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

**Quantificação de parâmetros da pré-penetração e monocíclicos
relacionados ao patossistema *Phakopsora pachyrhizi* - soja**

Silvio André Meirelles Alves

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

**Piracicaba
2007**

Silvio André Meirelles Alves

Engenheiro Agrônomo

**Quantificação de parâmetros da pré-penetração e monocíclicos relacionados ao
patossistema *Phakopsora pachyrhizi* - soja**

Orientador:

Prof. Dr. ARMANDO BERGAMIN FILHO

**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

Alves, Silvio André Meirelles

Quantificação de parâmetros da pré-penetração e monocíclicos
relacionados ao patossistema *Phakopsora pachyrhizi* – soja / Silvio André
Meirelles Alves. - - Piracicaba, 2007.

64 p. : il.

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

1. Doenças de plantas 2. Epidemiologia 3. Resistência genética vegetal
4. Soja 5. Temperatura I. Título

CDD 633.34

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Aos meus pais e irmãos que sempre me apoiaram e incentivaram

OFEREÇO

À minha esposa Joana Paula da Silva Alves com muito amor

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que tem me proporcionado, pois todas as coisas foram feitas por ele, e sem ele nada do que foi feito se fez;

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) da Universidade de São Paulo, pelas condições oferecidas;

Ao prof. Dr. Armando Bergamin Filho pela orientação, amizade e confiança;

Ao grande amigo Gleiber Quintão Furtado, por ter compartilhado desde o começo os questionamentos, problemas e execução dos experimentos;

À Dra. Cláudia Vieira Godoy, pela idealização e apoio para realização dos experimentos, pelas muitas conversas, sugestões, incentivo e amizade;

À profa. Dra. Lilian Amorim pelas sugestões e indicação do caminho a seguir para soluções de dúvidas na análise dos dados deste trabalho;

Ao prof. Dr. José Baldin Pinheiro pela ajuda indispensável no fornecimento de sementes, mesmo que escassa para todos, e nas discussões sobre as lacunas do conhecimento sobre a doença;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos durante o curso;

Aos amigos Marconi e Daniel que compartilharam a mesma casa comigo, assim formamos uma breve república;

Ao prof. Marcelo Schneider pela ajuda na revisão do abstract;

Aos professores e funcionários do Setor de Fitopatologia pela convivência, amizade e pelos ensinamentos aqui recebidos;

Aos colegas do curso de Pós-Graduação, em especial a Ana Paula, José Segundo, Luiz Fernando, Paulo, Ricardo, Sheila, Kércia, Janaína, Alexandre, Rock, Ivan, Luciana, Davi, Júlio, Leonardo, Maurício, Nívea, Odair, Eliane, Fabrício, Juliane e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	9
2 Desenvolvimento.....	11
2.1 Revisão Bibliográfica.....	11
2.1.1 Etiologia.....	11
2.1.2 Efeito das condições ambientais no processo de pré-penetração da ferrugem da soja.....	12
2.1.3 Efeito das condições ambientais nos parâmetros monocíclicos da ferrugem da soja.....	13
2.1.4 Efeito de temperatura elevada no desenvolvimento da ferrugem da soja.....	15
2.1.5 Controle genético da ferrugem da soja.....	17
2.2 Material e Métodos.....	21
2.2.1 Germinação.....	21
2.2.2 Efeito das condições ambientais nos parâmetros monocíclicos da ferrugem da soja.....	22
2.2.3 Efeito de temperatura elevada no desenvolvimento da ferrugem da soja.....	25
2.2.4 Quantificação da resistência parcial de genótipos à ferrugem da soja.....	26
2.3 Resultados e Discussão	27
2.3.1 Efeito das condições ambientais no processo de pré-penetração da ferrugem da soja.....	27
2.3.1.1 Efeito da temperatura e da duração do molhamento na germinação de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> in vitro.....	27
2.3.1.2 Efeito da temperatura e da duração do molhamento na formação de apressórios de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> in vitro	29
2.3.2 Efeito das condições ambientais nos parâmetros monocíclicos da ferrugem da soja.....	34
2.3.2.1 Efeito da temperatura no desenvolvimento da ferrugem da soja	34
2.3.2.2 Efeito da duração do período de molhamento foliar no desenvolvimento da ferrugem da soja	38

2.3.2.3 Efeito combinado da temperatura e da duração do período de molhamento foliar no desenvolvimento da ferrugem da soja	41
2.3.3 Efeito de temperatura elevada no desenvolvimento da ferrugem da soja	48
2.3.4 Quantificação da resistência parcial de genótipos à ferrugem da soja.....	49
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
REFERÊNCIAS.....	59

RESUMO

Quantificação de parâmetros da pré-penetração e monocíclicos relacionados ao patossistema *Phakopsora pachyrhizi* – soja

O conhecimento de aspectos epidemiológicos do patossistema *Phakopsora pachyrhizi* - soja pode auxiliar no controle da doença. Para isso, foram realizados quatro experimentos. (1) Urediniósporos foram avaliados quanto à germinação e formação de apressórios em placas de poliestireno, nas temperaturas de 8, 12, 15, 20, 25 e 30°C e períodos de molhamento de 1, 2, 4, 8 e 12h de incubação. As avaliações foram realizadas contando-se os urediniósporos não germinados, germinados e os que formaram apressório. (2) Plantas de soja da variedade BRS 154, no estágio V2, foram inoculadas e mantidas nas temperaturas de 10, 15, 20, 22,5, 25, 27,5 e 30°C e nos períodos de molhamento foliar de 0, 4, 6, 8, 12, 16 e 24h. Em cada tratamento foi determinado o período latente e após 14 dias da inoculação, por meio de fotografia das folhas, foram quantificadas a frequência de infecção, tamanho médio de lesão e severidade. (3) Plantas da mesma variedade e estágio, foram inoculadas e mantidas na temperatura de 23°C por período de 24h de molhamento foliar. Após esse período, elas foram transferidas para temperaturas de 23, 30, 35 e 40°C. Foram determinados o período de incubação e latente. Após 14 dias da inoculação foram quantificadas a frequência de infecção, tamanho médio de lesão e severidade. (4) Plantas de soja dos genótipos BRS 154, BRS 258, PI 459025 (Bing Nan), PI 200487 (Kinoshita), PI 471096 (Orba) e PI 274453 (Shiranui) no estágio V2, foram inoculadas e mantidas em câmaras de crescimento nas temperaturas de 15 e 25°C e duração do período de molhamento foliar inicial de 24h. Foram determinados o período de incubação e latente. As avaliações da intensidade da doença foram realizadas aos 13 e 20 dias após a inoculação para as plantas mantidas a 25 e 15°C, respectivamente. Os dados de germinação e formação de apressórios apresentaram bom ajuste ao modelo Beta generalizado em relação à temperatura e o modelo Monomolecular em relação ao período de molhamento. Houve infecção nos períodos de molhamento a partir de 6 horas e em todas as temperaturas testadas, exceto na de 30 °C. O período latente foi influenciado pela temperatura e os dados foram ajustados a equação do segundo grau. O menor período latente foi de nove dias na temperatura de 22,5 °C. A função Beta generalizada ajustou-se ao comportamento da severidade e da frequência de infecção em relação à temperatura e o modelo Monomolecular ajustou-se em relação ao período de molhamento. O tamanho médio de lesão não foi influenciado pelos tratamentos testados. A temperatura interferiu no processo de colonização e o patógeno conseguiu se desenvolver apenas nas temperaturas de 23 e 30 °C. A temperatura de 30°C não influenciou nas variáveis: frequência de infecção, tamanho médio de lesão e severidade, mas aumentou o período de incubação e o período latente. Os genótipos que desenvolveram sintomas RB apresentaram maior período latente e menor número de urédias por lesão quando comparadas com BRS 154.

Palavras-chave: Epidemiologia; Temperatura; Molhamento foliar; Resistência vegetal

ABSTRACT

Quantification of prepenetration and monocyclic parameters related to *Phakopsora pachyrhizi* – soybean pathosystem

The knowledge of epidemiological aspects of *Phakopsora pachyrhizi* - soybean pathosystem can help in controlling this disease. For this four experiments were performed. (1) Urediniospores were evaluated regarding germination and appressorium formation in polystyrene plates, in the temperatures of 8, 12, 15, 20, 25 and 30°C and wetness duration of 1, 2, 4, 8 and 12h of incubation. The evaluations were carried out by counting ungerminated, germinated without appressorium and germinated with appressorium urediniospores. (2) Plants of BRS 154 soybean cultivar, in the V2 stage, were inoculated and kept in temperatures of 10, 15, 20, 22.5, 25, 27.5 and 30°C and in leaf wetness duration of 0, 4, 6, 8, 12, 16 and 24h. In each treatment the latent period was determined. 14 days after inoculation, the frequency of infection, lesion size and severity were evaluated by digital images of the leaves. (3) Plants of the same cultivar and stage were inoculated and kept in the temperature of 23°C for a period of 24h of leaf wetness. After this period, the plants were transferred to temperatures of 23, 30, 35 and 40°C. The incubation and latent period were determined. After 14 days of inoculation the frequency of infection, lesion size and severity were quantified. (4) Plants of soybean genotypes BRS 154, BRS 258, PI 459025 (Bing Nan), PI 200487 (Kinoshita), PI 471096 (Orba) and PI 274453 (Shiranui) in the V2 stage, were inoculated and kept in growth chambers in temperatures of 15 and 25°C and 24h of initial leaf wetness duration. The incubation and latent period were determined. The evaluations of disease intensity were carried out at 13 and 20 days after inoculation for the plants kept at 25 and 15°C respectively. The data of germination and appressorium formation had a good fit to the Beta generalized model in relation to the temperature and the Monomolecular model in relation to the wetness duration. Infection occurred in wetness duration of 6 hours or more and in all of temperatures, except 30°C. The latent period was influenced by the temperature and the data were fitted to a second degree equation. The shortest latent period was nine days in the temperature of 22.5°C. The Beta generalized model fitted the behavior of severity and frequency of infection in relation to the temperature, and the wetness duration fitted the Monomolecular model. The lesion size was not influenced by the treatments. The temperature interfered the pathogen colonization and it developed only in the temperatures of 23 and 30°C. The temperature of 30°C did not influence frequency of infection, lesion size and severity, but it increased the incubation and latent periods. The genotypes with RB symptoms showed greater latent period and smaller number of uredia per lesion when compared with BRS 154.

Keywords: Epidemiology; Temperature; Leaf wetness; Plant resistance.

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma espécie que possui grande adaptabilidade a diferentes latitudes, solos e condições climáticas, sendo cultivada em várias partes do mundo. A soja possui grande importância na dieta alimentar humana e animal, e é considerada a mais importante fonte de proteína e óleo vegetal, em função de sua qualidade e baixo custo de produção.

A produção mundial no ano de 2005 foi estimada em aproximadamente 214,3 milhões de toneladas, sendo que os Estados Unidos foram os maiores produtores, com uma produção de 83,9 milhões de toneladas, seguido pelo Brasil que produziu 52,7 milhões de toneladas (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO, 2006).

Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a produtividade brasileira de soja foi de 1.580 kg/ha na safra 1990/91 e subiu para 2.751 kg/ha na safra 2000/01, ou seja, um aumento de 74,1% nesse período. Porém, depois dos valores alcançados em 2000/01, a produtividade oscilou e caiu para aproximadamente 2.208 kg/ha na safra 2004/05.

Embora o Brasil, de maneira geral, tenha aumentado sua produção e produtividade nos últimos anos, a cultura apresenta um potencial ainda maior, e dentre os fatores que impedem que o seu potencial seja atingido estão as doenças. No Brasil, já foram identificadas mais 40 doenças de causa biótica na cultura da soja (YORINORI, 1997). Dentre elas a ferrugem da soja foi a doença que ganhou maior interesse dos sojicultores nos últimos cinco anos.

A ferrugem da soja pode ser causada por duas espécies de fungo do gênero *Phakopsora*, *P. meibomiae*, causadora da ferrugem americana, e *P. pachyrhizi*, causadora da ferrugem asiática. Esta última foi constatada pela primeira vez no Brasil no final da safra de 2000/01 (YORINORI et al., 2002).

A ferrugem asiática é uma doença considerada altamente agressiva, causando danos 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). As perdas causadas pela ferrugem asiática no Brasil, na safra 2002/2003 foram estimadas em

aproximadamente US\$ 1 bilhão. Na safra 2003/2004, o fungo causador da doença já foi identificado em praticamente todas as regiões produtoras de soja (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA, 2004).

O fungo (*Phakopsora pachyrhizi*) só sobrevive de uma safra para outra em hospedeiros vivos, sendo capaz de infectar 60 espécies vegetais em 26 gêneros (ONO; BUTIRICA; HENNEN, 1992). No caso brasileiro, o principal hospedeiro no inverno tem sido a própria soja, através de plantas voluntárias (aquelas que germinam a partir de grãos perdidos na colheita) e da soja irrigada para produção de semente. O surgimento precoce da ferrugem na safra 2003/2004 foi atribuído ao aumento das áreas de produção de semente no inverno na região Central do Brasil (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA, 2004).

Por ser uma doença recente no Brasil, as recomendações de controle ainda estão sendo definidas. Dentre os cultivares atualmente em uso, a resistência genética não é satisfatória. Os fungicidas recomendados são pertencentes aos grupos dos triazóis e estrobilurinas (GODOY; CANTERI, 2004), sendo ainda necessária a determinação do número e épocas de aplicação para evitar os danos dessa doença.

A determinação das condições ambientais para o desenvolvimento da ferrugem da soja, em variedades utilizadas no Brasil, pode fornecer subsídios necessários para a tomada de decisão do momento certo para se fazer uso do controle químico. Ademais, o uso do controle químico poderá ser feito com mais critério, evitando-se assim a utilização excessiva do mesmo, o que trará melhorias econômicas e ambientais para o sistema produtivo.

Diante da necessidade de informações dessa doença, o presente trabalho teve os seguintes objetivos: (i) verificar o efeito da temperatura e do período de molhamento na germinação e formação de apressórios de *P. pachyrhizi* em placas de poliestireno, (ii) verificar o efeito da temperatura e da duração do período de molhamento foliar nos parâmetros monocíclicos da ferrugem da soja, (iii) verificar o efeito de temperaturas elevadas nos parâmetros monocíclicos da ferrugem da soja e (iv) quantificar a resistência parcial de variedades de soja à ferrugem da soja.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Etiologia

O agente causal da ferrugem da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, foi descrito pela primeira vez no Japão em 1903. Por muito tempo, acreditou-se que essa doença era causada apenas por *P. pachyrhizi*, mas alguns registros indicaram que os isolados da Ásia e Austrália diferiam dos oriundos do continente Americano, genética e patologicamente (BONDE; BROWN, 1980; BONDE; PETERSON; DOWLER, 1988; BROMFIELD; MELCHING; KINGSOLVER, 1980). Posteriormente, foi proposta a separação em duas espécies, sendo *Phakopsora pachyrhizi* proveniente da região Austroasiana e *Phakopsora meibomiae* (Arthur) Arthur da região do Novo Mundo (ONO; BUTIRICA; HENNEN, 1992).

No Brasil o primeiro registro da ferrugem da soja foi realizado em 1979, ocasião na qual acreditou-se que se tratava de *P. pachyrhizi* (DESLANDES, 1979). Na época, essa constatação foi de grande preocupação devido ao alto potencial de danos que esse patógeno apresenta nos países asiáticos, porém a não confirmação desse potencial fez com que as pesquisas conduzidas pelo Centro Nacional de Pesquisas da Soja (CNPSo) fossem desativadas em 1989 (YORINORI, 1997).

A constatação esporádica dos danos à cultura da soja devido à ferrugem no Brasil aliada à proposta de Ono; Butirica e Hennen (1992) geraram dúvidas acerca da identidade da ferrugem no Brasil. Carvalho Júnior e Figueiredo (2000) realizaram uma análise dos trabalhos publicados e propuseram que a identificação deveria ser corrigida de *Phakopsora pachyrhizi* para *P. meibomiae*. A distinção das duas espécies foi realizada através da morfologia dos teliósporos. *P. pachyrhizi* possui teliósporos organizados em duas a sete camadas, as paredes dos esporos são marrons amarelo pálidas, com espessura mais ou menos uniforme de 1 mm ou apenas levemente engrossadas acima e com até 3 mm de espessura nas células das camadas apicais. *P. meibomiae* apresenta teliósporos organizados em uma a quatro camadas, raramente cinco, os esporos têm paredes de coloração canela a castanho claras, com 1,5 a 2,0 mm de espessura, mas com células da camada apical com espessura de até 6 mm.

Assim, até o ano de 2000, acredita-se que a espécie prevalecente causadora da ferrugem da soja no Brasil tenha sido *P. meibomiae*. No final da safra de 2000/01, na região de fronteira do Brasil e Paraguai, foram observadas lavouras de soja com alta severidade da doença. Yorinori et al. (2002) confirmaram que se tratava da espécie asiática, ou seja, *P. pachyrhizi*. Nos anos seguintes o patógeno se disseminou rapidamente para outras regiões do Brasil.

Nos últimos anos, a distinção entre as duas espécies de *Phakospora* tem sido realizada por meio de técnicas moleculares (FREDERICK et al., 2002).

2.1.2 Efeito das condições ambientais no processo de pré-penetração da ferrugem da soja

Desde a década de 70 do século passado, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos realizou várias pesquisas para avaliar o risco da entrada do patógeno *P. pachyrhizi* em seu território. A preocupação era de se entender as condições ambientais para o desenvolvimento da doença e avaliar a resistência das variedades utilizadas naquele país frente aos isolados da Ásia e Austrália.

P. pachyrhizi possui a capacidade de germinar entre temperaturas de 7 a 28°C, porém a faixa ótima de germinação é de 15 a 25°C (MARCHETTI; MELCHING; BROMFIELD, 1976). Em cerca de uma hora de incubação a germinação se inicia, e não há acréscimo na porcentagem de germinação para períodos maiores que 6 horas de incubação, tanto em ágar como em folhas (MELCHING et al., 1989).

Temperaturas acima de 28,5°C por período de 8 horas são prejudiciais ao patógeno, diminuindo sua capacidade de germinação, mesmo se submetido a condições ideais quanto a outros fatores (KOCHMAN, 1979). A sobrevivência dos urediniósporos armazenados em condições de laboratório está estimada em aproximadamente 14 dias (FURTADO; ALVES; MASSOLA JÚNIOR, 2006).

Quando urediniósporos de *P. pachyrhizi* são semeados em meio ágar-água para germinar, não é possível visualizar a formação de apressórios, devido à consistência do meio de cultura. Por outro lado, o uso de membranas artificiais e de papel de filtro de várias porosidades permite que essa estrutura seja observada (KOCH;

HOPPE, 1988). As estruturas de pré-penetração também foram observadas por Koch; Ebrahim-Nesbat e Hoppe (1983) utilizando-se de técnicas de microscopia eletrônica. A germinação em folhas de soja suscetível ocorre entre 1 e 2 horas e a formação de apressório inicia-se dentro de 2 horas e após 5 horas a maioria dos apressórios já está completamente desenvolvida (BONDE; MELCHING; BROMFIELD, 1976). Não há evidências de atraso ou menor germinação dos urediniósporos quando inoculados em variedades resistentes (KEOGH; DEVERALL; McLEOD, 1980; McLEAN, 1979).

Diferente de outras ferrugens, *P. pachyrhizi* realiza a penetração diretamente nas células epidérmicas, ao invés de penetrar via estômato (BONDE; BROWN, 1980; BONDE; MELCHING; BROMFIELD, 1976; KOCH; EBRAHIM-NESBAT; HOPPE, 1983). Além disso, *P. pachyrhizi* é capaz de infectar um grande número de espécies além da soja (ONO; BUTIRICA; HENNEN, 1992). Essas características levam a acreditar que esse fungo é pouco dependente de reconhecimento da superfície para a formação do apressório. Koch; Ebrahim-Nesbat e Hoppe (1983) não encontraram indicações de preferência da formação do apressório em estruturas específicas da superfície do hospedeiro. Além disso, não observaram crescimento direcional do tubo germinativo.

Na fase de pré-penetração não há diferenças entre *P. pachyrhizi* e *P. meibomiae* quando inoculados em variedade suscetível de soja. Após 10 horas de incubação, apresentam completa formação de apressórios e dimensões semelhantes (BONDE; BROWN, 1980).

2.1.3 Efeito das condições ambientais nos parâmetros monocíclicos da ferrugem da soja

Testes de infecção de um isolado de *P. pachyrhizi* oriundo de Taiwan na variedade Wayne mostraram que o período mínimo de umidade requerido para infecção é de seis horas na faixa de temperatura de 20 a 25°C (BONDE; MELCHING; BROMFIELD, 1976; MARCHETTI; MELCHING; BROMFIELD, 1976) e torna-se progressivamente mais longo em temperaturas maiores e menores (MARCHETTI; MELCHING; BROMFIELD, 1976).

Em observações histológicas, foi possível observar hifas do fungo no espaço intercelular aproximadamente 20-24 horas após a inoculação (BONDE; MELCHING; BROMFIELD, 1976; KEOGH; DEVERALL; McLEOD, 1980; KOCH; EBRAHIM-NESBAT; HOPPE, 1983). Entre 24 e 48h foram observados os primeiros haustórios em cultivares suscetíveis (KOCH; EBRAHIM-NESBAT; HOPPE, 1983; McLEAN; 1979), mas não em resistentes (KEOGH; DEVERALL; McLEOD, 1980). Durante 5 a 7 dias, o patógeno continuou colonizando e diferenciou primórdios da urédia. Após 7 a 9 dias os urediniósporos foram diferenciados e no nono dia a epiderme do hospedeiro foi rompida (MARCHETTI; UECKER; BROMFIELD, 1975).

Experimentos conduzidos em casa de vegetação demonstraram que após uma condição inicial de molhamento foliar em seguida à inoculação, novas urédias são produzidas ao longo do tempo (BROMFIELD; MELCHING; KINGSOLVER, 1980; MARCHETTI; UECKER; BROMFIELD, 1975). As urédias podem ser formadas nas superfícies superior e inferior das folhas. Após duas semanas da inoculação, a quantidade de urédias nas duas superfícies é semelhante, porém novas urédias são formadas principalmente na superfície inferior (BONDE; BROWN, 1980; BROMFIELD; MELCHING; KINGSOLVER, 1980) e após 7 semanas da inoculação a quantidade de urédias na superfície inferior é cerca de 4 a 6 vezes maior que na superfície superior (MELCHING; BROMFIELD; KINGSOLVER, 1979).

O período infeccioso foi estimado em aproximadamente 4 semanas (MARCHETTI; UECKER; BROMFIELD, 1975), mas como novas urédias são formadas, a esporulação na folha só cessa quando a mesma se destaca da planta. O padrão de esporulação é o de vários picos de produção de esporos durante o período infeccioso (MELCHING; BROMFIELD; KINGSOLVER, 1979).

Em plantas de até aproximadamente 50 dias de idade (6ª folha trifoliada presente) a suscetibilidade é diminuída quando comparada com plantas de 15-20 dias após a semeadura. Além disso, as folhas mais velhas (1ª folha) são mais suscetíveis do que as mais novas (até a 6ª folha) (MELCHING et al., 1988; MELCHING et al., 1989). Quando se compara a primeira folha com a sexta, vê-se que a primeira produz maiores lesões, maior número de esporos por lesão, maior número de lesões por cm² e tem menor período latente (MELCHING et al., 1988). Porém, em condições de campo, essa

diminuição da suscetibilidade não é percebida devido aos vários períodos de molhamento foliar a que as plantas estão sujeitas.

O tamanho das lesões aumenta linearmente com o tempo (BROMFIELD; MELCHING; KINGSOLVER, 1980). Duas semanas após a inoculação o tamanho das lesões variou de 0,30 a 0,77mm² e em sete semanas após a inoculação o tamanho ficou entre 1,43 e 2,01 mm² (MELCHING; BROMFIELD; KINGSOLVER, 1979).

O progresso da doença pode diferir quando plantios de diversas estações do ano são comparados. Assim, a escolha da época de plantio pode ser uma medida de controle para atrasar o início da epidemia e/ou para diminuir a taxa de progresso da doença. Esse efeito desfavorável do ambiente sobre o patógeno foi verificado em plantios com temperaturas acima de 28°C (YANG et al., 1990).

2.1.4 Efeito de temperatura elevada no desenvolvimento da ferrugem da soja

Vários trabalhos já foram conduzidos para verificar o efeito da temperatura no patógeno e/ou desenvolvimento da ferrugem da soja. Marchetti; Melching e Bromfield (1976) avaliaram a germinação de urediniósporos do fungo provenientes da Austrália, Índia, Indonésia e Taiwan, os quais germinaram entre 7 e 28°C, com um ótimo na faixa entre 15 e 25°C. Os mesmos autores também avaliaram o efeito da temperatura nos momentos iniciais de estabelecimento da doença. Para isso plantas de soja da cultivar Wayne foram submetidas a diferentes temperaturas e períodos de molhamento, as quais após decorrido o período de molhamento inicial foram transferidas para casa de vegetação com temperatura variando entre 15 e 30°C. O máximo de infecção ocorreu numa faixa de temperatura entre 20 e 25°C, com 10 a 12 horas de molhamento foliar. Além disso, não houve infecção nas plantas submetidas à temperatura de 27,5°C.

Kochman (1979) verificou a sobrevivência de urediniósporos de *P. pachyrhizi* expostos a diferentes temperaturas. Por um período de 8 horas, os urediniósporos foram mantidos a temperaturas entre 11 e 42,5°C. Após esse período, os urediniósporos foram submetidos à germinação em ágar-água a 21°C. Aqueles que

foram expostos anteriormente a temperaturas acima de 28,5°C tiveram sua germinação reduzida significativamente.

O desenvolvimento da ferrugem em condições de casa de vegetação, com diferentes regimes de temperatura, foi avaliado por Kochman (1979). Os resultados indicaram a capacidade da doença em se desenvolver numa ampla faixa de temperatura. Dentre as testadas, o regime que variou entre 17 e 27°C foi o mais favorável. Dados obtidos por Yang et al. (1990), referentes a plantios em diversas estações do ano, indicaram que as condições climáticas têm forte influência no desenvolvimento da doença. As menores taxas de progresso foram observadas no verão, quando comumente as temperaturas ficaram acima de 28°C.

Durante os anos de 1970 a 1974 a ferrugem da soja foi severa e largamente disseminada na Índia, porém nos anos de 1975 e 1976 a doença não foi observada. O verão de 1975 foi muito quente com temperaturas alcançando 40 a 44°C, o que pode ter sido letal ao fungo (SING; THAPLIYAL, 1977).

Vale (1985) investigou o efeito de diferentes temperaturas no período pós-penetração do patógeno na cultivar de soja Paraná. Para isso, o autor inoculou as plantas e manteve as primeiras 24h em temperatura constante de 21 ±1°C e umidade relativa acima de 95%. Em seguida, transferiu as plantas para temperaturas entre 12 e 28°C. Ele verificou que temperaturas de 24 e 28°C, no período de pós-penetração, resultaram em aumento de 3 e 9 dias no período latente, respectivamente, em relação à temperatura de 20°C.

Experimentos como o descrito acima também podem fornecer informações importantes sobre a faixa de temperatura adequada ou letal à colonização do patógeno que pode ser mais ampla do que a faixa favorável à infecção. A definição do término do processo de infecção e início do processo de colonização é uma tarefa difícil (AMORIM, 1995), porém acredita-se que o tempo necessário para a completa penetração de *P. pachyrhizi* em folhas de soja e início das relações parasitárias estáveis seja de aproximadamente 24h. Avaliar o efeito do ambiente sobre o processo de colonização é importante, pois a temperatura nas condições de campo é variável, diferentemente do que geralmente é observado em experimentos conduzidos em câmaras de crescimento.

Em observações histológicas, o tempo necessário para hifas de *P. pachyrhizi* atingirem os espaços intercelulares do hospedeiro é de aproximadamente 20-24h após a inoculação (BONDE; MELCHING; BROMFIELD, 1976; KEOGH; DEVERALL; McLEOD, 1980; KOCH; EBRAHIM-NESBAT; HOPPE, 1983). A colonização é realizada pelo crescimento de micélio intercelular com emissão de haustórios. Koch, Ebrahim-Nesbat e Hoppe (1983) e McLean (1979) observaram os primeiros haustórios entre 24 e 48h após a germinação. Portanto, esse período de tempo é uma boa estimativa para a completa penetração do patógeno no hospedeiro e início do processo de colonização.

2.1.5 Controle genético da ferrugem da soja

A resistência a doenças pode ser classificada como vertical ou horizontal. A resistência vertical, do ponto de vista epidemiológico, é aquela efetiva contra apenas algumas raças do patógeno, o que reduz a quantidade efetiva de inóculo inicial e faz com que o início da epidemia seja atrasado (CAMARGO; BERGAMIN FILHO, 1995).

Por outro lado, a resistência horizontal de uma variedade é efetiva contra todas as raças do patógeno, mas pode ser maior ou menor dependendo da combinação isolado do patógeno e cultivar do hospedeiro. Assim, o nível de resistência horizontal é variável, porém muitas vezes essa diferença entre as variedades não é facilmente identificada. A resistência horizontal é controlada por muitos genes. Os muitos genes envolvidos na resistência horizontal parecem exercer suas influências pelo controle de numerosos passos de processos fisiológicos na planta que fornecem materiais e estruturas que ativam os mecanismos de defesa da planta. A resistência horizontal também é denominada, algumas vezes, de não-específica, geral, quantitativa, de planta adulta, de campo ou durável (AGRIOS, 1997).

No caso da ferrugem da soja, não existem, atualmente, cultivares de soja imunes a *P. pachyrhizi*. Mesmo assim, é possível observar, em condições de campo, que os cultivares podem diferir entre si quanto à severidade, grau de amarelecimento ou desfolha. Os cultivares que apresentam menor desenvolvimento da doença (maior resistência horizontal) são denominados “slow rusting”.

Várias tentativas, no passado, foram realizadas para se identificar genótipos resistentes. No ano de 1961, em trabalho cooperativo entre o Departamento de Agricultura do Estados Unidos (USDA) e o Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC), a coleção de germoplasma de soja dos Estados Unidos foi testada com relação à infecção natural por *P. pachyrhizi* em Taiwan. Somente duas introduções, PI 200499 e PI 200492 (cv. Komata), ambas obtidas no Japão em 1952, foram indicadas como possuidoras de apreciável resistência à ferrugem (BROMFIELD, 1976). A introdução PI 200492 foi posteriormente utilizada como parental em cruzamentos realizados em Taiwan, originando as variedades “Tainung-3”, “Kaohsiung-3” e “Tainung-4”, todas com algum grau de resistência de campo (CHENG; CHAN, 1968 apud McLEAN, 1979; CHAN; CHENG; CHEN, 1971 apud McLEAN, 1979). A PI 200492 também foi utilizada em programas de melhoramento na Austrália (McLEAN; BYTH, 1980).

Com o objetivo de elucidar a herança da resistência presente em PI 200492, foram realizados cruzamentos com uma cultivar suscetível (Davis), resultando numa segregação em F₂ na proporção de 3 resistentes para 1 suscetível, demonstrando que a resistência é dominante e condicionada por um único gene, o qual foi denominado Rpp (McLEAN; BYTH, 1980).

Nos trabalhos realizados na Austrália foram distinguidos três tipos de sintomas. Tipo 1 (imune) – sem sintomas visíveis de infecção; tipo 3 (suscetível) – presença de urédias esporulantes, circundadas por tecido necrótico; tipo 2 (resistente) – reação intermediária entre os tipos 1 e 3, consistindo de lesões necróticas, sem formação de urédias (McLEAN, 1979; McLEAN; BYTH, 1980). Posteriormente esse sistema de classificação dos sintomas foi modificado por Bromfield, Melching e Kingsolver (1980) e é o mais utilizado atualmente. Nesse sistema são considerados três tipos de reações: TAN – lesões de aproximadamente 0,4 mm², usualmente com 2 a 5 urédias na superfície abaxial da folha, 2 semanas após a inoculação, indicando suscetibilidade; RB – lesões de aproximadamente 0,4 mm², usualmente com 0 a 2 urédias na face abaxial da folha, 2 semanas após a inoculação, indicando resistência do hospedeiro com hipersensibilidade; 0 – ausência de sintomas da ferrugem visíveis

macroscopicamente. Esses autores acreditam que os sintomas TAN, RB e 0 são respectivamente os sintomas tipo 3, 2 e 1, descritos por McLean (1979).

Em outro trabalho de seleção realizado pelo AVRDC em cooperação com o USDA, foram avaliadas 1080 linhagens de soja no ano de 1975. Nesse trabalho, nove acessos foram classificados com algum grau de resistência, sendo PI 230970 e PI 230971 os mais promissores. Diante da descoberta de novas linhagens apresentando resistência, essas duas últimas foram cruzadas com suscetíveis e revelaram apresentar um único gene de resistência com herança dominante (BROMFIELD; HARTWIG, 1980).

Os genótipos de soja PI 200492, PI 230970 e PI 462312 foram cruzados com suscetíveis e seus descendentes foram desafiados por dois isolados de ferrugem denominados Taiwan-72-1 e India-73-1. Assim foi possível comprovar que os parentais resistentes possuíam um único gene conferindo resistência específica à ferrugem da soja e foi proposta a utilização da nomenclatura *Rpp*₁, *Rpp*₂ e *Rpp*₃ para denominar os genes presentes em PI 200492, PI 230970 e PI 462312, respectivamente (HARTWIG; BROMFIELD, 1983).

Um quarto gene de resistência, denominado *Rpp*₄ foi identificado na PI 459025. Essa linhagem apresentou resistência (sintoma RB) ao isolado Taiwan-80-2, que foi capaz de causar sintoma TAN nas linhagens possuidoras dos genes *Rpp*₁, *Rpp*₂ e *Rpp*₃ (PI 200492, PI 230970 e PI 462312). A linhagem PI 459025 também foi cruzada com uma cultivar suscetível e seus descendentes apresentaram a proporção 3:1 de plantas resistentes em relação às suscetíveis, comprovando que a resistência conferida por esse gene também é dominante (HARTWIG, 1986).

Genes de resistência também foram relatados em espécies nativas do gênero *Glycine* as quais apresentam variabilidade na reação a *P. pachyrhizi* e algumas delas podem representar valiosas fontes de resistência para programas de melhoramento (BURDON; MARSHALL, 1981a). Segundo Burdon e Marshall (1981b), quatro espécies de *Glycine* nativas da Austrália (*G. canescens*, *G. clandestina*, *G. tabacina* e *G. tomentella*) apresentam resistência qualitativa à ferrugem da soja.

Embora haja o conhecimento dessas fontes de resistência, nenhum desses genes tem sido empregado em cultivares comerciais devido à ocorrência de raças em *P. pachyrhizi*. Em um estudo (AVRDC, 1985 apud HARTMAN; WANG;

SHANMUGASUNDARAM, 1997), 42 isolados purificados foram inoculados em Ankur, PI 200492, PI 230970, PI 230971, PI 239871A, PI 239871B, PI 459024, PI 459025, TK #5, TN #4 e Wayne. A maioria dos isolados causou sintomas tipo TAN em no mínimo sete dessas linhas e esses isolados foram classificados em nove raças. Os dados sugerem que há predomínio de raças complexas de ferrugem e que essas raças possuem múltiplos fatores de virulência para compatibilidade na maioria das linhas. Yeh (1983) identificou três raças dentre 50 isolados monospóricos (a partir de um urediniósporo) usando cinco cultivares diferenciadores. Além disso, no mínimo uma raça originária de Taiwan foi observada possuir três genes de virulência (BROMFIELD; MELCHING, 1982).

A ocorrência de múltiplos genes de virulência em *P. pachyrhizi* parece desnecessária, pois não são conhecidas linhas de soja possuidoras de mais de um gene de resistência. Assim, o desenvolvimento de cultivares por meio de técnicas como rotação e piramidamento de genes de resistência específicos poderão ser ineficientes já que o patógeno parece reter freqüentemente esses genes de virulência desnecessários.

Linhas com resistência parcial têm sido identificadas e caracterizadas por meio do período latente e do número de urédias por lesão (HARTMAN; WANG; TSCHANZ, 1991; ZAMBOLIM; VALE; CHAVES, 1983; BONDE et al., 2006). O principal impedimento no desenvolvimento de linhas com resistência horizontal tem sido como avaliar linhas de uma população segregante ou de acessos que possuem diferentes maturidades. A taxa de progresso da doença tem sido usada para determinar o nível de resistência horizontal por meio de comparação da inclinação das curvas de regressão (HARTMAN; WANG; SHANMUGASUNDARAM, 1997; KAWUKI; TUKAMUHABWA; ADIPALA, 2004).

No caso da ferrugem da soja, tem sido sugerido que a resistência pode ser explicada pelos seguintes mecanismos: (i) redução da penetração no hospedeiro; (ii) diminuição do desenvolvimento do micélio dentro de tecidos do hospedeiro; (iii) aumento do tempo antes da erupção das urédias e (iv) redução na produção dos urediniósporos (MELCHING et al., 1988).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Germinação

Os experimentos foram conduzidos com urediniósporos recém coletados de plantas doentes. A coleta foi realizada pela raspagem das folhas com o auxílio de um pincel macio. Os urediniósporos coletados foram adicionados a um Becker contendo água destilada. A suspensão foi homogeneizada em agitador magnético e a concentração foi estimada por contagem em câmara de Newbauer e, por meio de diluição, foi ajustada para 10^5 esporos por mL.

Quatro alíquotas de 40µL da suspensão foram adicionadas a placas de Petri de poliestireno. Para se obter ambiente úmido, foram utilizadas caixas plásticas contendo cerca de dois centímetros de água no fundo. As placas foram colocadas dentro dessas caixas plásticas, sobre lâminas de isopor, e em seguida, as caixas foram envoltas em um saco plástico e acondicionadas em câmaras de crescimento nas temperaturas de 8, 12, 15, 20, 25 e 30°C, no escuro. O desenvolvimento dos urediniósporos foi interrompido pela adição de 20µL de lactoglicerol a cada gota da suspensão, nos intervalos de 1, 2, 4, 8 e 12 h de incubação. A contagem de urediniósporos germinados, não germinados e que formaram apressórios foi realizada em microscópio óptico em aumento de 100 vezes.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, no esquema fatorial, com 6 temperaturas, 5 períodos de molhamento e quatro repetições, sendo cada repetição constituída por uma gota da suspensão. Em cada gota foram contados 100 urediniósporos aleatoriamente. O experimento foi repetido duas vezes. Na segunda repetição do experimento foi incluído mais um período de molhamento de 24h, apenas para se realizar observações nos urediniósporos este tratamento não entrou na análise estatística.

Os dados obtidos nos dois experimentos foram analisados por meio de regressões não-lineares, utilizando o programa STATISTICA versão 6.0 (STATSOFT, 2001) e os gráficos foram elaborados com o mesmo programa. O efeito da temperatura sobre a germinação e formação de apressórios de *P. pachyrhizi* foi ajustado ao modelo Beta generalizado: $Y = B_1 * (((T - B_2)^{B_4}) * ((B_3 - T)^{B_5}))$, onde B_2 e B_3 representam,

respectivamente, as temperaturas mínima e máxima, B_1 , B_4 e B_5 são parâmetros da equação, sem significado biológico, T é a temperatura e Y é a variável resposta, germinação ou formação de apressórios (HAU; KRANZ, 1990). O efeito do período de molhamento na germinação e formação de apressórios de *P. pachyrhizi* foi ajustado ao modelo Monomolecular: $Y = B_6 * (1 - (1 - B_7) * \exp(-B_8 * M))$, onde Y representa a variável resposta, B_6 é a assíntota máxima, B_7 é um parâmetro do modelo, B_8 está relacionado à taxa de crescimento e M representa a duração do período de molhamento. Em seguida, os modelos foram multiplicados para a elaboração de uma superfície de resposta, e assim possibilitar a verificação do efeito de diferentes combinações de temperatura e molhamento na germinação e formação de apressórios de urediniósporos de *P. pachyrhizi*.

2.2.2 Efeito das condições ambientais nos parâmetros monocíclicos da ferrugem da soja

Os experimentos foram realizados no setor de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP, em Piracicaba, SP. Vasos contendo mistura de substrado (2 partes de solo de barranco, 1 parte de areia, 1 parte de esterco curtido) foram semeados com a variedade BRS 154 e mantidos em casa de vegetação. Dez dias após a semeadura as plantas foram raleadas para três plantas por vaso. Quando as plantas atingiram o estágio V2, estas foram inoculadas. O estágio V2 é caracterizado pela planta apresentar a primeira folha trifoliolada estendida, ou seja, com seus três folíolos expandidos e a segunda folha trifoliolada já se apresenta aberta, de tal modo que os bordos de cada folíolo não estão se tocando. As inoculações foram realizadas com urediniósporos armazenados conforme metodologia sugerida por Furtado et al. (2005). A concentração da suspensão de urediniósporos foi estimada por contagem em câmara de Neubauer e, por meio de diluição, foi ajustada para 5×10^4 esporos por mL.

Em cada inoculação, três alíquotas de 500 μ L da suspensão foram adicionadas a placas de Petri contendo meio AA, para se obter estimativa da germinação dos urediniósporos. As placas foram mantidas por 6 horas na temperatura

de 25°C, no escuro, e em seguida foram contados 100 esporos aleatoriamente em cada placa de Petri para estimar a porcentagem de urediniósporos germinados.

Na inoculação, a superfície superior das folhas foi pulverizada até a máxima retenção de gotas. Em seguida, cada vaso foi envolto em um saco plástico umedecido. Os vasos foram transferidos para câmaras de crescimento previamente reguladas com fotoperíodo desligado, nas temperaturas de 10, 15, 20, 22,5, 25, 27,5 e 30°C, as quais receberam de maneira combinada plantas com períodos de molhamento foliar de 0, 4, 6, 8, 12, 16 e 24h. Os períodos de molhamento foliar foram obtidos retirando-se as câmaras úmidas. Após decorrido o maior período de molhamento foliar as câmaras de crescimento foram reguladas para fotoperíodo de 12h luz e 12h escuro.

Diariamente as plantas foram observadas para determinação do período latente. Para essa quantificação foi utilizada a seguinte definição: intervalo de tempo, em dias, decorrido entre a inoculação e o aparecimento de 50% das lesões esporuladas.

Quatorze dias após a inoculação uma folha unifoliolada e folíolo central do primeiro trifólio foram destacados para avaliação da intensidade da doença. Para isso, as folhas amostradas foram colocadas dentro de um molde fotográfico para slide, de modo que a área central do folíolo não ficasse encoberta. Com o auxílio de máquina fotográfica digital, fixada sobre chapa de madeira com parafuso adequado, foram realizadas fotos das folhas amostradas, todas de uma mesma distância (Figura 1). Para se obter contraste adequado entre os tecidos sadio e doente, as fotografias foram feitas com uma fonte de luz imediatamente atrás da moldura de slide contendo o folíolo. Após a obtenção das fotografias as mesmas foram transferidas para um computador e foram submetidas aos processos de calibração, binarização e quantificação. No processo de calibração, a área amostrada do slide, cujas medidas eram de 34mm x 23mm, foram redimensionadas para 340 x 230 pixels. Em seguida, de cada imagem recortou-se uma área de 200 x 200 pixels, a qual foi submetida ao processo de binarização. Neste processo, a imagem colorida foi transformada para duas cores, preto e branco, sendo o tecido sadio representado por pixels brancos e o tecido doente por pixels pretos. No processo de quantificação, utilizando-se do software Image Tool 3.0 (UTHSCSA, 2002)

foi possível obter a frequência de infecção (número de lesões por cm²), tamanho médio de lesão e severidade da doença.

As plantas submetidas à temperatura de 10°C tiveram suas folhas avaliadas por esse método de fotografia aos 28 dias após a inoculação. A severidade obtida nessas plantas foi comparada com as demais temperaturas. Para isso, a severidade observada foi dividida pelo número de dias da avaliação, ou seja, os dados da temperatura de 10°C foram divididos por 28 e os dados das demais temperaturas foram divididos por 14. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas por meio do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 1 - Método para registro das imagens digitais

O efeito do período de molhamento foliar na frequência de infecção e na severidade da doença foi ajustado ao modelo Monomolecular $Y = B_6 * (1 - (1 - B_7) * \exp(-B_8 * M))$, onde Y representa a frequência de infecção ou a severidade da doença, B_6 é a assíntota máxima, B_7 é um parâmetro do modelo, B_8 está relacionado à taxa de crescimento e M representa a duração do período de molhamento.

Para descrever a influência da temperatura na frequência de infecção e na severidade da doença foi utilizada a função Beta generalizada: $Y = B_1 * (((T - B_2)^{B_4}) * ((B_3 - T)^{B_5}))$, onde B_2 e B_3 representam, respectivamente, as temperaturas mínima e máxima para o desenvolvimento da doença, B_1 , B_4 e B_5 são parâmetros da equação, sem

significado biológico, T é a temperatura e Y é a variável resposta, frequência de infecção ou severidade da doença (HAU; KRANZ, 1990).

As funções Monomolecular e Beta generalizada, obtidas nos experimentos, foram multiplicadas para a elaboração de um modelo que indicasse o efeito de diferentes combinações de temperatura e períodos de molhamento foliar no desenvolvimento da doença, gerando uma superfície de resposta em função das variáveis climáticas, temperatura e duração do período de molhamento foliar. A integração das duas equações gera a função Beta-monomolecular: $Y = B_1 * ((T - B_2)^{B_4}) * ((B_3 - T)^{B_5}) * B_6 * (1 - (1 - B_7) * \exp(-B_8 * M))$.

A importância do período de molhamento foliar e da temperatura na variação do tamanho médio das lesões da doença foi verificado por meio de regressão linear: $Y = ax + b$, em que Y é o tamanho médio das lesões, a é o coeficiente angular, x é o período de molhamento ou a temperatura e b é uma constante. O coeficiente angular foi testado pela hipótese de $a = 0$.

Os ajustes matemáticos foram realizados por meio do software STATISTICA versão 6.0 (STATSOFT, 2001). O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, no esquema fatorial, com 7 temperaturas, 7 períodos de molhamento e nove repetições, sendo cada repetição constituída por uma área amostrada da folha. O experimento foi repetido duas vezes.

2.2.3 Efeito de temperatura elevada no desenvolvimento da ferrugem da soja

A metodologia utilizada neste ensaio foi semelhante à descrita no item 2.2.2, com as seguintes diferenças. Após a inoculação, os vasos foram transferidos para câmaras de crescimento previamente reguladas com fotoperíodo desligado, na temperatura de 23°C. Depois de decorrido 24h de período de molhamento foliar nesta temperatura, as câmaras úmidas foram retiradas e cinco vasos de cada tratamento foram transferidos para câmaras de crescimento reguladas com fotoperíodo de 12h luz e 12h escuro, nas temperaturas de 23, 30, 35 e 40°C.

Diariamente as plantas foram observadas para determinação do período de incubação e do período latente. O período de incubação foi definido como o intervalo

de tempo decorrido entre a inoculação e aparecimento dos primeiros sintomas visíveis a olho nu e o período latente foi definido como o intervalo de tempo entre a inoculação e maioria das folhas apresentando 50% das lesões com esporulação. Quatorze dias após a inoculação o folíolo central do primeiro trifólio de cada planta foi destacado e avaliado por meio de fotografia digital, como nos demais experimentos.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com quatro temperaturas e cinco repetições, sendo cada repetição constituída pela média de duas plantas. O experimento foi repetido duas vezes, o qual entrou na análise de variância como efeito de bloco.

Os dados obtidos no ensaio foram submetidos ao teste F da análise de variância a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa STATISTICA versão 6.0 (STATSOFT, 2001).

2.2.4 Quantificação da resistência parcial de genótipos à ferrugem da soja

Os experimentos foram realizados no setor de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP, em Piracicaba, SP. Vasos contendo mistura de substrado (2 partes de solo de barranco, 1 parte de areia, 1 parte de esterco curtido) foram semeados com os genótipos Bingnan (PI 459025), BRS 154, BRS 232, BRS 258, CD 208, FT 2, IAS 5, Kinoshita (PI 200487), Msoy 7979, Orba (PI 471096), PI 274454A e Shiranui (PI 274453) e mantidos em casa de vegetação.

Após a inoculação das plantas, os vasos foram transferidos para câmaras de crescimento previamente reguladas com fotoperíodo desligado, nas temperaturas de 15 e 25°C. As plantas foram mantidas em câmaras úmidas nas primeiras 24h e em seguida, as câmaras de crescimento foram reguladas para fotoperíodo de 12h luz e 12h escuro.

Diariamente as plantas foram observadas para determinação do período de incubação e do período latente. O período de incubação foi definido como o intervalo de tempo decorrido entre a inoculação e aparecimento dos primeiros sintomas visíveis a olho nu e o período latente foi definido como o intervalo de tempo entre a inoculação e maioria das folhas apresentando 50% das lesões com esporulação. As avaliações da

intensidade da doença foram realizadas aos 13 e 20 dias após a inoculação para as plantas mantidas a 25 e 15°C, respectivamente. Para isso, o folíolo central foi destacado e fotografado de acordo com a metodologia descrita no item 2.2.2. A determinação do tipo de sintoma RB ou TAN foi realizada aos nove e 15 dias após a inoculação, nas temperaturas de 25 e 15°C, respectivamente.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos (genótipos) e nove repetições, sendo cada repetição constituída por uma área amostrada da folha. O experimento foi repetido duas vezes. Cada temperatura foi analisada separadamente. As médias de severidade foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Durante a realização do experimento pela segunda vez, mais uma variável foi incluída, a contagem de urédias por lesão. Assim, as urédias desenvolvidas em cada genótipo foram quantificadas sob microscópio estereoscópico, com aumento de 50 vezes. Na temperatura de 25°C foram contadas em 10 lesões individualizadas, 28 dias após a inoculação e em 15°C foram quantificadas em 30 lesões individualizadas aos 35 dias após a inoculação.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado com seis genótipos (tratamentos) e dez repetições, na análise de 25°C e 30 repetições na análise de 15°C, sendo cada repetição constituída pela contagem das urédias de uma lesão. Os dados foram transformados em raiz quadrada e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Efeito das condições ambientais no processo de pré-penetração da ferrugem da soja

2.3.1.1 Efeito da temperatura e da duração do molhamento na germinação de *Phakopsora pachyrhizi* in vitro

O fungo foi capaz de germinar em todas as temperaturas testadas. O período mínimo para início da germinação foi de uma hora de incubação e o processo estabilizou-se após oito horas. A função Beta generalizada se ajustou ao

comportamento da germinação em relação à temperatura e o modelo Monomolecular em relação ao período de molhamento (Tabela 1). A combinação dos dados de temperatura e período de molhamento permitiu calcular a superfície de resposta para esta variável. Os dados foram ajustados ao modelo Beta-monomolecular (Figura 2).

Tabela 1 - Coeficiente de determinação (R^2) e parâmetros dos modelos Beta generalizado $Y = B_1 * (((T - B_2)^{B_4}) * ((B_3 - T)^{B_5}))$, Monomolecular $Y = B_6 * (1 - (1 - B_7) * \exp(-B_8 * M))$ e Beta-monomolecular, $Y = B_1 * ((T - B_2)^{B_4}) * ((B_3 - T)^{B_5}) * (B_6 * (1 - B_7 * \exp(-B_8 * M)))$, onde Y é a germinação, T é a temperatura, M é o período de molhamento, os parâmetros B_2 e B_3 são, respectivamente, as temperaturas mínima e máxima e B_1 , B_4 , B_5 , B_6 , B_7 e B_8 são parâmetros da equação sem significado biológico

Modelos	B_1	B_2	B_3	B_4	B_5	B_6	B_7	B_8	R^2
Beta generalizado	$1,2 \cdot 10^{-5}$	-5,4	43,7	2,5	2,2	-	-	-	0,599
Monomolecular	-	-	-	-	-	47,2	-0,1	0,4	0,614
Beta-monomolecular	$4,0 \cdot 10^{-2}$	4,1	32,4	0,8	0,5	41,7	-0,2	0,5	0,622

Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Marchetti; Melching e Bromfield (1976) em que o patógeno apresentou como faixa ótima de germinação entre 15 e 25°C e os extremos de germinação foram de 7 e 28°C. As temperaturas mínima e máxima previstas pelo modelo ajustado no presente trabalho foram de 4,1 e 32,4°C, respectivamente.

O efeito deletério de temperaturas elevadas à germinação foi observado por Kochman (1979). Esse autor investigou a sobrevivência de urediniósporos expostos a temperaturas de 11 a 42,5°C, por período de 8 horas. Após esse período, os urediniósporos foram deixados germinar a 21°C. Aqueles que foram expostos anteriormente a temperaturas acima de 28,5°C tiveram sua germinação reduzida significativamente.

De acordo com as observações realizadas por Melching et al. (1989), a germinação é iniciada após uma hora de incubação, e não há acréscimo na porcentagem de germinação para períodos maiores que 6 horas de incubação, tanto em ágar como em folhas. No presente trabalho, a germinação foi perceptível após duas horas de incubação e não houve grandes acréscimos no percentual de germinados após oito horas de incubação.

Essas pequenas diferenças entre este trabalho e o realizado por Melching et al. (1989) podem ser decorrentes do método utilizado, já que a superfície de

poliestireno é artificial e pode ter acarretado um atraso no processo de germinação dos urediniósporos.

$$z = (0,039726) * ((x - 4,08536))^{(,764896)} * (((32,3923) - x)^{(,490772)}) * (41,6731) * (1 - (1 - (-,23568)) * \exp(-,473963 * y))$$

Figura 2 - Superfície de resposta da germinação de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*, em função da temperatura e do período de molhamento, descrita pela função $Y = B_1((T - B_2)^{B_4})((B_3 - T)^{B_5})(B_6(1 - B_7 \exp(-B_8 M)))$, onde Y é a germinação, T é a temperatura, M é o período de molhamento e B_1 a B_8 são parâmetros do modelo

2.3.1.2 Efeito da temperatura e da duração do molhamento na formação de apressórios de *Phakopsora pachyrhizi* in vitro

O fungo foi capaz de formar apressório em todas as temperaturas testadas. Porém, houve acentuado decréscimo nas temperaturas de 8°C e de 30°C. Nas temperaturas de 12 a 25°C, a formação de apressórios iniciou-se após quatro horas de incubação e nas temperaturas de 8°C e de 30°C os apressórios foram observados após oito horas. A função Beta generalizada ajustou-se aos dados de formação de apressórios em relação à temperatura e o modelo Monomolecular aos de duração do período de molhamento (Tabela 2). A combinação dos dados das duas variáveis permitiu calcular a superfície de resposta com o uso do modelo Beta-monomolecular (Figura 3).

Tabela 2 - Coeficiente de determinação (R^2) e parâmetros dos modelos Beta generalizado $Y = B_1 * (((T - B_2)^{B_4}) * ((B_3 - T)^{B_5}))$, Monomolecular $Y = B_6 * (1 - (1 - B_7) * \exp(-B_8 * M))$ e Beta-monomolecular, $Y = B_1 * ((T - B_2)^{B_4}) * ((B_3 - T)^{B_5}) * (B_6 * (1 - B_7 * \exp(-B_8 * M)))$, onde Y é a formação de apressórios, T é a temperatura, M é o período de molhamento, os parâmetros B_2 e B_3 são, respectivamente, as temperaturas mínima e máxima e B_1 , B_4 , B_5 , B_6 , B_7 e B_8 são parâmetros da equação sem significado biológico

Modelos	B_1	B_2	B_3	B_4	B_5	B_6	B_7	B_8	R^2
Beta generalizado	$4,4 \cdot 10^{-2}$	2,7	31,9	1,3	1,2	-	-	-	0,746
Monomolecular	-	-	-	-	-	67,4	-0,1	0,1	0,868
Beta-monomolecular	1,4	5,6	31,3	0,8	1,1	38,2	$-6,2 \cdot 10^{-4}$	$4,5 \cdot 10^{-4}$	0,856

Quando urediniósporos de *P. pachyrhizi* são semeados em meio ágar-água para germinar, não é possível visualizar a formação de apressórios, devido à consistência do meio de cultura. Koch e Hoppe (1988) realizaram estudos para verificar a influência da superfície testada na germinação e diferenciação de apressório em *P. pachyrhizi*. Esses autores utilizaram diversas membranas artificiais e papel de filtro com diversas porosidades e conseguiram demonstrar que os urediniósporos originaram apressórios mais abundantemente quando a superfície apresentava poros menores que $0,20 \mu\text{m}$. No presente trabalho foi possível verificar que a superfície plástica utilizada foi adequada para a germinação e diferenciação do apressório. Na combinação 12h e 20°C foi observado, em média dos dois experimentos, 71% dos urediniósporos germinados formaram apressório.

$$z = (1,40481) * ((x - (5,61789))^{(,841634)}) * (((31,2966) - x)^{(1,05364)}) * (38,1665) * (1 - (1 - (-,62e-3)) * \exp(-,451e-3 * y))$$

Figura 3 - Superfície de resposta da formação de apressórios de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*, em função da temperatura e do período de molhamento, descrita pela função $Y = B_1((T-B_2)^{B_4})((B_3-T)^{B_5})(B_6(1-B_7\exp(-B_8M)))$, onde Y é a germinação, T é a temperatura, M é o período de molhamento e B_1 a B_8 são parâmetros do modelo

Em folhas de soja, quase todos os urediniósporos viáveis de *P. pachyrhizi* germinam em temperaturas favoráveis dentro de seis horas de molhamento foliar e 40 a 50% dos urediniósporos germinados formam apressórios. (BONDE; MELCHING; BROMFIELD, 1976; McLEAN; BYTH, 1981).

McLean e Byth (1981) observaram a germinação e formação de apressórios de *P. pachyrhizi* em sete diferentes genótipos de soja, incluindo entre eles genótipos suscetível, resistente e altamente resistente. Numa média de todos os genótipos foi encontrado 3 h após a inoculação, cerca de 33 e 13 % dos urediniósporos germinados e com apressórios, respectivamente. Maior acréscimo na porcentagem de germinação foi observado até 12 h após a inoculação e na formação de apressórios até 24 h. Na observação realizada 12 h após a inoculação foi registrado 56,2 % de germinação e 47,7 % de apressórios.

Bonde; Melching e Bromfield (1976) observaram que a formação de apressório foi iniciada em duas horas e após cinco horas a maioria já estava

completamente desenvolvida. No presente trabalho a formação de apressórios foi quase linear com o aumento do período de molhamento até 12h.

Com relação à infecção, Bonde; Melching e Bromfield (1976) observaram que o período mínimo de umidade requerido por *P. pachyrhizi* para infectar a variedade de soja Wayne foi de sete horas na temperatura de 20°C. Melching et al. (1989) observaram infecção de *P. pachyrhizi* a partir de seis horas de molhamento nas temperaturas entre 18 e 26,5°C. Embora no presente trabalho não tenha sido quantificada a infecção em folhas de soja, a formação do apressório, que é uma estrutura de pré-penetração do fungo, foi observada nos períodos de molhamento a partir de quatro horas, nas temperaturas de 15 a 25°C. Os resultados de formação de apressórios *in vitro* observados na superfície de resposta (Figura 3) corroboram aqueles obtidos por Marchetti; Melching e Bromfield (1976), que verificaram que o período de umidade requerido para a infecção torna-se progressivamente mais longo em temperaturas menos favoráveis.

O aspecto geral dos urediniósporos nas diferentes combinações de período de molhamento e temperatura podem ser observados na Figura 4. De acordo com o modelo ajustado, em temperaturas acima de 31,3°C, o fungo seria incapaz de produzir apressório. Nas observações realizadas no período de molhamento de 24h, foi possível verificar a formação de hifa de penetração (KOCH; EBRAHIM-NESBAT; HOPPE, 1983; KOCH; HOPPE, 1988) e o efeito deletério da temperatura de 30°C. Nessa temperatura, houve formação de tubos germinativos ramificados, o que demonstra imperfeições no desenvolvimento do patógeno (Figura 5).

Figura 4 - Aspecto dos urediniósporos submetidos a diferentes períodos de molhamento e temperaturas. Duas horas de período de molhamento, nas temperaturas de 8, 12, 15, 20, 25 e 30°C (A a F, respectivamente). Oito horas de período de molhamento, nas temperaturas de 8, 12, 15, 20, 25 e 30°C (G a M, respectivamente). Doze horas de período de molhamento, nas temperaturas de 8, 12, 15, 20, 25 e 30°C (N a S, respectivamente). Observados em microscópio óptico, aumento de 100x, barra = 50µm

Figura 5 - Aspecto dos urediniósporos submetidos ao período de molhamento de 24h. Na temperatura de 20 e 25°C (A e B) e na temperatura de 30°C (C e D). Observados em microscópio óptico, aumento de 100x, barra = 50µm

Esses dados são concordantes com os obtidos por Yang et al. (1990) que compararam plantios de diversas estações do ano e verificaram que as condições climáticas têm forte influência no desenvolvimento da doença. As menores taxas de progresso foram observadas no verão, quando comumente as temperaturas ficaram acima de 28°C e foram desfavoráveis ao patógeno.

2.3.2 Efeito das condições ambientais nos parâmetros monocíclicos da ferrugem da soja

2.3.2.1 Efeito da temperatura no desenvolvimento da ferrugem da soja

O fungo foi capaz de infectar em todas as temperaturas testadas, exceto na de 30°C. Na avaliação realizada 14 dias após a inoculação, as plantas do tratamento de 10°C não apresentaram sintomas, fato que aconteceu apenas 20 dias após a inoculação. A temperatura influenciou a frequência de infecção e a severidade da doença e este efeito foi ajustado à função Beta generalizada. O aumento da temperatura provocou aumento na frequência de infecção e severidade da doença até 20 ou 22,5°C, a partir da qual decresceu. O ajuste matemático foi realizado para cada período de molhamento testado. Os resultados do ajuste obtido no período de molhamento de 12h podem ser observados na Figura 6 A-D. A temperatura mínima para desenvolvimento da doença na folha unifoliolada, estimada pela função Beta generalizada, foi de 7,42 e 9,93°C e a máxima foi de 30,0 e 30,1°C, respectivamente para frequência de infecção e severidade. Na folha trifoliolada, a temperatura mínima estimada foi de 10,0°C e a máxima de 31,1 e 30,6°C para os parâmetros frequência de infecção e severidade, respectivamente (Tabela 3). O tamanho médio de lesão não foi influenciado pela variação da temperatura entre 15 e 27,5°C (Figura 6 E-F).

Figura 6 - Efeito da temperatura na frequência de infecção (A e B), severidade (C e D) e tamanho médio de lesão (E e F) de *Phakopsora pachyrhizi* na variedade BRS 154. Os gráficos de frequência de infecção e severidade referem-se ao período de molhamento foliar de 12h. Nas folhas unifoliolada (A, C e E) e folíolo central da primeira folha trifoliada (B, D e F). Círculos vazios correspondem aos dados do primeiro experimento e círculos cheios do segundo

Tabela 3 - Coeficiente de determinação (R^2) e parâmetros da função Beta-Monomolecular, $Y = B_1((T - B_2)^{B_4})((B_3 - T)^{B_5})(B_6(1 - B_7 \exp(-B_8 M)))$, onde Y é o componente monocíclico, T é a temperatura, M é o período de molhamento, os parâmetros B_2 e B_3 são, respectivamente, as temperaturas mínima e máxima e B_1 , B_4 , B_5 , B_6 , B_7 e B_8 são parâmetros da equação sem significado biológico

Folha	Componente monocíclico	B_1	B_2	B_3	B_4	B_5	B_6	B_7	B_8	R^2
Unifólio	Frequência de infecção	$1,08 \cdot 10^{-3}$	9,96	1,63	30,00	1,43	48,99	-0,73	0,12	0,86
	Severidade	$8,43 \cdot 10^{-4}$	9,99	1,49	30,09	1,61	16,38	-0,73	0,12	0,86
Trifólio	Frequência de infecção	0,09	10,00	0,41	30,03	0,68	40,95	-0,93	0,14	0,78
	Severidade	0,01	9,97	0,82	30,00	1,12	12,74	-1,08	0,16	0,81

A temperatura também influenciou o período latente. Os dados obtidos ajustaram-se à equação do segundo grau: $Y = 0,11T^2 - 5,20T + 69,53$, onde Y é o período latente em dias e T é a temperatura em $^{\circ}\text{C}$ ($R^2 = 0,99$). O menor período latente foi de 9 dias, na temperatura de $22,5^{\circ}\text{C}$ (Figura 7).

Figura 7 - Efeito da temperatura no período latente da ferrugem da soja, causada por *Phakopsora pachyrhizi*

O valor atribuído à severidade dividido pelos dias após a inoculação obtida em 10°C foi significativamente menor que o valor referente à severidade obtida à temperatura de $22,5^{\circ}\text{C}$, tanto no unifólio quanto no primeiro trifólio (Figura 8).

Figura 8 - Valores de severidade por dia em diferentes temperaturas. Na folha unifoliolada (A) e no folíolo central do primeiro trifólio (B)

O desenvolvimento da ferrugem em condições de casa de vegetação, com diferentes regimes de temperatura, foi avaliado por Kochman (1979). Os resultados indicaram a capacidade da doença em se desenvolver numa ampla faixa de temperatura. Dentre as testadas, o regime que variou entre 17 e 27°C foi o mais favorável. Em experimentos realizados por Marchetti; Melching e Bromfield (1976) foram estudadas as condições de temperatura e molhamento foliar para a ocorrência de infecção. Foram testadas temperaturas entre 15 e 27,5°C. Esses autores observaram o desenvolvimento da doença nas temperaturas entre 15 e 25°C. Dados obtidos por Yang et al. (1990), referentes a plantios em diversas estações do ano, indicaram que as condições climáticas têm forte influência no desenvolvimento da doença. As menores taxas de progresso foram observadas no verão, quando comumente as temperaturas ficaram acima de 28°C.

A função Beta generalizada está entre as funções citadas por Hau e Kranz (1990) para explicar o efeito da temperatura sobre o desenvolvimento de doenças em plantas. Esta equação tem sido utilizada por diversos autores em outros patossistemas (BASSANEZI et al., 2001; DALLA PRIA et al. 2006; GODOY; AMORIM; BERGAMIN FILHO, 1999).

Em experimento conduzido no Japão foi observado que o período latente variou de 13 dias, na temperatura de 15,4°C, a 6 dias, na temperatura de 28°C (KITANI;

INOUE, 1960). Em outro experimento, este realizado na Austrália, o período latente foi de 14 dias em regime de temperatura variando de 7 a 17°C, 9 dias no regime de 17 a 27°C e 11 dias no regime de 22 a 32°C (KOCHMAN, 1979).

Todos esses experimentos mostraram que temperaturas acima de 30°C foram desfavoráveis à infecção. Por outro lado, o limite mínimo de temperatura para a infecção não pôde ser determinado. Na temperatura de 10°C o fungo foi capaz de infectar nos períodos de molhamento superiores a 8 horas. Entretanto, o período latente foi bastante longo (em média, 29 dias).

Se por um lado a temperatura influencia a colonização e reprodução do patógeno no hospedeiro, o que pode ser observado na variação do período latente, por outro lado o tamanho médio de lesão não foi influenciado significativamente. O tamanho médio de lesão observado no presente trabalho variou de 0,24 a 0,43 mm² na folha unifoliolada e de 0,19 a 0,40 mm² no primeiro trifólio. Esses resultados estão de acordo com Bromfield; Melching e Kingsolver (1980), os quais observaram o tamanho de lesão ao estudar a agressividade de quatro isolados. O tamanho de lesão variou de 0,3 a 0,4 mm aos 14 dias após a inoculação.

2.3.2.2 Efeito da duração do período de molhamento foliar no desenvolvimento da ferrugem da soja

Nas duas folhas testadas (unifoliolada e primeiro trifólio), o comportamento foi o mesmo, ou seja, a doença foi capaz de se desenvolver a partir de seis horas de período de molhamento. O ajuste matemático foi realizado para cada temperatura testada. Os resultados do ajuste obtido na temperatura de 22,5°C podem ser observados na Figura 9 A-D. Os tratamentos submetidos a 8 e 12 horas de molhamento foliar resultaram em acentuado aumento na frequência de infecção e severidade da doença; acima disso houve tendência de estabilização do processo. O tamanho médio de lesão não foi influenciado pela variação do período de molhamento (Figura 9 E-F). O fato do tamanho médio de lesão não ter sido influenciado pela temperatura e pelo período de molhamento foliar indica que a severidade da doença pode ser estimada pela simples contagem de lesões por cm².

Figura 9 - Efeito do período de molhamento foliar na frequência de infecção (A e B), severidade (C e D) e tamanho médio de lesão (E e F) de *Phakopsora pachyrhizi* na variedade BRS 154. Os gráficos de frequência de infecção e severidade referem-se a temperatura de 22,5°C. Nas folhas unifololada (A, C e E) e folíolo central da primeira folha trifoliada (B, D e F). Círculos vazios correspondem aos dados do primeiro experimento e círculos cheios do segundo

A variação da severidade em função do período de molhamento foliar normalmente é descrita por modelos não-lineares que assumem as premissas básicas de que a severidade aumenta com a duração do período de molhamento e tende a um limite superior quando o período de molhamento é prolongado (DUTHIE, 1997;

GODOY; AMORIM; BERGAMIN FILHO, 1999). O modelo utilizado neste trabalho foi o Monomolecular.

Em condições de campo, as chances de infecção geralmente são maiores durante a noite e início da manhã, pois a umidade relativa e a duração do período de molhamento foliar são maiores durante a noite (PIVONIA; YANG, 2006).

A importância do molhamento foliar no desenvolvimento da doença foi verificada por Melching et al. (1989) em plantas de soja cultivadas sob condições de casa de vegetação. Para isso as plantas foram irrigadas a cada três, seis ou nove dias. O regime mais freqüente de irrigação resultou em maior quantidade de doença, a qual foi mensurada em lesões/cm²/planta. Em outro experimento os mesmos autores estudaram o efeito de um período de molhamento interrompido no processo de infecção. Quando plantas foram inoculadas e submetidas a atraso no período de molhamento foliar houve perda significativa na capacidade de *P. pachyrhizi* em causar doença, principalmente quando esse período seco ocorreu durante clima ensolarado. Essa menor infectividade foi atribuída a temperaturas elevadas na superfície da folha e/ou ação da radiação solar.

Em Taiwan foram realizados experimentos em três estações de cultivo nos anos de 1979 e 1980. As epidemias de ferrugem da soja foram observadas nos regimes de irrigação por aspersão, por sulco ou sem irrigação, em condições de campo. De maneira geral nas duas estações de cultivo em que houve bom volume de precipitação o comportamento da doença foi semelhante para os métodos de irrigação, porém num dos plantios houve seca e o método de irrigação por aspersão proporcionou início mais precoce da epidemia e maior taxa de progresso da doença (TSCHANZ, 1984).

Dentre as variáveis climáticas que interferem no crescimento das doenças, normalmente as mais investigadas são temperatura e molhamento foliar. Em estudo recente ficou demonstrado que a chuva tem papel principal no desenvolvimento da ferrugem da soja (DEL PONTE et al., 2006), a qual apresentou alta correlação com a severidade da doença.

O efeito da chuva no desenvolvimento da epidemia pode estar ligado a diferentes processos do ciclo das relações patógeno-hospedeiro. De acordo com Melching; Bromfield e Kingsolver (1979) os urediniósporos de *P. pachyrhizi* não são

facilmente liberados pelo vento, pois formam grupos e ficam fortemente aderidos uns aos outros. Assim, o impacto da gota de chuva sobre a folha de soja pode contribuir para o processo de disseminação da doença. Outro aspecto a ser considerado é o vento de maior velocidade que precede um período chuvoso, o que poderia aumentar a liberação dos urediniósporos. A chuva pode realizar a deposição desses urediniósporos liberados pelo vento e, numa etapa seguinte, fornecer molhamento foliar para o processo de infecção.

Além desses efeitos nos processos de disseminação e infecção, existem outras maneiras para a chuva influenciar direta ou indiretamente o desenvolvimento da doença. *P. pachyrhizi* não é favorecido por temperaturas maiores que 28°C, dessa maneira, a chuva também exerce o papel de diminuir a temperatura no macro e microclima durante as fases de pré-penetração e penetração.

No controle da doença, o método mais utilizado é o químico, o qual na maioria dos casos apresenta bons resultados. Porém, a chuva pode diminuir a eficiência do controle químico se esta ocorrer logo após a aplicação do fungicida. Nas situações em que a chuva ocorre por vários dias, esta fornece condições para o desenvolvimento da doença (temperatura amena e molhamento foliar) e impede a aplicação do controle químico, o que algumas vezes resulta em perda do momento adequado para uso desse método, pois a eficiência dos fungicidas é maior quando aplicado de modo protetor do que aplicado de maneira curativa (GODOY; CANTERI, 2004).

Bergamin Filho (2006) propôs a hipótese que explicaria o rápido crescimento da doença pela existência de uma via anti-horária de infecção, além da via horária. A via anti-horária, aqui representada pelo aumento do número de urédias, é menos influenciada pelas variáveis climáticas.

2.3.2.3 Efeito combinado da temperatura e da duração do período de molhamento foliar no desenvolvimento da ferrugem da soja

A multiplicação das funções Beta generalizada, para o efeito da temperatura, e Monomolecular, para aos dados de período de molhamento foliar,

permitiu calcular a superfície de resposta para as variáveis severidades e freqüências de infecção. Os dados ajustaram-se bem ao modelo Beta-monomolecular (Figuras 10 e 11). Essas variáveis foram determinadas nas folhas unifolioladas (Figuras 10A e 11A) e no folíolo central do primeiro trifólio (Figuras 10B e 11B) e representam as combinações de deferentes temperaturas e períodos de molhamento foliar.

Não houve desenvolvimento de lesões nas temperaturas de 10 e 30°C, aos 14 dias após a inoculação, mesmo nos períodos de molhamento de 24h. Com 6h de molhamento, a doença ocorreu somente nas plantas submetidas às temperaturas de 15 a 25°C e poucas lesões foram observadas, o que variou de 0,8 a 4,3 lesões/cm² no primeiro experimento e de 0,9 a 5,8 lesões/cm² no segundo experimento. O período de molhamento foliar de 8h permitiu o aparecimento de lesões nas temperaturas de 10 a 27,5°C, embora os sintomas em 10°C tenham aparecido cerca de 20 dias após a inoculação.

De maneira geral, o aumento na freqüência de infecção ocorreu com o aumento do molhamento foliar até 24h, com tendência de estabilização do processo acima de 12h. As linhas da superfície de resposta (Figuras 10 e 11) paralelas ao eixo de molhamento representam a severidade em uma determinada temperatura em relação ao período de molhamento. Com relação à freqüência de infecção e severidade observada no primeiro trifólio (Figuras 10A e 11A), o período de molhamento exerceu pequena influência no desenvolvimento da doença, nas temperaturas próximas de 10 e 30°C. Entretanto, nas temperaturas de 20 e 22,5°C a diferença foi bastante acentuada, assim, à medida que a temperatura se aproxima da faixa ótima, os maiores períodos de molhamento tornam-se mais eficientes, proporcionando maiores níveis de doença.

Nas linhas paralelas ao eixo de temperatura da superfície de resposta (Figuras 10A e 11A) estão representadas a freqüência de infecção e severidade em cada molhamento em relação às temperaturas. Entre os períodos de molhamento de 12 e 24 h, a linha mostra incrementos crescentes até que o ponto de inflexão seja atingido ($\pm 20^\circ\text{C}$), seguindo-se acentuados decréscimos que tendem a zero. A curva formada é simétrica em relação à temperatura ótima.

O sinergismo da temperatura com o período de molhamento nos componentes monocíclicos da ferrugem da soja é bastante evidente para a freqüência

de infecção e severidade. O molhamento e a temperatura ótimos foram de 24 horas e 20°C (Figuras 10 e 11).

Os comentários apresentados acima são válidos para resultados observados na folha unifoliolada (Figuras 10B e 11B), a qual mostrou comportamento semelhante do desenvolvimento da doença, porém houve um deslocamento da simetria da curva de temperatura para os valores mais baixos de temperatura. Além disso, os dados obtidos na folha unifoliolada apresentaram maiores variações, o que resultou em valores de coeficiente de determinação menores que dos obtidos nos ajustes do primeiro trifólio.

$$z = (,001078) * ((x - (9,96328))^{(1,62504)}) * (((30,)-x)^{(1,42667)}) * (48,9878) * (1 - (1 - (-,73338)) * \exp(-,117327 * y))$$

$$z = (,094784) * ((x - (10,))^{(,40732)}) * (((30,0349) - x)^{(,684185)}) * (40,946) * (1 - (1 - (-,92693)) * \exp(-,144783 * y))$$

Figura 10 - Superfície de resposta da frequência de infecção por *Phakopsora pachyrhizi*, em função da temperatura e do período de molhamento, descrita pela função $Z = B_1((T - B_2)^{B_4})((B_3 - T)^{B_5})(B_6(1 - B_7 \exp(-B_8 M)))$, em que Z é a frequência de infecção, T é a temperatura, M é o período de molhamento e B₁ a B₈ são parâmetros do modelo. No unifólio (A) e no primeiro trifólio (B)

$$z = (,843e-3) * ((x - (9,99026))^{(1,48935)}) * (((30,0888) - x)^{(1,60842)}) * (16,3842) * (1 - (1 - (-,73229)) * \exp(-,119126 * y))$$

$$z = (,011696) * ((x - (9,97259))^{(,818973)}) * (((30,0005) - x)^{(1,119)}) * (12,7433) * (1 - (1 - (-1,0803)) * \exp(-,162014 * y))$$

Figura 11 - Superfície de resposta da severidade da doença causada por *Phakopsora pachyrhizi*, em função da temperatura e do período de molhamento, descrita pela função $Z = B_1((T - B_2)^{B_4})((B_3 - T)^{B_5})(B_6(1 - B_7 \exp(-B_8 M)))$, em que Z é a severidade, T é a temperatura, M é o período de molhamento e B_1 a B_8 são parâmetros do modelo. No unifólio (A) e no primeiro trifólio (B)

O principal objetivo da epidemiologia vegetal é entender os mecanismos que regulam o desenvolvimento das doenças. Numa cultura suscetível, o aumento da severidade da doença durante a estação de cultivo freqüentemente é determinado pelos fatores ambientais, principalmente temperatura e molhamento.

Vários modelos propostos na literatura podem ser utilizados para descrever o comportamento da variável resposta em função da temperatura e do molhamento. Geralmente são assumidos pelos modelos que essas variáveis: (i) aumentam monomolecularmente com a duração do molhamento foliar; (ii) tendem a um limite superior quando o período de molhamento é prolongado; (iii) diminuem a partir de um máximo quando a temperatura se afasta do ótimo; (iv) são desprezíveis quando o período de molhamento é curto ou quando a temperatura é extrema (DUTHIE, 1997).

No patossistema *P. pachyrhizi*-soja a influência da temperatura e do período de molhamento, nas primeiras horas após a inoculação, foi estudada por Melching, Bromfield e Kingsolver (1979). Caldwell et al. (2005) também estudaram o efeito de variáveis ambientais. Além da temperatura e do período de molhamento, foi avaliado o efeito da umidade relativa após o período de infecção. Nesse experimento não houve desenvolvimento da doença nas temperaturas de 15 e 30°C. Os autores afirmam que as plantas submetidas a 95% de umidade relativa apresentaram maior tamanho de lesão do que quando submetidas a 85%.

Melching et al. (1989) não observaram infecção nas temperaturas de 9 ou 28,5°C e nos períodos de molhamento menores que 6h. Nesse período de molhamento o fungo foi capaz de infectar as plantas submetidas a temperaturas entre 18 e 26,5°C. Não observaram diferenças no desenvolvimento da ferrugem entre as plantas submetidas a período de molhamento maior que 12h e temperaturas entre 18 e 26,5°C.

Os resultados do presente trabalho são concordantes com os obtidos por Melching et al. (1989) e ampliam a faixa de ocorrência da doença observada por Caldwell et al. (2005) e Melching, Bromfield e Kingsolver (1979), no que se refere às temperaturas mais baixas. O conhecimento da faixa de temperatura e período de molhamento foliar adequados à infecção e colonização de *P. pachyrhizi* em soja permite afirmar que nas regiões produtoras de soja raramente a doença não se

instalará por falta de condições ambientais. De acordo com os resultados e dados da literatura, as condições inadequadas para a infecção do patógeno seriam temperaturas acima de 28°C e períodos de molhamento foliar menores que 6h.

Em experimentos conduzidos em condições de campo, em diferentes regiões do Brasil e distintos regimes de precipitação, a temperatura não apresentou boa correlação com os dados de severidade. Assim a temperatura não é uma boa variável climática para a previsão desta doença (DEL PONTE et al., 2006). O patógeno possui uma faixa considerável de temperatura adequada para infecção (10 a 27,5°C), desta maneira, a duração do período de molhamento foliar é a variável ambiental que mais facilmente pode limitar a ocorrência do processo de infecção. Del Ponte et al. (2006) verificaram que a precipitação apresentou alta correlação com a severidade da doença.

O método de avaliação da doença utilizado no presente trabalho, por meio de imagem digital, foi útil para mensurar com precisão as variáveis frequência de infecção, tamanho médio de lesão e severidade. Esse método apresentou algumas vantagens e desvantagens.

Como vantagens, ele dispensou o uso de lupa, instrumento este que é utilizado quando se determina o tamanho médio de lesão ou a frequência de infecção o que se obtém realizando-se a contagem direta das lesões em áreas de 1 cm² (10 x 10 mm). Permitiu que pessoas sem treinamento na quantificação por meio de escala diagramática realizassem a obtenção precisa dessa variável. Com esse método foi possível quantificar áreas contínuas de 20 x 20 mm, sendo possível até áreas de 23 x 34 mm. O método foi adequado para quantificação dessa doença que apresenta como característica principal lesões de tamanho diminuto e pode ser adequado para outras doenças com lesões muito pequenas. O método foi altamente preciso e pode ser utilizado para calibração de outros métodos de avaliação.

O método apresentou as seguintes desvantagens: as amostras foram destrutivas, impedindo assim a determinação das variáveis ao longo do tempo. Embora tenha sido rápida a etapa de obtenção das imagens digitais, as etapas seguintes, ou seja, a realização da calibração, binarização e quantificação foram trabalhosas e demoradas. A etapa de binarização é muito dependente da qualidade da imagem, a qual deve apresentar adequado contraste entre os tecidos sadios e doentes.

2.3.3 Efeito de temperatura elevada no desenvolvimento da ferrugem da soja

O patógeno foi capaz de se desenvolver apenas nas temperaturas de 23 e 30°C (Tabela 4). Nessas temperaturas não houve diferença significativa nas variáveis frequência de infecção (lesões/cm²), tamanho médio de lesão e severidade. Por outro lado, na temperatura de 30°C a doença se comportou com maior período de incubação (PI) e o período latente (PL).

Tabela 4 - Efeito da temperatura na colonização de *P. pachyrhizi* sob condições controladas

Temperatura (°C)	Lesões/cm ²	Tamanho (mm ²)	Severidade (%)	PI (dias)	PL (dias)
23	70,83 A	0,27 A	21,06 A	4	9
30	79,04 A	0,33 A	22,81 A	6	12
35	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-

Médias seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente, a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Além do efeito deletério que a temperatura causa durante as fases de pré-penetração e penetração (MELCHING et al., 1989), os resultados do presente trabalho demonstram que temperaturas elevadas durante o processo de colonização e reprodução também são prejudiciais ao desenvolvimento do patógeno.

Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Kochman (1979) o qual verificou aumento de dois dias no período latente quando plantas inoculadas com *P. pachyrhizi* foram submetidas a regime de temperatura noturna/diurna variando entre 22 e 32°C, quando comparado com o regime de temperatura variando entre 17 e 27°C.

A temperatura durante a condução dos experimentos foi constante, o que na prática, em condições de campo não ocorre. A temperatura de 30°C não foi favorável ao fungo durante os processos de infecção (item 2.3.1), porém permitiu a colonização do patógeno com infecção prévia na temperatura de 23°C.

Assim, pode-se inferir que depois de estabelecida a infecção, a ferrugem não paralisa por completo seu desenvolvimento se temperaturas mais altas ocorrerem por determinado período.

Esses resultados são um indício que em condições de campo, quando ocorrem temperaturas amenas e período de molhamento favorável o fungo poderia

realizar a infecção. Essas temperaturas, abaixo de 28°C, normalmente ocorrem durante a noite, quando há maior chance de orvalho (PIVONIA; YANG, 2006) ou durante um período chuvoso. Assim, é comum se observar, em condições de campo, altas severidades da doença em dias quentes, porém a doença observada não reflete o efeito da temperatura do dia da observação, mas sim uma condição ambiental favorável ocorrida no passado.

A temperatura de 35°C foi letal ao fungo e em 30°C houve aumento do período latente de 9 para 12 dias, o que demonstra a falta de adaptação do fungo a temperaturas mais altas que 23°C.

2.3.4 Quantificação da resistência parcial de genótipos à ferrugem da soja

Embora a tarefa de classificar os genótipos quanto à resistência seja difícil, pois não existem atualmente critérios que façam com eficiência essa diferenciação, houve a expectativa de se encontrar, dentre as variáveis avaliadas, alguma diferença, pelo menos nos genótipos portadores de genes de resistência vertical. Os genótipos Bing Nan, Kinoshita, Orba e Shiranui possuem resistência provavelmente associada aos locos Rpp₂ e Rpp₄.

Dentre os parâmetros avaliados, o período latente e o número de urédias por lesão foram úteis para diferenciar os genótipos. Por outro lado, por meio da severidade e frequência de infecção não foi possível diferenciá-los.

O período latente foi variável entre os genótipos testados tanto na temperatura de 15°C quanto na temperatura de 25°C (Tabelas 5 e 6). Os genótipos com resistência vertical apresentaram período latente maior do que BRS 154, o qual variou de 16 a 25 dias. Dentre os genótipos que não se conhece possuir genes de resistência vertical, na temperatura de 15°C, BRS 258 e FT 2 apresentaram período latente maior que 15 dias. Nos demais genótipos que apresentaram sintoma TAN foi observado período latente de 15 dias, igual ao observado no genótipo BRS 154 (Tabela 5).

Tabela 5 - Tipo de sintoma e período latente dos diferentes genótipos submetidos a 15°C

Genótipo	Reação	Período latente em dias	
		Experimento 1	Experimento 2
Bingnan	RB	25	18
BRS 154	TAN	15	15
BRS 232	TAN	15	-
BRS 258	RB	18	17
CD 208	TAN	15	-
FT 2	TAN	15	-
IAS 5	TAN	18	-
Kinoshita	RB	16	18
Msoy 7979	TAN	15	-
Orba	RB	18	16
PI 274454A	TAN	15	-
Shiranui	RB	16	17

Na temperatura de 25°C o período latente foi de 9 dias para todos os genótipos que apresentaram sintomas TAN, igual ao observado no genótipo BRS 154 (Tabela 6). Os genótipos com resistência vertical apresentaram período latente maior do que BRS 154, variando de 10 a 13 dias.

Tabela 6 - Tipo de sintoma e período latente dos diferentes genótipos submetidos a 25°C

Genótipo	Reação	Período latente em dias	
		Experimento 1	Experimento 2
Bingnan	RB	13	12
BRS 154	TAN	9	9
BRS 232	TAN	9	-
BRS 258	RB	11	12
CD 208	TAN	9	-
FT 2	TAN	9	-
IAS 5	TAN	9	-
Kinoshita	RB	11	12
Msoy 7979	TAN	9	-
Orba	RB	10	12
PI 274454A	TAN	9	-
Shiranui	RB	11	12

A severidade na temperatura de 15°C foi significativamente diferente entre os genótipos, sendo BRS 258 o que apresentou menor severidade e diferenciou-se estatisticamente de Kinoshita (Tabela 7). Houve diferença entre os genótipos também quando comparados na temperatura de 25°C. Nesse caso todos os genótipos foram diferentes de Bing Nan (Tabela 8).

Tabela 7 - Severidade média nos diferentes genótipos submetidos a 15°C, 20 dias após a inoculação

Genótipo	Severidade (%)
BRS 258	19,2 A
Shiranui	26,1 AB
BRS 154	27,6 AB
Orba	28,9 AB
Bing Nan	30,2 AB
Kinoshita	32,4 B

Médias seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente, a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 8 - Severidade média nos diferentes genótipos submetidos a 25°C, 13 dias após a inoculação

Genótipo	Severidade (%)
Orba	17,5 A
Shiranui	18,0 A
BRS 258	19,8 A
Kinoshita	22,0 A
BRS 154	22,8 A
Bing Nan	35,6 B

Médias seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente, a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os demais parâmetros avaliados, frequência de infecção e tamanho médio de lesão, apresentaram dados inconsistentes e não foi possível realizar a análise de variância por não atenderem aos pressupostos dessa análise. De maneira geral, o que pôde ser observado, com relação a esses parâmetros, foi que os genótipos portadores de genes de resistência apresentaram lesões maiores que BRS 154. Portanto o uso da frequência de infecção (lesões/cm²) como parâmetro de diferenciação entre variedades deve ser utilizado com cautela, pois o tamanho das lesões é variável entre os genótipos.

Na amostra de pelo menos 200 lesões de cada genótipo e temperatura, foi possível fazer uma análise descritiva com relação ao tamanho de lesão. Na temperatura de 15°C, o tamanho de lesão mais freqüente esteve dentro da classe de 0,15 a 0,30 mm², para todos os genótipos, em pelo menos um dos experimentos, exceção feita aos genótipos Bing Nan e BRS 258, o quais apresentaram como intervalo mais freqüente o de 0,30 a 0,45 mm² e de 0,30 a 0,60 mm², respectivamente (Figura 12).

O genótipo BRS 154 foi o único que não apresentou lesões maiores que 1,2 mm² em quaisquer dos experimentos. Nos genótipos BRS 258, Kinoshita e Shiranui

foi possível observar, em pelo menos um experimento, maior frequência de lesões na classe 0,45 a 0,60 mm² (Figura 12 C, D e F).

Na temperatura de 25°C, o genótipo BRS 154 apresentou mais que 40% das lesões menores que 0,15 mm² (Figura 13B). Os genótipos BRS 258, Kinoshita, Orba e Shiranui tiveram a classe 0,15 a 0,30 mm² como a mais freqüente em pelo menos um experimento.

Os genótipos Bing Nan e Kinoshita apresentaram tamanho de lesão na classe 0,30 a 0,45 mm² como mais freqüente em um dos experimentos. No outro experimento do genótipo Bing Nan, a maior freqüência ficou deslocada para a primeira classe de tamanho. Mesmo assim, nesse experimento, houve cerca de 12% das lesões pertencendo às classes acima de 1,05 mm² (Figura 13A).

Figura 12 - Distribuição do tamanho de lesões em diferentes genótipos submetidos a temperatura de 15°C. A - Bing Nan, B - BRS 154, C - BRS 258, D - Kinoshita, E - Orba e F - Shiranui

Figura 13 - Distribuição do tamanho de lesões em diferentes genótipos submetidos a temperatura de 25°C. Colunas brancas representam os resultados observados no experimento 1 e colunas pretas experimento 2. A - Bing Nan, B - BRS 154, C - BRS 258, D - Kinoshita, E - Orba e F - Shiranui

Quanto à determinação do número urédias por lesão, os genótipos apresentaram diferença significativa entre eles. Na temperatura de 15°C, os genótipos Orba e Bing Nan foram os que apresentaram menor número de urédias por lesão e diferiram dos genótipos IAS 5, Shiranui, BRS 258 e BRS 154, sendo este último o que

apresentou maior média dessa variável e foi diferente de todos os demais genótipos (Tabela 9).

Tabela 9 - Número médio de urédias por lesão em diferentes genótipos mantidos a 15°C, 35 dias após a inoculação

Genótipo	Urédias por lesão
Orba	4,90 A
Bing Nan	5,50 AB
Kinoshita	7,13 BC
IAS 5	9,00 CD
Shiranui	9,23 D
BRS 258	9,73 D
BRS 154	14,20 E

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra, não diferem estatisticamente, a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Na temperatura de 25°C, os genótipos Bing Nan e Shiranui apresentaram menor número de urédias por lesão e diferiram dos genótipos Kinoshita, BRS 154 e IAS 5. Os genótipos BRS 154 e IAS 5 apresentaram numericamente cerca de três vezes mais urédias por lesão do que Bing Nan e diferiram estatisticamente de todos os outros genótipos (Tabela 10).

Tabela 10 - Número médio de urédias por lesão em diferentes genótipos mantidos a 25°C, 28 dias após a inoculação

Genótipo	Urédias por lesão
Bing Nan	3,10 A
Shiranui	3,40 A
BRS 258	4,70 AB
Orba	4,80 AB
Kinoshita	6,30 B
BRS 154	9,40 C
IAS 5	11,50 C

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra, não diferem estatisticamente, a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Por muitos anos foram realizadas avaliações em bancos de germoplasma de soja na busca de genótipos imunes ou resistentes. O progresso conseguido com essas avaliações foi a descoberta de genótipos com sintomas diferentes, o que recebeu o nome de sintoma RB. Posteriormente foi determinado que esse sintoma RB sempre esteve associado a um único gene dominante que conferia esse tipo de resistência. Devido às dificuldades de se transferir esse gene sem grandes prejuízos às variedades comerciais e, além disso, da grande possibilidade de quebra dessa resistência devido à

variabilidade do patógeno e de seus múltiplos genes de virulência. Existe uma busca por variedades com tolerância, ou ainda, com alto grau de resistência horizontal.

A tolerância pode ser definida como a habilidade da cultivar em produzir sob severa epidemia da doença e a resistência horizontal é aquela, independentemente da produção, efetiva a todas as raças do patógeno, além de ser durável. O efeito da resistência horizontal que observamos pode ser resultante do somatório de diversos componentes, tais como: frequência de infecção, período latente, tamanho de lesão, período infeccioso (PARLEVLET, 1979). A ação desses componentes resulta em menor taxa de progresso da doença. No caso específico da ferrugem da soja, a taxa de progresso da doença também é influenciada pelo grupo de maturação do genótipo, ou seja, se o cultivar é de ciclo precoce, médio ou tardio (KAWUKI, TUKAMUHABWA, ADIPALA, 2004). Os genótipos de ciclo tardio normalmente apresentam taxa de progresso da doença menor do que os de ciclo precoce (HARTMAN, 1995; TSCHANZ; WANG, 1980). Para contornar esse problema e possibilitar a comparação de genótipos de diferentes grupos de maturação foi desenvolvida uma equação para que os valores possam ser corrigidos (AVRDC, 1992). Com essa equação é possível calcular um valor relativo que leva em consideração o tempo necessário para o genótipo completar o seu ciclo. Esse valor relativo indica a porcentagem do ciclo da soja que foi completado numa certa data.

Algumas tentativas de diferenciar os genótipos em condições de casa de vegetação e câmaras de crescimento já foram realizadas, porém nem sempre foi possível verificar diferenças consistentes. Bromfield (1976) comparou a variedade Wayne e a introdução PI 200492 quanto ao sucesso de infecção e desenvolvimento da ferrugem, em condições de casa de vegetação. Os parâmetros observados a intervalos semanais após a inoculação foram: número de lesões por cm^2 , área da lesão e número de urédias por lesão nas faces inferior e superior da superfície foliar. Nenhuma diferença significativa entre os hospedeiros foi comprovada. Esse autor considera, neste teste em condição de casa de vegetação, que as características observadas não confirmaram a resistência de campo da PI 200492.

Zambolim; Vale e Chaves (1983) avaliaram a resistência de 38 materiais, entre cultivares e PI's de soja. Eles observaram que o número de lesões por cm^2 e a

área das lesões não mostraram quaisquer consideráveis diferenças entre os materiais. Os parâmetros que permitiram diferenciar os materiais em níveis de resistência quantitativa foram o período latente e o número de urédias por lesão. Atualmente acredita-se que a ferrugem que os autores investigaram tratava-se da ferrugem americana.

Carneiro et al. (2006) avaliaram 14 genótipos em condições de câmara de crescimento para a determinação do período latente. Todos os genótipos apresentaram reação do tipo TAN e não houve diferença no período latente entre os genótipos.

Bergamin Filho (2006) considera que o número de urédias por lesão pode ser uma variável útil para diferenciar genótipos com reação TAN, se houver um período relativamente longo entre a inoculação e a avaliação das mesmas. Bonde et al. (2006) propuseram que essa variável foi útil para diferenciar os genótipos de reação RB do TAN.

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, de maneira geral, foi possível verificar diferenças entre os genótipos, tanto na temperatura de 15°C quanto na temperatura de 25°C. Porém, a temperatura de 15°C possibilitou mais fácil diferenciação dos genótipos por meio do período latente, tamanho de lesão e número de urédias por lesão.

Durante a condução dos experimentos observou-se que as plantas mantidas na temperatura de 25°C apresentaram amarelecimento precoce das folhas e em alguns casos de severidade mais elevada, queda das mesmas. Assim, para que observações ao longo do tempo sejam feitas em plantas na temperatura de 25°C é necessário que as mesmas apresentem baixa severidade da doença.

Outra dificuldade observada foi a utilização do parâmetro frequência de infecção (lesões/cm²) quando a severidade é alta. Acima de aproximadamente 15% as lesões se tornam muito próximas uma das outras o que resulta em coalescência das mesmas. Nesse caso, a quantificação via software considera menor número de lesões/cm² e conseqüentemente maior tamanho médio de lesão.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* germinam e formam apressórios entre temperaturas que variam de 8 a 30°C, com uma faixa mais favorável entre 15 e 25°C, sob condições in vitro.

A temperatura influencia os parâmetros frequência de infecção, severidade e período latente. O período mínimo de molhamento foliar para ocorrer infecção é de 6h. O período de molhamento influencia os parâmetros frequência de infecção e severidade.

Depois de estabelecida a infecção, a temperatura, na faixa de 23 a 30°C, não influencia os parâmetros frequência de infecção, severidade e período latente. Temperaturas constantes maiores ou iguais a 35°C impedem a colonização de *P. pachyrhizi*, mesmo se o processo de infecção for iniciado em temperaturas ideais.

Os parâmetros período latente, número de urédias por lesão são úteis para auxiliar na diferenciação dos genótipos de soja quanto a sua resistência parcial.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 4th ed. San Diego: Academic Press, 1997. 635 p.

AMORIM, L. Ciclos primário e secundário. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3.ed. São Paulo: Ceres, 1995. cap. 12, p. 234-245.

ASIAN VEGETABLE RESEARCH AND DEVELOPMENT CENTER (AVRDC). Annotated bibliography of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow). Asian Vegetable Research and Development Center AVRDC Library Bibliography Series 4-1, Tropical Vegetable Information Service, AVRDC, 1992. 160p.

BASSANEZI, R.B.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; HAU, B.; BERGER, R.D. Accounting for photosynthetic efficiency of bean leaves with rust, angular leaf spot and anthracnose to assess crop damage. **Plant Pathology**, Oxford, v. 50, p. 443-452, 2001.

BERGAMIN FILHO, A. Epidemiologia comparativa: ferrugem da soja e outras doenças. In: ZAMBOLIM, L. **Ferrugem asiática da soja**. Visconde do Rio Branco: Suprema Gráfica e Editora, 2006. cap. 2, p.15-35.

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

BONDE, M.R.; MELCHING, J.S.; BROMFIELD, K.R. Histology of the suscept-pathogen relationship between *Glycine max* and *Phakopsora pachyrhizi*, the cause of soybean rust. **Phytopathology**, Saint 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**, Saint Paul, v. 78, p. 1491-1494, 1988.

BONDE, M.R.; NESTER, S.E.; AUSTIN, C.N.; STONE, C.L.; FREDERICK, R.D.; HARTMAN, G.L.; MILES, M.R. Evaluation of virulence of *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia* isolates. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, p. 708-716, 2006.

BROMFIELD, K.R. World soybean rust situation. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 1., 1976, Danville. **Proceedings...** Danville, 1976. p. 491-500.

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

BROMFIELD, K.R.; MELCHING, J.S. Sources of specific resistance to soybean rust. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, p. 702, 1982. Abstract.

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

BURDON, J.J.; MARSHALL, D.R. Evaluation of Australian native species of *Glycine* for resistance to soybean rust. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 65, p. 44-45, 1981a.

BURDON, J.J.; MARSHALL, D.R. Inter and intra-specific diversity in the disease-response of *Glycine* species to the leaf-rust fungus *Phakopsora pachyrhizi*. **The Journal of Ecology**, Oxford, v. 69, p. 381-390, 1981b.

CALDWELL, P.M.; NUNKUMAR, A.; PRETORIUS, Z.A.; FERNANDES, J.M.C. Development of *Phakopsora pachyrhizi* at different temperatures, relative humidities and leaf wetness duration. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON PLANT DISEASE EPIDEMIOLOGY, 9., 2005, Landerneau. **Abstracts...** Landerneau, 2005. p. C3.

CAMARGO, L.E.A.; BERGAMIN FILHO, A. Controle genético. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3.ed. São Paulo: Ceres, 1995. cap. 37, p.729-760.

CARNEIRO, L.C.; ALVES, S.A.M.; FURTADO, G.Q.; GODOY, C.V.; COSTA, T.N.; AMORIM, L. Avaliação da resistência de genótipos de soja à *Phakopsora pachyrhizi*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. S259, 2006. Resumo.

CARVALHO JÚNIOR, A.A. e FIGUEIREDO, M.B. A verdadeira identidade da ferrugem da soja no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 26, p. 197-200, 2000.

DALLA PRIA M.; CHRISTIANO, R.C.S.; FURTADO, E.L.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Effect of temperature and leaf wetness duration on infection of sweet oranges by Asiatic citrus canker. **Plant Pathology**, Oxford, v. 55, p. 657-663, 2006.

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

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

DUTHIE, J.A. Models of the response of foliar parasites to the combined effects of temperature and duration of wetness. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, p. 1088-1095, 1997.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Sistema de Alerta**. http://www.cnpso.embrapa.br/alerta/mostra_alerta.php?pagina=7. 26 Mar 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. **Faostat Agriculture Data**. <http://faostat.fao.org>. 22 Nov. 2006.

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**, Saint Paul, v. 92, p. 217-227, 2002.

FURTADO, G.Q.; ALVES, S.A.M.; MASSOLA JR., N.S. Sobrevivência no ambiente e reversão de dormência dos urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. S248-249, 2006. Resumo.

FURTADO, G.Q.; ALVES, S.A.M.; CZERMAINSKI, A.B.C.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Preservação dos urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 31, p. 79, 2005. Resumo.

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

GODOY, C.V.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Influência da duração do molhamento foliar e da temperatura no desenvolvimento da ferrugem do milho causada por *Puccinia polysora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 160-165, 1999.

HARTMAN, G.L. Highlights of soybean rust research at the asian vegetable research and development center. In: SOYBEAN RUST WORKSHOP, 1995, Urbana. **Proceedings...** Urbana, 1995. p.19.

HARTMAN, G.L.; WANG, T.C.; SHANMUGASUNDARAM, S. Soybean Rust Research: Progress and Future Prospects. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE. 5., 1997,. Bangkok. **Proceedings...** Bangkok, 1997. p. 180-186.

HARTMAN, G.L.; WANG, T.C.; TSCHANZ, A.T. Soybean rust development and the quantitative relationship between rust severity and soybean yield. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, p. 596-600, 1991.

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

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

HAU, B.; KRANZ, J. Mathematics and statistics for analysis in epidemiology. In: KRANZ, J. (Ed.). **Epidemics of plant diseases**. Mathematical analysis and modeling. Berlin: Springer, 1990. chap. 2, p. 12-52.

KAWUKI, R.S.; TUKAMUHABWA, P.; ADIPALA, E. Soybean rust severity, rate of rust development, and tolerance as influenced by maturity period and season. **Crop Protection**, Guildford, v. 23, p. 447-455, 2004.

KEOGH, R.C.; DEVERALL, B.J.; McLEOD, S. Comparison of histological and physiological responses to *Phakopsora pachyrhizi* in resistant and susceptible soybean. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 74, p. 329-333, 1980.

KITANI, K.; INOUE, Y. Studies on soybean rust and its control measure. Part 1. Studies on the soybean rust. **Bulletin of the Shikoku Agricultural Experiment Station**, Zentsuju-Shi, v. 5, p. 319-342, 1960.

KOCH, E.; HOPPE, H.H. Development of infection structures by direct-penetrating soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) on artificial membranes. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 122, p. 232-244, 1988.

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

KOCHMAN, J.K. The effect of temperature on development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*). **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 30, p. 273-277, 1979.

MARCHETTI, M.A.; UECKER, F.A.; BROMFIELD, K.R. Uredial development of *Phakopsora pachyrhizi* in soybeans. **Phytopathology**, Saint 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**, Saint Paul, v. 66, p. 461-463, 1976.

McLEAN, R.J. Histological studies of resistance to soybean rust, *Phakopsora pachyrhizi* Syd. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 30, p. 77-84, 1979.

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

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

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

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

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

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

PARLEVLIET, J.E. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 17, p. 203-222, 1979.

PIVONIA, S.; YANG, X.B. Relating epidemic progress from a general disease model to seasonal appearance time of rusts in the United States: implications for soybean rust. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, p. 400-407, 2006.

SINCLAIR, J.B.; HARTMAN, G.L. Soybean rust. In: HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B.; RUPE, J.C. (Ed.). **Compendium of soybean diseases**. 4. ed. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society, 1999. p. 25-26.

SINGH, B.B.; THAPLIYAL, P.N. Breeding for resistance to soybean rust in India. In: FORD, R.E.; SINCLAIR, J.B. (Ed.). **Rust of soybean: The problem and research needs**. University of Illinois, Urbana-Champaign: INTSOY Series, 12, 1977. p. 62-65.

STATSOFT INC. **STATISTICA 6.0**. Tulsa, 2001. Disponível em <www.statsoft.com>. 2001.

TSCHANZ, A.T. Soybean rust epidemiology: final report. Asian Vegetable Research and Development Center, Sanhua, Taiwan. 1984.

TSCHANZ, A.T.; WANG, T.C. Soybean rust development and apparent infection rates at five locations in Taiwan. **Protection Ecology**, Amsterdam, v. 2, p. 247-250, 1980.

UTHSCSA. **Image Tool 3.0**. San Antonio. 2002. Disponível em <<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>> 2002.

VALE, F.X.R. **Aspectos epidemiológicos da ferrugem (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) da soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 1985. 102 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1985.

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

YEH, C.C. Physiological races of *Phakopsora pachyrhizi* in Taiwan. **Journal of Agricultural Research of China**, Wufeng, v. 32, p. 69-74, 1983.

YORINORI, J.T. Soja. In: VALE, F.X.R. e ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas**: grandes culturas. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema Gráfica e Editora, 1997. cap. 21, p. 953-1023.

YORINORI, J.T.; PAIVA, W.M.; FREDERICK, R.D.; FERNANDEZ, P.F.T. Ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) no Brasil e no Paraguai, nas safras 2000/01 e 2001/02. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA SOJA, 2., 2002, Foz do Iguaçu. **Resumos...** Foz do Iguaçu, PR., 2002. p. 94.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; CHAVES, G.M. Partial resistance of soybean cultivars to *Phakopsora pachyrhizi*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, p. 117-122, 1983.