Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Ferrugem asiática da soja: métodos de preservação dos
urediniósporos e fatores relacionados à infecção do hospedeiro**

Gleiber Quintão Furtado

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba

2007

Gleiber Quintão Furtado
Engenheiro Florestal

Ferrugem asiática da soja: métodos de preservação dos urediniósporos e fatores
relacionados à infecção do hospedeiro

Orientador:
Prof. Dr. **NELSON SIDNEI MASSOLA JÚNIOR**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Furtado, Gleiber Quintão

Ferrugem asiática da soja: métodos de preservação dos urediniósporos e fatores relacionados à infecção do hospedeiro / Gleiber Quintão Furtado. - - Piracicaba, 2007.

79 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Fenologia 2. Ferrugem (Doença de planta) 3. Fungos Fitopatogênicos
4. Germinação 5. Soja I. Título

CDD 633.34

os meus queridos pais, Iracema Quintão
e Paulo Furtado (*in memoriam*)

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Fitopatologia da ESALQ pela oportunidade de realização do doutorado e a todos os professores e funcionários que contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial, ao professor Dr. Nelson Sidnei Massola Jr, pela orientação, amizade e confiança e à professora Dra. Lílian Amorim, pelos esclarecimentos e disponibilidade em ajudar.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro;

Ao amigo Silvio Alves pela ajuda constante na condução dos experimentos e agradável convivência ao longo deste tempo;

À pesquisadora Dra. Claudia Godoy, pelas sugestões iniciais e fornecimento de sementes;

Aos colegas do Laboratório de Micologia, principalmente a Sylvia Moraes e Maria Eugênia, por suas contribuições na parte de microscopia;

Aos amigos Rê, Mateus, Pietra, Renato, Paulão, Cleci, Alexandre (Jiló), Carla, Rock, Liliane e Adriana, pela amizade e por tornar essa fase da vida mais alegre;

A todos os pós-graduandos do setor de Fitopatologia da ESALQ: pelos descontraídos momentos compartilhados e pela amizade;

A Lú pelo amor e valiosas sugestões no texto.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 DESENVOLVIMENTO.....	16
2.1 Revisão Bibliográfica.....	16
2.1.1 Importância da soja.....	16
2.1.2 Desenvolvimento da planta de soja.....	17
2.1.3 Surgimento da ferrugem asiática da soja.....	18
2.1.4 Ferrugens da soja: <i>P. pachyrhizi</i> e <i>P. meibomia</i>	19
2.1.5 Ciclo de vida de <i>P. pachyrhizi</i>	21
2.1.6 Sintomatologia da ferrugem asiática.....	24
2.1.7 Epidemiologia da ferrugem asiática.....	25
2.1.8 Controle da doença	27
2.1.9 Preservação dos urediniósporos.....	31
2.1.10 O papel da cera epicuticular.....	32
2.2 Material e Métodos.....	34
2.2.1 Preservação dos urediniósporos de <i>P. pachyrhizi</i>	34
2.2.1.1 Viabilidade dos urediniósporos em diferentes condições de armazenamento.....	34
2.2.1.2 Sobrevivência de urediniósporos de <i>P. pachyrhizi</i> no ambiente.....	35
2.2.1.3 Efeito do choque térmico e da hidratação na reversão da dormência dos urediniósporos de <i>P. pachyrhizi</i>	36
2.2.2 Infecção de urediniósporos de <i>P. pachyrhizi</i> em condição de molhamento descontínuo.....	37
2.2.2.1 Obtenção dos urediniósporos.....	37
2.2.2.2 Inoculação.....	38
2.2.2.3 Germinação e formação de apressórios <i>in vitro</i> com descontinuidade do molhamento.....	39

2.2.3 Influência da luminosidade e da superfície foliar na infecção de urediniósporos de <i>P. pachyrhizi</i>	41
2.2.3.1 Infecção em relação à superfície da folha de soja.....	41
2.2.3.2 Luminosidade na germinação e formação de apressórios <i>in vitro</i>	42
2.2.3.3 Quantificação e aspecto ultra-estruturais da camada de cera epicuticular de folhas de soja.....	42
2.2.4 Influência do estágio fenológico e da idade da folha na infecção de <i>P. pachyrhizi</i>	43
3 Resultados e Discussão.....	46
3.2.1 Preservação dos urediniósporos de <i>P. pachyrhizi</i>	46
3.2.2 Infecção de urediniósporos de <i>P. pachyrhizi</i> em condição de molhamento descontínuo.....	49
3.2.3 Influência da luminosidade e superfície foliar na infecção de urediniósporos de <i>P. pachyrhizi</i>	56
3.2.4 Influência do estágio fenológico e da idade da folha na infecção de <i>P. pachyrhizi</i>	63
4 CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS.....	69

RESUMO

Ferrugem asiática da soja: métodos de preservação dos urediniósporos e fatores relacionados à infecção do hospedeiro

A soja é a cultura agrícola com maior extensão de área plantada no Brasil, país que se destaca no cenário mundial como o segundo maior produtor e exportador desta oleaginosa. A ferrugem asiática (FA), causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, apresenta-se como um dos mais graves problemas fitossanitários da cultura da soja no Brasil, principalmente por não existirem, até o presente momento, cultivares com níveis de resistência satisfatórios. Com o objetivo de melhor se conhecer a biologia de *Phakopsora pachyrhizi* e alguns fatores relacionados ao processo infeccioso em soja, no presente trabalho foram avaliados: (1) Métodos de preservação de urediniósporos; (2) Influência da descontinuidade do molhamento foliar no processo infeccioso dos urediniósporos; (3) Influência da luminosidade e da superfície foliar no processo infeccioso de urediniósporos de *P. pachyrhizi*; (4) Influência do estágio fenológico da soja na infecção de *P. pachyrhizi*. Os resultados obtidos mostraram que a desidratação dos esporos proporcionou maior viabilidade destes ao longo do tempo, para todas as condições de armazenamento testadas. No deep freezer foi possível preservar os esporos por até 231 dias, independente da sua condição de hidratação. No ambiente, os esporos não desidratados e desidratados permaneceram viáveis por 16 e 22 dias, respectivamente. A reversão de dormência dos esporos foi efetiva ao empregar hidratação (24h de câmara úmida) seguida ou não por choque térmico (40°C/5 minutos). Em todos os tratamentos onde se aplicou molhamento foliar descontínuo, a severidade de FA foi sempre inferior quando comparada ao molhamento contínuo, principalmente quando a interrupção do molhamento se deu após 4 horas de câmara úmida inicial. A interrupção temporária do molhamento afetou os esporos que haviam germinado, pois os mesmo não foram aptos a infectar após novo período de molhamento. Com relação à luminosidade, os urediniósporos foram aptos a infectar plantas de soja tanto na luz quanto no escuro. Porém, severidade maior foi observada quando se inoculou a superfície adaxial, com posterior incubação das plantas no escuro. Os experimentos *in vitro* mostraram que, na ausência de luz, houve maior germinação e maior formação de apressórios. O teor de cera epicuticular e o seu aspecto ultra-estrutural não apresentaram diferenças entre as superfícies adaxial e abaxial no cultivar BRS 154. Os cultivares BRS 154 e BRS 258, no estágio fenológico reprodutivo, R₅, apresentaram menor severidade em relação aos estádios V₃ e R₁. O período latente médio (PLM) da FA foi 8 e 9 dias para os cultivares BRS 154 e BRS 258, respectivamente. O PLM não se diferenciou em função do estágio fenológico para ambos cultivares. Quanto à influência da idade da folha na suscetibilidade à FA, a folha 1, considerando-se o sentido base-ápice da planta, mostrou maior suscetibilidade e frequência de infecção de *P. pachyrhizi*. Os resultados apresentados são essenciais, tanto por disponibilizarem informações sobre a biologia e epidemiologia do fungo, quanto por servirem como base para novos estudos, nas mais diversas áreas sobre este importante patossistema.

Palavras chave: *Phakopsora pachyrhizi*; Soja; Ferrugem asiática; Preservação de esporos; Germinação de esporos; Luminosidade; Molhamento descontínuo; Cera epicuticular; Estádios fenológicos

ABSTRACT

Asian soybean rust: methods for uredospores preservation and factors related to host infection

Soybean is the agricultural crop with the largest planted area in Brazil. The country stands out in the world scenario as the second-largest producer and exporter of this oilseed crop. The Asian rust (AR), caused by the fungus *Phakopsora pachyrhizi*, is one of the most serious phytosanitary problems of soybean in Brazil, especially because no cultivars exist so far with satisfactory resistance levels. In order to acquire better knowledge about the biology of *Phakopsora pachyrhizi* and some factors related to its infectious process in soybean, the following were evaluated in the present work: (1) Uredospore preservation methods; (2) Influence of leaf wetness discontinuity on the infectious process of uredospores; (3) Influence of luminosity and leaf surface on the infectious process of *P. pachyrhizi* uredospores; (4) Influence of phenological stage of soybean on infection by *P. pachyrhizi*. The results obtained showed that spore dehydration provided greater spore viability with time, in all storage conditions tested. Spores could be preserved for up to 231 days in the deep freezer, regardless of their hydration condition. At room temperature, non-dehydrated and dehydrated spores remained viable for 16 and 22 days, respectively. Spore dormancy reversion was effective when hydration was used (24h in humid chamber), followed or not by thermal shock (40°C/5 minutes). In all treatments where discontinuous leaf wetting was applied, AR severity was always lower when compared with continuous wetting, especially when wetting was interrupted after 4 hours of initial treatment in the humid chamber. Temporary wetness interruption affected spores that had already germinated, as these were not able to infect after a new wetness period. As to luminosity, uredospores were capable of infecting soybean plants both in the light and in the dark. However, higher severity was observed when the adaxial surface was inoculated, with later incubation of the plants in the dark. The *in vitro* experiments showed that there was greater germination and greater formation of appressoria in the absence of light. Epicuticular wax content and its ultra-structural aspect did not show differences between the adaxial and abaxial surfaces in cultivar BRS 154. At the R₅ reproductive phenological stage, cultivars BRS 154 and BRS 258 showed smaller severity in relation to stages V₃ and R₁. The AR mean latent period (MLP) was 8 and 9 days for cultivars BRS 154 and BRS 258, respectively. MLP differences due to phenological stage were not detected in any of the cultivars. As to the influence of leaf age on AR susceptibility, leaf 1 showed greater susceptibility and frequency of infection by *P. pachyrhizi*, considering the plant base-apex direction. The results herein presented are essential, either because they make information available on the biology and epidemiology of the fungus, or because they serve as a foundation for new studies on the most diverse areas about this important pathosystem.

Keywords: *Phakopsora pachyrhizi*; Soybean; Asian rust; Spore preservation; Spore germination; Luminosity; Discontinuous wetness; Epicuticular wax; Phenological stages

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Diagrama do processo infeccioso de *P. pachyrhizi* proposto por Koch; Ebrahim-Nesbat; Hoppe, em 1983). (U) - urediniósporos; (Gt) - tubo germinativo; (Ap) - apressório; (E) - célula epidérmica; (Ac) - cone apressorial; (PH) - hifa de penetração; (PrH) - hifa primária; (HMC) - célula mãe do haustório; (H) - haustório.....23
- Figura 2 - Escala diagramática de severidade de ferrugem asiática da soja (GODOY; KOGAN; CANTERI, 2006).....44
- Figura 3 - Germinação (A e B) e infectividade, nº de lesões/cm² (C e D) dos urediniósporos desidratados e não desidratados de *P. pachyrhizi* em função do tempo de armazenamento (dias). Barra de erro representa erro padrão da média.....47
- Figura 4 - Sobrevivência dos urediniósporos de *P. pachyrhizi* no ambiente. Barra de erro representa erro padrão da média.....48
- Figura 5 - Efeito da interrupção do molhamento na severidade média de FA em folha de soja. Os tratamentos com as mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Barra de erro representa erro padrão da média.
Seqüência dos tratamentos em horas: Período de molhamento após a inoculação - (período seco) – período de molhamento após o período seco.
1) 1 (1) 11; 2) 1 (3) 11; 3) 1 (6) 11; 4) 2 (1) 10; 5) 2 (3) 10; 6) 2 (6) 10; 7) 4 (1) 8; 8) 4 (3) 8; 9) 4 (6) 8; 10) 12 (0)50
- Figura 6 - Germinação e formação de apressórios de *P. pachyrhizi* em folhas de soja do cultivar BRS 154, em função do tempo. Os tratamentos com as mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Barra de erro representa erro padrão da média.....51
- Figura 7 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura do processo de pré-penetração de *P. pachyrhizi* em folha de soja, cultivar BRS 154. A – Urediniósporos após 1 hora de incubação; B – Urediniósporos após 4 horas de incubação, C – Urediniósporos germinados com (seta) e sem apressórios (ponta de seta); D – Detalhe do apressório com maior magnificação (seta). Notar que o conteúdo do esporo migrou para o apressório.....53

- Figura 8 - Efeito da interrupção do molhamento *in vitro* na porcentagem média de germinação (A) e de formação de apressórios (B) de urediniósporos de *P. pachyrhizi*. Os tratamentos com as mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Barra de erro representa erro padrão da média.
Seqüência dos tratamentos em horas: Período de molhamento após a inoculação - (período seco) - período de molhamento após o período seco.....55
- Figura 9 - Severidade (A e B) e freqüência de infecção (FI) (C e D) de FA, em folhas do cultivar BRS 154, em função da superfície foliar inoculada (adaxial ou abaxial) e da condição de luminosidade usada na incubação (luz ou escuro). Os tratamentos com letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Barra de erro representa erro padrão da média.....57
- Figura 10 - Porcentagem de germinação e formação de apressórios de urediniósporos de *P. pachyrhizi in vitro* em função da luminosidade. Os tratamentos com letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Barra de erro representa erro padrão da média.....57
- Figura 11 - Apressórios de *P. pachyrhizi* sob luz (A) e escuro (B).....58
- Figura 12 - Teor de cera epicuticular da superfície adaxial e abaxial de folha de soja do cultivar BRS 154. Barra de erro representa erro padrão da média.....60
- Figura 13 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura do aspecto da estrutura da camada de cera epicuticular da superfície adaxial de folhas de soja do cultivar BRS 154.....61
- Figura 14 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura do aspecto da estrutura da camada de cera epicuticular da superfície abaxial de folhas de soja do cultivar BRS 154.....62
- Figura 15 - Influência da fenologia de plantas de soja sobre a severidade da ferrugem da soja aos 8 (A) e 16 (B) dias após a inoculação. Os tratamentos com letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Barra de erro representa erro padrão da média.....64
- Figura 16 - Influência da idade da folha de soja, cultivar BRS 154, na freqüência de infecção (n° de lesões/ cm^2) (A), na severidade (B) e no tamanho de lesão (C) de *P. pachyrhizi*. Os tratamentos com as mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Barra de erro representa erro padrão da média.....66

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Efeito de choque térmico e hidratação na germinação de urediniósporos de *P. pachyrhizi* armazenados a -80 °C por 30 dias.....48
- Tabela 2 - Período latente médio (dias) de *P. pachyrhizi* em função do cultivar e do estágio fenológico de plantas de soja63

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma planta da família Leguminosae originária da China. Em 1882 esta oleaginosa foi introduzida no Brasil, via Estados Unidos, quando ocorreram os primeiros estudos de avaliação de cultivares. Apenas em 1914 registrou-se o primeiro cultivo no país e, somente na década de 60, a cultura tornou-se economicamente importante para o país (EMBRAPA, 2003).

Atualmente o Brasil se destaca no cenário mundial como um dos maiores produtores e exportadores de grãos de soja, perdendo apenas para os Estados Unidos. Nos últimos anos a soja também se destacou como a cultura agrícola com maior extensão de área plantada e principal responsável pela expansão da fronteira agrícola, principalmente no sentido da região Norte e Centro-Oeste. Isto só foi possível com o desenvolvimento de cultivares adaptados a diferentes condições, viabilizando o cultivo em qualquer região do território nacional e transformando milhões de hectares improdutivos em área potencial de cultivo.

Além da sua importância em valores econômicos, a soja apresenta-se como um grão com valiosas características nutricionais para a alimentação humana e animal, principalmente como fonte de proteína, fibras e gorduras insaturadas, dentre outras. O óleo, a lecitina e o farelo são exemplos de produtos de grande importância para a indústria.

Esta performance, aparentemente positiva, contabilizada pelos números da safra não faz justiça, entretanto, à realidade vivida pelo setor. O desestímulo diante das perdas com a desvalorização cambial, problemas climáticos e a ocorrência da ferrugem asiática têm sido os principais vilões do desempenho da produção brasileira (ANUÁRIO BRASILEIRO DE SOJA, 2006).

A ferrugem asiática é causada pelo fungo basidiomiceto *Phakopsora pachyrhizi*, oriunda da região australasiana, introduzido no território brasileiro em 2001. Em 2002 a doença já estava disseminada em 60% da área de cultivo do país e 90% no ano seguinte. As perdas, US\$ 125 milhões na safra de 2001/2002, alcançaram mais de US\$ 1 bilhão em 2002/2003 e mais de 2 bilhões em 2003/2004 (YORINORI, 2005).

A maioria dos trabalhos publicados sobre a ferrugem asiática enfoca no monitoramento do desenvolvimento da doença, avaliações de perdas no campo, modelagem da epidemia, estudos sobre gamas de hospedeiros, desenvolvimento de modelos de avaliação de risco e fontes de

resistência. Todos estes trabalhos dependem, por sua vez, de estudos básicos sobre a biologia do fungo, que permitam conhecer melhor o seu desenvolvimento e os mecanismos de interação com o hospedeiro.

Para fins de pesquisa, a manutenção e a multiplicação dos urediniósporos de *P. pachyrhizi* são feitas por meio de sucessivas inoculações em plantas de soja, pois trata-se de um fungo biotrófico, característica que impede seu cultivo em meio de cultura. Esta é, portanto, uma tarefa laboriosa, envolvendo disponibilidade de espaço físico em casa de vegetação e/ou campo, gasto de tempo e mão-de-obra. Além disso, é difícil a manutenção, ao longo do tempo, das características genéticas da população ou do isolado do patógeno usado na pesquisa. Desta forma um método eficiente de preservação dos urediniósporos é essencial à pesquisa, possibilitando a manutenção temporária da viabilidade dos esporos, e facilitando a condução de ensaios fitopatológicos de rotina. Várias propostas de metodologia de preservação de urediniósporos estão descritas na literatura para outras ferrugens, dentre elas a ferrugem do trigo (Bromfield, 1964), da cana-de-açúcar (Garcia et al., 2006) e do feijoeiro (FALEIRO et al., 2000).

O processo de infecção dos urediniósporos de *P. pachyrhizi* compreende diversos passos distintos: adesão na superfície do hospedeiro, germinação, formação do apressório, penetração através da cutícula, invasão e crescimento das hifas no tecido hospedeiro (BONDE et al, 1976; KOCH; EBRAHIM-NESBAT; HOPPE, 1983; MARCHETTI, M.A.; UECKER, F.A.; BROMFIELD, K.R., 1975; KOCK; HOPPE, 1988). No entanto, algumas informações básicas relacionadas à infecção ainda são deficientes para esse importante patossistema, principalmente no que se refere aos cultivares plantados no Brasil. Ainda não se conhece, por exemplo, se o fungo apresenta preferência por uma das superfícies do folíolo (adaxial ou abaxial) e se a camada de cera da cutícula dos cultivares e o estágio de desenvolvimento da planta de soja podem influenciar os eventos de pré-penetração e penetração. Além disso, faltam informações com relação à infecção e molhamento foliar, principalmente se as estruturas infectivas conseguem interromper o processo de infecção, quando na ausência de molhamento, e retomar quando na presença. O entendimento destes processos é essencial, tanto na geração de novos métodos de controle quanto na validação de modelos de simulação da doença.

Com base nas necessidades descritas, são objetivos do presente trabalho: (i) desenvolver uma metodologia para preservar os urediniósporos de *P. pachyrhizi*, mantendo suas características de viabilidade e infectividade; (ii) determinar a influência da superfície foliar,

quantidade e disposição da cera epicuticular e da luminosidade na infecção de *P. pachyrhizi*; (iii) avaliar a capacidade do fungo de se desenvolver em situação de molhamento foliar descontínuo e (iv) avaliar a suscetibilidade à ferrugem asiática de plantas de soja em diferentes estádios de desenvolvimento da cultura.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Importância da soja

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma planta da família Leguminosae, originada a partir do cruzamento de espécies selvagens da costa leste da Ásia (EMBRAPA, 2003). A relação entre o consumo de soja e a saúde humana tem sido amplamente investigada pelas características nutricionais deste alimento, quer seja pelo elevado teor de proteína de qualidade nutricional adequada, o conteúdo significativo de minerais e fibras ou, ainda, a quantidade reduzida de gordura saturada (GRIESHP; FAHEY JR, 2001; YOUNG, 1991).

A soja também é considerada um grão altamente versátil no que se refere ao grande número de produtos e subprodutos que podem se originar a partir dos grãos. O óleo, a lecitina e o farelo são exemplos de produtos de grande importância econômica obtidos a partir da soja. O óleo refinado é obtido a partir do óleo bruto, processo em que também é produzida a lecitina, agente emulsificante utilizado na indústria de alimentos. O farelo de soja, por sua vez, é utilizado intensivamente na ração animal, como fonte protéica complementar ao milho (ANUÁRIO BRASILEIRO DA SOJA, 2006).

Atualmente, com a implantação do Plano Nacional de Agroenergia, a soja também tem se destacado como uma matéria-prima que apresenta grande potencial para a produção do biodiesel. Apesar da soja, juntamente com o algodão, apresentar menores teores de óleo do que outras oleaginosas como a mamona, seu uso torna-se economicamente vantajoso devido à estrutura de produção, distribuição e de esmagamento existente no Brasil (ESALQ, 2007).

A produção mundial da soja é de cerca de 220 mil toneladas anuais. Na safra de 2005/2006, a produção estimada dos Estados Unidos, Brasil e Argentina, os maiores produtores mundiais, ficou em torno de 78.653, 56.120 e 39.000 mil toneladas, respectivamente. Os Estados Unidos é o país que possui os maiores índices, de área cultivada, produção, produtividade e exportação, seguido do Brasil e da Argentina. No Brasil, a soja é a cultura agrícola que mais cresceu, tendo um aumento de 43 % em termos de área nos últimos dez anos. A maior região

produtora é o Centro-Oeste, com uma área cultivada de 27.155 ha e uma produção anual de 9.939 mil toneladas (ton.), seguido da região Sul (19.029 ha; 7.491 mil ton.), Sudeste (4.653 ha; 1.715 mil ton.), Nordeste (4.203 ha; 1.482 mil ton.) e Norte (1.078 ha; 395 mil ton.). Quanto à importação, a China, União Européia e Japão lideram o mercado (FNT, 2006).

Em termos econômicos a soja apresenta uma grande importância para o Brasil, respondendo por uma receita cambial direta de mais de 7 bilhões de dólares anuais, valor que representa 11% do total das receitas cambiais brasileiras, e 5 vezes esse valor, se considerados os benefícios que gera ao longo da sua extensa cadeia produtiva (EMBRAPA, 2007). A soja é também o maior produto de exportação, nos últimos 4 anos exportou-se em torno de 20.000 milhões de toneladas anualmente (FNT, 2006).

2.1.2 Desenvolvimento da planta de soja

O desenvolvimento da soja pode ser dividido segundo Herman (1997) em duas fases, vegetativo (V) e reprodutivo (R). As subdivisões ou estádios da fase vegetativa podem ser designados numericamente como V_1 , V_2 , até V_n , menos os dois primeiros estádios, conhecidos como V_e (emergência) e V_c (estádio de cotilédone). O último estágio vegetativo é conhecido como V_n , onde o “n” representa o número do último nó vegetativo formado por um cultivar específico. O valor de “n” pode variar em função das diferenças varietais e ambientais. Um nó vegetativo com folha completamente desenvolvida é identificado quando no nó vegetativo acima os folíolos não estão enrolados e nem dobrados. O estágio V_3 , por exemplo, é definido quando os folíolos do primeiro nó vegetativo (unifoliolado) ao quarto nó estão desenrolados. As folhas unifolioladas, que são usadas como ponto de referência para contagem são produzidas em lados opostos da haste e com pecíolos pequenos. Todas as outras folhas verdadeiras formadas pela planta são trifolioladas, com pecíolos longos e filotaxia alternada.

A fase reprodutiva apresenta 8 subdivisões cuja representações também são numéricas. São divididas em 4 partes que descrevem o florescimento (R_1 e R_2), o desenvolvimento da vagem (R_3 e R_4), o desenvolvimento da semente (R_5 e R_6) e a maturação da planta (R_7 e R_8).

2.1.3 Surgimento da ferrugem asiática da soja

Entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos em soja, estão as doenças. Aproximadamente 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus já foram identificadas no Brasil. Esse número continua aumentando com a expansão da soja para novas áreas, como consequência da monocultura e com a introdução de novos patógenos. A importância econômica de cada doença varia de ano para ano e de região para região, dependendo das condições climáticas de cada safra. As perdas anuais de produção por doença são estimadas em cerca de 15 a 20%, entretanto, algumas doenças podem ocasionar perdas de quase 100% (ALMEIDA et al, 2005).

O maior problema da soja atualmente é o fungo, *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & Sydow, causador da ferrugem asiática, doença altamente destrutiva e agressiva em todos os países onde foi detectada na cultura. A ferrugem asiática (FA) da soja é causada pelo basidiomiceto *P. pachyrhizi*, sendo relatada inicialmente na Ásia, centro de origem da soja, mais especificamente no Japão, em 1902 (HENNINGS, 1903 citado por BONDE et al, 2006). Além da soja, este fungo pode infectar mais de 60 espécies em 26 gêneros (ONO; BURITICÁ; HENNEN, 1992). Esta ampla gama de hospedeiro, incomum para a maioria das espécies de ferrugem, provavelmente é resultado de genes que contribuem para um complexo padrão de virulência (HARTMAN; MILES; FREDERICK, 2005).

A partir de 2001, logo após sua introdução no Paraguai, a FA vem causando severas epidemias em plantios de soja no Brasil (YORINORI et al, 2005). Em 2002, um ano após a detecção da ferrugem asiática da soja no Brasil, a doença já estava disseminada em 60% da área de cultivo do país e 90% no ano seguinte. As perdas, US\$ 125 milhões na safra de 2001/2002, alcançaram mais de US\$ 1 bilhão em 2002/2003 e mais de US\$ 2 bilhões em 2003/2004 (YORINORI, 2005).

Além dos prejuízos ocorridos no Brasil, no hemisfério leste relatam-se danos decorrentes da FA em torno de 10-40% na Tailândia, 10-90% na Índia, 10-50% no Sul da China, 23-90% em Taiwan e 40% no Japão (SINCLAIR; HARTMAN, 1999).

A doença disseminou-se pelos países da América do Sul e a partir de 2004 foi relatada nos Estados Unidos (YORINORI; LAZZAROTTO, 2004; SCHEIDER et al, 2005; ISAKEIT et al, 2006; SCONYERS et al, 2006; KOENNING et al, 2006).

O sistema de modelo integrado, combinação do modelo de dispersão e transporte de partículas (HYSPLIT_4) com o de previsão de clima regional (MM5), simulou a disseminação da FA da soja, da África para a América do Sul e deste continente para Columbia (EUA), em 2004. O modelo validado confirmou o padrão de disseminação da FA observado e desta forma se apresenta como uma ferramenta a ser utilizada para previsão de ocorrência da doença em outras localidades (PAN et al, 2006; ISARD et al, 2005).

2.1.4 Ferrugens da soja: *P. pachyrhizi* e *P. meibomiae*

Os primeiros estudos feitos na década de 80 consideravam a existência de uma única espécie e diferentes populações de *Phakopsora*. Em estudos de patogenicidade comparando diversas populações de *Phakopsora*, Bromfield; Melching; Kingsolver (1980) realizaram inoculações em soja e mostraram que populações procedentes do hemisfério ocidental eram menos virulentas e menos agressivas, com lesões de áreas necróticas extensivas, com nenhum ou apenas 1 ou 2 soros uredinais (reação do tipo RB). As populações provenientes da Ásia produziram lesões com mais de dois soros uredinais, sem áreas necróticas (reação do tipo TAN).

Bonde e Brown (1980) observaram diferenças morfológicas ao comparar os poros germinativos de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* de populações procedentes de Porto Rico com aquelas provenientes da Austrália, Índia, Filipinas e Taiwan, concluíram que os poros germinativos daqueles oriundos de Porto Rico eram mais facilmente visíveis do que os poros das populações provenientes das demais regiões.

Foram observadas diferenças também entre as populações de *Phakopsora* provenientes do hemisfério Leste e do Oeste, com base na análise de isoenzimas de 14 loci codificadores de enzimas. Destes loci, apenas a leucina-aminopeptidase mostrou um padrão idêntico de bandas entre as populações. A análise das isoenzimas indicou que todos os isolados da Ásia-Austrália e

todos os isolados da América foram idênticos nos 13 loci analisados para isoenzima, porém, ao comparar os isolados da Ásia-Austrália com aqueles da América, observou-se um padrão de bandas distinto, resultando num máximo coeficiente de similaridade entre os dois grupos de 7% de alelos comuns (BONDE; PETERSON; BROWN, 1988).

A taxonomia do fungo causador da ferrugem da soja somente foi esclarecida em 1992, com o criterioso trabalho realizado pelo pesquisador Ono e colaboradores onde foi demonstrado que ocorrem duas espécies de *Phakopsora* incitando ferrugem em plantas de soja, e que as diferenças observadas não se deviam apenas as características fisiológicas dos isolados. Além da espécie *P. pachyrhizi*, originária da região Australasiana, pode ocorrer também *P. meibomiae* (Arthur) Arthur, endêmica nas Américas (ONO; BURITICÁ; HENNEN, 1992).

A principal diferença entre as duas espécies de *Phakopsora* está nos teliósporos. *P. pachyrhizi* possui teliósporos organizados em duas a sete camadas, com coloração marrom amarelado, espessura em torno de 1 µm ou levemente mais grossa na região superior e com até 3 µm de espessura nas células das camadas apicais. *P. meibomiae* apresenta teliósporos organizados em uma a quatro camadas, raramente cinco, os esporos possuem parede de coloração canela a castanho claras, com 1,5 a 2,0 µm de espessura e com células da camada apical com espessura até 6 µm. Portanto, a diferença marcante que separa morfologicamente as duas espécies está na espessura das paredes das células da camada apical de teliósporos (ONO; BURITICÁ; HENNEN, 1992).

Frederick et al (2002), após a determinação da sequência de nucleotídeo da região ITS (Internal Transcribed Spacer) ribossomal, revelou que os isolados dentro de *P. pachyrhizi* e *P. meibomiae* possuem acima de 99% de similaridade, mas apenas 80% de similaridade entre as duas espécies. Com base nessas comparações foram determinados 4 e 2 conjuntos de primers para PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que permitem diferenciar *P. pachyrhizi* e *P. meibomiae*, respectivamente, utilizando tecidos infectados com ou sem urediniósporos. De acordo com Lamour et al (2006) a utilização destes primers torna possível a detecção do patógeno a partir de 6 dias após a infecção, ou seja, antes mesmo da manifestação dos sintomas.

Estudos de biologia molecular foram realizados também por Posada-Buitrago e Frederick (2005) visando o conhecimento da expressão de genes de *P. pachyrhizi* na fase de germinação dos urediniósporos, para isso construíram uma biblioteca de cDNA e compararam a sequência destes clones EST's (Expressed sequence tags) com aquelas existentes em banco de dados.

Apesar de mais de 52% dos clones não mostrarem similaridades significantes às seqüências contidas no banco de dados, 189 EST's únicas ou unigenes foram identificadas com funções ligadas ao metabolismo primário, expressão gênica/proteína, crescimento e estrutura celular, divisão celular, comunicação/sinalização celular e defesa da célula/organismo.

No Brasil apesar das epidemias de FA terem ocorrido recentemente, ferrugem em plantas de soja foi primeiramente constatada por Deslandes em 1979. Na época, o fungo foi identificado como *Phakopsora pachyrhizi*, ao adotar a classificação disponível, baseada apenas na planta hospedeira. No entanto, de acordo com trabalho de Carvalho Jr. e Figueiredo (2000) a espécie que ocorria no Brasil naquela época era *P. meibomiae*, nativa das Américas.

Apesar de alguns relatos conflitantes existentes na literatura sobre a presença de uma ou outra espécie de ferrugem, a análise por PCR em amostras coletadas após os surtos epidêmicos de 2001 mostrou que existe também a possibilidade de ocorrência de infecção mista, de ferrugem americana (*P. meibomiae*) e asiática (*P. pachyrhizi*). Resultados muito interessantes foram obtidos com uso da PCR em material do herbário urediniológico “Victoria Rosseti” do Instituto Biológico de São Paulo, onde também foram detectadas infecções mistas em amostras de ferrugem da soja coletadas em Minas Gerais em 1979 e em 1983. A análise quantitativa do DNA das ferrugens, feita por PCR em tempo real, verificou concentração 100 vezes maior para a ferrugem americana em relação à asiática (HARAKAVA, 2005). O resultado deste trabalho confirma a presença do fungo causador da ferrugem asiática no Brasil desde final da década de 70, início dos anos 80, levanta a questão referente à causa do surto epidêmico da ferrugem em 2001, ou seja, qual mudança, relacionada principalmente às condições ambientais, ocorreu para ter favorecido o processo infeccioso do fungo em plantas de soja de forma tão drástica.

2.1.5 Ciclo de vida de *P. pachyrhizi*

Os fungos penetram a superfície das plantas por penetração direta da parede celular, abertura natural e/ou injúria. A penetração direta por meio de superfície intacta é provavelmente

o tipo mais comum de penetração, utilizada por fungos, oomicetos e nematóides, sendo que nenhum dos outros patógenos pode penetrar por essa via (AGRIOS, 2005).

A maioria dos fungos agentes etiológicos de ferrugens utiliza, no entanto, a abertura natural, mais precisamente os estômatos, para iniciar o processo infeccioso em tecidos de hospedeiros suscetíveis. No caso da ferrugem da soja causada por *P. pachyrhizi* o processo infeccioso ocorre devido à penetração direta do fungo nas células epidérmicas (KOCH, 1983; BONDE; MELCHING; BROMFIELD, 1976; ZAMBENEDETTI, 2004) e, de forma menos freqüente, sob células guarda do estômato (KOCH, 1983). O crescimento do fungo entre as células guarda do estômato, como acontece para a maioria das espécies de fungos causadores de ferrugem, não foi observado no caso de *P. pachyrhizi* (KOCH; EBRAHIM-NESBAT; HOPPE, 1983).

A penetração do patógeno na célula epidérmica pode ocorrer de duas formas, a primeira e mais freqüente ocorre diretamente no lúmen celular, e na segunda forma o processo inicia-se no espaço entre células adjacentes da epiderme e posteriormente o fungo penetra uma dessas células (BONDE; MELCHING; BROMFIELD, 1976).

Quando as condições ambientais favorecem a ocorrência da doença, inicialmente os urediniósporos emitem o tubo germinativo e em seguida o apressório. Esta estrutura desenvolve-se em direção a superfície da planta e perfura a cutícula e a parede celular por força mecânica e enzimática (AMORIM, 2005).

A separação do tubo germinativo de *P. pachyrhizi* do apressório é feita por um septo, formado somente após o citoplasma do tubo germinativo ser completamente transportado para o apressório. O urediniósporo e o apressório apresentam tamanho médio de 18-25 e 18-22 μm , respectivamente. O apressório originará hifa de penetração, por meio da estrutura chamada cone apressorial. O cone apressorial consiste em uma ramificação da parede celular do apressório, contínua à hifa de penetração, o que indica que essa hifa é conectada ao apressório através do processo de elongação do cone apressorial. A hifa de penetração penetra transversalmente a célula epidérmica do hospedeiro e alcança o mesófilo, onde o primeiro septo é formado delimitando-a da hifa primária. Com a ramificação da hifa primária origina-se a hifa secundária e concomitantemente ocorre o crescimento intercelular (Figura 1). A formação de haustórios ocorre em torno de 24 e 48 horas após a inoculação do fungo (KOCH; EBRAHIM; HOPPE, 1983; BONDE; MELCHING; BROMFIELD, 1976).

Figura 1 - Diagrama do processo infeccioso de *P. pachyrhizi* proposto por Koch; Ebrahim-Nesbat; Hoppe, em 1983. (U) – urediniósporos; (Gt) – tubo germinativo; (Ap) – apressório; (E) – célula epidérmica; (Ac) – cone apressorial; (PH) – hifa de penetração; (PrH) – hifa primária; (HMC) – célula mãe do haustório; (H) – haustório.

O tempo de germinação e formação do apressório em temperatura de 20°C, sobre as folhas de plantas de soja, está em torno de 1-2 horas e 2-5 horas após a inoculação, respectivamente. Muitos apressórios mostraram-se sésseis aos urediniósporos de origem (BONDE; MELCHING; BROMFIELD, 1976).

A formação de apressório de *P. pachyrhizi* foi observada inclusive em plantas não-hospedeiras, como alface, trigo e batata, sugerindo que os estímulos de tigmotrofia são menos específicos quando comparados àqueles requeridos para diferenciação de tubo germinativo de espécies fúngicas causadoras de ferrugem com penetração via estômato (HOPPE; KOCH, 1986). Esse fenômeno foi confirmado também ao investigar o desenvolvimento de estruturas de infecção de *P. pachyrhizi* em membranas artificiais de diferente natureza química e física. Foi observado elevado índice de formação de tubo germinativo e apressório, porém, baixa taxa de formação de hifa de penetração. Portanto, a formação dessa hifa parece ser o ponto crítico do processo de infecção deste patógeno (KOCH; HOPPE, 1988).

Mclean e Byth (1981) ao investigar o processo de pré-penetração e penetração de *P. pachyrhizi* em linhagens de soja suscetível, resistente e altamente resistente, observaram que não houve diferença significativa no tempo de desenvolvimento do tubo germinativo e do apressório entre as linhagens. Porém observaram diferenças estatísticas para taxa de germinação e desenvolvimento de apressório entre as linhagens.

Os uredínios de *P. pachyrhizi*, tornam-se evidentes na cultivar Lee 68 (suscetível), quando em temperatura de 25°C, entre 5 e 7 dias após a inoculação. O início e término da esporulação ocorreu entre 9 dias e 3 semanas, a proliferação dos uredínios ocorreram até aproximadamente 4 semanas após a inoculação. No entanto, os uredínios formados em introduções de plantas, P.I. 200492 (resistentes), apresentaram maior período de desenvolvimento, menor durabilidade e podem ser formadas até 3 semanas após a inoculação (MARCHETTI; UERCKER; BROMFIELD, 1975).

O papel dos teliósporos no ciclo de infecção de *P. pachyrhizi* é desconhecido. No entanto, na China, sabe-se que quando formados sob condições naturais foram incapazes de germinar e causar ferrugem em plantio de soja subsequente. A formação dessa estrutura pode ser influenciada pelos seguintes fatores: genótipo do cultivar, temperatura (médias diurnas acima de 20°C, com mínima diária de 16°C), umidade relativa e intensidade de luz (TAN-YUJUN et al, 2001a; TAN-YUJUN et al, 2001b).

2.1.6 Sintomatologia da ferrugem asiática

Os sintomas iniciais da doença são pequenas pústulas foliares, de coloração castanha a marrom-escura. Na face inferior da folha, pode-se observar uma ou mais urédias que se rompem liberando os urediniósporos. As lesões tendem para o formato angular e podem atingir 2 a 5 mm de diâmetro, podem aparecer em pecíolos, vagens e caules, porém são mais abundantes nas folhas, principalmente na superfície inferior, onde podem ocupar extensas áreas e, ao longo do tempo, amarelecer e cair (SINCLAIR; HARTMAN, 1999). Plantas severamente infetadas apresentam desfolha precoce, comprometendo a formação e o enchimento de vagens e o peso final do grão. Quanto mais cedo ocorrer a desfolha, menor será o tamanho do grão e, conseqüentemente, maior a perda de rendimento e de qualidade (YANG et al, 1991).

Bromfield; Melching; Kingsolver (1980) apontam três tipos de reações decorrentes da infecção de *P. pachyrhizi* em plantas hospedeiras, TAN (lesões castanho claro), RB (lesões

castanho escuro) e imunidade (sem sintomas visíveis da doença). A reação TAN indica suscetibilidade do hospedeiro, com lesões com maior número de uredínios e maior esporulação comparada com a sintomatologia da reação RB, que determina um maior grau de resistência do hospedeiro. Apesar das diferenças entre TAN e RB, com o decorrer da epidemia elas podem tornar menos óbvias.

2.1.7 Epidemiologia da ferrugem asiática

A relação entre o número de horas de molhamento foliar (5-16 horas), a quantidade de esporos germinados que penetram nas folhas e o número de lesões por folha foi estudada por Bonde, Melching, Bromfield (1976), sob temperatura de 20°C e escuro. As primeiras penetrações e a maior quantidade de penetrações foi observado após 7 e 16 horas de molhamento foliar, respectivamente. O número de penetrações do fungo não teve diferença após 9 horas de molhamento e, provavelmente, o acréscimo na quantidade de lesões que ocorreu entre 9-16 horas seja decorrente de sítios de infecção já estabelecidos entre 7-9 horas de molhamento.

A capacidade infectiva de *P. pachyrhizi* no cultivar Wayne variou conforme a combinação do binômio temperatura e período de molhamento foliar. A infecção máxima ocorreu sob temperatura de 20-25°C e 12 horas de molhamento. O molhamento mínimo necessário para ocorrer infecção foi de 6 horas. Nas temperaturas de 15 e 17,5°C o mínimo de molhamento necessário para infecção foi 10 e 8 horas, respectivamente. Independente do período de molhamento foliar não houve doença em plantas incubadas na temperatura de 27,5°C (MARCHETTI; MELCHING; BROMFIELD, 1976).

Experimentos conduzidos no Brasil, com o cultivar BRS 154, revelaram efeitos semelhantes. Neste caso o fungo necessitou de no mínimo 6 e no máximo 24 horas de água livre para infectar, com faixa de temperatura ideal entre 15 e 25°C e temperatura ótima de 23°C. O período latente diminuiu conforme o aumento da temperatura. Em 10, 20 e 28°C o período latente foi de 30, 10 e 12 dias, respectivamente (ALVES; FURTADO; BERGAMIM, 2006).

Já em meio ágar-água a germinação dos urediniósporos foi favorável na faixa de 15-25°C quando incubados por 4 ou 22 horas. Os isolados provenientes da Austrália, Taiwan, Indonésia e Índia mostraram-se incapazes de germinar sob temperaturas abaixo de 7°C e acima de 28°C e todos foram aptos a germinar na faixa de 14-24°C (MARCHETTI; MELCHING; BROMFIELD, 1976).

A capacidade de infecção de *P. pachyrhizi*, no cultivar Wayne, depende da idade da folha e da idade da planta. As folhas mais novas foram mais suscetíveis em relação as mais velhas, e folhas que ocupam a mesma posição em plantas de diferentes idades mostraram ser mais suscetíveis quanto mais nova a planta (MELCHING et al., 1988).

MELCHING et al., (1988) após inoculação de suspensão de urediniósporos de *P. pachyrhizi* em plantas de soja cultivar Wayne em diferentes idades observaram que plantas com 15-20, 25-32 e 37-42 dias no momento da inoculação apresentam período latente médio de 7, 8 e 9 dias, respectivamente. Plantas com 15 dias de idade, em relação às plantas com 42 dias, apresentam maior tamanho de lesão (mm²) e maior número de uredínios por lesão na superfície abaxial, quando comparadas com a superfície adaxial da folha.

Melching; Bromfield; Kingsolver (1979) observaram o progresso do número de uredínios ao longo de 8 semanas em lesões na superfície adaxial e, principalmente, na abaxial em plantas de soja cultivar Wayne, quando inoculadas com isolados de *P. pachyrhizi* provenientes da Índia, Indonésia, Taiwan e Austrália. As primeiras lesões apareceram 7 dias após a inoculação, não havendo diferença entre isolados. O isolado australiano, porém, foi o que menos progrediu nesse intervalo de tempo.

Bergamim (2006) propôs que o surgimento de novos uredínios em lesões de ferrugem asiática da soja, corresponde a uma nova via anti-horária de infecção do modelo analógico para o patossistema tropical, descrito em Bergamim Filho e Amorin (1996). Uma via anti-horária devida à produção de novos uredínios, como acontece para a FA da soja, tem a mesma vantagem que o crescimento de lesão para patógeno tropical, exemplificado pela a ferrugem do cafeeiro (*Hemilea vastatrix*): torná-los menos dependentes de variações climáticas, principalmente molhamento foliar e temperatura.

Del Ponte; Godoy; Li; Yang (2006) estudaram epidemias de ferrugem da soja no Brasil em 34 campos experimentais, nas safras de 2002-2003 e 2004-2005, e correlacionaram variáveis climáticas, temperatura e chuva, com a severidade final da doença. Variáveis relacionadas à

quantidade de chuva, ao contrário das relacionadas a temperatura, explicaram parte da variação da severidade final da doença entre campos. Em todos os campos onde a severidade da doença foi maior que 70%, a quantidade de chuva variou de 250 a 450 mm após um mês da primeira detecção da doença e, nos campos onde a severidade foi menor que 30%, a chuva variou entre 20 e 125 mm.

A alta correlação entre chuva e severidade final da doença pode ser explicada pela característica incomum de *P. pachyrhizi*, não compartilhada com a maioria das outras ferrugens: urediniósporos do fungo tendem a permanecer firmemente juntos, não sendo facilmente liberados pela ação do vento. No entanto, as gotas de chuva, exercem o papel de liberar os esporos, seja por efeito do *splash*, seja pelo impacto que causam nas folhas. Assim, a via anti-horária sempre supre a epidemia com uredínios novos, independentemente da temperatura, e a chuva, quando cai, encarrega de disseminar os esporos nelas produzidos (BERGAMIM, 2006).

Estudos realizados por Yang et al (1990), em Taiwan, mostraram que a duração da epidemia de ferrugem asiática foi diferente em plantios realizados na primavera, verão e outono. Durante dois anos de observação, no outono as epidemias atingiram níveis máximos 40-60 dias após o plantio, no entanto, no verão, os níveis máximos de doença ocorreram após 80-100 dias. Uma possível explicação é que a maior sensibilidade da soja ao fotoperíodo do verão resulte em maiores taxas de crescimento com o conseqüente comprometimento do desenvolvimento da doença, além da sensibilidade do patógeno ao fotoperíodo (KOCH; HOPPE, 1987).

Estudos realizados por Isard et al (2006) mostram que a viabilidade dos urediniósporos de *P. pachyrhizi* é influenciada pela radiação solar. Esporos expostos à radiação igual ou superior a 27,3 MJ/m² não germinaram e esporos oriundos de folhas em posição superior na planta germinaram menos que aqueles obtidos de folhas inferiores.

2.1.8 Controle da doença

A obtenção de cultivar de soja resistente à ferrugem asiática tem sido um desafio para pesquisa. Genes dominantes para resistência, denominados *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3* e *Rpp4*,

identificados em introduções de plantas (PI's) e cultivares são relatados na literatura (BROMFIELD; HARTWIG, 1980; MCLEAN; BYTH, 1980; HARTWIG, 1986).

No entanto, a estabilidade dessa resistência é duvidosa, devido a grande variabilidade do patógeno (HARTMAN ET AL., 1994). Por exemplo, a PI 230970 foi identificada como resistente nos campos entre 1971 e 1973, no entanto, em 1976 observaram-se poucas lesões suscetíveis (TAN). Porém, em 1978 a maioria das lesões encontradas nessas plantas no campo foram do tipo TAN (BROMFIELD, 1984).

Estudos realizados pela Embrapa Soja identificaram 11 cultivares com resistência a ferrugem. No entanto, a maioria dos cultivares comercial atualmente utilizados foi classificada como suscetível (YORINORI, 2002). Das quatro fontes de resistência já descritas na literatura, apenas aquelas com os genes *Rpp2* e *Rpp4* permanecem resistentes à ferrugem no Brasil (ARIAS et al, 2004).

Evidências sobre a existência de raças fisiológicas de ferrugem foram primeiramente descritas quando nove isolados foram inoculados em seis cultivares de soja e em 5 introduções de plantas. A reação entre isolados e cultivares foi similar, porém identificaram-se seis patótipos nas reações com as introduções (LIN, 1966).

Evidência da existência de raças também foi observada quando 45 isolados mono urediniais de *P. pachyrhizi* coletados em soja e em hospedeiros alternativos (*Pueraria lobata* e *Glycine soja*) de diversas localidades do Japão foram inoculados em um conjunto de plantas diferenciadoras, em 9 cultivares de soja e em 2 linhagens de *G. soja*. Neste trabalho 9 raças foram encontradas em soja e 11 raças foram encontradas nos hospedeiros alternativos (YAMAOKA et al, 2002).

Nestes trabalhos sobre controle genético de FA ficou demonstrado que a utilização de apenas um gene para controlar a ferrugem asiática tem importância limitada, o que faz com que a resistência parcial e a tolerância adquiram importância no programa de melhoramento genético. As linhagens com resistência parcial, em condições de campo, mostram menor desenvolvimento de lesões ao longo da safra. Devido às dificuldades em incorporar a resistência parcial em programas de melhoramento e ao uso limitado desta com o avanço das gerações, a estratégia de selecionar plantas com estabilidade da produção (tolerância) tem se tornado interessante. A tolerância se refere à estratégia de selecionar genótipos com elevado potencial de produção mesmo que sejam atacadas pelo fungo (HARTMAN; MILES; FREDERICK, 2005).

Bonde et al (2006) sugerem que em programas de melhoramentos utilizem como metodologia de avaliação da ferrugem asiática as variáveis, número de uredínios por lesão e diâmetro de uredínios, por possibilitar detectar tanto a presença de um gene maior de resistência quanto a resistência parcial, ou seja, uma reação intermediária entre os sintomas de suscetibilidade (TAN) e de resistência (RB). Essa informação é proveniente de experimentos no qual utilizaram-se genótipos suscetíveis e resistentes inoculados com isolados *P. pachyrhizi* e *P. meibomiae* de diversos locais do mundo.

Embora sejam conhecidos alguns cultivares que são mais tolerantes à doença, ainda não se dispõe de cultivares suficientemente resistentes que possam dispensar o uso de fungicidas (YORINORI et al., 2002).

Em virtude da existência de hospedeiras, cultivadas ou não, infectadas durante todo o ano em diversas localidades do Brasil e de países vizinhos, a ocorrência das primeiras infecções na lavoura depende apenas das condições climáticas de cada safra. O momento da primeira aplicação de fungicida depende, portanto das condições climáticas, incidência e/ou da severidade da doença na região, idade das plantas de soja, extensão das lavouras, capacidade operacional de pulverizar toda área no devido tempo e, principalmente pela eficácia do fungicida escolhido (YORINORI, 2005).

Os fungicidas, atualmente utilizados para o controle da ferrugem asiática da soja são aqueles que já haviam sido registrados para a cultura, pertencentes ao grupo dos triazóis, estrobilurinas e benzimidazóis (SISTEMAS DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS, 2006).

O efeito protetor, curativo e erradicante destes fungicidas foi investigado em experimentos em casa de vegetação. Com exceção dos fungicidas benzimidazóis, os demais apresentaram percentuais acima de 90% e 60-90% de proteção após 8 e 14 dias, respectivamente, após ocorrida a pulverização. As plantas inoculadas 14 dias após a aplicação de carbendazin (benzimidazóis) apresentaram severidade estatisticamente semelhantes à testemunha. Nenhum produto mostrou ação curativa quando aplicado durante o período de incubação da doença, no entanto, todos fungicidas reduziram a severidade da ferrugem asiática e a viabilidade dos urediniósporos. Com exceção do carbendazin, todos os fungicidas inibiram acima de 60% a germinação de urediniósporos, quando aplicado até 8 dias após a inoculação (GODOY; CANTERI, 2004).

Recentemente, os pesquisadores Mendgen et al (2006) detectaram por cromatografia gasosa e espectrometria de massa alguns compostos voláteis que são produzidos pela planta durante a interação de alguns agentes etiológicos de ferrugens e seus respectivos hospedeiros. Posteriormente, testaram a ação destes em ensaios com fungos sobre membranas artificiais e em plantas, o composto do grupo dos terpenóides, acetato de farnesyl, inibiu a diferenciação do haustório de *P. pachyrhizi* e mostrou um significativo controle da FA. Com isso, os autores do trabalho sugerem que plantas modificadas geneticamente visando maior produção desse composto podem contribuir para o controle dessa enfermidade.

O controle da ferrugem da soja exige a combinação de várias táticas, como semear cultivares precoces no início da época recomendada; evitar o prolongamento do período de semeadura; realizar vistorias periódicas na lavoura, manejar adequadamente o solo, fazer rotação de culturas, evitar o desequilíbrio nutricional e pulverizar com fungicidas (YORINORI; PAIVA, 2002; ANDRADE; ANDRADE, 2002).

O ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), numa tentativa de evitar a propagação da ferrugem da soja de um ano agrícola para o outro, determinou para a entressafra de 2006 o decreto que ficou conhecida como “Vazio Sanitário”. Essa medida prevê um período de 90 dias sem que haja o plantio de soja nas principais regiões produtoras (EMBRAPA, 2006).

No entanto, apesar da tentativa do decreto de eliminar fontes de inóculo entre safras sucessivas, a existência de hospedeiros alternativos e mesmo a soja transgênica podem ser um risco em potencial. Com o aumento da área de cultivo da soja transgênica pode haver aumento das chances de sobrevivência de *P. pachyrhizi* em plantas guaxas RR (resistentes ao *Round up*) em áreas dessecadas com herbicida glifosato. Neste caso para que todas as plantas, potenciais fontes de inóculo, sejam eliminadas, deve ser usado um herbicida diferente do glifosato. É importante também que o fungo não sobreviva em plantas voluntárias ou em hospedeiros secundários, como o kudzu (*Pueraria lobata*), para se evitar a antecipação da doença na safra de verão (ZAMBOLIM, 2006).

2.1.9 Preservação dos urediniósporos

Estudos relacionados aos procedimentos para preservação dos esporos da ferrugem são essenciais, tanto na investigação de processos fisiológicos relacionados ao desenvolvimento do fungo quanto em experimentos para o desenvolvimento de variedades de soja resistentes à ferrugem. Espécies de *Phakopsora* são fungos biotróficos e, como tal, apresentam particularidades que tornam mais complexos os procedimentos de conservação.

Bromfield (1964) mostrou que os urediniósporos da ferrugem do trigo, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* teve inibição da germinação quando exposta a faixa de temperatura de -1 à -196°C. Entretanto, quando os urediniósporos foram submetidos ao choque-térmico de 40°C por 5 minutos ou hidratados por 16-24 horas, após o resfriamento, suas germinações foram semelhantes àqueles não resfriados. Estes resultados indicam que baixa temperatura não inviabiliza os esporos, mas induzem a dormência reversível. Neste caso foi possível reverter a dormência de esporos que permaneceram em 20°C até 34 dias após a indução da dormência.

A preservação dos urediniósporos de *Uromyces appendiculatus*, agente etiológico da ferrugem do feijoeiro, foi avaliada por meio da frequência de infecção em cultivar suscetível, por 6 e 12 meses nas temperaturas de 5°C, -20°C, -80°C e -196°C e na temperatura de 5°C (neste caso com redução da umidade relativa para 50%). Os resultados indicam drástica redução da infecção dos esporos durante a preservação. Aqueles preservados à -196°C não apresentaram germinação em nenhuma das avaliações. Após seis meses, maiores infecções foram obtidas nas temperaturas de -80°C e 5°C (50% de umidade), sendo estatisticamente diferente das demais taxas de infecção. A temperatura de 5°C com 50% de umidade foi a melhor condição para preservar esses esporos por até 12 meses (FALEIRO et al, 2000).

Schein (1962) ao utilizar a reversão de dormência para *Uromyces appendiculatus*, recuperou esporos viáveis (40% de germinação) depois de armazenados por quase 2 anos à -60 °C. Loegering et al (1961) congelaram esporos de *P. graminis* f.sp. *tritici* em nitrogênio líquido e posteriormente submeteram estes esporos ao choque térmico por poucos minutos em temperaturas entre 36 e 60 °C, obtendo níveis de germinação semelhantes ao dos esporos não congelados.

Para os urediniósporos de *Puccinia melanocephala*, agente causal de ferrugem em cana-de-açúcar, a desidratação em sílica gel seguido pelo armazenamento à -20°C ou -80°C mantiveram os esporos viáveis mesmo após 1 ano de armazenamento. Os esporos armazenados à temperatura ambiente e à 5°C não permaneceram viáveis por mais que 60 dias, independente da desidratação. A desidratação foi importante para os esporos armazenados à -20°C, mas não para aqueles à -80°C (GARCIA et al, 2006).

Estudo recente de preservação de *Phakopsora pachyrhizi* mostrou que a temperatura de -196° possibilitou a preservação de seus urediniósporos por até 270 dias, com germinação em torno de 60%. Os esporos preservados à -80°C permaneceram viáveis por 90 dias, com 10% de germinação. Os esporos armazenados em folhas herborizadas e geladeira tiveram germinação nula aos 60 dias (ZAMBENEDETTI, 2005).

2.1.10 O papel da cera epicuticular

O contato inicial entre o patógeno e a planta geralmente ocorre ao nível da cutícula, uma superfície hidrofóbica composta por uma mistura de ceras e um polímero insolúvel denominado cutina, que recobre a parede celular das células epidérmicas de folhas, flores, frutos e talos jovens (PASCHOLATI, 1995).

A cera epicuticular protege os órgãos da planta de dessecação (POSSINGHAN ET AL, 1967), dos poluentes do ar (SWIECKI; ENDRESS; TAYLOR, 1962) e dos patógenos (DAVIES, 1961; MARTIN; BATT; BURCHILL, 1957; SKOROPAD; TEWARI, 1977; STOCKWELL; HANCHEY, 1983). A produção de cera pelas plantas é aumentada quando as plantas são submetidas as altas intensidades de luz, altas temperaturas e baixa umidade relativa (McNAIR, 1931).

Estudo realizado por Marois et al (1986) mostrou que a cera desempenha um papel importante como barreira física na proteção das bagas de uva ao ataque de *Botrytis cinerea*. A porcentagem de bagas que desenvolveram doença após inoculação foi significativamente afetada pela remoção da cera com clorofórmio. Após a remoção 100% das bagas ficaram doentes 3 dias

após a inoculação, enquanto no tratamento controle, com água, apenas 31% delas ficaram doentes. Foi observado também que cachos de uva onde as bagas ficavam em contato uma com as outras a estrutura se alterava, o que favorecia o surgimento da doença.

A cera epicuticular mostrou-se importante também como mecanismo de defesa de planta de canola e mostarda a *Alternaria brassicae*, agente causal da pinta preta em crucíferas. A remoção de cera em cultivares que apresentavam elevada quantidade dessa substância, os tornaram menos resistentes a esse patógeno. Portanto, sugere-se que essa característica deve ser usada em melhoramento de cultivares com resistência a pinta preta (SKOROPAD; TEWARI, 1977).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Preservação dos urediniósporos de *P. pachyrhizi*

2.2.1.1 Viabilidade dos urediniósporos em diferentes condições de armazenamento

Os urediniósporos utilizados nestes experimentos foram coletados de plantas de soja naturalmente infectadas, na região de Piracicaba/SP. Parte destes urediniósporos foi desidratada previamente ao armazenamento e parte permaneceu sem desidratação.

Para a desidratação, os urediniósporos foram espalhados em placas de Petri colocadas abertas no interior de dessecador contendo sílica gel, por 24 horas. Os urediniósporos não desidratados permaneceram em placas de Petri em ambiente de laboratório, também por 24 horas.

Os esporos foram, então, depositados em microtubos de plásticos, com capacidade de 0,5 mL. Cada microtubo recebeu cerca de 0,05 g de esporos e foi hermeticamente fechado. Em seguida, os microtubos foram acondicionados nas seguintes temperaturas: $25^{\circ}\text{C} \pm 3$ (ambiente), $5^{\circ}\text{C} \pm 2$ (geladeira), -20°C (freezer), -80°C (deep freezer). Em cada temperatura mencionada armazenaram-se esporos desidratados e não desidratados. Para a avaliação dos urediniósporos coletaram-se, periodicamente, dois microtubos por tratamento.

As avaliações da viabilidade dos urediniósporos foram feitas por meio de testes de germinação *in vitro* e a infectividade foi avaliada por meio de inoculações em plantas de soja. Estas avaliações foram realizadas imediatamente antes do armazenamento (controle) e após 15, 29, 76, 154 e 231 dias de armazenamento. A reversão da dormência induzida pelo armazenamento foi feita submetendo-se os esporos ao choque térmico de 40°C por 5 minutos em aparelho termociclador (Peltier Thermal Cycle/ PTC-200,), seguido de hidratação por 16-24 horas (BROMFIELD, 1964). Para a hidratação, os urediniósporos foram transferidos para placas de Petri e estas foram acondicionadas em bandejas de plástico contendo uma lâmina de água. Para criar um ambiente de câmara úmida a bandeja foi fechada com saco plástico transparente.

Para os teste de germinação *in vitro*, utilizaram-se suspensões com 10^5 urediniósporos/mL de água destilada + Tween 20 (0,05%). Uma alíquota de 0,5 mL foi espalhada com auxílio de alça de Drygalsky em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio de cultura ágar-água (2%). As placas, 6 por tratamento (3/microtubo), foram mantidas em câmara climatizada (BOD) com temperatura de 20 °C, no escuro. Após 6 horas de incubação interrompeu-se o processo de germinação por meio de adição de quatro volumes de 30 µL de lactofenol na superfície do meio de cultura para cada repetição. Avaliou-se a porcentagem de urediniósporos germinados em 100 esporos, por repetição, tomados ao acaso sob microscópio ótico com aumento de 100 vezes. O urediniósporo foi considerado germinado quando o tubo germinativo apresentou o comprimento maior que o diâmetro do esporo.

Para o teste de infectividade, sementes do cultivar BRS 154 foram semeadas em vasos de alumínio com 2L de mistura de terra argilosa, areia e esterco (2:1:2). Dois vasos por tratamento, cada qual contendo três plantas de soja, foram mantidos em casa de vegetação até o momento da inoculação. A mesma suspensão utilizada no teste de germinação foi atomizada na superfície adaxial do par de folhas opostas, no estágio fenológico V₁. Após as inoculações, as plantas foram colocadas em câmaras climatizadas, com temperatura de 23 °C. Nas primeiras 24 horas, as plantas permaneceram sob condições de câmara úmida e de escuro.

As avaliações foram realizadas 14 dias após as inoculações em 8 folhas. Para isso, com auxílio de um molde de papelão colocado no centro da folha, delimitou-se um quadrado de 1 cm² de limbo foliar, no qual foi contado o número de lesões visíveis, utilizando-se aumento de 8 vezes obtido com lupa.

2.2.1.2 Sobrevivência de urediniósporos de *P. pachyrhizi* no ambiente

Para avaliar mais detalhadamente a perda de viabilidade dos urediniósporos no ambiente, foi instalado um novo ensaio. Para isso, parte dos esporos foi desidratada, conforme metodologia descrita anteriormente e parte permaneceu sem desidratação. Posteriormente, esses esporos foram acondicionados em microtubos. A viabilidade foi avaliada por meio de teste de germinação *in*

vitro, de acordo com metodologia já descrita. A porcentagem de germinação foi avaliada no início do experimento (controle) e após 4, 6, 9, 14, 16, 20 e 22 dias. Os esporos desidratados foram submetidos à hidratação (câmara úmida) 24 horas antes da montagem do teste de germinação. Nas avaliações utilizaram-se urediniósporos provenientes de dois microtubos, separadamente. Para os esporos de cada microtubo, foi preparada uma suspensão de urediniósporos, a qual foi plaqueada em 4 placas de Petri, totalizando 8 repetições. Cada repetição consistiu em uma placa. A avaliação foi realizada após 12 horas de incubação no escuro.

2.2.1.3 Efeito do choque térmico e da hidratação na reversão da dormência dos urediniósporos de *P. pachyrhizi*

Para esse estudo utilizaram-se urediniósporos desidratados e acondicionados em microtubos, obtidos de acordo com a metodologia descrita acima. Esses microtubos foram acondicionados em deep freezer por 30 dias. Após esse período de armazenamento os microtubos foram submetidos aos seguintes tratamentos: (1) sem choque térmico e sem hidratação, (2) apenas choque térmico, (3) apenas hidratação e (4) choque térmico seguido por hidratação. O choque térmico e a hidratação dos esporos foram realizados conforme a metodologia descrita no item 2.2.1.1. Como tratamento controle avaliou-se a germinação dos esporos no dia em que foram coletados. A viabilidade desses foi avaliada pelo teste de germinação *in vitro*, seguindo os mesmos procedimentos utilizados anteriormente.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 3 repetições. Cada parcela constituiu-se de uma placa de Petri.

2.2.2 Infecção de urediniósporos de *P. pachyrhizi* em condição de molhamento descontínuo

Os experimentos foram realizados no laboratório de Micologia, casa de vegetação e em câmaras climatizadas, do Setor de Fitopatologia, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Piracicaba/SP.

2.2.2.1 Obtenção dos urediniósporos

O isolado utilizado foi obtido em plantas de soja infectadas naturalmente, provenientes do campo experimental do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, Piracicaba-SP. Para multiplicação dos urediniósporos realizaram-se sucessivas inoculações em plantas de soja. As plantas foram inoculadas com suspensão de 10^5 urediniósporos/mL de água destilada + Tween 20, 0,05%, e mantidas em câmara climatizada com temperatura de 23 °C. Nas primeiras 24 horas as plantas permaneceram sob câmara úmida e escuro, posteriormente o fotoperíodo foi ajustado para 12 horas luz. A câmara úmida foi criada envolvendo os vasos em sacos plásticos transparentes e umedecidos. A partir de dez dias após a inoculação os esporos foram coletados periodicamente a cada 2 dias, sem destacar as folhas, até que essas senecessem. Os esporos foram coletados por meio de leve agitação dos folíolos infectados sobre uma placa de Petri aberta e, em seguida, armazenados em microtubos e acondicionados em temperatura de -80°C (deep freezer). Um dia antes da preparação da suspensão de esporos para inoculação, os microtubos contendo os esporos foram retirados do deep freezer e submetidos a choque térmico e câmara úmida, de acordo com a metodologia descrita no item 1.1.1. Para assegurar que os esporos da suspensão estavam viáveis, foi avaliada sua germinação em 3 placas de Petri, contendo meio ágar-água (2%). Avaliou-se a porcentagem de germinação de 100 esporos, por placa, escolhidos aleatoriamente.

2.2.2.2 Inoculação

Foi utilizado o cultivar BRS 154, considerado altamente suscetível à ferrugem. As sementes foram semeadas em vasos de alumínio com 2L de mistura de terra argilosa, areia e esterco (2:1:2).

Plantas no estágio fenológico V₁, foram inoculadas com suspensão de 10⁵ urediniósporos/mL. A suspensão foi pulverizada no par de folhas opostas. A pulverização foi feita até ponto de escorrimento. Posteriormente, as plantas foram envolvidas em sacos plásticos transparentes umedecidos, para obter o ambiente de câmara úmida. A mesma suspensão de esporos foi plaqueada em placas de Petri, contendo meio ágar-água (2%) e acondicionada junto às plantas. Os tratamentos consistiram em diferentes combinações de horas com molhamento foliar (M.F.), por meio de câmara úmida, e horas sem molhamento foliar, sem câmara úmida. Em todos os tratamentos a somatória dos períodos de molhamento foi de 12 horas. Como controle utilizaram-se plantas submetidas a 12 horas de molhamento contínuo. Após o período sem molhamento foliar, água foi aspergida na superfície adaxial até umedecimento completo da folha, evitando-se que ocorresse escorrimento. Os seguintes tratamentos foram utilizados:

- 1 - 1 hora com MF, 1 hora sem M.F., 11 horas com M.F.;
- 2 - 1 hora com MF, 3 horas sem M.F., 11 horas com M.F.;
- 3 - 1 hora com MF, 6 horas sem M.F., 11 horas com M.F.
- 4 - 2 horas com M.F., 1 hora sem M.F., 10 horas com M.F.;
- 5 - 2 horas com M.F., 3 horas sem M.F., 10 horas com M.F.;
- 6 - 2 horas com M.F., 6 horas sem M.F., 10 horas com M.F.;
- 7 - 4 horas com M.F., 1 hora sem M.F., 8 horas com M.F.;
- 8 - 4 horas com M.F., 3 horas sem M.F., 8 horas com M.F.;
- 9 - 4 horas com M.F., 6 horas sem M.F., 8 horas com M.F.;
- 10 - 12 horas com M.F. contínuo.

Posteriormente, as plantas permaneceram em temperatura de 23°C e fotoperíodo de 12 horas de luz. A avaliação foi realizada por meio da quantificação da severidade da doença, realizada 14

dias após a inoculação, por meio de fotografia digital, utilizando os programas Paint Shop Pro e Image Tool (Alves, 2005).

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com 16 repetições. Cada repetição consistiu em 1 folha oposta proveniente de 1 vaso com duas plantas. A análise estatística consistiu de análise de variância seguida de teste de média, Tukey ($P < 0,05$). O ensaio foi repetido 2 vezes.

Para observar a evolução da germinação após os períodos iniciais de molhamento foram, também, preparadas amostras para visualização dos urediniósporos em microscópio eletrônico de varredura. Para isso, 10 folhas opostas de plantas do cultivar BRS 154, no estágio fenológico V₁ foram destacadas, lavadas em água corrente, secas com algodão e acondicionadas em bandeja plástica desinfestada com álcool. No fundo da bandeja foram colocadas duas folhas de papel (germitest) umedecidas com água destilada e cobertas com papel alumínio perfurado, para proporcionar o contato dos pecíolos com a água do papel. Para inoculação, em cada folha depositaram-se duas gotas de 30 µL de suspensão de 10⁵ urediniósporos/mL. Após a inoculação, a bandeja foi coberta com plástico transparente umedecido e incubada em câmara climatizadas sob temperatura de 23°C e escuro. As secções foram obtidas, com auxílio de um bisturi, após 1, 2, 4, 7 e 12 horas. Em cada horário de coleta obtiveram-se 4 secções, provenientes de 2 folhas. Posteriormente, as secções foram fixadas por 12 horas em vapor de ósmio (KITAJIMA; LEITE, 1999). Logo após, foram transferidas para um recipiente com sílica gel, onde permaneceram por 24 horas. Os espécimes foram aderidos em fita de carbono fixada no suporte de alumínio (*Stubs*) e metalizados com vapor de ouro. Avaliaram-se as porcentagens de germinação e de formação de apressórios em 100 esporos aleatoriamente em microscópio eletrônico de varredura Zeiss modelo DMS 940A.

2.2.2.3 Germinação e formação de apressório *in vitro* com descontinuidade do molhamento

Foram utilizadas gotas de 30 µL da suspensão de 10⁵ urediniósporos sobre placas de Petri de poliestireno com 90 mm de diâmetro. Estas foram acondicionadas no interior de caixas “Gerbox” contendo papel germitest umedecido com 20 mL de água destilada, para evitar que as

gotas secassem, e mantidas em câmaras climatizadas com temperatura de 23°C no escuro. A posição da gota na placa foi marcada previamente, com caneta para retro projetor, na superfície inferior da placa. Para interromper o período de molhamento (M), as placas foram colocadas abertas sob fluxo de ar contínuo (capela) para que as gotas secassem e ficassem apenas os urediniósporos aderidos ao poliestireno. Para restabelecer o molhamento, após o período seco, uma gota de 30 µL de água foi depositada sobre a área da gota. Os seguintes tratamentos foram testados:

- 1 - 1 hora com M contínuo;
- 2 - 1 hora com M, 3 horas sem M, 11 horas com M;
- 3 - 1 hora com M, 6 horas sem M, 11 horas com M;
- 4 - 2 horas com M contínuo;
- 5 - 2 horas com M, 3 horas sem M, 10 horas com M;
- 6 - 2 horas com M, 6 horas sem M, 10 horas com M;
- 7 - 4 horas com M contínuo;
- 8 - 4 horas com M, 3 horas sem M, 8 horas com M;
- 9 - 4 horas com M, 6 horas sem M, 8 horas com M;
- 10 - 12 horas com M contínuo.

O desenvolvimento do tubo germinativo e apressório foram cessados com adição de 15 µL de lactoglicerol sobre cada gota da suspensão. Em seguida, cobriu-se com lamínula de vidro.

Avaliaram-se as porcentagens de germinação e formação de apressório por meio da contagem de 100 urediniósporos aleatoriamente, por repetição, em microscópio ótico com aumento de 100x.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com 4 repetições por tratamento, cada repetição consistiu em uma placa de Petri contendo três gotas da suspensão de esporos. Os dados foram analisados pela ANOVA e teste de média, Tukey ($P < 0,05$). O experimento foi repetido 2 vezes.

2.2.3 Influência da luminosidade e da superfície foliar na infecção de urediniósporos de *P. pachyrhizi*

2.2.3.1 Infecção em relação à superfície da folha de soja

Os experimentos foram realizados no laboratório de Micologia, casa de vegetação e em câmaras climatizadas, do Setor de Fitopatologia, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Piracicaba/SP. O inóculo utilizado foi obtido conforme metodologia descrita no item 2.2.2.1.

Utilizaram-se plantas de soja, cultivar BRS 154, no estágio fenológico V₂. A inoculação foi realizada na superfície adaxial ou abaxial do folíolo central do primeiro trifólio da planta de soja que, posteriormente, foi acondicionada na presença ou ausência de luz. Para garantir que a inoculação alcançasse apenas a superfície alvo, colocou-se um saco plástico protegendo as plantas vizinhas que existiam no vaso. Após a inoculação as plantas foram envoltas em sacos plásticos umedecidos e acondicionadas em câmaras climatizadas com temperatura ajustada para 23°C. Nas primeiras 24 horas as plantas permaneceram em câmara úmida, na luz ou no escuro. Posteriormente, as câmaras úmidas foram removidas e as plantas permaneceram sob fotoperíodo de 12 horas de luz, por 14 dias. A mesma suspensão de esporos foi plaqueada em placas de Petri, contendo meio ágar-água (2%) e acondicionada junto às plantas, tanto no escuro quanto na luz.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 (superfícies adaxial e abaxial) x 2 (luz e escuro), com 4 repetições. Cada repetição consistiu num vaso com 3 plantas.

Foram avaliados a frequência de infecção (número de lesões/cm²), o tamanho médio de lesão (cm²) e a severidade da doença aos 14 dias após a inoculação, por meio de fotografia digital, utilizando os programas Paint shop Pro e Image tool (Alves, 2005). Nas placas de Petri colocadas junto às plantas, avaliaram-se a porcentagem de germinação de 100 urediniósporos por repetição, em microscópio ótico com aumento de 100x.

2.2.3.2 Luminosidade na germinação e formação de apressório *in vitro*

Neste experimento, utilizaram-se gotas de suspensão de urediniósporos sobre placas de Petri de poliestireno, com metodologia idêntica à utilizada no item 2.2.2.3. Porém, incubaram-se as placas no escuro ou na luz. A avaliação, porcentagens de germinação e de formação de apressório em 100 urediniósporos, em microscópio ótico com aumento de 100x, foi realizada após 6 horas de incubação.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com 5 repetições por tratamento. Cada repetição consistiu em uma placa de Petri contendo 3 gotas da suspensão de esporos. Os dados foram analisados pela ANOVA e teste de média, Tukey ($P < 0,05$). O experimento foi repetido 2 vezes.

2.2.3.3 Quantificação e aspectos ultra-estruturais da camada de cera epicuticular de folhas de soja

Estes ensaios se basearam na quantificação da cera epicuticular e na visualização dos aspectos ultra-estruturais dessa cera na superfície de folhas de soja. As extrações químicas da cera foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo/ SP e as análises de ultra-estrutura, no Núcleo de Microscopia Eletrônica Aplicada a Pesquisa Agropecuária da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

Para a quantificação da cera das superfícies adaxial e abaxial, separadamente, foram utilizados os primeiros trifólios do cultivar BRS 154, no estágio V₂. As sementes foram semeadas em vasos de alumínio contendo 2L da mistura de terra, areia e esterco (2:1:2) e as plantas foram mantidas em casa de vegetação. Foram utilizadas 10 repetições por superfície, cada repetição consistiu de 1 trifólio. A extração da cera de cada trifólio foi realizada utilizando-se o volume de 9 mL de clorofórmio, sendo 3 mL para cada folíolo. A lavagem das superfícies foi feita com auxílio de pipeta Pauster. O filtrado, obtido em balão volumétrico, sofreu evaporação por

aquecimento, sob pressão reduzida em rota-evaporador. Após a evaporação do clorofórmio o balão volumétrico foi lavado 3 vezes novamente com clorofórmio para remoção da cera, e o conteúdo transferido para pequeno frasco de vidro, previamente pesado, e levados para evaporação em capela de fluxo. Após a completa evaporação, os recipientes foram transferidos para dessecador até atingirem peso constante.

O teor de cera foi determinado em função da área do folíolo. Para a quantificação da área foliar foi utilizado o software Quant.

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para visualização da organização estrutural da camada de cera epicuticular das superfícies adaxial e abaxial de folíolos de plantas de soja.

Para as observações da camada de cera em relação à superfície foliar coletaram-se 2 amostras de cada folíolo central do primeiro trifólio de seis plantas de soja do cultivar BRS 154, no estágio fenológico V₂. As secções dos folíolos, realizadas com auxílio de bisturi, foram fixadas por 12 horas em vapor de ósmio (KITAJIMA; LEITE, 1999). Posteriormente, foram transferidas para um recipiente com sílica gel, onde permaneceram por 24 horas. As amostras, 6 referentes a cada superfície foliar, foram aderidas em fita de carbono fixada em suportes de alumínio (*stubs*), metalizadas com ouro e observadas em Microscópio Eletrônico de varredura Zeis modelo DMS 940A.

2.2.4 Influência do estágio fenológico e da idade da folha na infecção de *P. pachyrhizi*

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação e em câmaras climatizadas, do Setor de Fitopatologia, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Piracicaba/SP. O inóculo utilizado foi obtido conforme metodologia descrita no item 2.2.2.1.

Para verificar a influência do estágio fenológico na reação à ferrugem, plantas de soja dos cultivares, BRS 154 e BRS 258 foram inoculadas nos estádios V₃, R₁ e R₅. A obtenção das plantas nesses 3 estádios foi conseguida por meio de semeaduras em 3 datas sucessivas

intercaladas por 20 dias. As sementes foram semeadas em vasos de plástico de 10 L com a mistura de terra argilosa, areia e esterco (2:1:2).

As plantas foram inoculadas com suspensão de 10^5 urediniósporos/mL em todos os trifólios. Posteriormente foram acondicionadas em câmara úmida no escuro a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. A mesma suspensão de esporos foi plaqueada em placas de Petri, contendo meio ágar-água (2%) e acondicionada junto às plantas. Após esse período as plantas permaneceram em condições de casa de vegetação por 20 dias.

Foram avaliados o período latente médio (PLM), dias após a inoculação em que 50% das lesões estavam esporulando, e a severidade, de acordo com a escala de notas (Figura 2) para a ferrugem da soja (GODOY; KOGA, CANTERI, 2006). Para obtenção do PLM as plantas foram examinadas diariamente no mesmo horário. A severidade foi avaliada aos 8 e 16 dias após a inoculação. Na segunda avaliação, as plantas do estágio fenológico V3, de ambos cultivares, não foram reavaliadas, pois não apresentam ferrugem em decorrência da queda das folhas inoculadas.

O delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 3 ou 2 (estádios fenológicos) x 2 (cultivares), com 7 repetições. Cada repetição consistiu de um vaso com 2 plantas.

Figura 2 - Escala diagramática de severidade de ferrugem asiática da soja (GODOY; KOGAN; CANTERI, 2006)

Para a avaliação da influência da idade da folha de plantas de soja à FA utilizaram-se plantas do cultivar BRS 154, no estágio fenológico V₅. A inoculação foi realizada na superfície adaxial dos 4 primeiros trifólios expandidos com uma suspensão de 10^5 urediniósporos/mL. No sentido base-ápice, a idade do trifólio foi denominada, 1, 2, 3 e 4. Após a inoculação as plantas foram envoltas em sacos plásticos umedecidos e mantidas assim, em câmara úmida, por 24 horas,

sob temperatura de 23°C, no escuro. Posteriormente, as plantas permaneceram sob fotoperíodo de 12 horas de luz.

Aos 15 dias após a inoculação, os folíolos dos trifólios foram destacados e avaliados quanto à severidade, tamanho médio de lesão e frequência de infecção, por meio de fotografia digital, utilizando os programas Paint Shop Pro e Image Tool (ALVES, 2005).

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições. Cada repetição consistiu em um vaso com 1 planta. A repetição constituiu-se da média de 3 folíolos para cada idade de trifólio.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Preservação dos urediniósporos de *P. pachyrhizi*

Nos estudos de preservação dos esporos, a germinação inicial foi de 50,6% e 62,2% e a infectividade inicial foi de 62 e 106 lesões/ cm² para os urediniósporos desidratados e sem desidratação, respectivamente. Observa-se, portanto, que a desidratação diminuiu a germinação e infectividade iniciais dos urediniósporos.

De maneira geral, observou-se que o processo de desidratação proporcionou maior viabilidade dos esporos ao longo do tempo, para todas as temperaturas de armazenamento testadas. Apenas no deep freezer (-80 °C) foi possível observar germinação e infectividade dos urediniósporos após 231 dias (7,7 meses) de armazenamento, independentemente da condição de hidratação. Nesta condição de armazenamento, urediniósporos desidratados apresentaram maior taxa de germinação (56,6%) quando comparado com aqueles não desidratados (28,0%) (Figura 3, A e B).

De acordo com os resultados de preservação de urediniósporos de *P. pachyrhizi* obtidos por Zambenedetti (2005), no deep freezer e em nitrogênio líquido foi possível preservar por 3 e 9 meses, respectivamente. Esses métodos foram superiores às demais condições testadas, ou seja, folhas herborizadas, dessecador e geladeira.

Os esporos que germinaram *in vitro*, independente da taxa de germinação, também mantiveram a infectividade em plantas de soja, embora, na maioria das vezes, não tenha sido possível estabelecer uma correlação entre estas 2 variáveis (Figura 3 - C e D).

Para *Puccinia melanocephala* (ferrugem da cana-de-açúcar), os melhores tratamentos para preservação dos esporos foram desidratação em sílica gel, seguida pelo armazenamento à -20 °C e -80 °C. Nestas condições, mesmo após 1 ano de armazenamento, os esporos apresentavam-se viáveis e infectivos (GARCIA et al., 2006).

Figura 3 - Germinação (A e B) e infectividade, nº de lesões/cm² (C e D) dos urediniósporos desidratados e não desidratados de *P. pachyrhizi* em função do tempo de armazenamento (dias). Barra de erro representa erro padrão da média

No ensaio que avaliou a viabilidade somente no ambiente, os resultados mostraram que os urediniósporos de *P. pachyrhizi* não apresentaram níveis satisfatórios de sobrevivência nesta condição, sendo que a desidratação dos esporos, apesar de reduzir a viabilidade inicial, permitiu prolongar em 6 dias o período de preservação (Figura 4).

Figura 4 - Sobrevivência dos urediniósporos de *P. pachyrhizi* no ambiente. Barra de erro representa erro padrão da média

Entre os tratamentos de reversão de dormência, aqueles submetidos a hidratação foram os que proporcionaram maior recuperação da germinação (Tabela 1). Os tratamentos constituídos de choque térmico/hidratação (39,96%) e sem choque térmico/hidratação (36,8%) foram similares. A germinação inicial, logo após a coleta dos esporos, foi 43%.

Tabela 1- Efeito de choque térmico e hidratação na germinação de urediniósporos de *P. pachyrhizi* armazenados a -80 °C por 30 dias

TRATAMENTOS	GERMINAÇÃO (%)
Com choque térmico e com hidratação	39,96 A
Sem choque térmico e com hidratação	36,80 A
Com choque térmico e sem hidratação	22,51 B
Sem choque térmico e sem hidratação	2,96 C

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), $CV=23,7\%$. A germinação inicial dos esporos, após a coleta, foi 43%

Os esporos das ferrugens aparentemente entram em dormência quando armazenados em temperaturas baixas, apresentando reduzidas taxas de germinação (Bromfield, 1964). Loegering et al (1961) congelaram esporos de *P. graminis* f sp. *tritici* em nitrogênio líquido e observaram níveis de germinação semelhantes a de esporos não congelados, após submetê-los a choque

térmico de poucos minutos em temperaturas entre 36 e 60 °C. Bromfield (1964), também trabalhando com *P. graminis* f sp. *tritici*, observou maior reversão de dormência quando os esporos foram submetidos ao choque térmico e ao processo de hidratação. Schein (1962), ao utilizar a reversão de dormência, obteve sucesso ao recuperar esporos de *Uromyces appendiculatus* depois de armazenados por quase 2 anos a -60 °C.

2.3.2 Infecção de urediniósporos de *P. pachyrhizi* em condição de molhamento descontínuo

A média da porcentagem de germinação dos urediniósporos, *in vitro*, foi 52%. De acordo com a figura 5, a severidade de FA em folhas de soja, em temperatura favorável à ocorrência da doença (23°C), mostrou ser influenciada pela interrupção do molhamento após 1 (tratamentos 1, 2 e 3), 2 (4, 5 e 6) e 4 (7, 8 e 9) horas de câmara úmida após a inoculação das plantas.

Resultados semelhantes ao obtido para *P. pachyrhizi*, com redução da capacidade infectiva sob molhamento descontínuo, foram observados também para outros patossistemas, tanto para fungos causadores de ferrugens, tais como, *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* (de Vallavielle-Pope; Huber; Goyeau, 1995, Stuckey; Zadocks, 1989) e *P. striiformis* em trigo (de Vallavielle-Pope; Huber; Goyeau, 1995) quanto para outros patógenos, *Cercospora Kikuchii* em soja (Schuh, 1993), *Coccomyces hiemalis* em cereja (Eisensmith; Jones; Cress, 1982) e *Botrytis squamosa* em cebola (ALDERMAN, LACY, EVERTS, 1985).

Os tratamentos com molhamento foliar descontínuo agruparam-se em três níveis de severidade da doença distintos estatisticamente. Os maiores níveis de doença foram observados nos tratamentos 1, 2, 4, e 5. Valores intermediários foram observados para os tratamentos 3 e 6, enquanto os tratamentos 7, 8 e 9 apresentaram severidades praticamente nulas.

A severidade da FA, em todos os tratamentos, foi reduzida em relação ao controle, independente da duração do período seco. Após 1 ou 2 horas iniciais de câmara úmida, 6 horas de interrupção do molhamento foliar proporcionou baixos índices da doença. Já para interrupções ocorridas após 4 horas, o efeito sobre a severidade da doença foi drástico independente da duração do período seco.

Figura 5 – Efeito da interrupção do molhamento na severidade média de FA em folha de soja. Os tratamentos com as mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Barra de erro representa erro padrão da média

Seqüência dos tratamentos em horas: Período de molhamento após a inoculação - (período seco) – período de molhamento após o período seco

1) 1 (1) 11; 2) 1 (3) 11; 3) 1 (6) 11; 4) 2 (1) 10; 5) 2 (3) 10; 6) 2 (6) 10; 7) 4 (1) 8; 8) 4 (3) 8; 9) 4 (6) 8; 10) 12 (0) 0

Avaliações da influência do período seco para diferentes interações patógeno-hospedeiro mostraram resultados diversos. Arauz e Sutton (1990) observaram para o patossistema *Botryosphaeria obtusa*/maçã que período seco de 1 hora após 12 horas iniciais de molhamento comprometeu o processo infeccioso da mesma forma que interrupções de 2, 3 ou 4 horas.

No entanto, em plantas de pêra inoculadas com conídios de *Stemphylium vesicarium*, o efeito da duração do período seco (0, 6, 12, 18 e 24 horas), antecedido e precedido de 12 horas de molhamento, dependeu da umidade relativa. Para umidade relativa de 60 %, o processo de infecção foi irreversivelmente paralisado. Já para 96% de umidade relativa, a severidade da doença incrementou na medida em que aumentou as horas de interrupção (LLORENTE; MONTESINOS, 2001). O mesmo comportamento foi observado para *Cercospora kikuchii* em soja (SCHUH, 1992).

Em folhas de cenoura, o fungo *Cercospora carotae* foi favorecido por 3 horas de período seco entre o molhamento inicial (24 horas) e final (12 horas), sendo observado maior número de lesão por planta nesta condição do que sob o correspondente período contínuo (CARISSE; KUSHALAPPA, 1992).

No patossistema *P. pachyrhizi*-soja, a interrupção do molhamento foliar após 4 horas iniciais de câmara úmida impossibilitou a ocorrência da doença para todos intervalos secos testados. No entanto, quando a interrupção ocorreu após 1 ou 2 horas de molhamento inicial menor comprometimento do processo infectivo foi observado, apresentando, porém, níveis de severidade muito inferiores ao tratamento controle, com 12 horas de molhamento contínuo.

Estudos de microscopia eletrônica de varredura a fim de avaliar os percentuais de germinação e formação de apressórios, durante as primeiras horas de molhamento contínuo, ou seja, antes do período seco, mostraram que não houve germinação dos urediniósporos 1 hora após a inoculação (h.a.i) (Figura 6 e Figura 7A). Os valores de germinação obtidos 2 h.a.i (7,25%) diferenciaram estatisticamente daqueles com 4 (31%), 7 (35%) e 12 (34,7%) h.a.i., estes, porém, não apresentaram diferenças entre si. O máximo de germinação dos esporos ocorreu após 4 horas de molhamento foliar. Na Figura 7B observa-se imagem dos esporos neste intervalo de tempo. A formação de apressórios iniciou-se 4 h.a.i (6,5%), não se diferenciando do valor médio obtido 7 h.a.i (11%). No entanto, diferenciou-se do valor com 12 h.a.i. (18,5%). Nas figuras 7 C e D observam-se imagens de urediniósporos germinados com formação de apressórios.

Figura 6 - Germinação e formação de apressórios de *P. pachyrhizi* em folhas de soja do cultivar BRS 154, em função do tempo. Os tratamentos com as mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Barra de erro representa erro padrão da média

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Bonde; Melching e Bromfield (1976), com início da germinação dos esporos e da formação de apressório entre 1-2 horas e 2-5 horas, respectivamente.

Os dados de severidade e os resultados da microscopia mostraram que a baixa severidade obtida quando o molhamento foliar foi interrompido após 4 horas iniciais de câmara úmida, período que a maioria dos urediniósporos já havia germinado é, provavelmente, consequência da alta fragilidade do tubo germinativo destes esporos. No entanto, quando a interrupção do molhamento ocorreu após 1 e 2 h.a.i, momento que apenas poucos esporos tiveram tempo suficiente para germinar, menor comprometimento do sucesso do processo infeccioso ocorreu.

Estas conclusões corroboram com os resultados obtidos para *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* e *P. striiformis* em trigo. A infecção relativa de ambas as ferrugens foram similarmente afetadas por período seco após a germinação dos urediniósporos e antes da formação da vesícula sub-estomatal (DE VALLAVIELLE-POPE; HUBER; GOYEAU, 1995). Segundo estes autores, quando o molhamento inicial for menor que o período mínimo para ocorrer infecção, os urediniósporos germinados não resistem e morrem e apenas aqueles que não haviam germinado estariam aptos a germinar durante o segundo período de molhamento.

Para *P. recondita* f.sp. *tritici*, de Vallavielle-Pope; Huber; Goyeau (1995) observaram que apressórios com penetração completa em trigo foram aptos a continuar o processo infeccioso após o período seco, apesar de não ter demonstrado, nesta condição ambiental, vantagem significativa sobre *P. striiformis*, que não produz apressórios. Para *P. pachyrhizi* foi observado que os apressórios formados com 4 horas de molhamento não contribuíram para a ocorrência da FA em folhas de soja, possivelmente nesse intervalo não houve tempo suficiente para formação da hifa de penetração, o que possivelmente garantiria a infecção do fungo.

O fungo *Venturia inaequalis*, agente causal da sarna da macieira, não teve a viabilidade de seus conídios, não germinados, reduzida ao serem expostos a intervalos secos maiores ou iguais a 24 horas, independente da temperatura e da umidade relativa, e somente após 96 horas houve decréscimo na viabilidade. Já para aqueles que haviam germinado houve decréscimo de 20% após os primeiros 15 minutos do intervalo seco e um decréscimo adicional de 10-30% após 96 horas (BECKER; BURR, 1994). Arauz e Sutton (1989) observaram, porém, que conídios não germinados de *Botryosphaeria obtusa* foram sensíveis à interrupção do molhamento com mais de 60% de redução da viabilidade após 20 minutos do início do período seco.

Figura 7 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura do processo de pré-penetração de *P. pachyrhizi* em folha de soja, cultivar BRS 154, com aumento de 1000x

A - Urediniósporos após 1 hora de incubação; B - Urediniósporos após 4 horas de incubação, C - Urediniósporos germinados com (seta) e sem apressórios (ponta de seta); D - Detalhe do apressório em maior magnificação (ponta de seta). Notar que o conteúdo do esporo migrou para o apressório

Neste mesmo trabalho cita-se que os esporos de *P. recondita* que germinam em uma ampla faixa de temperatura, inclusive nas mais elevadas, são mais afetados por descontinuidade do molhamento que os esporos de *P. striiformis*, que germinam especificamente em temperaturas mais baixas, onde a alta umidade relativa favorece a germinação e a penetração. Especula-se que, neste caso, para compensar a estreita faixa de temperatura utilizada para germinar, os esporos de

P. striiformis permanecem por mais tempo na condição de não germinado, aptos, porém, a completar a infecção quando ocorrer condição favorável.

Os urediniósporos de *P. pachyrhizi* também germinam em uma ampla faixa de temperatura, 10-28°C (ALVES; FURTADO; BERGAMIM FILHO, 2006). Portanto, o que a princípio parece ser uma vantagem para o patógeno, em termos de eficiência de infecção, pode tornar-se uma desvantagem, se houver descontinuidade no molhamento foliar, principalmente para esporos germinados.

É interessante observar que os patógenos apresentam comportamento variável em relação ao molhamento. O trabalho de Bashi e Rotem (1974) ilustra a habilidade de alguns fungos fitopatogênicos de causar epidemias em habitats semi-áridos, onde o molhamento é descontínuo ou curto. Segundo estes autores, em tomateiro, o fungo *Stemphylium botryosum* f. sp. *lycopersici* infectou sob molhamento descontínuo da mesma forma que sob longo período de molhamento contínuo, inclusive quando o período seco ocorreu após a germinação dos conídios. A estratégia adotada por *Phytophthora infestans* e *Alternaria porri* f. sp. *solani* foi a rápida penetração em folhas de batata para compensar a sensibilidade de seus esporos à dessecação. Segundo (Jacome; Schuh, 1992), os conídios de *Micosphaerella fijiensis* var. *difformis*, agente causal de sigatoka negra em banana, possuem capacidade de infectar quando o período de molhamento é curto ou ausente, desde que haja umidade relativa alta, além de terem tubos germinativos com capacidade de sobreviver a intervalos secos entre períodos úmidos. De acordo com os trabalhos apresentados, fungos que infectam sob molhamento interrompido apresentam, basicamente, duas estratégias de sobrevivência: rápida germinação e penetração no hospedeiro ou alta capacidade de sobrevivência de esporos germinados.

Quanto à germinação e formação de apressórios *in vitro*, os tratamentos 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 proporcionaram maiores porcentagens de germinação dos urediniósporos (Figura 8A) e os tratamentos 7, 8 e 9 e 10, nos quais a interrupção do molhamento ocorreu após 4 horas, apresentaram maiores valores médios para a variável formação de apressórios (Figura 8B).

Não se observou acréscimo na germinação dos esporos e na formação de apressórios após a interrupção dos intervalos iniciais de molhamento. Isto pode ser evidenciado ao se comparar o tratamento 1 com 2 e 3 (Figura 8 A e B), comprovando a intolerância desses esporos à períodos secos entre períodos úmidos.

Figura 8 - Efeito da interrupção do molhamento *in vitro* na porcentagem média de germinação (A) e de formação de apressórios (B) de urediniósporos de *P. pachyrhizi*. Os tratamentos com as mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Barra de erro representa erro padrão da média.
 Sequência dos tratamentos em horas: Período de molhamento após a inoculação - (período seco) - período de molhamento após o período seco
1) 1 (0) 0; **2)** 1 (3) 11; **3)** 1 (6) 11; **4)** 2 (0) 0; **5)** 2 (3) 10; **6)** 2 (6) 10; **7)** 4 (0) 0; **8)** 4 (3) 8; **9)** 4 (6) 8; **10)** 12 (0) 0.

Com a análise dos resultados obtidos com o experimento de molhamento descontínuo, uma possível hipótese, a ser testada em experimentos futuros, é a de que plantios de soja em espaçamentos menos adensados proporcionam maior arejamento da lavoura e,

conseqüentemente, tornam menos efetiva a sobrevivência do fungo por dificultar a formação de água livre sobre as folhas e/ou por interromper mais rapidamente o molhamento estabelecido.

2.3.3 Influência da luminosidade e da superfície foliar na infecção de urediniósporos de *P. pachyrhizi*

A média da porcentagem de germinação dos urediniósporos, *in vitro*, foi 44%. O fungo *P. pachyrhizi* mostrou-se apto a infectar folhas de soja tanto na luz quanto no escuro. No entanto, a condição de escuro proporcionou severidade e frequência de infecção ligeiramente maior, tanto para a superfície adaxial quanto para a abaxial. Com relação à superfície foliar, observaram-se valores discretamente superiores quando a inoculação foi realizada na superfície adaxial, tanto para a severidade quanto para a frequência de infecção (Figura 9). No escuro, as severidades observadas nas superfícies adaxial e abaxial foram 24,46% e 17,45%, respectivamente (Figura 9A). Já na presença de luz, a severidade na superfície adaxial foi 15,99% e na abaxial 10,24% (Figura 9B). As frequências de infecção de *P. pachyrhizi* no escuro foram de 99,91 e 77,37 lesões/cm² nas superfícies adaxial e abaxial, respectivamente (Figura 9C). Na luz também se observou maior valor na superfície adaxial (57,7 lesões/cm²) em relação à abaxial (41,0 lesões/cm²) (Figura 9 D). A variável tamanho médio de lesão não mostrou diferença estatística para nenhuma das condições testadas. Apesar de *P. pachyrhizi* ter causado infecção em todas as condições testadas, os resultados mostraram índices de doença ligeiramente superiores quando a inoculação foi realizada na superfície adaxial e a incubação foi realizada no escuro.

O experimento realizado *in vitro* confirmou a capacidade dos urediniósporos de *P. pachyrhizi* de germinarem e formarem apressórios quando incubados no escuro ou na luz. A condição de escuro mostrou-se, porém, mais favorável que a luz para o desenvolvimento destas estruturas infectivas (Figura 10).

Figura 9 - Severidade (A e B) e frequência de infecção (FI) (C e D) de FA, em folhas do cultivar BRS 154, em função da superfície foliar inoculada (adaxial ou abaxial) e da condição de luminosidade usada na incubação (luz ou escuro). Os tratamentos com letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Barra de erro representa erro padrão da média

Figura 10 - Porcentagem de germinação e formação de apressórios de uredinósporos de *P. pachyrhizi* in vitro, em função da luminosidade. Os tratamentos com letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Barra de erro representa erro padrão da média

A porcentagem de germinação dos esporos no escuro (40,7%) foi estatisticamente diferente da germinação na luz (28,5%). O mesmo ocorreu para a formação de apressórios, no escuro (24,7%) e na luz (12,8%). Estes resultados explicam as observações de maiores níveis de FA quando se incubou, após a inoculação, as plantas no escuro (Figura 9). Além disso, a maioria dos apressórios desenvolvidos sob luz apresentou tamanho reduzido quando comparados àqueles que tiveram seu desenvolvimento no escuro (Figura 11), sendo mais um indício da sensibilidade desse fungo à luz.

Figura 11 - Apressórios de *P. pachyrhizi* sob luz (A) e escuro (B)

Segundo Koch e Hoppe (1987), o tubo germinativo de urediniósporos de *P. pachyrhizi* emerge a partir do lado sombreado e o seu crescimento apresenta fototropismo negativo, sendo a luz azul responsável por esse efeito. Os autores discutem que esse fenômeno poderia favorecer a infecção deste fungo na presença de luz, por favorecer o contato entre o tubo germinativo e a superfície da folha, facilitando a formação de estruturas de infecção e, conseqüentemente, aumentando a frequência de infecção. Não existe, porém, evidência que os efeitos da luz descritos naquele trabalho são significativos para a sobrevivência ou epidemiologia de FA.

Os efeitos da luz na germinação de urediniósporos de *P. pachyrhizi* foram recentemente investigados por Isard et al (2006). Foi observado que os esporos submetidos à radiação solar total e ultravioleta iguais ou superiores a 27,3 e 1,2 MJ/m², respectivamente, não germinaram. A inoculação de urediniósporos submetidos à radiação solar moderada (10 MJ/m²) e alta (23MJ/m²), em plantas de soja, resultou em níveis de doença significativamente menores quando

os esporos foram submetidos à alta radiação. Esses autores também observaram que esporos oriundos de lesões de folhas em posição superior na planta germinaram menos que aqueles obtidos de folhas baixas, possivelmente decorrente da maior luminosidade no terço superior da planta.

Yang et al (1990) quantificaram ferrugem da soja em 73 plantios sequenciais de soja e observaram maior severidade na primavera e no outono do que no verão. Estes autores discutem que esse efeito pode ser devido ao maior crescimento das plantas no fotoperíodo de verão, o que pode ter atrasado o desenvolvimento da doença ou, por outro lado, devido à sensibilidade dos esporos de *P. pachyrhizi* a mudança do fotoperíodo.

Os trabalhos acima mostram a influência da luz no desenvolvimento da doença, resultados que estão de acordo com o obtido no presente trabalho, onde foi demonstrado maiores índices de doença em condições de escuro e penetração preferencial do fungo via superfície adaxial. Estes resultados são importantes para padronização de experimentos e reprodução da doença em condições controladas, além de contribuir com informações a respeito do processo infeccioso deste importante patógeno responsável por severas epidemias em plantações de soja no Brasil.

O teor de cera obtido de folha de soja, não mostrou diferença estatística entre as superfícies foliares (Figura 12). Diferenças visuais também não foram observadas pelas análises de microscopia eletrônica de varredura que avaliou a organização estrutural das ceras em ambas as superfícies foliares (Figura 13 e Figura 14).

Apesar de não haver diferenças evidentes na cera epicuticular de ambas as superfícies das folhas de soja, de tal forma que se pudessem explicar as diferenças observadas na infecção de *P. pachyrhizi*, em outros patossistemas isso é mais comum. No trabalho de Carver et al (1990), foi demonstrada a influência da organização da camada de cera na infecção do patógeno biotrófico *Erysiphe graminis* em centeio. Folhas de centeio e aveia foram inoculadas na superfície adaxial e abaxial, porém, apenas na superfície abaxial de centeio o crescimento e o desenvolvimento normal do tubo germinativo foi impedido. Por meio de microscopia eletrônica de varredura, ficou demonstrado que a cera epicuticular dessa superfície apresentava aspecto amorfo, enquanto na sua superfície adaxiais e ambas as superfícies de aveia diferenciaram por possuir uma camada de cera cristalina. Porém, após a remoção da cera abaxial de centeio, com clorofórmio, o tubo germinativo dos conídios de *E. graminis* teve seu desenvolvimento normalizado.

Figura 12 - Teor de cera epicuticular da superfície adaxial e abaxial de folhas de soja do cultivar BRS 154. Barra de erro representa erro padrão da média

A camada de cera amorfa da superfície abaxial, em centeio, juntamente com o pequeno número de estômatos, impediu o desenvolvimento de espécies causadoras de ferrugem, *Puccinia coronata*, *P. graminis* e *P. loliina*. Entretanto, quando os urediniósporos dessas ferrugens foram inoculados na superfície adaxial, os tubos germinativos apresentaram desenvolvimento e crescimento direcional aos estômatos normalizados. Provavelmente, decorrente da organização cristalina da camada de cera desta face foliar (RODERICK; THOMAS, 1997).

O desenvolvimento de FA em ambas as superfícies foliares não foi correlacionado com as características da cera epicuticular. Para melhor compreensão desse fato novas pesquisas devem ser realizadas buscando elucidar a influência de outros mecanismos de resistência a essa doença. Possivelmente, a infecção de *P. pachyrhizi* é afetada posteriormente ao processo de pré-penetração.

Figura 13 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura do aspecto da estrutura da camada de cera epicuticular da superfície adaxial de folhas de soja do cultivar BRS 154

Figura 14 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura do aspecto da estrutura da camada de cera epicuticular da superfície abaxial de folhas de soja do cultivar BRS 154

2.3.5 Influência do estágio fenológico e da idade da folha na infecção de *P. pachyrhizi*

A média da porcentagem de germinação dos urediniósporos, *in vitro*, foi 36%. O estágio fenológico das plantas de soja não influenciou no período latente médio (PLM) da ferrugem. Entretanto, essa variável diferiu apenas em função dos cultivares, com diferença de apenas 1 dia entre eles. As plantas do cultivar BRS 154 e BRS 258 tiveram PLM de 8 e 9 dias, respectivamente, em condições de casa de vegetação com temperatura entre 22 e 32°C (Tabela 2).

Tabela 2 - Período latente médio (dias) de *P. pachyrhizi* em função do cultivar e do estágio fenológico de plantas de soja

Cultivar	Estádio Fenológico		
	V ₃	R ₁	R ₅
BRS 154	8	8	8
BRS 258	9	9	9

Alves, Furtado e Bergamim (2006) ao estudar o efeito da temperatura sobre o PLM da ferrugem da soja para o cultivar BRS 154, observaram, na temperatura de 22,5°C, 9 dias de duração do PLM. Já os resultados obtidos por Balardin, Navarini e Dallagnol (2005), em cultivares suscetíveis após o florescimento com variação da temperatura entre 22 e 30°C, apresentaram início da formação das lesões entre 7 e 9 dias.

Melching et al (1988), em estudos com plantas de soja cultivar Wayne, encontraram menor período latente da FA em plantas que apresentavam, no momento da inoculação, idade entre 15 e 20 dias (PLM de 8 dias) do que nas plantas com 37-42 dias (PLM de 10 dias). Estes resultados diferem, portanto, daqueles encontrados no presente trabalho, nos quais os cultivares BRS 154 e BRS 258 não apresentaram influência do estágio de desenvolvimento da planta sobre o PLM da FA.

O estágio fenológico das plantas é um importante fator que afeta diretamente o desenvolvimento das doenças. Dependendo da doença, a suscetibilidade do tecido do hospedeiro pode aumentar ou decrescer ao longo do tempo. Welty and Baker (1992) compararam a suscetibilidade de plantas de centeio perene à infecção de *Puccinia graminis* subsp. *graminicola*

e observaram que plantas com 8 semanas de idade eram mais suscetíveis que plantas com 14 semanas. O mesmo comportamento, maior suscetibilidade de plantas mais novas, foi observado para os patossistemas: fumo - *Peronospora tabacina* (Reuveni et al, 1986) e alface - *Bremia lactucae* (DICKINSON E CRUTE, 1974). Entretanto, plantas de feijão mostraram maior suscetibilidade a *Uromyces phaseoli* e TMV (Tobacco Mosaic Virus) em folhas mais desenvolvidas em relação às menos desenvolvidas (SCHEIN, 1965)

Nas avaliações de severidade da FA não houve interação estatística, ao nível de 5% de probabilidade, entre os fatores fenologia e cultivares, ou seja, os cultivares apresentaram o mesmo comportamento à FA nos diferentes estádios fenológicos. No entanto, a fenologia influenciou a suscetibilidade dos cultivares à FA.

As severidades da FA, aos 8 dias após a inoculação (d.a.i.), de plantas de soja nos estádios fenológicos V₃ e R₁ não se diferenciaram estatisticamente, porém, essas foram superiores à severidade das plantas no estágio R₅ (Figura 15 A). Na avaliação realizada aos 16 d.a.i., a severidade de FA em plantas nos estádios R₁ e R₅ foram estatisticamente iguais (Figura 15 B).

Figura 15 - Influência da fenologia de plantas de soja sobre a severidade da ferrugem da soja aos 8 (A) e 16 (B) dias após a inoculação. Os tratamentos com letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Barra de erro representa erro padrão da média

De acordo com estes resultados conclui-se que os estádios de desenvolvimento reprodutivo R₅ é menos favorável a ocorrência de FA que os demais estádios testados nesse trabalho.

Nos trabalhos realizados por Melching et al (1988) foi encontrada uma maior eficiência de infecção de *P. pachyrhizi* em plantas de soja mais novas do que em plantas mais velhas. As porcentagens de infecção de plantas com 15 e 42 dias de idade foram 5 e 1, respectivamente.

Em condições de campo as epidemias da FA aumentam a partir do florescimento das plantas. Em contraste, no presente trabalho observou-se já no estágio vegetativo alta suscetibilidade ao patógeno. Isso pode ser explicado ao considerarmos que quando as plantas estão no estágio vegetativo, a população do patógeno ainda se encontra em baixos níveis, nível este que aumenta simultaneamente com o ciclo da cultura. Desta forma, na fase reprodutiva, a maior concentração de esporos propicia maiores taxas de infecção e, conseqüentemente, maior severidade da FA. Esta condição pode ser exemplificada por regiões em que o plantio de soja é feito ao longo do ano, como em certas áreas do Mato Grosso, onde severas epidemias ocorrem já no início do desenvolvimento das plantas. Além disso, na fase reprodutiva o adensamento da lavoura, decorrente do desenvolvimento máximo das plantas, pode contribuir para ocorrência de períodos maiores de molhamento foliar e, conseqüentemente, favorecer o progresso da doença em campo.

Em relação a suscetibilidade dos trifólio de soja à FA, observou-se efeito estatisticamente significativo entre a idade dos mesmos e as variáveis relacionadas à doença, frequência de infecção, severidade e tamanho médio de lesão (Figura 16).

Para todas variáveis avaliadas, o trifólio mais velho, trifólio 1, apresentou maiores valores de doença. A amplitude dos valores obtido na folha 1 e 4 para frequência de infecção, severidade e tamanho de lesão foram 5,4-0,96, 1,97-0,22 e 0,34-0,21, respectivamente. Resultados diferentes foram, no entanto, obtidos por Melching et al (1988) que observou, para a variável frequência de infecção, valores maiores para os trifólios mais novos independente do estágio de desenvolvimento das plantas de soja.

Figura 16 - Influência da idade da folha de soja, cultivar BRS 154, na frequência de infecção (n° de lesões/ cm²) (A), na severidade (B) e no tamanho de lesão (C) de *P. pachyrhizi*. Os tratamentos com as mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Barra de erro representa erro padrão da média

Esses resultados apresentados por Melching, bem como aqueles referentes ao PLM, são diferentes dos resultados obtidos no presente trabalho e uma possível explicação são os diferentes cultivares de soja e isolados do fungo utilizados em cada um dos trabalhos. Desta forma a

interação patógeno-planta parece apresentar características específicas, em relação ao PLM, fenologia e idade da folha em função do isolado do patógeno e do cultivar utilizado. Outros patossistemas também apresentam resultados variáveis. As folhas de morango tornaram-se progressivamente menos suscetíveis à infecção de *Phomopsis obscurans* durante suas primeiras duas semanas de idade (NITA; ELLIS; MADDEN, 2003). Em contraste, as folhas da espécie de grama, *Coix lacryna-jobi*, foram mais suscetível à infecção por *Bipolaris coicis* com o aumento da idade (CHANG; HWANG, 2003). Para o patossistema girassol – *Alternaria helianthi* foi observado que as folhas mais velhas são mais suscetíveis que as mais novas (ALLEN; BROWN; KOCHMAN, 1983).

A maior suscetibilidade das folhas mais velhas juntamente com maiores períodos de molhamento, favorecidos pelo micro-clima, podem ser responsáveis pelo desenvolvimento da doença no sentido base-ápice das plantas de soja, em condições de campo.

4 CONCLUSÕES

Urediniósporos de *P. pachyrhizi* foram satisfatoriamente preservados a -80°C , mantendo a capacidade de germinar e infectar após cerca de 8 meses de armazenamento. A desidratação prévia dos urediniósporos melhorou a eficiência da preservação;

A dormência dos urediniósporos armazenados foi eficientemente revertida submetendo-os à hidratação, seguida ou não de choque térmico;

A interrupção do molhamento foliar após a germinação dos urediniósporos, mesmo que por período de 1 hora, impediu que o fungo completasse a infecção;

A FA ocorreu independente da superfície foliar inoculada e da condição de luminosidade aplicada na câmara úmida. Porém, a infecção foi favorecida quando se inoculou a superfície adaxial, com manutenção das plantas no escuro durante a câmara úmida;

Os urediniósporos de *P. pachyrhizi* germinaram mais e formaram apressórios maiores e mais numerosos quando incubados no escuro;

A diferença na quantidade de infecção em relação às superfícies foliares não foi relacionada à quantidade ou disposição da cera epicuticular;

O estágio fenológico reprodutivo R_5 foi menos suscetível à ocorrência de FA que os estádios V_3 e R_1 ;

A FA foi mais severa nos trifólios mais velhos de plantas de soja.

REFERÊNCIAS

ALLEN, S.J.; BROWN, J.F.; KOCHMAN, J.K. The effects of leaf age, host growth stage, leaf injury, and pollen on infection of sunflower by *Alternaria helianthi*. **Phytopathology**, St Paul, v.73, p.896-898, 1983.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE SOJA – 2006, Santa Cruz do Sul, p.136, 2006.

AGRIOS, G.N. Parasitism and disease development. In: AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. cap. 2, p. 77-104.

ALDERMAN, S.C.; LACY, M.L.; EVERTS, K.L. Influence of interruptions of dew period on numbers of lesion produced on onion by *Botrytis squamosa*. **Phytopathology**, St Paul, v.75, n.7, p.808-810, 1985.

ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F.V.; HENNING, A.A.; GODOY, C.V.; COSTAMILAN, L.M.; MEYER, M.C. Doenças da soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. cap. 64, p.569-588.

ALVES, S.A.M.; FURTADO, G.Q.; BERGAMIM FILHO, A. Influência das condições climáticas sobre a ferrugem da soja. In: ZAMBOLIM, L. **Ferrugem asiática da soja**. Viçosa: UFV, 2006. cap. 3, p. 15-32.

ALVES, S.A.M.; CARNEIRO, L.C.; FURTADO, G.Q.; BERGAMIM FILHO, A. Método preciso para quantificação de ferrugem asiática da soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 38.,2005, Brasília. **Resumos....**Brasília: SBF, 2005. 461.

AMORIM, L. Infecção. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. cap. 15, p.295-307.

ANDRADE, P.J.M.; ANDRADE, D.F.A. Ferrugem asiática: uma ameaça a sojicultura brasileira. **Circular Técnica**, Dourados, n.11, p.5-11, 2002.

ARAUZ, L.F.; SUTTON, T.B. Effect of interrupted wetness periods on spore germination on apple infection by *Botryosphaeria obtusa*. **Phytopathology**, St Paul, v.80, n.11, p.1218-1220, 1990.

ARAUZ, L.F.; SUTTON, T.B. Influence of temperature and moisture on germination of ascospores and conidia of *Botryosphaeria obtusa*. **Phytopathology**, St Paul, v.79, n.4, p.449-444, 1989.

ARIAS, C.A.A., RIBEIRO, A.S., YORINORI, J.T., BROGIN, R.L., OLIVEIRA, M.F.; TOLEDO, J.F.F. Inheritance of resistance of soybean to rust (*Phakospora pachyrhizi* Sidow). In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 2004. 7., Foz do Iguaçu. **Anais...**Foz do Iguaçu: 2004. p.100.

BALARDIN, R.S.; NAVARINI, L.; DALLAGNOL, L.J. Epidemiologia da ferrugem da soja. In: JULIATTI, F.C.; POLIZEL, A.C.; HAMAWAKI, O.T. WORKSHOP BRASILEIRO SOBRE A FERRUGEM ASIÁTICA, 1., 2005. Uberlândia Anais....Uberlândia: EDUFV, 2005. chap. 3, p. 39-50.

BASHI, E.; ROTEM, J. Adaptation of four pathogens to semi-arid habitats as conditioned by penetration rate and germinating spore survival. **Phytopathology**, St Paul, v.64, p.1035-1039, 1974.

BECKER, C.M.; BURR, T.J. Discontinuous wetting and survival of conidia of *Venturia inaequalis* on apple leaves. **Phytopathology**, St Paul, v.84, n.4, p.372-378, 1994.

BERGAMIM FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Ceres, 1996. 299p.

BERGAMIM FILHO, A. Epidemiologia comparativa: ferrugem da soja e outras doenças. In: ZAMBOLIM, L. **Ferrugem asiática da soja**. Viçosa: UFV, 2006. chap. 2, p. 15-32.

BONDE, M.R.; BROWN, M.F. Morphological comparison of isolates of *Phakopsora pachyrhizi* from different areas of the world. **Canadian Journal of Microbiology**, Ontario, v.26, p.1443-1449, 1980.

BONDE, M.R.; MELCHING, J.S.; BROMFIELD, K.R. Histology of the susceptible-pathogen relationship between *Glycine max* and *Phakopsora pachyrhizi*. **Phytopathology**, St. Paul, v.66, p.1290-1294, 1976.

BONDE, M.R.; PETERSON, G.L.; DOWLER, W.M. A comparison of isozymes of *Phakopsora pachyrhizi* from the Eastern Hemisphere and the New World. **Phytopathology**, St. Paul, v.78, p.1491-1494, 1988.

BONDE, M.R.; NESTER, S.E.; AUSTIN, C.N.; STONE, C.L.; FREDERICK, R.D. Evaluation of virulence of *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia* isolates. **Plant Disease**, St. Paul, v.90, n.6, p.706-716, 2006.

BROMFIELD, K.R. Cold-induced dormancy and its reversal in uredospores of *Puccinia graminis* var. *tritici*. **Phytopathology**, St. Paul, v.54, p.68-74, 1964.

BROMFIELD, K.R.; HARTWIG, E.E. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. **Crop Science**, Madinson, v.20, p.254-255, 1980.

BROMFIELD, K.R.; MELCHING, J.S.; KINGSOLVER, C.H. Virulence and agressiveness of *Phakopsora pachyrhizi* isolates causing soybean rust. **Phytopathology**, St Paul, v.70, p.17-21, 1980.

CARISSE, O.; KUSHALAPPA, A.C. Influence of interrupted wet periods, relative humidity, and temperature on infection of carrots by *Cercospora carotae*. **Phytopathology**, St Paul, v.82, n.5, p.602-606, 1992.

CARVALHO JR, A.A.; FIGUEIREDO, M.B. A verdadeira identidade da ferrugem da soja no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.26, n.2, p.197-200, 2000.

CARVER, T.L.; THOMAS, B.J.; INGERSON-MORRIS, S.M.; RODERICK, H.W. The role of the abaxial leaf surface waxes of *Lolium* spp. In resistance to *Erysiphe graminis*. **Plant Pathology**, Oxford, v.39, n.5, p.573-583, 1990.

CHANG, S.W.; HWANG, B.K. Effects of plant age, leaf position, inoculum density, and wetness perod on *Bipolaris coicis* infection in adlays of differing resistance. **Plant Disease**, St Paul, v.87, p.821-826, 2003.

DAVIES, R.R. Wetability and the capture, carriage, and deposition of particles by raindrops. **Nature**, London, v.191, p.616-617, 1961.

DE VALLAVIEILLE-POPE, C.; HUBER, L.; LECONTE, M.; GOYEAU, H. Comparative effects of temperature and interrupted wet periods on germination, penetration, and infection of *Puccinia recondita* f sp. *tritici* and *P. Striformis* on wheat seedlings. **Phytopathology**, St Paul, v.85, n.4, p.409-415, 1995.

DEL PONTE, E.M.; GODOY, C.V.; LI, X; YANG, X.B. Predicting severity of asian soybean rust epidemics with empirical rainfall models. **Phytopathology**, St Paul, v.96, n.7, p.797-803, 2006.

DESLANDES, J.A. Ferrugem da soja e de outras leguminosas causada por *Phakopsora pachyrhizi* no Est. Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.4, n.2, p.337-339, 1979.

DICKINSON, C.H.; CRUTE, J.R. The influence of seedling age and development on the infection of lettuce by *Bremia lactucae*. **Annual Applied of Biology**, Washington, v.76, p.49-61, 1974.

EISENSMITH, S.P.; JONES, A.L.; CRESS, C.E. Effects of interrupted wet periods on infection of sour cherry by *Coccomyces hiemalis*. **Phytopathology**, St Paul, v.72, n.6, p.680-682, 1982.

EMBRAPA. Disponível em: <http://www.CPNSo.embrapa.br/alerta>. Acesso em: 29 nov. 2006.

EMBRAPA – Embrapa sistemas de produção 4, tecnologia de produção de soja – Região Central do Brasil. Londrina, 2003. 237p.

EMBRAPA. Tecnologia de produção de soja região central do Brasil 2004. Disponível em: <http://garoupa.cnpso.embrapa.br/producaosoj/SojanoBrasil.htm/> Acesso em 24 jan. 2007.

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Centro de estudos avançados em economia. **Análise de custos e de tributos nas cinco regiões do Brasil suporte à tomada de decisão e à formulação política**. Parte 1 – Cálculos e análises dos custos de produção do biodiesel até a usina (PVU). Disponível em <http://cepea.esalq.usp.br/biodiesel>. Acesso em 12 nov. 2007.

FALEIRO, F.G.; RAGAGNIN, V.A.; VINHADELLI, W.S.; MESQUITA, A.G.G.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Redução da capacidade de infecção de urediniósporos de *Uromyces appendiculatus* após o armazenamento em diferentes condições. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, n.1, p.98-100, 2000.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Soja. In_____. **Agrianual 2006**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2006. p.460-468.

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**, St. Paul, v. 92, n.2, p. 217-227, 2002.

GARCIA, E. O., M. V. CASAGRANDE, N. S. MASSOLA JR. Viabilidade e infectividade de urediniósporos de *Puccinia melanocephala* preservados por um ano. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 2006, Botucatu. **Resumos....** Botucatu: GFP, 2006. Resumo 71. 1 CD - Rom

GODOY, C.V.; CANTERI, M.G. Efeitos protetor, curativo e erradicante de fungicidas no controle da ferrugem asiática da soja por *Phakopsora pachyrhizi*, em casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.1, p.97-101, 2004.

GODOY, C.V.; KOGA, L.J.; CANTERI, M.G. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, n.1, p.63-68, 2006.

GRIESHOP, C.M.; FAHEY JR., G.C. Comparison of quality characteristics of soybeans from Brazil, China, and the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.49, n.5, p.2669-2673, 2001.

HARAKAVA, R. Distinção molecular das ferrugem asiática e americana da soja. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.31, n.1, p.119, 2005. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 28., 2005, São Paulo.

HARTMAN, G.L.; MILES, M.R.; FEDERICK, R.D. Breeding for resistance to soybean rust. **Plant Disease**, St. Paul, v.89, n.6, p.664-666, 2005. Suplemento. Apresentado no Soybean rust: too close for comfort, 2005, Charlotte.

HARTMAN, G.L.; WANG, T.C. Soybean rust research: progress and future. In: WORLD SOYBEAN CONFERENCE, 1994, Thailand. **Proceedings...**Thailand: Chang Mai, 1994. p.180-186.

HERMAN, J.C. (Ed.) **Como a planta de soja se desenvolve**. (Special Report, 53.) Tradução de G.M. de Souza Câmara. Piracicaba: Potafós, 1997.22p. (Arquivo do agrônomo, 11).

ISAKEIT, T.; MILLER, M.E.; SALDANÃ, R.; BARNES, L.W.; McKEMY, J.M.; PALM, M.E. First report of rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* on soybean and kudzu in Texas. **Plant Disease**, St. Paul, v.90, n.7, p.970, 2006. Abstract.

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

ISARD, S.A.; DUFAULT, N.S.; MILES, M.R.; HARTMAN, G.L.; RUSSO, J.M. DE WOLF, E.D.; MOREL, W. The effect of solar irradiance on the mortality of *Phakopsora pachyrhizi* urediniospores. **Plant Disease**, St. Paul, v.90, n.7, p.941-945, 2006.

JACOME, L.H.; SCHUH, W. Effects of leaves wetness duration and temperature on development of black sigatoka disease on banana infected by *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. **Phytopathology**, St Paul, v.82, n.5, p.515-520, 1992.

KITAJIMA, E.W.; LEITE, B. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura**. 2.ed. Piracicaba: NAP/MEPA; ESALQ/USP, 1999. 47p.

KOCH, E.; HOPPE, H.H. Effect of light on uredospore germination and germ tube growth of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.). **Journal of Phytopathology**, Hamburg, v.119, p.64-74, 1987.

KOCH, E.; HOPPE, H.H. Development of infection structures by the direct-penetrating soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) on artificial membranes. **Journal of Phytopathology**, Hamburg, v.22, p.232-244, 1988.

KOCH, E.; EBRAHIM-NESBAT, F.; HOPPE, H.H. Light and electron microscopical studies on the development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in susceptible soybean leaves. **Phytopathologische Zeitschrift**, Hamburg, v.106, p.302-320, 1983.

KOENING, S.R.; MOORE, A.D. CRESWELL, T.C.; ABAD, G.Z. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in North Carolina. **Plant Disease**, St. Paul, v.90, n.7, p.973, 2006. Abstract.

LAMOUR, K.H.; FINLEY, L.; SOVER-CLIFT, K.L.; STACK, J.P.; PERZYNSKI, J.; HAMMERSCHMIDT, R.; JACOBS, J.L.; BYRNE, J.M.; HARMON, P.F.; VITORELI, A.M.; WISLER, G.C.; HARMON, C.L.; LEVY, L.; ZELLER, K.A.; STONE, C.L.; LUSTER, D.G.; FREDERICK, R.D. Early detection of asian soybean rust using PCR. **Plant Health Progress**, St Paul, p.1-9, mai, 2006.

LIN, S.Y. Studies on the physiologic races of soybean rust fungus, *Phakopsora pachyrhizi* Syd. **Journal of Taiwan Agricultural Research**, Taipei, v.15, p.24-28, 1966.

LLORENTE, I.; MONTESINOS, E. Effect of relative humidity and interrupted wetness periods on brown spot severity of pear caused by *Stemphylium vesicarium*. **Phytopathology**, St Paul, v.92, n.1, p.99-104, 2002.

LOEGERING, W. Q.; MCKINNEY, H. H.; HARMON, D. L.; CLARK, W. A. A long term experiment for preservation of uredospores of *Puccinia graminis tritici* in liquid nitrogen. **Plant Disease Reporter**, Washington v.45, p.384-385, 1961.

MARCHETTI, M.A.; UECKER, F.A; BROMFIELD, K.R. Uredial development of *Phakopsora pachyrhizi* in soybean. **Phytopathology**, St. Paul, v.65, p.822-823, 1975.

MARCHETTI, M.A.; MELCHING, J.S.; BROMFIELD, K.R. The effects of temperature and dew period on germination and infection by uredospores of *Phakopsora pachyrhizi*. **Phytopathology**, St. Paul, v.66, p.464-463, 1976.

MAROIS, J.J.; NELSON, J.K.; MORRISON, J.C.; LILE, L.S.; BLEDSOE, A.M. The influence of berry contact within grape clusters on the development of *Botrytis cinerea* and epicuticular wax. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, n.37, n.4, p.293-296, 1986.

MARTIN, J.T.; BATT, R.F.; BURCHILL, R.T. Defense mechanism of plants against fungi, fungistatic properties of apple leaf wax. **Nature**, London, v.180, p.796-799, 1957.

McLEAN, R.J.; BYTH, D.E. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybeans. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v.32, p. 951-956, 1980.

McLEAN, R.J.; BYTH, D.E. Histological studies of the pre-penetration development and penetration of soybeans by rust, *Phakopsora pachyrhizi* Syd. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v.32, p.435-443, 1981.

McLEAN, R.J.; BYTH, D.E. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybeans. **Australian Journal Agriculture Research**, Melbourne, v.31, p.951-956, 1980.

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

McNAIR, J.B. Some properties of plant waxes in relation to climate of habitat. **American Journal of Botany**, New York, v.18, p.518-525, 1931.

MELCHING, J.S.; BROMFIELD, K.R.; KINGSOLVER, C.H. Infection, colonization, and uredospore production on Wayne soybean by four culture of *Phakopsora pachyrhizi*, the cause of soybean rust. **Phytopathology**, St. Paul, v.69, n.12, p.1262-1265, 1979.

MELCHING, J.S.; DOWLER, W.M.; KOOGLE, D.L.; ROYER, M.H. Effect of plant age on suscetibility of soybean to soybean rust. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v.10, n. 10, p.30-35, 1988.

MELCHING, J.S.; DOWLER, W.M.; KOOGLE, D.L.; ROYER, M.H. Effect of duration, frequency, and temperature of leaf wetness periods on soybean rust. **Plant disease**, St. Paul, v.73, n.2, p.117-122, 1989.

MENDGEN, K.; WIRSEL, S.G.R.; JUX, A.; HOFFMANN, J.; BOLAND, W. Volatiles modulate the development of plant pathogenic rust fungi. **Planta**, Berlim, v.224, p.1353-1361, 2006.

NITA, M.; ELLIS, M.A.; MADDEN, L.V. Effects of temperature, wetness duration, and leaflet age on infection of strwberry foliage by *Phomopsis obscurans*. **Plant Disease**, St Paul, v.87, p.579-590, 2003.

OLIVEIRA, A.C.B.; GODOY, C.V.; MARTINS, M.C. Avaliação de cultivares de soja à ferrugem asiática no oeste da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, p.658-662, 2005.

ONO, Y.; BUTIRICA, P.; HENNEN, J.F. Delimitation of *Phakopsora*, *Physopella* and *Cerotelium* and their species on leguminosae. **Mycological Research**, Cambridge, v.96, n. 10, p.825-850, 1992.

PACHOLATI, S.F. Fitopatógenos: arsenal enzimático. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. cap. 19, p.343-364.

PAN, Z.; YANG, X.B.; PIVONIA, S.; XUE, L.; PASKEN, R.; ROADS, J. Long-term prediction of soybean rust entry into the continental United States. **Plant Disease**, St. Paul, v.90, n.7, p.840-846, 2006.

POSSINGHAM, J.V.; CHAMBERS, T.C.; RADLER, F.; GRNCAREVIC. Cuticular transpiration and wax structure and composition of leaves and fruit of *Vitis vinifera*. **Australian Journal of Biology Science**, Melbourne, v.20, p.1149-1153, 1967.

POSADA-BUITRAGO, M.L.; FREDERICK, R.D. Expressed sequence tag analysis of the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v.42, p.949-962, 2005.

REUVENI, M.; TUZUN, S.; COLE, J.S.; SIEGEL, M.R.; KUÉ, J. The effects of plant age position on the susceptibility of tobacco to blue mold caused by *Peronospora tabacina*. **Phytopathology**, St Paul, v.76, n.4, p.455-458, 1986.

RODERICK, H.W.; THOMAS, B.J. Infection of ryegrass by three rust fungi (*Puccinia coronata*, *P. graminis* and *P. Loliina*) and some effects of temperature on the establishment of the disease and sporulation. **Plant Pathology**, Oxford, v.46, n.4, p.751-761, 1997.

SCHEIN, R. D. Storage viability of bean rust uredospores. **Phytopathology**, St Paul, v52, p.653-657, 1962.

SCHEIN, R.D. Age-correlated in susceptibility of bean leaves to *Uromyces phaseoli* and Tobacco Mosaic Virus. **Phytopathology**, St Paul, v.55, p.455-457, 1965.

SCHNEIDER, R.W.; HOLLIER, C.A.; WHITAM, H.K. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the continental United States. **Plant Disease**, St. Paul, v.89, n.7, p.774., 2005. Abstract.

SCHUH, W. Influence of interrupted dew periods, relative humidity, and light on disease severity and infections caused by *Cercospora kikuchii* on soybean. **Phytopathology**, St Paul, v.83, n.1, p.109-113, 1993.

SCONYERS, L.E.; KEMERAIT, R.C.; BROCK, J.H.; GITAITIS, R.D.; SANDERS, F.H. First report of *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of asian soybean rust, on Florida Beggarweed in the United States. **Plant Disease**, St. Paul, v.90, n.7, p.972, 2006. Abstract.

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

SISTEMAS DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS – AGROFIT. Pragas. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 29 nov. 2006.

SKOROPAD, W.P.; TEWARI, J.P. Field evaluation of the role of epicuticular wax in rapeseed and mustard in resistance to *Alternaria* blackspot. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.57, p.1001-1003, 1977.

STOCKELL, V.; HANCHEY, P. The role of the cuticle in resistance of beans to *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, St Paul, v.73, n.12, p.1640-1642, 1983.

STUCKEY, R.E.; ZADOKS, J.C. Effect of interrupted leaf wetness periods on pustule development of *Puccinia recondita* f sp. *tritici* on wheat. **Netherland Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v.95, supplement 1, p.175-185, 1989.

SWIECKI, T.J.; ENDRESS, A.G.; TAYLOR, O.C. The role of surface wax in suscetibility of plants to air pollution injury. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.60, p.316-319, 1982.

TAN-YUJUN; FEI-FUHUA; SHAN-ZHIHUI; ZHOU-LECONG; SHEN-MIGZHEN; LI-SONG; TAN-YJ; FEI-FH; SHAN-ZH; ZHOU-LC; SHEN-MZ; LI-S. The role of teliospore of soybean rust pathogen (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) in the infection cycle. **Chinese Journal of Oil Crop Sciences**, Wuhan, v.23, n.1, p.49-51, 2001a.

TAN-YUJUN; FEI-FUHUA; SHAN-ZHIHUI; ZHOU-LECONG; SHEN-MIGZHEN; LI-SONG; TAN-YJ; FEI-FH; SHAN-ZH; ZHOU-LC; SHEN-MZ; LI-S. Study on teliospore formation of *Phakopsora pachyrhizi* Sydow. **Chinese Journal of Oil Crop Sciences**, Wuhan, v.23, n.1, p.57-59, 2001b.

WELTY, R.E.; BARKER, R.E. Evaluation of resistance to stem rust in perennial ryegrass grown in controlled and field conditions. **Plant disease**, St Paul, v.76, p.637-641, 1992.

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. **Journal of General Plant Pathology**, Tóquio, v.68, n.1, p.52-56, 2002.

YANG, X.B.; TSCHANZ, A.T.; DOWLER, W. M.; WANG, T.C. Development of yield loss models in relation to reductions of components of soybean infected with *Phakopsora pachyrhizi*. **Journal of Phytopathology**, Hamburg, v.81, n.11, p.420-426, 1991.

YANG, X.B.; ROYER, M.H.; TSCHANZ, A.T.; TSAI, B.Y. Analysis and quantification of soybean rust epidemics from seventy-three sequential experiments. **Phytopathology**, St Paul, v.80, n.12, p.1421-1427, 1990.

YORINORI, J.T. A ferrugem “asiática” da soja no continente americano: evolução, importância econômica e estratégias de controle. In: JULIATTI, F.C.; POLIZEL, A.C.; HAMAWAKI, O.T. I **Workshop brasileiro sobre a ferrugem asiática**. Uberlândia: EDUFU, 2005. chap. 2, p. 21-37.

YORINORI, J.T.; PAIVA, W.M. Ferrugem da soja: *Phakopsora pachyrhizi* Sydow. Londrina: EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa da Soja, 2002. 1 folder.

YORINORI, J.T.; LAZZAROTTO, J.J. **Current situation of soybean rust in Brazil and in South America**. Londrina: EMBRAPA, 2004. 27p. (Documentos Embrapa Soja).

YORINORI, J.T.; MOREL PAIVA, W. Ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*): Alerta: Londrina: EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Soja, 2002. 4 p.

YORINORI, J.T.KIHL, R.A.S.; ARIAS, C.A.A.; ALMEIDA, L.A.; YORINORI, M.A.; GODOY, C.V. Reações de cultivares de soja a ferrugem “asiática” (*Phakopsora pachyrhizi*) In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL. São Pedro, 2002.p. **Resumos...**São Paulo, 2002. p.149.

YORINORI, J.T.; PAIVA, W.M.; FREDERICK, R.D.; COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLLI, P.F.; HARTMAN, G.E.; GODOY, C.V.; NUNES, J.,JR. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, St. Paul, v.89, n.6, p.675-677, 2005. Suplemento. Apresentado no SOYBEAN RUST: TOO CLOSE FOR COMFORT, 2005, Charlotte.

YOUNG, V.R. Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition. **Journal of the American Dietetic Association**, New York, v.91, n.7, p.828-835, 1991.

ZAMBENEDETTI, E.B. **Preservação de *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sidow e aspectos epidemiológicos e ultra-estruturais da sua interação com a soja (*Glycyne max* (L.) Merrill).** 2005. 92p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

ZAMBOLIM, L. Manejo integrado da ferrugem asiática da soja. In: ZAMBOLIM, L. **Ferrugem asiática da soja.** Viçosa: UFV, 2006. cap. 5, p. 73-98.