460	349	210	125	184	332	154	214	138
RS 16*	215	188	178	336	339	226	240	256	279	459	349	210	ND	184	333	155	216	138
RS 16-2	215	188	178	ND	ND	226	241	256	281	460	348	209	125	ND	ND	155	214	ND
RS 17*	215	188	178	ND	339	226	239	256	279	460	349	210	125	184	333	ND	216	138
RS 17-1	215	188	177	335	340	227	239	255	279	460	349	210	125	184	332	155	215	138
GO 16-2	215	188	177	335	339	227	239	255	279	459	349	210	125	184	332	155	214	138
GO 17-12	215	188	177	335	339	226	239	255	279	460	349	210	124	184	332	155	215	139
GO 20-1	215	189	177	336	339	226	240	255	279	460	349	210	125	185	333	155	216	139

Continua...

<sup>a</sup>Identificação dos isolados em três partes: (i) origem da amostra (MG = Minas Gerais, PR = Paraná, RS = Rio Grande do Sul, GO = Goiás, MS = Mato Grosso do Sul, MT = Mato Grosso, DF = Distrito Federal); (ii) número de localização das amostras e (iii) número do isolamento monolesional.

<sup>b</sup> Motif: repetição do alelo

<sup>c</sup> (CAAT)<sub>12</sub>...(TTA)<sub>10</sub>

\*Populações de uredósporos de *P. pachyrhizi* correspondentes aos isolados monolesionais MG 18-1, PR 08-4 e MT 22-2.

\*\*Amostras de tecido infectado correspondentes aos isolados monolesionais MG 14-1, RS 02-3, RS 16-2 e RS 17-1.

Tabela 10 (Continuação)

Isolados <sup>a</sup>	Locos microssatélites (Tamanho esperado)																	
	PP002	PP003	PP006	PP007	PP009	PP010	PP011	PP012	PP014	PP015	PP016	PP017	PP018	PP019	PP021	PP022	PP023	PP024
	(200-223)	(186-196)	(159-179)	(331-333)	(336-342)	(205-281)	(242-256)	(253-255)	(279-293)	(462-471)	(320-348)	(208-216)	(124-144)	(194-198)	(335-338)	(157-163)	(194-209)	(139-145)
	(AT) <sub>16</sub>	(AT) <sub>15</sub>	(AGA) <sub>13</sub>	(AG) <sub>15</sub>	(TTA) <sub>10</sub>	(TGT) <sub>21</sub>	(TC) <sub>14</sub>	(AT) <sub>12</sub>	(CT) <sub>17</sub>	(TC) <sub>12</sub>	<sup>b</sup>	(TA) <sub>11</sub>	(TGA) <sub>11</sub>	(TA) <sub>9</sub>	(TA) <sub>12</sub>	(TA) <sub>17</sub>	(TCA) <sub>8</sub>	(AT) <sub>6</sub>
MS 16-1	215	188	177	336	339	226	239	256	279	460	ND	211	126	185	332	155	214	138
MT 20-5	215	188	177	335	339	226	241	256	280	460	349	210	125	184	332	154	214	138
MT 22**	217	188	178	336	339	226	240	256	279	460	349	211	125	184	333	155	216	ND
MT 22-2	215	188	177	336	339	226	240	256	280	460	349	210	125	184	332	154	214	138
MT 25-1	215	188	175	337	339	227	239	257	279	460	349	210	125	184	332	155	215	138
MT 42-2	215	188	178	337	339	226	239	256	280	460	ND	210	125	185	333	155	216	138
MT 60-2	215	188	178	335	339	226	240	255	278	460	349	210	125	184	332	155	215	138
MT 98-2	ND	188	178	ND	339	226	239	255	279	459	ND	211	125	185	333	155	215	138
MT 116-2	215	188	178	335	339	226	239	255	279	459	349	211	125	185	333	155	216	138
MT 117-1	217	188	177	336	339	227	240	255	279	459	348	211	125	185	333	155	215	138
MT 117-2	ND	188	177	ND	ND	226	239	255	279	460	349	210	125	185	333	155	215	138
MT 118-1	215	188	178	336	339	226	240	255	279	ND	349	210	125	185	333	155	215	ND
DF01-1	215	188	178	338	340	226	239	256	279	459	349	211	125	184	332	ND	215	ND

<sup>a</sup>Identificação dos isolados em três partes: (i) origem da amostra (MG = Minas Gerais, PR = Paraná, RS = Rio Grande do Sul, GO = Goiás, MS = Mato Grosso do Sul, MT = Mato Grosso, DF = Distrito Federal); (ii) número de localização das amostras e (iii) número do isolamento monolesional.

<sup>b</sup> Motif: repetição do alelo

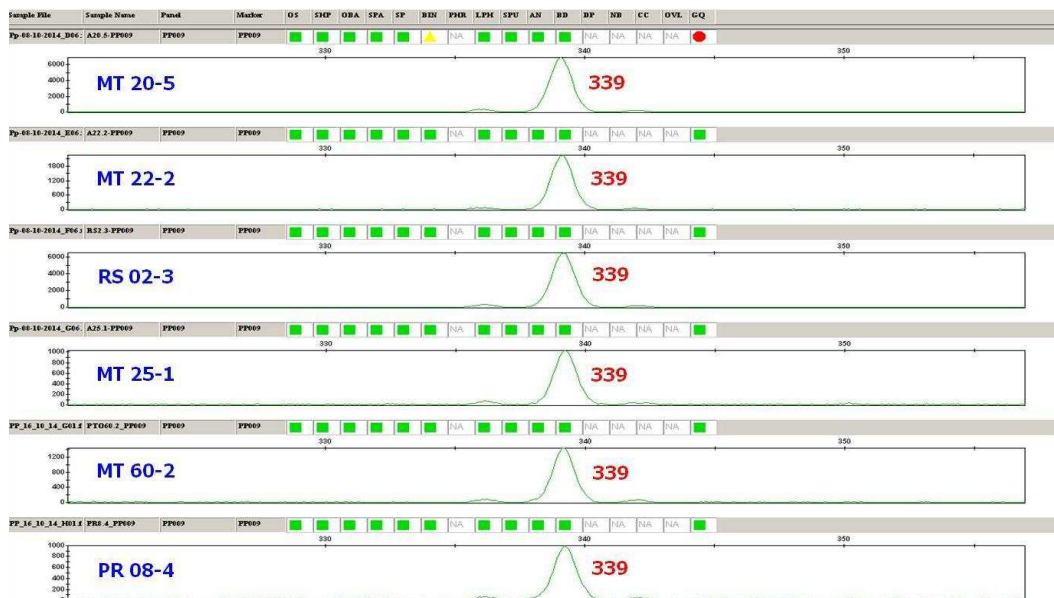
<sup>c</sup> (CAAT)<sub>12</sub>...(TTA)<sub>10</sub>

\*Populações de uredósporos de *P. pachyrhizi* correspondente ao isolado monolesional MT 22-2.

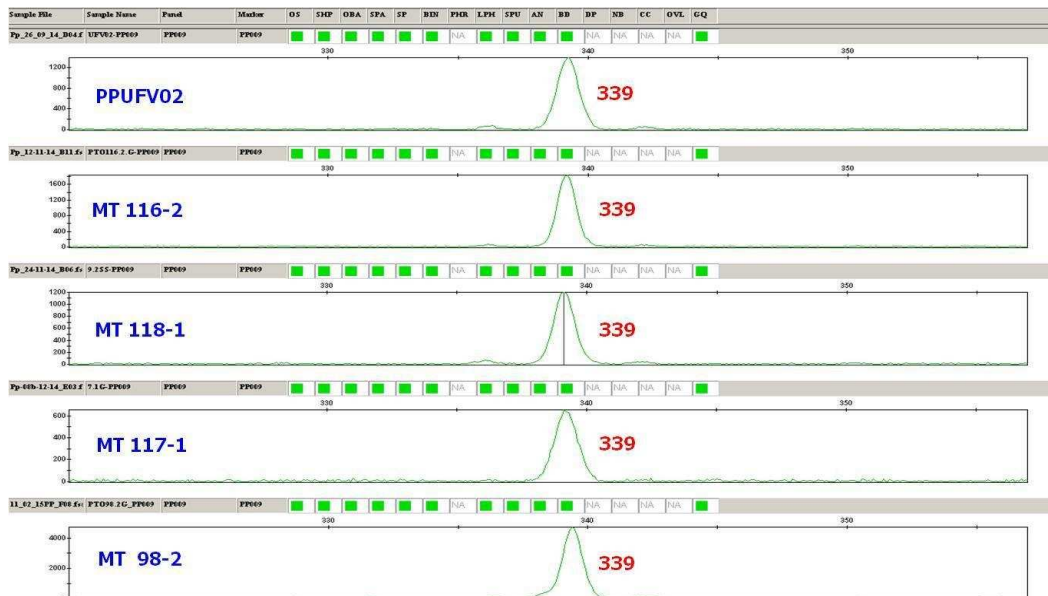
ND: não determinado



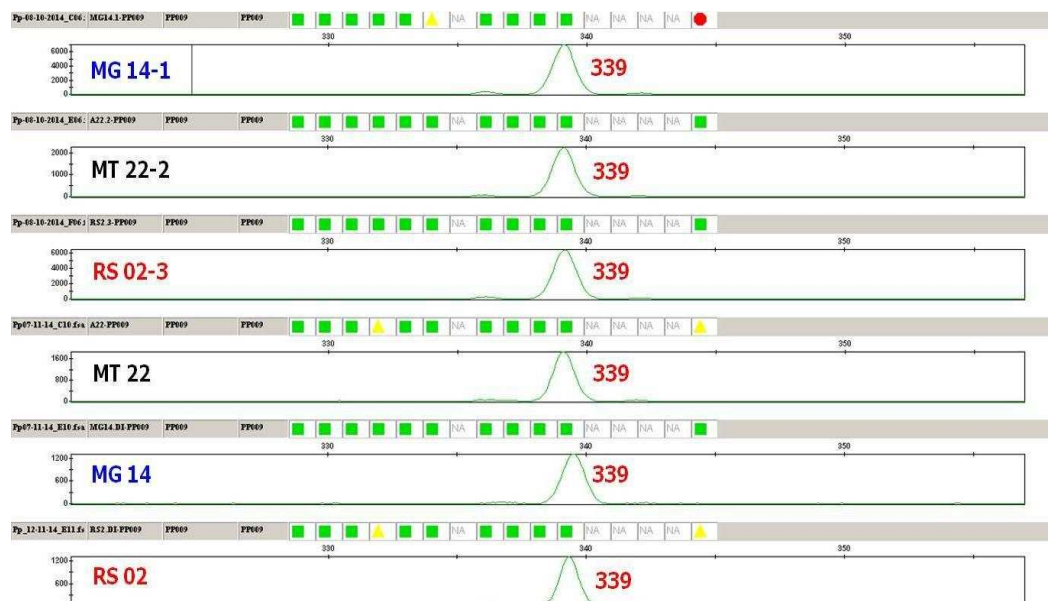
**Figura 3:** Eletroferograma mostrando o tamanho dos fragmentos gerados pela amplificação do loco PP016 dos isolados monolesionais de *P. pachyrhizi* obtidos a partir das amostras coletadas na safra 2013/2014 dos estados produtores de soja: Rio Grande do Sul (RS 17-1), Goiás (GO 16-2 e GO 17-12), Mato Grosso (MT 60-2), Minas Gerais (MG 19-1). PPUFV02: isolado padrão. Análise dos *amplicons* evidenciada no sequenciador automático ABI 3100.



**Figura 4:** Eletroferograma mostrando o tamanho dos fragmentos gerados pela amplificação do Loco PP009 dos isolados monolesionais de *P. pachyrhizi* obtidos a partir das amostras coletadas na safra 2013/2014 dos estados produtores de soja: Mato Grosso (MT 20-5, MT 22-2, MT 25-1, MT 60-2), Rio Grande do Sul (RS 02-3) e Paraná (PR 08-4). Análise dos *amplicons* evidenciada no sequenciador automático ABI 3100.



**Figura 5:** Eletroferograma mostrando o tamanho dos fragmentos gerados pela amplificação do Loco PP09 dos isolados monolesionais de *P. pachyrhizi* obtidos a partir das amostras coletadas do cultivo da segunda safra e de plantas guaxas em 2014 no estado do Mato Grosso (MT 116-2, MT 118-1, MT 117-1, MT 98-2). PPUFV02: isolado padrão. Análise dos *amplicons* evidenciada no sequenciador automático ABI 3100.



**Figura 6:** Eletroferograma mostrando o tamanho dos fragmentos gerados pela amplificação do Loco PP09 dos isolados monolesionais de *P. pachyrhizi* e populações de uredósporos correspondentes obtidos a partir das amostras coletadas na safra 2013/2014 dos estados produtores de soja: Minas Gerais (MG 14-1/MG 14), Mato Grosso (MT 22-2/MT 22) e Rio Grande do Sul (RS 02-3/RS 02). Análise dos *amplicons* evidenciada no sequenciador automático ABI 3100.

## 5 – DISCUSSÃO

As diferenças no número de amostras coletadas e amostras recuperadas podem estar relacionadas à ausência de urédias com estruturas reprodutivas viáveis devido a aplicação de fungicidas nos plantios comerciais de soja; à coleta de amostras com sintomas de outras doenças semelhantes à ferrugem asiática da soja e o manejo fitossanitário da cultivar Conquista, em casa de vegetação. Verificou-se que alguns produtos utilizados no controle de oídio e de ácaros tem efeito fungistático ou fungicida sobre *P. pachyrhizi*, o que ocasionou a perda de alguns isolados durante a multiplicação, quando efetuou-se o manejo fitossanitário das plantas inoculadas com esses produtos.

Os tipos de reação combinado com a intensidade relativa de esporulação obtidos nos genótipos de soja com diferentes genes de resistência permitem inferir que os isolados de *P. pachyrhizi* das regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul são geneticamente similares. Todavia as diferenças na intensidade de esporulação indica a existência de padrões de agressividade diferentes dentre ou entre os isolados dos Estados brasileiros.

Kato & Yorinori (2008) estudaram a virulência de isolados de ferrugem coletados a partir de diferentes locais do Brasil. Embora tenham observado diferenças na virulência dos isolados quando inoculados em diferentes genótipos incluindo PI 200492 (*Rpp1*), PI 230970 (*Rpp2*) e PI 459025 (*Rpp4*), todos os isolados se comportaram de forma idêntica produzindo lesões RB em PI 230970 (*Rpp2*) e PI 459025 (*Rpp4*), enquanto no PI 200492 (*Rpp1*) os isolados induziram lesões RB ou TAN. Os isolados monolesionais, obtidos das amostras coletadas em 2014, induziram lesões TAN com intensa esporulação no genótipo PI 200492 (*Rpp1*), enquanto que nos genótipos PI 230970 (*Rpp2*) e PI 459025 (*Rpp4*) induziram na maioria das interações lesões RB com abundante esporulação, indicando que estes materiais genéticos não são atualmente efetivos para o controle da doença.

Os genes *Rpp5* e *Rpp6* limitaram o crescimento e a esporulação do fungo nos genótipos PI471904 e PI567102B, respectivamente. Todavia,

apesar de serem observadas, em ambos, lesões do tipo RB, as diferentes intensidades de esporulação evidenciam diferenças de agressividade nos isolados analisados. É interessante ressaltar que para o gene *Rpp6* este resultado é relevante, uma vez que ainda não foi avaliado em condições de campo no Brasil

A classificação dos genótipos com o gene de resistência *Rpp1?* foi diferente em comparação com os genótipos que contém os genes *Rpp1-6*, indicando que estes genes supostamente desconhecidos são efetivos contra os isolados analisados. É interessante realizar outros estudos envolvendo avaliação em casa-de-vegetação e no campo para confirmar o comportamento destes genótipos.

A comparação da patogenicidade dos isolados monolesionais de *P. pachyrhizi* que representam diferentes origens geográficas com o isolado padrão PPUFV02 demonstra que isolados coletados em 2014 são mais virulentos. Apesar disso, não se observou variabilidade molecular entre os isolados analisados. Esta uniformidade não foi resultado de algum processo seletivo durante a manipulação das populações para a obtenção dos isolados monolesionais, pois resultados idênticos foram observados quando se efetuou a análise simultânea de isolados monolesionais, das amostras populacionais correspondentes e do tecido infectado do qual foram coletadas as amostras.

A redução de hospedeiros para a sobrevivência do fungo no período entre safra, através da implantação do vazio sanitário em vários Estados brasileiros a partir de 2006, pode estar refletindo na pouca variabilidade observada. Assim, a população de uredósporos de *P. pachyrhizi* no campo pode ser considerada como uma população clonal que é reestabelecida por um pequeno número de indivíduos que sobrevivem em plantas guaxas e hospedeiros alternativos, seguida pela eficiente dispersão pelo vento a principal forma de dispersão do inóculo no campo.

É interessante notar que Anderson et al. (2008) verificaram a utilidade dos microssatélites utilizados no presente por meio da constatação do poliformismos em isolados de *P. pachyrhizi* provenientes de diferentes

países, por meio da detecção de diferentes alelos nos locos caracterizados. Em outro estudo realizado com populações de *P. pachyrhizi* coletadas em diferentes localidades do Brasil nos anos 2009 e 2010, Tschurtschenthaler et al. (2012) observaram variabilidade genética em sete locos microssatélites amplificados com os mesmos conjuntos de oligonucleotídeos utilizados neste trabalho. Assim, é possível que a população de *P. pachyrhizi* no Brasil esteja sofrendo alterações decorrentes de pressões seletivas originárias das diferentes práticas de manejo da doença atualmente adotadas, como o uso intensivo de fungicidas sistêmicos e a adoção do vazio sanitário. Portanto, essa ausência de variabilidade molecular, poderia ser decorrente de um efeito fundador recorrente na população do patógeno, em função dessas práticas, como anteriormente discutido. Todavia, essa hipótese deverá ser confirmada por uma análise englobando todos os isolados monolesionais obtidos e novas amostras coletadas na safra 2014/2015.

## 6 - CONCLUSÕES

- Todos os 68 isolados monolesionais de *P. pachyrhizi* analisados foram virulentos nos acessos de soja PI 200492 (*Rpp1*) e PI 462312 (*Rpp3*);
- Os 68 isolados monolesionais de *P. pachyrhizi* diferiram quanto ao nível de esporulação nos acessos PI 230970 (*Rpp2*), PI 459025 (*Rpp4*), PI 471904 (*Rpp5*) e PI 567102B (*Rpp6*);
- Não houve variabilidade molecular nos locos microssatélites analisados nos 68 isolados monolesionais, sugerindo a existência de uma população clonal nas regiões amostradas.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAMATSU, H.; YAMANAKA, N.; YAMAOKA, Y.; SOARES, R. M.; MOREL, W.; IVANCOVICH, A. J. G.; BOGADO, A. N.; KATO, M.; YORINORI, J. T.; SUENAGA, K. Pathogenic diversity of soybean rust in Argentina, Brazil, and Paraguay. **Journal of General Plant Pathology**, v. 79, p. 28-40, 2013.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. Introductory Mycology. New York, Wiley, 1996.
- ALVES, S. A. M.; FURTADO, G. Q.; BERGAMIN FILHO, A. 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, 2006.
- ANDERSON, S. J.; STONE, C. L.; POSADA-BUITRAGO, M. L.; BOORE, J. L.; NEELAM, B. A.; STEPHENS, R. M.; LUSTER, D. G.; FREDERICK, R. D.; PEDLEY, K. F. Development of simple sequence repeat markers for the soybean rust fungus, *Phakopsora pachyrhizi*. **Molecular Ecology Resources**, p. 1310-1312, 2008.
- ANDRADE, P. J. M.; ANDRADE, D. F. de A. A. **Ferrugem asiática: uma ameaça à sojicultura brasileira**. Dourados: Embrapa Pecuária Oeste, 2002. 11p. (Embrapa Pecuária Oeste. Circular técnica, 11).
- BARNES, C. W.; SZABO, L. J.; BOWERSOX, V. C. Identifying and quantifying *Phakopsora pachyrhizi* spores in Rain. **Phytopathology**, v. 99, n. 4, p. 328-338, 2009.
- BARR, R.; CALDWELL, R. M.; AMACHER, R. H. An examination of vegetative recombination of urediniospore color and virulence in mixtures of certain races of *Puccinia recondita*. **Phytopathology**, v. 54, p. 104-109, 1964.
- BONDE, M. R.; NESTER, S. E.; AUSTIN, C. N.; STONE, C. L.; FREDERICK, R. D.; HARTMAN, G. L.; MILES, M. R. Evaluation of virulence of *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia* isolates. **Plant Disease**, v. 90, p. 708-716, 2006.
- BONDE, M. R.; NESTER, S. E.; BERNER, D. K.; FREDERICK, R. D. Comparative Susceptibilities of Legume Species to Infection by *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Disease**, v. 92, p. 30-36, 2008.
- BROMFIELD, K. R. **Soybean rust**. Saint Paul, United States, 65 p. (Monograph, American Phytopathological Society), 1984.

- BROMFIELD, K. R. & HARTWIG, E. E. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. **Crop Science**, v. 20, p. 254–255, 1980.
- BROMFIELD, K. R.; MELCHING, J. S.; KINGSOLVER, C. H. Virulence and aggressiveness of *Phakopsora pachyrhizi* isolates causing soybean rust. **Phytopathology**, v. 70, p. 17-21, 1980.
- BROWN, J. K. & HOVMOLLER, M. S. Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. **Science**, v. 297, n. 5581, p. 537-541, 2002.
- BURDON, J. J. & SILK, J. Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi. **Phytopathology**, v. 87, p. 664-669, 1997.
- CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: Borém, A.; Caixeta, E. T. (Eds). **Marcadores moleculares**. 2 ed. Viçosa-MG: Edito Folha de Viçosa, 2009, p. 11-94.
- CHRISTIANO, R. S. C. & SCHERM, H. Quantitative aspects of the spread of Asian soybean rust in the southeastern United States, 2005-2006. **Phytopathology**, v. 97, p. 1428–1433, 2007.
- CONAB. **Companhia nacional de abastecimento**. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 2, n. 4, 2015.
- CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM: Sistema de alerta – Embrapa Soja. Disponível em: < <http://www.consorcioantiferrugem.net/portal/>>. Acesso em: 04/05/2015.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.
- EMBRAPA. **Empresa brasileira de pesquisa agropecuária**. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/alerta/>>. Acesso em: 19/01/2015.
- FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org/economic/ess/ess-fs/en/>>. Acesso em: 31/01/2015.
- FEHR, W. R. & CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University. 11p. (Special Report, 80), 1977.
- FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, p. 220, 1996.

- FREIRE, M. C. M.; DE OLIVEIRA, L. O.; DE ALMEIDA, A. M. R.; SCHUSTER, I.; MOREIRA, M. A.; LIEBENBERG, M. M.; MIENIE, C. M. S. Evolutionary history of *Phakopsora pachyrhizi* (the Asian soybean rust) in Brazil based on nucleotide sequences of the internal transcribed spacer region of the nuclear ribosomal DNA. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 920–931, 2008.
- GARCIA, A.; CALVO, É. S.; KIIHL, R. A. DE S.; HARADA, A.; HIROMOTO, D. M.; VIEIRA L. G. E. Molecular mapping of soybean rust *Phakopsora pachyrhizi* resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, p. 545-553, 2008.
- GIRAUD, T.; ENJALBERT, J.; FOURNIER, E.; DELMOTE, F.; DUTECH, C. Population genetics of fungal disease of plants. **Parasite**, v. 15, p. 449-454, 2008.
- GODOY, C. V. & LAZZAROTTODA, J. J. Ferrugem: Escolhendo a arma. In: **Grandes Culturas Cultivar**. Ano VI, n. 69, p. 24-25, 2005.
- GODOY, C. V. & CANTERI, M. G. Efeitos protetor, curativo e erradicante de fungicidas no controle da ferrugem da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi*, em casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, p. 97-101, 2003.
- GOELLNER, K.; LOEHRER, M.; LANGENBACH, C.; CONRATH, U.; KOCH, E.; SCHAFFRATH, U. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 2, p. 169-177, 2010.
- HARTMAN, G. L.; WANG, T. C.; TSCHANZ, A. T. Soybean rust development and the quantitative relationship between rust severity and soybean yield. **Plant Disease**, v. 75, p. 596-600, 1991.
- HARTMAN, G. L. Sources of resistance to soybean rust in perennial *Glycine* species. **Plant Disease**, v. 76, p. 396-399, 1992.
- HARTMAN, G. L.; MILES, M. R.; FREDERICK, R. D. Breeding for resistance to soybean rust. **Plant Disease**, v. 89, p. 664-666, 2005.
- HARTWIG, E. E. Identification of a 4th major gene conferring resistance to soybean rust. **Crop Science**, v. 26, p. 1135-1139, 1986.
- HARTWIG, E. E. & BROMFIELD, K. R. Relationships among 3 genes conferring specific resistance to rust in soybeans. **Crop Science**, v. 23, p. 237-239, 1983.

- HENNING, A. A.; GODOY, C. V. Situação da ferrugem da soja no Brasil e no mundo. In: **Ferrugem Asiática da Soja**. Editor: Laércio Zambolim. Ed. UFV. Viçosa, cap. 1, p. 1-14, 2006.
- HENNINGS, P. Some new Japanese Uredinales. **Nova Hedwigia** (Suppl.), v. IV, p. 107-108, 1903.
- ISARD, S. A.; GAGE, S. H.; COMTOIS, P.; RUSSO, J. M. Principles of the atmospheric pathway for invasive species applied to soybean rust. **Bioscience**, v. 55, p. 851-861, 2005.
- KATO, M. & YORINORI, J. T. A study on a race composition of *Phakopsora pachyrhizi* in Brazil: A difficulty of race identification. **JIRCAS Working**, n.58, p. 94-98, 2008.
- LAZZAROTTO, J. J. & HIRAKURI, M. H. Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja nos contextos mundial brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, p. 46, 2010. (Documentos, 319).
- LI, S.; SMITH, J. R.; RAY, J. D.; FREDERICK, R. D. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 125, p. 133-142, 2012.
- LIN, S.Y. Studies on the physiologic races of soybean rust fungus, *Phakopsora pachyrhizi* Syd. **Journal of Taiwan Agricultural Research**, v. 15, p. 24-28, 1966.
- LITTLE, R. & MANNERS, J. G. Somatic recombination in yellow rust of wheat (*Puccinia striiformis*). In: The production and possible origin of two new physiological races. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 53, p. 251-258, 1969.
- MAIA, T. A.; ZAMBOLIM, E. M.; CAIXETA, E. T.; MIZUBUTI, E. S. G.; ZAMBOLIM, L. The population structure of *Hemileia vastatrix* in Brazil inferred from AFLP. **Australasian Plant Pathology**, v. 42, p. 533-542, 2013.
- MANNERS, J. G. & BAMPTON, S. S. Fusion of uredospore germ tubes in *Puccinia graminis*. **Nature**, v. 179, p. 483-484, 1957.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/exportacao>>. Acesso em: 04/05/2015.

- MCDONALD, B. A.; MCDERMOTT, J. M.; ALLARD, R. W.; WEBSTER, R. K. Coevolution of host and pathogen populations in the *Hordeum vulgare*–*Rhynchosporium secalis* pathosystem. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, p. 3924-3927, 1989.
- MCLEAN, R. J. & BYTH, D. E. Inheritance of resistance to rust *Phakopsora pachyrhizi* in soybeans. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 31, p. 951–956, 1980.
- MILES, M. R.; BONDE, M. R.; NESTER, S. E.; BERNER, D. K.; FREDERICK, R. D.; HARTMAN, G. L. Characterizing resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in soybean. **Plant Disease**, v. 95, p. 577-581, 2011.
- OLIVEIRA, M. B. Caracterização molecular de cultivares de soja utilizando marcadores microssatélites genotipados em seqüenciador automático. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia aplicada à agricultura) – Umuarama: Universidade Paranaense – UNIPAR, 88 f. 2009.
- ONO, Y.; BURITICA, P.; HENNEN J. F. Delimitation of *Phakopsora*, *Physopella* and *Cerotelium* and their species on Leguminosae. **Mycological Research**, v. 96, p. 825-850, 1992.
- PARK, R. F.; BURDON, J. J.; JAHOOR, A. Evidence for somatic hybridization in nature in *Puccinia recondite* f. sp. *tritici*, the leaf rust pathogen of wheat. **Mycological Research**, v. 103, p. 715-723, 1999.
- PARLEVLIT, J. E. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annu. Rev. Phytopathology*, v. 17, p. 203-222, 1979.
- PAUL, C. & HARTMAN, G. L. Sources of soybean rust resistance challenged with single-spored isolates of *Phakopsora pachyrhizi* collected from the USA. **Crop Science**, v. 49, p. 1781-1785, 2009.
- PAUL, C.; HILL, C. B.; HARTMAN, G. L. Comparisons of visual rust assessments and DNA levels of *Phakopsora pachyrhizi* in soybean genotypes varying in rust resistance. **Plant Disease**, v. 95, p. 1007-1012, 2011.
- PHAM, T. A.; MILES, M. R.; FREDERICK, R. D.; HILL, C. B.; HARTMAN, G. L. Differential responses of resistant soybean entries to isolates of *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Disease**, v. 93, p. 224–228, 2009.
- SAKSIRIRAT, W. & HOPPE, H. H. Teliospore germination of soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.). **Journal of Phytopathology**, v. 132, p. 339-342, 1991.

- SCHNEIDER, R. W.; HOLLIER, C. A.; WHITAM, H. K.; PALM, M. E.; MCKEMY, J. M.; HERNÁNDEZ, J. R.; LEVY, L.; DEVRIES-PATERSON, R. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the continental United States. **Plant Disease**, v. 89, p. 774–774, 2005.
- SCHERB, C. T. & MEHL, A. FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) – *Phakopsora pachyrhizi*: detached leaf test, p. 1-4, 2006.
- SHANER, G.; STROMBERG, E. L.; LACY, G. H.; BARKER, K. R.; PIRONE, T. P. Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. **Annual Review Phytopathology**, v. 30, p. 47-66, 1992.
- SINCLAIR, J. B. & HARTMAN, G. L. Soybean rust. In: Hartman, G. L., Sinclair, J. B. & Rupe, J. C. Compendium of soybean diseases. **American Phytopathological Society**, Saint Paul, 4 ed., p.3-4, 1999.
- SOARES, R. M.; AKAMATSU, H.; YAMANAKA, N.; SUENAGA, K.; YAMAOKA, Y.; IVACOVICH, A.; MOREL, W.; JANEGITZ, T. Variabilidade patogênica do fungo *Phakopsora pachyrhizi*. Parte I - projeto ferrugem da soja JIRCAS/Embrapa Soja/CRIA/INTA/Tsukuba University. In: REUNIÃO DO CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM SAFRA 2008/2009, Londrina. **Resumos**. Londrina: Embrapa Soja, 2009. p. 93-101. (Embrapa Soja. Documentos 315).
- STOKSTAD, E. Agriculture-plant pathologists gear up for battle with dread fungus. **Science**, v. 306, p. 1672–1673, 2004.
- TAUTZ, D. & RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 12, p. 4127-4138, 1984.
- TSCHURTSCHENTHALER, N. N.; VIEIRA, E. S. N.; NORA, T. D.; SCHUSTER, I. Variabilidade genética de *Phakopsora pachyrhizi* avaliada por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 2, p. 181-186, 2012.
- TWIZEYIMANA, M.; OJIAMBO, P. S.; HAUDENSHIELD, J. S.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; PEDLEY, K. F.; BANDYOPADHYAY, R.; HARTMAN, G. L. Genetic structure and diversity of *Phakopsora pachyrhizi* isolates from soybean. **Plant Pathology**, v. 60, p. 719-729, 2011.
- TWIZEYIMANA, M. & HARTMAN, G. L. Pathogenic variation of *Phakopsora pachyrhizi* isolates on soybean in the United States from 2006 to 2009. **Plant Disease**, v. 96, p. 75-81, 2012.

- USDA. **United States Department of Agriculture**. FAS Databases. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/data.asp>>. Acesso em: 18/01/2015.
- VAKILI, N. G. & BROMFIELD, K. R. *Phakopsora* rust on soybean and other legumes in Puerto-Rico. **Plant Disease**, Rep. 60, p. 995–999, 1976.
- VITTAL, R.; YANG, H. -C.; HARTMAN, G. L. Anastomosis of germ tubes and migration of nuclei in germ tube networks of the soybean rust pathogen, *Phakopsora pachyrhizi*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 132, p. 163-167, 2012.
- VITTAL, R.; PAUL, C.; HILL, C. B.; HARTMAN, G. L. Characterization and quantification of fungal colonization of *Phakopsora pachyrhizi* in soybean genotypes. **Phytopathology**, v. 104, p. 86-94, 2014.
- ZAMBOLIM, L. Manejo integrado da ferrugem asiática da soja. In: Zambolim, L. (Ed.) **Ferrugem Asiática da Soja**. Viçosa-MG: Suprema Gráfica e Editora Ltda., 2006, p. 73-98.
- ZHANG, X. C.; FREIRE, M. C. M.; LE, M. H.; DE OLIVEIRA, L. O.; PITKIN, J. W.; SEGERS, G.; CONCIBIDO, V. C.; BAILEY, G. J.; HARTMAN, G. L.; UPCHURCH, G.; PEDLEY, K. F.; STACEY, G. Genetic Diversity and origins of *Phakopsora pachyrhizi* Isolates in the United States. **Asian Journal of Plant Pathology**, v. 6, n. 3, p. 52-65, 2012.
- ZOLAN, M. E. Chromosome length polymorphism in fungi. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 686-698, 1995.
- WANG, X. B. & MCCALLUM, B. Fusion body formation, germ tube anastomosis, and nuclear migration during the germination of urediniospores of the wheat leaf rust fungus, *Puccinia triticina*. **Phytopathology**, v. 99, p. 1355-1364, 2009.
- YAMANAKA, N.; SILVA, D. C. G.; PASSIANOTTO, A. L. L.; NOGUEIRA, L. M.; POLIZEL, A. M.; PEREIRA, S. S.; SANTOS, J. V. M.; BROGIN, R. L.; ARIAS, C. A. A.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; NEPOMUCENO, A. L.; ABDELNOOR, R. V. Identification of DNA markers and characterization of the genes for resistance against Asian soybean rust. In: Kudo, H.; Suenaga, K.; Soares, R.M.; Toledo, A. (Eds.) **JIRCAS Working Report**, Tsukuba Japan, n. 58, p. 99-107, 2008.
- YAMANAKA, N.; YAMAOKA, Y.; KATO, M.; LEMOS, N. G.; PASSIANOTTO, A. L. L.; DOS SANTOS, J. V. M.; BENITEZ, E. R.; ABDELNOOR, R. V.; SOARES, R. M.; SUENAGA, K. Development of classification criteria for resistance to soybean rust and differences in virulence among Japanese and Brazilian rust populations. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, p. 153-162, 2010.

YAMANAKA, N.; AKAMATSU, H.; YAMAOKA, Y. Laboratory manual for studies on soybean rust resistance, **Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS)**, Versão 19, 2013.

YAMAOKA, Y.; FUJIWARA, Y.; KAKISHIMA, M.; KATSUYA, K.; YAMADA, K.; HAGIWARA, H. Pathogenic races of *Phakopsora pachyrhizi* on soybean and wild host plants collected in Japan. **Plant Pathology**, v. 68, p. 52-56, 2002.

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

## **ANEXO**

**Tabela 1:** Sequências dos oligonucleotídeos espécie-específicos e condições da PCR para 18 loci SSR utilizados para amplificação das amostras de DNA de *Phakopsora pachyrhizi*

Loco	Número de Acesso	Sequência do primer (5'-3')	Repetição do alelo clonado	Ta (°C)	Primer (nM)	Número de Alelos (tamanho em pb)
PP002	EF193259	F: CCTCTGTCCCAACATAAGC R: CTAGGTTCCAAGCTGTATTTTC	(AT) <sub>16</sub>	65	750	3 (200-223)
PP003	EF193260	F: GGCTCAGTCAAAGCATCCTC R: ATCAATTCTGGCCTGGTGAG	(AT) <sub>15</sub>	65	500	4 (186-196)
PP006	EF193263	F: ACCCTGCCACTGGTAAGAGA R: TCCAAGACCCGTAGATGGTC	(AGA) <sub>13</sub>	65	250	5 (159-179)
PP007	EF193264	F: GGTTGATGTTAAGATGGGTTGG R: CCTAGACTGTCAGGGTGAGAG	(AG) <sub>15</sub>	68	250	2 (331-333)
PP009	EF193266	F: GGACTCTAGAACTGTGCACTAG R: GGTACTGTATGACCCTGCCTG	(TTA) <sub>10</sub>	68	250	3 (336-342)
PP010	EF193267	F: CTGAGTGAAATCACGCTGAGA R: GGCAGGTGATTCGTAGAGTCTAC	(TGT) <sub>21</sub>	65	250	7 (205-281)
PP011	EF193268	F: GACCCTTGTGACAGCTGATTG R: GAGTCAGCCTAAGCTCAGCCAC	(TC) <sub>14</sub>	65	250	6 (242-256)
PP012	EF193269	F: TGTAGCCCACCTTGAATCAG R: GTTGCCAAAAAGTGGGGTGAG	(AT) <sub>12</sub>	65	250	2 (253-255)
PP014	EF193271	F: CAGCGATCAGGTTCCAGAAATC R: CCATCAGAGTTGTTGGCTCTC	(CT) <sub>17</sub>	65	250	7 (279-293)
PP015	EF193272	F: CAACCACGTGCACAACCTATTC R: CCACCTCCTTTGAATCCTCA	(TC) <sub>12</sub>	65	250	3 (462-471)
PP016	EF193273	F: CAGGAAGACTCCAGAACTGTGC R: CCAAGGACACTTCTAGTCCTTC	(CAAT) <sub>12</sub> ...(TTA) <sub>10</sub>	68	500	3 (320-348)
PP017	EF193274	F: CGAGCCATTGCCCAAGTTTG R: CAGTTAGATGAGCCTGAGGAC	(TA) <sub>11</sub>	68	250	5 (208-216)
PP018	EF193275	F: GGTCTGATCTAACAGGATCCAG R: GTTGTGGAATCGGGTAGAGG	(TGA) <sub>11</sub>	65	250	5 (124-144)
PP019	EF193276	F: CCAAGTGCTGCAAAATCAAGC R: GCTCTAACTAGAGCCCTTGTG	(TA) <sub>9</sub>	68	500	3 (194-198)
PP021	EF193278	F: CAACGGCAAAAGACCTAGGTAC R: GCGCAGCCCTAACTACAATAC	(TA) <sub>12</sub>	65	250	3 (335-338)
PP022	EF193279	F: CAGCAGGTTAGTTCTGCACAGC R: TGGGTATCAGAGCTTTTCAG	(TA) <sub>17</sub>	68	500	4 (157-163)
PP023	EF193280	F: CCATTCTAACAGTGATGAAGATAG R: GACAGAGGGTTGTGATCTTGG	(TCA) <sub>8</sub>	65	500	8 (194-209)
PP024	EF193281	F: CACTTCTCCTCCACAGCTGTAG R: CCAACATGTGATCATCCCCTC	(AT) <sub>6</sub>	68	250	3 (139-145)