

Diversidade genética de isolados monouredinias de *Phakopsora pachyrhizi* coletados em diferentes regiões do Brasil.

Yokoyama, A.^{1*}; Darben, L.M.²; Lopes-Caitar, V.S.³; Aoyagi, L.N.⁴; Carvalho, M.C.C.G. de¹; Soares, R.M.⁵; Almeida, A.M.R.⁵; Marcelino-Guimarães, F.C.⁵.

¹Univ. Est. do Norte do Paraná/ Bolsista CNPq*; ²Dep. de Agronomia, Univ. Est. de Maringá; ³Depto de Ciência da Computação, UTFPR – Campus Cornélio Procopio; ⁴Dep. de Bioquímica e Biotecnologia, Univ. Est. de Londrina; ⁵Embrapa Soja, Londrina.

*E-mail: ale_yokoyama@hotmail.com

Introdução

A soja cultivada é uma planta da família Fabaceae, gênero *Glycine* e espécie *Glycine max* (L.) Merrill. A sojicultura brasileira apresenta números expressivos que traduzem a grande importância econômica e social que a atividade gera para a economia do país. Na safra atual (2013/14), espera-se que o Brasil se torne o maior produtor mundial, ultrapassando os Estados Unidos, chegando à produção de 81,94 milhões de toneladas (Conab, 2013). No entanto, fatores bióticos e abióticos ainda limitam a produtividade dessa cultura. Atualmente, a principal doença que afeta a produção de soja no Brasil é a ferrugem asiática da soja (FAS), causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow. De modo geral, as ferrugens são parasitas obrigatórios (biotróficos), desenvolvendo estratégias eficientes para explorar células vivas como fontes de alimento (ZAMBOLIN, 2006). O uso contínuo de fungicidas aliado à prática do vazio sanitário, adotada em todas as regiões produtoras de soja no Brasil, tem sido cruciais para o controle da doença nos últimos anos. No entanto, em condições ambientais favoráveis, focos da doença ocorrem rapidamente. Na safra 2012/13 foram detectados pelo menos 461 focos da doença nas principais regiões produtoras (Consórcio Nacional Anti-Ferrugem, 2013).

Vários genes de resistência a FAS foram identificados em introduções de plantas ou cultivares, sendo denominados *Rpp1* a *Rpp6* (Li et al., 2012). De acordo com Freire et al. (2008), mesmo com a disponibilidade de fontes de resistência, a obtenção de variedades comerciais com resistência durável ao fungo ainda não foram obtidas, dada a falta de compreensão sobre aspectos fundamentais da biologia do fungo, da interação entre planta-patógeno a nível intra-específico, bem como informações sobre a variabilidade do fungo nas lavouras de soja brasileira e mundial. Embora diferentes trabalhos tenham avaliado a variabilidade genética de populações de *P. pachyrhizi* no Brasil (Freire et al., 2008; Yamanaka et al., 2010), o estudo da diversidade genética de isolados ainda é inédita. O conhecimento do espectro de virulência e variabilidade do patógeno é fundamental para que programas de melhoramento genético possam realizar um planejamento estratégico, priorizando a obtenção de cultivares que apresentem uma ampla resistência aos isolados de determinada região, por exemplo, pela piramidação de genes (Paul e Hartman, 2009).

Para estudar a diversidade genética de muitos organismos, dentre eles os fungos, ferramentas moleculares tem sido amplamente utilizadas. A análise de sequências do DNA ribossomal (rDNA) vem sendo utilizada para estabelecer relações de filogenia molecular dentro de muitos grupos de fungos. Os três genes do RNA ribossômico fazem parte de um cluster gênico, contendo o gene 18S, o gene 5,8 S e o gene 28S que são separados pelas regiões de ITS1 e ITS2, as quais são transcritas e processadas para dar origem ao RNA ribossômico maduro.

As regiões ITS evoluem rapidamente e, então, são apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie (Fungaro, 2000).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética de isolados monouredinais do fungo *Phakopsora pachyrhizi* coletados em diferentes regiões produtoras de soja no Brasil, por meio da análise das sequências da região do espaçador interno transcrito 1 (ITS1).

Material e Métodos

A análise molecular foi realizada utilizando 22 isolados de *P. pachyrhizi* obtidos por meio de cultura monouredinial, com pelo menos 3 ciclos de purificação, a partir de amostras de folhas infectadas com o fungo *P. pachyrhizi* coletadas em diferentes regiões produtoras de soja do Brasil. Cada isolado recebeu um código referente à sua origem geográfica (Tabela 1).

Tabela 1. Relação dos isolados obtidos neste estudo com seus respectivos códigos e áreas de coleta.

Número	Localização	Código do isolado
1	Londrina-PR	L.LD511
2		L.LDEB11
3		L.LDP211
4		L.LDP411
5		L.LD412
6	Vilhena-RO	L.VL212
7		L.VL112
8	Conceição das Alagoas-MG	L.CA4A12
9		L.CA7A12
10	Rondonópolis-MT	L.RD612
11	Goiânia-GO	L.GO212
12		L.GO412
13	Campo Verde-MT	L.CV512
14	Primavera do Leste-PR	L.PL312
15		L.PL512
16	Ponta Grossa-PR	L.PG212
17		L.PG412
18	Uberlândia-MG	L.UB112
19		L.UB512
20	Lucas do Rio Verde-MT	L.LRV312
21	Santo Antônio das Posses-GO	L.STA212
22	Tamarana-PR	L.TAM212

Esporos frescos de cada isolado foram utilizados para a extração do DNA seguindo protocolo descrito por Dellaporta et al. (1983), com modificações. Após a extração, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 UVis e sua integridade verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%. As amostras foram diluídas para se obter uma concentração final de 10 η g/mL por amostra. Reações em cadeia da DNA polimerase (PCR's) foram realizadas para a caracterização molecular da região ITS1 do genoma de *P. pachyrhizi* a fim de detectar a variabilidade intraespecífica entre os isolados, utilizando iniciadores específicos para essa região: ITSP5 (5'-GCAACGGCACTTTACTGGCTC-3') e ITS6 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') (Freire et al., 2008). Os fragmentos amplificados foram

separados em gel de agarose a 1,2% em tampão TAE 1X. O marcador de tamanho molecular de 100pb foi utilizado como guia para verificar o tamanho dos fragmentos obtidos.

O produto de amplificação via PCR correspondente à região ITS1 foi purificado utilizando o Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega). O DNA purificado foi ligado ao vetor de clonagem pCR®2.1-TOPO (Invitrogen®) utilizando o TOPO®TA Cloning® Kit (Invitrogen®) e células de *Escherichia coli* DH5 eletrocompetentes foram transformadas por eletroporação.

Para análise dos transformantes, colônias brancas isoladas foram repicadas e analisadas por PCR. Os plasmídeos recombinantes foram extraídos das colônias que apresentavam o inserto utilizando-se o Kit *Wizard® Plus Minipreps DNA Purification Systems (Promega)*, seguindo as instruções do fabricante. O produto purificado foi quantificado em espectrofotômetro e sua integridade verificada em eletroforese. As amostras foram diluídas para uma concentração final de 200ng/mL. Quatro a seis clones de cada isolado foram sequenciados.

Quatro a seis contigs para cada isolado foram obtidos com o auxílio do programa Sequencher® v.4. As sequências já editadas foram inseridas no programa BioEdit 7.0.5.3. Esta sequência foi utilizada para alinhamentos múltiplos realizados pelo programa ClustalX2. O mesmo programa foi utilizado para gerar a árvore filogenética pelo método "neighbor-joining". Por fim, a árvore filogenética foi visualizada no programa MEGA 5.05.

Resultados e discussão

O tamanho dos fragmentos sequenciados variou de 196pb para os isolados L.CV512, L.LDP411, L.VL112, L.LD412, L.LDP211, L.PG412, L.PL3.12, L.RD612, L.STA212, L.TAM212 a 199pb para o isolado L.CA4A12. O alinhamento das 22 sequências revelou uma identidade de aproximadamente 94% entre os isolados, resultando na identificação de 13 haplótipos distintos. Tal resultado exprime uma elevada diversidade genética presente entre as amostras coletadas no Brasil. A distribuição dos 13 haplótipos entre as 12 localidades analisadas é apresentada na Tabela 2.

Frederick et al. (2002) observaram a mesma variação no comprimento da região ITS1 quando analisaram 13 isolados de *P. pachyrhizi* provenientes de diferentes países (Austrália, Havaí, Índia, Indonésia, Filipinas, Taiwan, Tailândia e Zimbábwe) conferindo uma identidade maior que 98% entre as sequências. Ao comparar os resultados destes autores com o observado no presente trabalho, pode-se considerar que houve uma alta diversidade de isolados encontrados no Brasil, já que as análises foram realizadas a partir de isolados coletados em apenas um país.

A árvore filogenética baseada nas sequências da região ITS1 revelou a separação dos isolados em dois grupos, não tendo sido agrupados a estes, três isolados (L.GO412, L.PG412 e L.LPD211).

A alta variabilidade observada entre os isolados pode ser explicada pela co-evolução entre patógeno e hospedeiro como consequência do uso de diferentes cultivares nas regiões produtoras de soja, bem como pela forte pressão seletiva exercida pelo elevado uso de fungicidas e elevada capacidade de dispersão dos esporos. A ocorrência de eventos de mutação, introdução de isolados geneticamente distintos e as práticas culturais também podem ter grandes influências na diversidade genética do patógeno. Outro mecanismo que poderia contribuir para a elevada variabilidade genética observada em populações de *P. pachyrhizi* é a ocorrência de anastomose seguida do ciclo parassexual, mecanismo já descrito na espécie (Vittal et al, 2011).

Tabela 2. Distribuição dos 13 haplótipos gerados pela análise da região ITS1 de isolados de *P. pachyrhizi*

Haplótipos	Localidades*												Total de haplótipos	
	LD	VL	CA	RD	GO	CV	PL	PG	UB	LRV	STA	TAM		
1	1												1	
2						1							1	
3					1								1	
4			1										1	
5								1		1			2	
6							1						1	
7		1	1							1			3	
8					1								1	
9	2	1		1			1				1	1	7	
10	1												1	
11								1					1	
12	1												1	
13									1				1	
Total de haplótipos / local	5	2	2	1	2	1	2	2	2	2	1	1	1	22

*LD-Londrina, VL-Vilhena, CA-Conceição das Alagoas, RD-Rondonópolis, GO-Goiânia, CV-Campo Verde, PL-Primavera do Leste, PG-Ponta Grossa, UB-Uberlândia, LRV-Lucas do Rio Verde, STA- Santo Antonio das Posses, TAM-Tamarana.

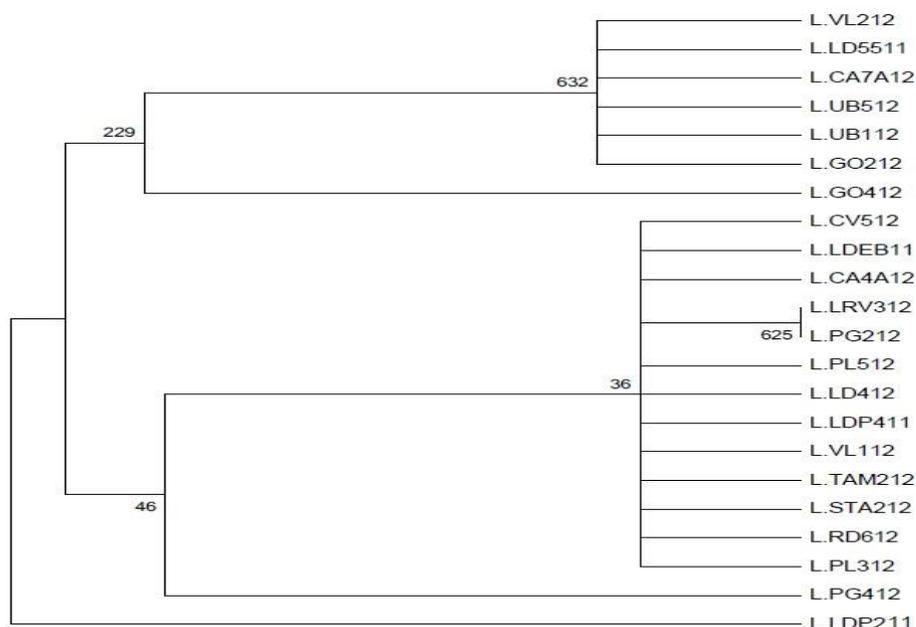


Figura 1. Árvore filogenética construída partir das sequências da região ITS1 dos isolados de *P. pachyrhizi*.

O conhecimento sobre a variabilidade e estrutura genética das populações de *P. pachyrhizi* é de extrema importância, pois permite traçar estratégias eficientes de controle com base na interação molecular entre patógeno e hospedeiro, no desenvolvimento de genótipos que apresentem ampla resistência ao fungo *P. pachyrhizi*.

Conclusão

A análise da região ITS1 foi eficiente na identificação de variação intraespecífica entre isolados de *P. pachyrhizi*, revelando a existência de 13 haplótipos diferentes dentre os 22 isolados analisados.

Referências

- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sétimo levantamento.** Brasília: 2013.
- CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2013. Disponível em: <http://www.consorcioantiferrugem.net/portal/?page_id=698> Acesso em: 27 abr. 2013.
- DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: version II. In: KORBAN, S.S. **Plant molecular biology reporter**. 1. ed. Nova York, 1983. v.1, p.19-21.
- FREDERICK, R. D.; SNYDER, C. L.; PETERSON, G. L.; BONDE, M. R. Polymerase chain reaction assays for the detection and discrimination of the soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*. **Phytopathology**, v.92, n.2, p.217-227, 2002.
- FREIRE, M. C. M; OLIVEIRA, L. de O; ALMEIDA, A. M. R de; SCHUSTER, I; MOREIRA, M. A; LIEBENBERG, M. M; MIENE, 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, n.4. p. 920-93, 2008.
- FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 3, n. 14, p.12-16, 2000.
- LI, S.; SMITH, J.R; RAY, J.D.; FREDERICK, R.D. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI567102B. **Theoretical Applied Genetics**, v. 125, p. 133-142, 2012.
- PAUL, C.; HARTMAN, G.L. Sources of soybean rust resistance challenged with single-spored isolates of *Phakopsora pachyrhizi*. **Crop Science**, n. 49, p. 1781-1785, 2009.
- YAMANAKA, N; YAMAOKA, Y; KATO, M; LEMOS, N. G; PASSIANOTTO, A.L de L; SANTOS, J.V.M; BENITEZ, E.R; ABDELNOOR, R. V; SOARES, R.M; SUENAGA, K. Development of classification criteria for resistance to soybean rust and differences in virulence among Japanese and Brazilian rust populations. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n.3, p.153-162, 2010.
- ZAMBOLIN, L. **Manejo integrado da ferrugem asiática da soja.** Ferrugem asiática da soja. Viçosa: Suprema, 2006,139p.
- VITTAL, R; YANG, H-C; HARTMAN, G.L. Anastomosis of germ tubes and migration of nuclei in germtube networks of the soybean rust pathogen, *Phakopsora pachyrhizi*. **European Journal of Plant Pathology**, v.132, p.163-167, 2011.